

TERÁPIÁS DÖNTÉSEKET BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA NEUROIMMUNOLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN

Dr. Rózsa Csilla

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

**Neurológiai Klinika
Pécsi Tudományegyetem**

Témavezető: Dr. Illés Zsolt

Programvezető: Prof. Dr. Komoly Sámuel

Doktori Iskola programvezető: Prof. Dr. Nagy Judit

Pécs

2008.



RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

KIR	központi idegrendszer
SM	sclerosis multiplex
RR	relapszáló-remittáló
SP	szekunder progresszív
PP	primer progresszív
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EAE	experimentális autoimmun encephalomyelitis
MAG	myelin associated glycoprotein
MG	myasthenia gravis
MC	myastheniás krízis
AchR	acetilkolin-receptor
AchR EA	acetilkolin-receptor ellenes ellenanyag
MusK R	izomspecifikus kináz receptor (Muscle specific Kinase)
MusK EA	MusK receptor ellenes ellenanyag
Anti-Ti EA	titin ellenes ellenanyag
AZA	azathioprin
PR	methylprednizolon v. prednizolon
GA	glatiramer acetát
INFB-1b	béta interferon-1b
INFB-1a	béta interferon-1a
LHON	Leber-féle hereditár optikus neuropathia
Mt-DNS	mitokondriális DNS
CoQ	koenzimQ
NADH	redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
GSH	redukált glutathion
CTLA4	citoxikus T-lymphocyta-asszociált antigen-4
3'UTR	3' untranslated region
ON	optikus neuritis

BEVEZETÉS

A neuroimmunológia tárgykörébe azon központi- és perifériás idegrendszeri kórképek tartoznak, melyek patomechanizmusában az immunológiai mechanizmusok fontos szerepet játszanak. A neuroimmunológiai betegségek jelentős csoportját az autoimmun kórképek alkotják. Ezek felosztása, csoportosítása több szempont szerint történhet - alapul vehetjük a patomechanizmust, oszthatjuk a betegségeket primer, kizárólag az idegrendszert érintő immunológiai betegségekre, ill. szisztémás immunbetegségek idegrendszeri manifesztációjáról beszélhetünk, másrészt az idegrendszeri struktúrák érintettsége szerint léteznek központi idegrendszeri, neuromuscularis junctiót, vagy a perifériás idegrendszert érintő immunmediált betegségek.

Az osztályozás, a kórképek pontos definiálása a terápiás lehetőségek tükrében nyer jelentőséget, hiszen hasonló tünetekkel járó, de különböző patomechanizmusú betegségekből a potenciálisan hatékony terápiák eltérőek lehetnek.

Jelen dolgozat alapját képező vizsgálatainkat három irányba indítottuk el: Már ismert terápiák hatásait, ill. a terápia elhagyásának következményeit elemeztük; a kezelés hatékonyságát potenciálisan befolyásoló háttér-tényezőket, molekuláris markereket vizsgáltunk, ill. a kórképek egyes fontos differenciál-diagnosztikai szempontjait elemeztük.

CÉLKITŰZÉSEK

- 1.** A kombinált immunmoduláló kezelés biztonságosságának, tolerálhatóságának vizsgálata nagyszámú myasthenia gravisban (MG) szenvedő beteg hosszú távú kezelése során, a mellékhatás-spektrum részletes elemzése.
- 2.** Hosszú távú kombinált immunmoduláló kezelés hatásának vizsgálata a myastheniás betegek krízis-rátájának alakulására.
- 3.** Annak vizsgálata, hogy az immunmoduláns (IM) kezelés tartós megszakításának milyen negatív hatásai vannak sclerosis multiplexes betegekben.
- 4.** Családi halmozódású sclerosis multiplex (SM) epidemiológiai vizsgálata hazánkban.
- 5.** SM és Leber-féle hereditér optikus neuropathia (LHON): differenciál-diagnosztikai szempontok elemzése, a két kórkép együttes előfordulásának felmérése és biokémiai eltérések vizsgálata LHON-ban.
- 6.** Molekuláris markerek vizsgálata, azok jelentősége neuroimmunológiai betegségek diagnózisában, differenciál-diagnosztikájában és terápiájában: ellenanyag vizsgálatok myasthenia gravisban, az autoimmunitásban kulcsszerepet játszó gének polimorfizmusának vizsgálata; szövet és DNS bank kialakítása SM-ben és MG-ban szenvedő betegektől.

EREDMÉNYEK

1. KOMBINÁLT IMMUNOSZUPRESSZÍV KEZELÉS HOSSZÚ TÁVÚ MELLÉKHATÁSAINAK VIZSGÁLATA MYASTHENIA GRAVISBAN

Generalizált MG-ban szenvedő 163 beteget követtünk átlagosan három éven keresztül, akik 1996 januárja és 2002 decembere között kombinált azathioprin-methylprednizolon (PRE-AZA) kezelésben részesültek a Jahn Ferenc Dél-pesti Kórházban. A diagnózis felállítása a típusos klinikai tünetek és a pozitív EMG eredmények alapján történt, az anti-AchR ellenanyag (AchR EA) kiegészítő vizsgálatával (a betegek 84,6%-ban szeropozitívak, 15,4%-ban szeronegatívak voltak; MuSK EA vizsgálat akkor még nem történhetett). A kombinált immunmoduláló terápia beállítására magas dózisú kolineszteráz-gátló (pyridostigmin-Mestinon) terápia mellett is kifejezett, életminőséget rontó myastheniás tünetek miatt, vagy myastheniás krízis kapcsán került sor. A betegek klinikai besorolása a Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) Klinikai Klasszifikációja alapján történt. A megfigyelési időszak elteltével a betegeket két csoportra osztottuk: az egyik csoportba kerültek azok, akiknél nem fordult elő mellékhatás a vizsgálat során, a másik csoportba pedig azok, akiknél mellékhatás jelentkezett. A mellékhatásokat tovább bontottuk „AZA mellékhatásokra”, „szteroid mellékhatásokra” és „AZA + szteroid mellékhatásokra”.

A betegek a követés során 3 havonként jelentkeztek klinikai és laboratóriumi kontrollra. A vizitek során a betegek részletes kérdőívet töltöttek ki a potenciális mellékhatásokra vonatkozó kérdésekkel, célzottan rákérdeztünk mindkét gyógyszer ismert mellékhatásaira, ill. arra, hogy észleltek-e valami szokatlan, új jelenséget a kezelés ideje alatt. A laborvizsgálatok mennyiségi és minőségi vérből, májfunkció, vércukor, ionok, karbamid-kreatinin vizsgálatából és rutin vizelet-vizsgálatból álltak. Ezen vizsgálatokat a kezelés kezdetén 2 hetente, majd három hónap elteltével 4 hetente elvégeztettük (lakóhelyhez legközelebb eső laboratóriumban), és elemeztük.

Megbeszélés:

Prospektív, nyílt vizsgálatunkban 163 beteg hosszú távú követésével vizsgáltuk a kombinált AZA+ PRE terápia biztonságosságát, mellékhatás profilját. Összességében magas arányban fordultak elő mellékhatások (61,4%), de ezek döntő többsége szteroid mellékhatás volt, és reverzibilisnek bizonyult a szteroid kezelés leépítése után. A szteroid elhagyása a betegek 76,7%-ánál legegyszerűbben vált 12-18 hónap eltelté után. Izolált AZA mellékhatás 20%-ban fordult elő. Ugyanakkor súlyos, a kezelés felfüggesztését igénylő mellékhatás csak 10 betegnél fordult elő. Elsősorban hematológiai mellékhatást észleltünk, leukopenia, anémia, pancytopenia kialakulását, ill. májfunkció rosszabbodását. A mellékhatások kialakulása nem tűnik dózisfüggőnek, mivel a mellékhatással bíró ill. mellékhatásmentes csoportban nem volt különbség az AZA dózisa között. Fontos kiemelni, hogy a PRE-AZA terápia egyik „rettegett” mellékhatását, a súlyos fertőzések arányát igen alacsonynak találtuk: 1.8% volt. A mellékhatások kialakulásának latenciája is említést érdemel, mivel igen változó volt, de késői mellékhatásként elsősorban hematológiai eltéréseket észleltünk. A malignus tumorok kialakulásának aránya nem volt gyakoribb, mint a várható, életkorhoz társuló gyakoriság. A legérdekesebb megfigyelés az volt, hogy a mellékhatások kialakulásának valószínűsége korrelál a betegség súlyosságával a terápia megkezdésének időpontjában: a mellékhatással bíró betegek MGFA klinikai klasszifikációja szerint szignifikánsan súlyosabb állapotban voltak a kombinált PRE-AZA kezelés beállításakor.

2. A KOMBINÁLT IMMUNOSZUPPRESSZÍV KEZELÉS HATÁSA A MYASTHENIÁS BETEGEK KRÍZIS-RÁTÁJÁNAK ALAKULÁSÁRA

A vizsgálatba 69 beteget választottunk be, akik valamennyien myastheniás krízisen (MC) estek át, és kórházunk Intenzív osztályán (ITO) álltak kezelés alatt 1990-1996, ill. 1997-2004 között. Az első időszakban nem történt rutinszerűen tartós immunoszuppresszív kezelés beállítása, így 27 olyan beteget tudtunk azonosítani, akikről tartós követési adatok (átlagosan 80 hónap) álltak rendelkezésre, és a követési idő során nem kaptak immunoszuppresszív kezelést. Ők képezték a nem-kezelt kontrollcsoportot. 1997-től valamennyi myastheniás krízisen átesett beteget szisztematikusan beállítottunk kombinált PRE-AZA kezelésre, és a betegeket prospektíven követtük. 42 beteget gyűjtöttünk össze, akiket átlagosan 64 hónapig követtünk (legalább 6 hónapig, az ennél rövidebb ideig követett, ill. myastheniás krízis kapcsán elhalálozott betegek nem kerültek be a vizsgálatba).

A két betegcsoport között nem volt szignifikáns különbség az alapvető demográfiai és klinikai jellemzők vonatkozásában. Megvizsgáltuk, hogy a klinikai tünetek és jellemzők a kiindulási krízis időpontjában eltértek-e a kezelt és kezeletlen csoport között, de ebben a vonatkozásban sem találtunk különbséget. Összehasonlítottuk a kombinált PRE-AZA kezelés hatását a MC-ek alakulására. A recidív krízisek előfordulási aránya 59,3% volt a kezeletlen és 19% a kezelt csoportban ($p < 0.001$). Mivel az AZA+PRE kezelés hatásának kialakulása az irodalmi adatok szerint késeleltetett, azt is megvizsgáltuk, hogyan alakultak a krízisek a kezelés beállítása utáni első hat hónapban, ill. az azt követő időszakban max. 126 hónapos követés során. A kezelés beállítását követő 6 hónapon belül nem volt szignifikáns különbség a két csoport krízis-rátájában, tehát a markánsan szignifikáns különbségért a hat hónapon túli krízis-csökkentő hatás volt felelős. A kezelt csoportban sokkal kevesebb volt az ITO felvétel a követési időszakban, mint a kezeletlen csoportban, és ezzel párhuzamosan a lélegeztetési alkalmak száma is szignifikánsan különbözött. Az átlagos, egy krízisre eső ITO tartózkodási idő azonban nem rövidült le a kezelés hatására, nem volt különbség a két betegcsoport között. A plazmaferézisek számában és a pyridostigmin dózisában sem volt különbség a két csoport között. Nem volt érdemi különbség a betegek állapotában a krízis kezdetétől számított egy hónap elteltével.

Megbeszélés:

Eredményeink szerint a kombinált PRE-AZA kezelés 6 hónapon belül még nem védi ki egyértelműen a recidív krízist. Eredményeink azonban egyértelműen bizonyítják, hogy hat hónapon túl a kombinált PRE-AZA kezelés drámai módon csökkenti a recidív krízis esélyét. A krízis kezelésében sincs hatása a kombinált PRE-AZA terápiának, hiszen sem a krízisek időtartamában, sem a plazmaferézisek számában, sem a betegek funkcionális pontértékeiben (egy hónap elteltével) nem találtunk különbséget a kezelt és kezeletlen csoport között.

3. AZ IMMUNMODULÁNS TERÁPIA MEGSZAKÍTÁSÁNAK KÖVETKEZMÉNYEI SCLEROSIS MULTIPLEXBEN

Magyarországon 1999-2001 között finanszírozási okokból sajátos helyzet alakult ki: a korábban GA-tal kezelt betegek (1996. óta) kezelése hirtelen megszakadt, a kezelést csak 2001-ben tudták folytatni. A 16 hónapos kezelés megszakítás ideje alatt a betegek rendszeres neurológiai kontroll alatt álltak, állapotukat prospektíven követtük. A másik betegcsoportot az INFB-1b-vel 1996 óta folyamatosan kezelt betegek alkották.

A multicentrikus vizsgálatban 6 SM központ betegei vettek részt, többek között a Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház betegei is. Valamennyi beteg relapszáló-remittáló kórfarmájú SM-ben szenvedett, a két csoport demográfiai eloszlása homogén volt. A betegek EDSS pontértékkel (0-10 funkcionális skála, mely a mozgáskorlátozottságot jelzi) egybekötött neurológiai vizsgálata háromhavonta, relapszus gyanúja esetén soron kívül történt. A GA-tal kezelt csoportban 1996-1999 között az éves relapszus-ráta a kezelés előtti 2 éves periódushoz viszonyítva szignifikánsan csökkent. A 16 hónapos gyógyszermentes időszak után az éves relapszus-ráta szignifikáns emelkedését észleltük a kezelés alatti periódushoz viszonyítva. Összehasonlítva a GA-tal és az INFB-1b-vel kezelt csoportokat, nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között, sem a kezelést megelőző két év relapszus-rátájában, sem a 3 éves kezelési periódus alatt. Ezzel szemben 1999-2001 között a korábban GA-tal kezelt, majd a kezelést megszakító betegek csoportjában szignifikánsan magasabb volt az éves relapszus-ráta, mint a továbbra is kezelt csoportnak minősülő INFB-1b csoportban. Az EDSS értékekben nem találtunk szignifikáns különbséget a két betegcsoport között.

Megbeszélés:

Vizsgálati eredményeink azt bizonyítják, hogy hasonló átlagos éves relapszus-rátával bíró, éveken keresztül (1996-1999) immunmoduláló kezelésben részesülő betegeknél a kezelés elhagyása után már 16 hónapon belül érzékelhető a negatív irányú változás. A kezelést elhagyó, korábban GA-tal kezelt betegek relapszus-rátája szignifikánsan magasabb lett az adott betegcsoport kezelés alatti saját értékeihez, és az INFB-1b-vel kezelt betegcsoport relapszus-rátájához viszonyítva is.

4. A FAMILIÁRIS SCLEROSIS MULTIPLEX HAZAI EPIDEMIOLÓGIÁJA

A familiáris halmozódású sclerosis multiplex prevalenciája 5-10% között mozog a magas SM rizikójú területeken. Öt SM központ 1500 betege között vizsgáltuk a familiáris esetek előfordulásának gyakoriságát. A diagnózist a McDonald-féle kritériumoknak megfelelően állítottuk fel, voltak közöttük RR, szekunder progresszív (SP) és benignus kórfarmában szenvedő betegek. Tizenöt családban találtunk familiáris előfordulású SM-et, 33 beteggel, közöttük egy monoizigóta ikerpárral. A férfi/nő arány 1:2.75 volt, ami hasonló a magyar SM-es populáció epidemiológiai adataihoz. Az ikrek egyikének súlyos SP SM-e volt 8-as EDSS értékkel, a másik azonban benignus kórfarmában szenved. Egy dizigóta ikerpár édesapja 20 évvel korábban SM-ben halt meg. Egy harmadik családban három generáción keresztül felbukkant a betegség (anya, fia, lányunoka). A többi családban változatos módon fordult elő első fokú rokonok között a betegség.

Megbeszélés:

Betegeink körében (ez a betegszám a magyar SM betegek megközelítően 25%-át reprezentálja) a familiáris esetek előfordulási gyakoriságát 2%-osnak találtuk. A monoizigóta ikerpár markánsan eltérő fenotípusa a környezeti faktorok hatására hívja fel a figyelmet.

5. LEBER-FÉLE HEREDITER OPTIKUS NEUROPATHIA (LHON) ÉS SCLEROSIS MULTIPLEX

5.1. Genetikailag definitív LHON-hoz társuló SM-re utaló neurológiai tünetek vizsgálata

Bilateralis optikus neuropathiában szenvedő 72 betegnél végeztük el a patogén mt-DNS mutációk analízisét. Közülük 12 betegnél igazolódott a LHON-ra jellemző valamelyik mutáció. Ezután a 12 beteg 27 anyai ágú, egészséges családtagját teszteltük, mint az várható volt, valamennyiüknél homoplazmikus mutációt találtunk ugyanarra a mt-DNS mutációra, amit korábban már igazoltunk beteg hozzátartozójuknál. A 39, genetikailag definitív, patogén mutációt hordozó egyénben vizsgáltuk az SM-szerű kórképek előfordulási gyakoriságát. A betegek közül két nőbetegnél a bilaterális optikus lézió mellett multifokális neurológiai tüneteket észleltünk. Egyikük homoplazmikus G11778A mutációt, a másik T14484C mutációt hordozott.

Megbeszélés:

Genetikailag igazolt LHON mutációt hordozó 39 egyént, köztük 12 LHON-ban szenvedő beteget és 27 tünetmentes hozzátartozót vizsgáltunk klinikailag, hogy az egyéb társuló neurológiai tünetek, elsősorban SM-re utaló klinikai tünetek előfordulási gyakoriságát megállapítsuk. Két esetben igazolódott SM-re utaló neurológiai tünetegyüttes. Mindkét esetben a multicentrális neurológiai góctünetek mellett koponya MRI vizsgálat is alátámasztotta a KIR érintettségét.

5.2. LHON biokémiai hátterének vizsgálata

A LHON biokémiai hátterét az ismert mt-DNS mutáció következtében kialakuló, a légzési láncban fontos szerepet játszó I. légzési komplex működészavara képezi. Az I. komplex a mitokondriumok belső membránjában található, az elektron-transzport és az oxidatív foszforiláció lebonyolításában játszik szerepet, a NADH – CoQ elektron transzportot katalizálja. Mivel a LHON-ban ismert három pontmutáció mindegyike az I. komplex alegységeit érinti, feltételezhető, hogy ezen enzim működészavara következtében alakul ki a betegség, bár a folyamat patogenezise nem ismert. Ami biztos, hogy a mt-DNS mutációk LHON-ban a komplex-I katalitikus aktivitásának mintegy 60%-os csökkenését eredményezik a különböző szövetekben. Ennek következtében a mitokondriumok energia termelése részben csökken, a szabadgyök képződés fokozódik, és beindul a lipid peroxidáció. A sejtek rendelkeznek endogén védekezési rendszerrel, melynek segítségével az oxigén-szabadgyököket, vagy az általuk okozott károsodásokat kiküszöbölhetik. A legfontosabb hidrofób gyökbefogó, mely a citoszolban, a mitokondriumban és a nukleuszban található, a redukált glutathion (GSH), ill. hidrofób megfelelője, mely a membránokban található, az α -tokoferol. A GSH és az α -tokoferol is hatékonyan gátolják a lipid peroxidációt, a GSH a szabad-gyök képződés kezdeti szakaszát gátolja, míg az α -tokoferol a láncreakció előrehaladását akadályozza meg. Mindezen elméleti megfontolásokból kiindulva megvizsgáltuk hogy a LHON-ban szenvedő betegeknél, és a mutáció egészséges hordozóinál kimutatható-e a fontosabb antioxidatív rendszerekben eltérés. 9 LHON betegben, 7 egészséges hordozóban és 15 kontrollban meghatároztuk a GSH, α -tokoferol és néhány egyéb antioxidáns koncentrációját. Valamennyi betegben és hordozóban homoplazmikus 11778 pontmutáció igazolódott. Az α -tokoferol:lipid arány a LHON betegekben és a mutáció hordozóiban szignifikánsan kisebb volt ($p < 0.05$) mint a kontroll csoportban.

Megbeszélés:

Az alacsony α -tokoferol plazma-koncentráció nagy valószínűséggel azt jelzi, hogy az érintett szövetek nagyobb mértékben használják fel az antioxidáns hatású

α -tokoferolt. Másrészt az eredmények azt látszanak alátámasztani, hogy az α -tokoferol a primer gyökbefogó molekula, mely az I. légzési komplex deficiencia következtében kialakuló fokozott szabad-gyök eltakarításban szerepet játszik.

6. MOLEKULÁRIS MARKEREK VIZSGÁLATA MYASTHENIA GRAVISBAN ÉS SCLEROSIS MULTIPLEXBEN

6.1. Sclerosis multiplex és myasthenia gravis szövet- és génbank

A PTE Neurológiai Klinika és a Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház Neurológiai Osztályának együttműködésével sclerosis multiplex szövetbankot hoztunk létre, mely a betegek klinikai adatait, genomikus DNS-t és liquormintát tartalmaz. Jelenleg 282 betegről állnak rendelkezésre adatok és minták.

A betegek többségében, 244 betegnél a HLA-DRB1*1501 genotípus meghatározás is megtörtént. Összesen 96 beteg, vagyis a vizsgált magyar SM populáció 40 %-a hordozza a kaukázusi rasszba tartozó SM populáció egyetlen konzisztens fogékonyság allélját.

Ugyancsak megtörtént a myasthenia gravis bank kialakítása: jelenleg 186 betegről rendelkezünk DNS és szérummintával.

6.2. Szerológiai alcsoportok a magyar myasthenia gravis betegpopulációban

Külföldi intézetekkel kollaborációban a myasthenia szövetbankunkat felhasználva megvizsgáltuk az anti-AchR, anti-titin és részben az anti-MuSK ellenanyagok megoszlását 100 myasthenia gravisban szenvedő magyar beteg szérumában.

Megbeszélés, az eredmények összefoglalása:

Acetilcolin-receptor ellen 72 betegnél észleltünk ellenanyagot, vagyis a betegek kb. 72 %-a volt „szeropozitív”. Az izom titin fehérje ellen 16 betegnél tudtunk kimutatni ellenanyagot. Ismert, hogy MuSK ellen csak azokban a betegekben termelődik ellenanyag, akiknél az acetilcolin-receptor ellen nincs antitest („szeronegatív” betegek). Ezért a MuSK ellenanyagot csak 40, AchR EA negatív, ill. ismeretlen antitest státuszú betegnél vizsgáltuk. Végül 29 szeronegatív beteg közül 4 betegnél találtunk ellenanyagot MuSK ellen.

A következő kérdés az volt, hogyan kombinálódnak az ellenanyagok az egyes betegek vérében? Először megvizsgáltuk, hogy az AchR EA pozitív (szeropozitív betegek) betegekben van-e ellenanyag a titin és a MuSK ellen is? Azon betegek szérumában, akiknél az AchR ellen termelődik ellenanyag - és ilyen a betegeink nagy része, 70 %-a - kb. 20 %-ban az izom titin fehérje ellen is kimutatható ellenanyag, a MuSK ellen azonban nem.

Ezt követően megvizsgáltuk azokat a betegeket, akik az AchR ellen antitest nem termelődik („szeronegatív”). A 29 betegből csak egynél találtunk ellenanyagot a titin ellen, viszont négy betegnél jelen volt a MuSK ellenes ellenanyag. Vagyis titin ellenanyag elsősorban azoknál a betegeknél található, akik az acetilcolin-receptor ellen már termelnek ellenanyagot, míg a MuSK ellenanyag azoknál, akik acetilcolin-receptor ellenanyagot nem termelnek.

Megvizsgáltuk, hogy azok a betegek, akik a titin és MuSK fehérje ellen termelnek ellenanyagot, milyen eséllyel rendelkeznek ellenanyaggal az acetilcolin-receptor ellen. Érdekes módon, a titin ellenanyagot termelő 16 betegből 15 rendelkezett acetilcolin-receptor ellenanyaggal, de MuSK ellenanyaggal egy sem. Ugyanakkor a MuSK ellenanyagot termelő 4 beteg egyikében sem lehetett kimutatni más ellenanyagot.

Összefoglalva, a titin ellen termelődő ellenanyagok rendszerint acetilkolin-receptor ellenanyagokkal együtt fordulnak elő; a MuSK ellenanyagok önállóan vannak jelen; az acetilkolin-receptor ellen termelődő ellenanyagok pedig döntően önállóan termelődnek, de a betegek közel egyharmadában titin ellenanyag is kimutatható. Nem fordulnak elő azonban az acetilkolin-receptor ellenanyagok MuSK ellenanyagokkal együtt.

6.3. CTLA4 polimorfizmus vizsgálata német, magyar és lengyel sclerosis multiplex betegek körében

A közös autoimmun gének egyik lehetséges jelöltje a *CTLA4*, mely a T sejt kostimuláció egyik legfontosabb molekuláját (*CTLA-4*) kódolja. A 3'UTR-ban lévő CT60 polimorfizmus több autoimmun betegséggel asszociálódik. Sclerosis multiplex vonatkozásban több kisebb tanulmány ellentétes adatokat közölt. Ezért megvizsgáltuk az esetleges CT60, valamint egy másik CTLA4 polimorfizmus (+49A/G) asszociációját német, lengyel és magyar kollaborációban, nagyszámú betegben és kontrollban. A három populáció nem különbözött egymástól sem genotípus, sem allél frekvenciák vonatkozásában. Az elvégzett meta-analízis nem igazolt asszociációt az SM és a CT60 ill. +49A/G allélek frekvenciája között. A CT60*G/G genotípus az SM betegek körében mindhárom populációban magasabb arányban reprezentálódott, bár nem ért el a statisztikai szignifikanciát

Megbeszélés:

Nem tudunk kimutatni összefüggést az SM szuszceptibilitással, a különböző klinikai kórlefolyási formákkal, betegség progresszióval és betegség kezdettel. A CT60*G/G genotípus kissé magasabb arányban fordult elő mind a három populáció SM betegeiben. A német betegekben a +49A/G*g-CT60*G haplotípus ugyancsak némileg gyakoribb volt, mint az egészséges populációban, ugyanez a különbség azonban nem volt kimutatható a magyar és a lengyel populációban. Egyik különbség sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak, és a polimorfizmus funkcionális következménnyel (sejtfelszíni kostimuláns CTLA-4 és ICOS expresszió) nem jár.

6.4. Az IL-23 receptor (IL23R) gén 3'UTR C2370A allélje és a relapsing-remitting sclerosis multiplex asszociációja

Számos citokin szerepe feltételezhető az autoimmun betegségek kialakulásában. Az utóbbi időszak új felfedezése volt, hogy az IL-23 és IL-17 alapvető szerepet játszik az autoimmun betegségek, többek között az SM kialakulásában. Az IL-23 receptoron ható IL-23 hatására IL-17-et termelő sejteket új, Th17 alcsoportként, és autoimmun T sejként definiálták.

Több *IL23R* polimorfizmust azonosítottak az utóbbi években, melyek gyulladáshoz vezető bélbetegséggel asszociálódtak. Az egyik leggyakoribb asszociáció a 3'UTR C2370A alléllal fordult elő. Ezért megvizsgáltuk ezen SNP asszociációját SM-mel. 223 RR betegről (közülük 45-nél már SP kórlefolyás alakult ki, az RR fázist követően) vettünk vért a vizsgálat céljából a megfelelő beleegyező nyilatkozatok és etikai engedély birtokában. Valamennyi betegnél teljesültek a McDonald kritériumok. A kontroll csoportba 200 egészséges személy tartozott.

Az AA genotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő a 223 SM-es betegnél, mint a 200 egészséges emberben (10.8% ill. 5.5%, $p < 0.05$). Szignifikánsan gyakoribb volt ugyanez a genotípus azokban az esetekben, ahol a liquor vizsgálatával intrathecalis immunválaszt (oligoclonalis gammopathia, OGP) tudunk kimutatni. Regressziós analízissel mind az SM, mind az OGP rizikóját kétszeresnek találtuk AA genotípus esetén. Ha különválasztottuk a HLA-DRB1*1501 pozitív betegeket és összehasonlítottuk a 84 HLA-DRB1*1501 pozitív, ill. 132 negatív beteget az egészségesekkel, nem találtunk ilyen különbséget. Nem volt szignifikáns

különbség akkor sem, ha a nőbetegeket külön analizáltuk, és a szekunder progresszív betegség lefolyással sem találtunk asszociációt.

Megbeszélés:

Az eredmények arra utalnak, hogy a RR SM és az *IL23R* gén C2370A polimorfizmusa között gyenge genetikai asszociáció mutatható ki, az AA homozigóta genotípus kétszeresére növeli az SM és a központi idegrendszeri lokális B-sejtes immunválasz rizikóját. A fogékonyság függetlennek bizonyult a HLA-DR15 konstellációtól. Az egyéb betegségekkel kapcsolatos asszociációt is figyelembe véve az *IL23R* közös autoimmun gén lehet.

6.5. Kóros transzkripció szabályozási hálózat a T-sejtekben sclerosis multiplexben

Egyetű ikrekben az SM konkordanciája 25-30%-ra tehető, míg kétetűjűekben 2-5% körül mozog (45). Ez arra utal, hogy az SM kialakulásáért vélhetően nem egy, hanem több szuszeptibilitás gén felelős. A potenciális szuszeptibilitás gének vizsgálata a genetikai vizsgálatok egyik fontos kutatási iránya sclerosis multiplexben. A többszörös fogékonyság gének szabályozása azonban multiplex jelátvitelt, és transzkripció faktorokat feltételez, melyek gén-hálózatokat alkotnak. A gén-hálózatok komplex vizsgálatán keresztül közelebb juthatunk a szuszeptibilitás gének azonosításához.

A potenciális szuszeptibilitás gének egyik csoportját az immunfunkciókat befolyásoló gének alkotják. Ezért perifériás vérből izolált CD3⁺ T-sejtek gén-expresszióját vizsgáltuk nemzetközi kollaboráció keretében magyar származású monozigóta konkordáns és diszkordáns SM-es ikerpárokban DNS microarray technikával, majd a differenciáltan expresszálódó gének transzkripció hálózati szabályozását elemeztük molekuláris adatbázis alkalmazásával.

A 4 monozigóta ikerpár közül háromnak mindkét tagja beteg volt (konkordáns ikerpár), egy ikerpár egyik tagja beteg, a másik pedig egészséges volt (diszkordáns ikerpár). Valamennyi vizsgált alany 33±5 éves nő volt átlagos 6±5 év betegség időtartammal. RR lefolyású betegségben szenvedtek, kivéve egy klinikailag izolált szindrómás (CIS) beteget; EDSS pontszámuk 1.3±0.8 volt, ami enyhe érintettséget jelent. A vizsgálat első fázisában az izolált T sejtek génexpressziós mintázatát hasonlítottuk össze a négy ikerpár tagjai között, és azonosítottuk az 50-100 differenciáltan expresszálódó gént. Ezt követően összehasonlítottuk e géneket a diszkordáns és konkordáns ikerpárok között, és azt a 34 gént elemeztük tovább, melyek csak a diszkordáns ikerpárban expresszálódott differenciáltan. Vagyis homogén genetikai háttérrel vizsgáltuk a kizárólag SM-re jellemző génexpressziót. A 34 gén közül olyan 20 gént vizsgáltunk a továbbiakban, melyek expressziójában legalább kétszeres különbség volt. Adatbázis alapján a 20 gén segítségével további 43 kapcsolt gént, és molekuláris hálózatokat azonosítottunk 39 csomóponttal. E csomópontok között az 5 legszignifikánsabb eltérés olyan transzkripció faktorokat azonosított, melyek az immun szabályozásban alapvetőek: Ets család, NF-κB, Myc/Mad család, IRF és EF család.

Megbeszélés:

Az adatok a génexpresszió szabályozásának változását jelezhetik sclerosis multiplex betegek T sejtjeiben: olyan kulcsmolekulák differenciált expressziója mutatható ki, melyek számos gén aktiválódását vagy gátlását szabályozzák. Az ETS család a proliferáció, differenciálódás és apoptózis kontrolljában játszik szerepet. Az NF-κB az ősi és adaptív immunválasz egyik központi szabályozó molekulája, mely a sejtszétválásban, és a sejthalálban is alapvető, közel 150 célgéneken hat; az SM plakkok makrofágjaiban és oligodendrocytáiban túlexpressziója mutatható ki. Az IRF (*interferon regulatory factors*) az NF-κB-vel együtt az *IFN-B* gén *enhance* része, az immunválasz, sejtnövekedés, apoptózis fontos reguláló faktora.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA (TÉZISEK)

1. Generalizált, MGFA Klinikai Klasszifikáció szerint III-IV-V csoportba tartozó, azaz középsúlyos és súlyos myastheniában szenvedő betegeknek a kombinált prednisolon-azathioprin (PRE-AZA) immunmoduláló kezelés hosszú távú alkalmazása jól tolerálható, biztonságos és jelentős klinikai javulást eredményez. Nagy beteganyagban igazoltuk a hosszútávú PRE-AZA kezelés biztonságosságát és hatékonyságát. Az AZA tartós adása lehetővé teszi a szteroid adagjának csökkentését, az esetek túlnyomó részében annak elhagyását, ami igen fontos, mivel a kezelés mellékhatásainak túlnyomó többsége a szteroid kezelés következtében alakul ki.
2. Elsőként vizsgáltuk és igazoltuk nagy beteganyagban, hosszú távú követés során, hogy a PRE-AZA kezelés hatékonyan csökkenti az ismételt krízisek kialakulásának gyakoriságát. Ez a megfigyelés azt támasztja alá, hogy myastheniás krízis után indokolt a hosszú távú immunosuppresszív kezelés (PRE-AZA kombináció) beállítása, mivel ez a kezelés alkalmas a krízisek ismétlődésének kivédésére.
3. A LHON differenciál-diagnosztikai jelentőséggel bír SM-ben, ugyanakkor LHON és SM, ill. SM-szerű tünetek együttesen is előfordulhatnak. A LHON biokémiai hátterének vizsgálata további adatokat szolgáltat a genetikai hátterű kórkép patogenezisének tisztázásához. Elsőként vizsgáltuk a magyar LHON betegek körében az egyéb neurológiai, SM-szerű tünetek előfordulását.
4. Sclerosis multiplexben az immunmoduláló kezelés tartós, folyamatos alkalmazásával érhető csak el a betegség aktivitásának és progressziójának mérséklése. Kimutattuk, hogy a kezelés elhagyását követően a betegek relapszus rátája visszatér a kiindulási szintre.
5. Elsőként végeztünk epidemiológiai vizsgálatot a magyarországi familiáris SM előfordulásának feltérképezésére. A familiáris SM előfordulási gyakorisága eddigi vizsgálataink alapján 2% körül mozog. A familiáris esetek felkutatása lehetőséget ad további genetikai vizsgálatokra.
6. Az autoimmun neuroimmunológiai kórképek szerteágazó genetikai vizsgálataiban az iker-vizsgálatok és a potenciális szuszceptibilitás gének vizsgálata kiemelkedő jelentőségű. Utóbbiak fontos csoportját alkotják az immunfunkciókat befolyásoló gének, melyek SNP-i asszociálódhatnak SM-mel és myasthenia gravis-szal, és szerepet játszhatnak a kórképek kialakulásában. Ennek komplex vizsgálatára SM és MG szövet- és génbankot alakítottunk ki.
7. A magyar SM populációban elsőként vizsgáltuk a HLA-DRB1*1501 genotípus gyakoriságát. Kimutattuk, hogy a *CTLA4* CT60 SNP nem asszociálódik SM-mel, az IL-23 receptor gén 3'UTR C2370A alléje viszont kb. kétszeres kockázatot mutat RR-SM, és kb 2,5-szeres kockázatot intrathecalis immunválasz kialakulására. SM ikerpárok vizsgálatával kóros transzkripció szabályozási körök, molekuláris hálózatok meglétét igazoltuk CD3⁺ T sejtekben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Rendhagyó módon mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani **Édesapámnak**, mert az ő biztatása, bizakodása és a neki tett ígéretem nélkül soha nem vágtam volna bele a jelen dolgozathoz vezető hosszú munkába. **Illés Zsolt** docens témavezetőm hatékony segítsége, szerteágazó és mindenre kiterjedő tudása, alaposága nélkül nem valósulhatott volna meg ez a munka. **Komoly Sámuel professzor úrtól** tanultam szinte mindent, amit a gyógyításról, neurológiáról, klinikai kutatásról tudok, az ő emberi, szakmai hozzáállása egész pályámat meghatározta. Hálás köszönettel tartozom neki ezért! Sokan mások is **hozzájárultak munkájukkal** a dolgozat alapját képező tudományos kutatásokhoz. Köszönet illeti: Péterfalvi Ágneszt, Szereday Lászlót, Pál Józsefet, Melegh Bélát (PTE), Rajczy Katalint (Budapest), Bernhard Grevet, Arthur Melms (Tübingen), Angela Vincentet (Oxford), Takashi Yamamuát (Tokyo), Tordai Attilát (Budapest), Karcagi Veronikát, Horváth Ritát (Budapest), Bencsik Krisztinát, Fricska-Nagy Zsanettet és Klivényi Pétert (SZOTE). Férjem, **Pánczél Gyula** nem csak biztatásával és támogatásával, hanem effektív segítségével, szakmai és számítástechnikai közreműködésével is hozzájárult a dolgozat megszületéséhez, hálás köszönetem illeti őt ezért. **Gyermekeimtől** ezúton szeretnék bocsánatot kérni az időért, amit a munkára, nem pedig rájuk fordítottam, ugyanakkor köszönöm a megható biztatást, amit tőlük kaptam. **Édesanyám** „háttér” segítsége, az otthoni terhek megosztása ugyancsak hozzájárult a munka elkészüléséhez. Köszönöm **dr. Gerő Gábor** főigazgató úr támogató hozzáállását, a tudományos tevékenységhez biztosított időt, mellyel lehetővé tette számomra, hogy a közkórházi munkával járó, megterhelő napi rutin mellett, ill. annak ellenére elkészüljön ez a dolgozat. Köszönöm **valamennyi kollegámnak**, elsősorban Kása Krisztiánnak, Lovas Gábornak, Matolcsi Juditnak, Jakabné Margónak, Fornádi Lászlónak és Szabó Györgyinek, hogy segítették munkámat, ill. dolgoztak helyettem is, amikor a dolgozattal kapcsolatos munka miatt távol voltam, és tolerálták tudományos tevékenységemet. Köszönöm Bérczy Ildikónak a dolgozat nyelvi lektorálását. Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom **betegeimnek**, hisz róluk szól, és értük történt ez a munka, így nélkülük nem valósulhatott volna meg.

MAKING THERAPEUTIC DECISIONS IN NEUROIMMUNOLOGY – ISSUES TO BE CONSIDERED

PhD Thesis

Csilla Rózsa MD

Leader of the project: Associate Prof. Zsolt Illés MD, PhD

Leader of program: Prof. Sámuel Komoly MD, DSc

Leader of Doctoral School: Prof. Judit Nagy MD, DSc

University of Pécs, Faculty of Medicine

Department of Neurology

Pécs

2008



LIST OF ABBREVIATIONS

CNS	central nervous system
MS	multiple sclerosis
RR	relapsing-remitting
SP	secondary progressive
PP	primary progressive
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
MAG	myelin associated glycoprotein
MG	myasthenia gravis
MC	myasthenic crisis
AchR	acetylcholine-receptor
AchR Abs	acetylcholine receptor antibodies
MusK R	Muscle specific Kinase Receptor
MusK Abs	MusK Receptor antibodies
Anti-Ti Abs	titin antibodies
AZA	azathioprin
PR	methylprednisolone or prednisolone
GA	glatiramer acetate
INFB-1b	interferone beta 1-b
INFB-1a	interferone beta 1-a
LHON	Leber's hereditary optic neuropathy
Mt-DNS	mitochondrial DNA
CoQ	coenzyme Q
NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
GSH	reduced glutathione
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
3'UTR	3' untranslated region
ON	optic neuritis

INTRODUCTION

Neuroimmunology covers diseases of central and peripheral nervous system with immunological involvement. Most of the neuroimmunological diseases are of autoimmune origin. Such diseases can be classified according to their pathogenesis, they can be primary diseases of the nervous system or systemic diseases with nervous system involvement. On the other hand, immune-mediated processes can affect different neurological structures: the central nervous system, the peripheral nerves or the neuromuscular junction.

The exact definition of the syndromes plays an important role in the selection of the exact therapy: since diseases with similar symptoms can be of different pathophysiological origin therefore the potentially effective treatments can be distinct.

The studies that underlie these theses were conducted in three directions: we observed and analysed the effects of well known therapies and the effects of cessation of some therapies; we studied the background factors and molecular markers which have a potential effect on the efficacy of these therapies; and we also analysed important differential diagnostic aspects.

AIMS

1. To analyze the safety and tolerability profile of the combined immunosuppressive treatment in myasthenia gravis (MG) by long-term observation of a great number of patients and with detailed evaluation of adverse events.
2. To evaluate the effect of the combined immunosuppressive treatment on the recurrence of myasthenic crisis.
3. To analyze the negative impacts of the cessation of immunomodulatory treatment on multiple sclerosis.
4. To study the epidemiology of familial MS in Hungary.
5. To examine differential diagnostic issues in MS and Leber's hereditary optic neuropathy (LHON); analysis of the coexistence of the two diseases and investigation of biochemical processes in LHON.
6. Analysis of molecular markers, their importance in diagnosis, differential diagnosis and therapy of neuroimmunological diseases: antibody spectrum in myasthenia gravis, genetic associations of autoimmune diseases; establishment of DNA- and tissue bank from Hungarian patients with MS and MG.

RESULTS

1. SAFETY OF LONG-TERM COMBINED IMMUNOSUPPRESSIVE TREATMENT IN MYASTHENIA GRAVIS.

163 patients with generalised myasthenia gravis were followed for three years in average, who were treated with combined azathioprine-methylprednisolone (PRE-AZA) medication in the Jahn Ferenc Hospital between 1996-2002. The diagnosis of MG was based on typical clinical symptoms, associated with positive EMG and with or without seropositivity of antibodies to acetylcholine receptors (AChR). 84,6% of our patients were seropositive, 15,4% were seronegative (MuSK antibodies were not examined). Immunosuppressive treatment was introduced only to patients with generalized MG, who were poor responders to the high dose cholinesterase inhibitor monotherapy or suffered previous myasthenic crisis. The patients were classified according to the Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) Classification. After the observation period, we divided the patients in two groups: patients in the first group didn't experience adverse effects (AEs) in contrast to patients with AEs in the other group. The second group was further divided to "AZA AEs", "steroid AEs" and "AZA+ steroid AEs".

The patients visited our out-patient department every 3 months for clinical and laboratory assessment. They filled a detailed questionnaire regarding the potential AEs of the treatment. We asked specifically for the usual AEs of both drugs and inquired the patients if they had experienced any new signs or symptoms during the treatment course. Laboratory tests (complete blood count and differential, platelet count, liver enzymes, urinalysis, serum glucose, ionogram, urea and creatin) were carried out every 2 weeks for the first 3 months of the treatment, every 4 weeks for the first year of treatment, and every second month afterwards.

Discussion:

In our prospective, open, observational long-term study of 163 patients the AE profile and safety of the combined AZA+ PRE therapy was analysed. The overall proportion of AEs in our study was high (61.4%), however most of the AEs could be attributed to steroids and were reversible following the discontinuation of the steroid treatment, which was possible in 76.7% of the patients after 12-18 months. The overall proportion of AEs due to AZA treatment was 20%. Serious AEs resulting in treatment discontinuation were observed in only 10 patients. Hematological alterations were the most frequently observed AEs of the AZAA treatment: leukopenia, anemia, pancytopenia as well as hepatotoxicity were observed. AZA AEs were not dose-dependent, there was no significant difference in the dose of AZA between the group of patients with and without AEs. We emphasize that in contrast to previous reports, we found a substantially lower proportion of severe infections (1.8%). The latency of the AZA-related AE development was variable, but tended to be longer in patients with hematologic AEs. The frequency of malignant tumors was not higher than expected in an age-matched population. Probability of developing AEs correlated with the severity of MG at the beginning of the treatment. The proportion of patients, who began the treatment immediately after a myasthenic crisis or who were in a severe class IV, had significantly higher risk of developing AEs.

2. LONG-TERM EFFECTS OF COMBINED IMMUNOSUPPRESSIVE TREATMENT ON MYASTHENIC CRISIS

Sixty-nine patients with consecutive episodes of MC between 1990-1996 and 1997-2004 were treated and followed prospectively in our study. In the first period, between 1990-1996, patients were not regularly treated with immunosuppressants on long term in Hungary. We could identify 27 patients without immunosuppressive treatment with long-term observational data (in average 80 months) during this period. They comprise the untreated (non-IM) historical control group. From 1997 all patients, who suffered a MC were uniformly treated on long-term with PR-AZA and were prospectively followed. We had 42 such patients: they were followed for 64 months (at least 6 months) in average. Patients with shorter follow-up or patients who died during the MC were not eligible for the study.

There were no significant differences between the study groups regarding the basic demographic and clinical data. The clinical symptoms and characteristics of the baseline crisis were also similar in the two groups. Next, we analysed the effect of combined PR-AZA treatment on the recurrence of MCs. Recurrent crisis occurred in 59.3% in the non-treated and 19% in the treated group ($p < 0.001$). Since a delayed effect of PR-AZA has been suggested, we also examined the number of crisis throughout the first 6 months and beyond, up to a maximum of 126 months. Indeed, a reduced frequency of recidive crises beyond half a year ($p < 0.001$) explained the observed statistical difference, as the number of repeated crises within 6 months after the baseline crisis did not differ between the two groups. There were significantly fewer admissions to the ICU in the treated group during the follow-up period, compared to the untreated group, and the number of occasions of mechanical ventilation was also lower. However, we did not find any significant difference in the length of mean ICU stay and duration of mechanical ventilation per crisis between the two groups. The number of plasma exchanges during the crisis and the dose of pyridostigmine were also similar in the two groups. There was no difference in the functional outcome one month after the onset of baseline MC, either.

Discussion:

Our results suggest that combined PR-AZA treatment does not prevent the recidive crises before 6 months after the first crisis. In contrast, our data indicate a highly significant decrease in the frequency of recidive MCs beyond 6 months: the risk of a recidive crisis was much lower in the treated group. This treatment has no effect on the MC itself as it did not influence the duration of the crisis, nor the functional outcome after one month.

3. EFFECTS OF INTERRUPTED IMMUNOMODULANT THERAPY ON THE NEUROLOGICAL STATE OF MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

Between 1999 and 2001, there was a special situation in Hungary. The patients who had received GA therapy from 1996, were forced to stop treatment in 1999 and were able to resume it only from 2001. During this 16-month period these patients were regularly examined and prospectively followed. In contrast, patients on INFB-1b could continue treatment without cessation. Due to this special situation we were able to analyze the effect of halting treatment on the course of the disease.

Six MS centres in Hungary including the Jahn Ferenc Hospital MS centre participated in this multicentric study. All patients had relapsing-remitting MS and the demographic data of the two study groups were homogenous. The EDSS score, which indicates the grade of disability (scores 1-10), was obtained during a

neurological examination every three months, or more often if the symptoms suggested exacerbation. In consequence of the continuous GA therapy from 1996 to 1999, the annual relapse rate decreased significantly as compared with the 2-year period prior to the immunomodulatory treatment. The annual exacerbation rates in the 2-year period prior to the beginning of the study did not differ between the patient groups treated with GA and INFB-1b. However, we found a significant increase in the annual exacerbation rate relative to the treatment period after the 16-month therapy-free period. In addition, the annual relapse rate was significantly higher in patients, who were forced to stop GA compared to patients treated continuously with INFB-1b. EDSS scores were not different.

Discussion:

Due to the interrupted therapy, negative trends in the disease course could be already seen after 16 months. The annual relapse-rate increased significantly compared to the course while on treatment and also to the continuously treated INFB-1b treated group.

4. EPIDEMIOLOGY OF FAMILIAL MULTIPLE SCLEROSIS IN HUNGARY

The prevalence of familial MS is between 5-10% in high-risk areas. By analyzing data of 1500 patients in five MS centres, familial aggregation of MS in Hungary was examined. The patients were diagnosed according to the McDonald's criteria and had relapsing-remitting (RR), secondary progressive (SP) or benign MS. We found aggregation of MS in 15 families involving 33 patients, including a monozygotic twin pair. The male/female ratio was 1:2.75 similar to sporadic MS in Hungary. One patient of the concordant monozygotic twin pair suffered of SPMS (EDSS score of 8), while the other had a benign form of the disease. We also found a dizygotic twin pair, whose father had died of MS 20 years previously. In another family, three generations were affected (mother, son and granddaughter).

Discussion:

In our cohort representing 25% of all MS patients in Hungary, we found a 2% familial rate. The significant difference in the phenotype of the monozygotic twin pair underlines the importance of environmental factors.

5. LEBER'S HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY (LHON) AND MULTIPLE SCLEROSIS

5.1. LHON presenting as multiple sclerosis-like disease of the CNS

DNA were isolated from 72 patients with bilateral optic neuropathy and tested for the three pathogenic mtDNA LHON point mutations. Pathogenic LHON mutations were found in 12 patients. In addition, 27 maternal relatives were examined. As expected, all maternal relatives were homoplasmic for the LHON mutation found in the related patients. All 39 genetically defined carriers were examined neurologically to determine the frequency of MS-like diseases. Two LHON patients (women) presented multifocal neurological symptoms. One was homoplasmic for the G11778A and the other for the T14484C mutation.

Discussion:

We examined 39 patients with genetically defined LHON mutations, 12 patients with LHON and 27 symptom free carriers, to determine the frequency of multicentral neurologic manifestations, especially MS like symptoms. We found two

patients with MS-like diseases. In both cases, the CNS involvement was also indicated by brain MRI.

5.2. Investigation of the biochemical background of LHON

The primary aetiological event in LHON is a mutation in the mtDNA affecting in most cases mtDNA-encoded subunits of the respiratory chain. Complex I is embedded in the mitochondrial inner membrane mediating electron transport and oxidative phosphorylation. It catalyzes electron transport from NADH to coenzyme Q. All three pathogenic LHON mutations involve complex I subunits, therefore it is assumed that they affect some functional properties of this enzyme complex. However, the relation between complex I dysfunction and disease pathogenesis is unclear. The various mtDNA mutants are associated with up to 60% reductions in the catalytic activity of complex I in different tissues in patients with LHON. The impaired complex I activity leads to a decline in mitochondrial energy production, enhances the generation of free radicals and initiates lipid peroxidation. The cells have their endogenous defence systems to neutralise reactive oxygen species or the damage elicited by these toxic species. The main hydrophilic scavenger found in cytosolic, mitochondrial, and nuclear compartments is reduced glutathione (GSH), whereas its hydrophobic equivalent localised in membranes is α -tocopherol. Both GSH and α -tocopherol are potent inhibitors of lipid peroxidation; GSH prevents the initiation of radical formation, α -tocopherol inhibits the propagation of the chain reaction. Due to these theoretical considerations, we wanted to determine whether patients with LHON, and carriers, display any alterations in these main antioxidant systems pointing to enhanced free radical reactions. The concentration of GSH, α -tocopherol, and some other antioxidants were determined in the blood samples from nine patients, seven carrier maternal relatives and 15 control subjects. All of the patients with LHON and the carriers had the homoplasmic 11778 point mutation in the mtDNA. The α -tocopherol/lipid ratio was significantly reduced ($p < 0.05$) in patients with LHON and carriers compared with control subjects.

Discussion:

The marked reduction in the plasma α -tocopherol/lipid ratio most probably reflects the high consumption of the scavenger molecule by affected tissues. Our data suggest that the primary antioxidant against free radicals elicited by complex I impairment is α -tocopherol.

6. MOLECULAR MARKERS IN MYASTHENIA GRAVIS AND MULTIPLE SCLEROSIS

6.1. Multiple sclerosis and myasthenia gravis tissue- and gene bank

With collaboration of Department of Neurology of University of Pécs and Department of Neurology of the Jahn Ferenc Hospital we established a multiple sclerosis tissue bank. This bank includes clinical data, genomic DNA and CSF samples. Data and samples from 282 patients have been collected so far.

The HLA-DRB1*1501 genotype was examined altogether in 244 patients. Forty percentage (96 patients) of the Hungarian MS population carries this single consistent susceptibility allele of the Caucasian MS.

The myasthenia gravis databank comprises clinical data, DNA and serum samples of 186 myasthenic patients.

6.2. Serological subgroups in the Hungarian myasthenia gravis patient population

In collaboration with foreign institutes we examined the distribution of anti-AchR-, anti-Titin- and anti-MuSK antibodies in 100 patients with myasthenia gravis.

Summary of results and Discussion:

We detected AchR Abs in 72 patients i.e. 72% of our patients were “seropositive”. Sixteen patients had Abs against the muscle Titin protein. It is established that MuSK Abs are present only in seronegative myasthenic patients. Therefore we tested the MuSK Abs only in AchR Ab negative and in patients with unknown AchR Ab status. We had 40 such patients. Twenty-nine of them turned out to be AchR Ab negative, and 4 of them were anti-MuSK positive.

We examined the combination of various antibodies. We checked whether the AchR Ab positive patients have Abs against Titin and MuSK. In 20%, of patients with AchR Abs in the sera, Abs against the muscle Titin protein were also present but anti-MuSK Abs were not found. When analysing the AchR Ab negative patients, only one out of the 29 anti-Titin Ab-positive belonged to this group, but 4 of them were anti-MuSK positive. We concluded that Titin Abs are present mostly in patients who are AchR Ab positive while MuSK Abs are present exclusively in AchR Ab negative patients. We also examined the frequency of AchR Abs in anti-Titin positive and anti-MuSK positive patients. Sera of 15 out of the 16 anti-Titin positive patients also contained anti-AchR Abs, but none of them had MuSK Abs. MuSK Abs were not associated with other antibodies.

In summary, the anti-Titin Abs are usually present together with anti-AchR antibodies while anti-MuSK Abs are present alone. Anti-AchR Abs are associated with anti-Titin Abs in one third of the patients. AchR Abs and MuSK Abs do not appear together.

6.3. Multiple sclerosis and the *CTLA4* autoimmunity polymorphism CT60 in German, Hungarian, and Polish patients

One possible candidate for shared autoimmunity genes is the *CTLA4* gene, the gene of one of the most important T-cell costimulatory factor, the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4). The CT60 polymorphism in the 3'UTR region is associated with several autoimmune diseases. Data about association with MS are conflicting. Therefore, we decided to examine the potential association of CT60 and one other *CTLA4* polymorphism (+49A/G) in a great number of German, Polish and Hungarian MS patients. The three populations were of similar genotypes and allele frequencies. The meta-analysis showed no association of MS with CT60 or +49A/G allele frequencies. The CT60*G/G genotype was overrepresented among MS patients in all three populations, however this finding did not reach statistical significance.

Discussion:

We could not demonstrate association with MS susceptibility, with age of onset, progression and disease course in these patients. The CT60*G/G genotype was slightly overrepresented in all three populations. The frequency of +49A/G-g-CT60*G haplotype was also slightly higher in German, but not Hungarian or Polish MS patients. No difference reached statistical significance, and these polymorphism does not cause functional changes in CTLA-4 and ICOS expression. In summary, it was not possible to demonstrate an association of this common autoimmune polymorphism with multiple sclerosis in these large cohort of MS.

6.4. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis

Cytokines play an important role in the development of autoimmune diseases. IL-23 and IL-17 have recently been suggested to play an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases such as MS. One of the Th17 differentiation pathways is IL-23-dependent and IL-23 is necessary for the survival and expansion of IL-17 producing autoimmune Th17 cells.

Several polymorphisms recently identified in the *IL23R* gene are associated with inflammatory bowel disease (IBD). The C2370A allele in the 3'UTR showed one of the most significant associations with IBD. Here, we examined the association of this SNP with MS. Patients with RRMS (n=223) were involved in the study, 45 patients have progressed into a secondary progressive phase following a relapsing-remitting course. The control population consisted of 200 clinically healthy subjects.

The AA genotype was significantly over-represented in the 223 MS patients compared to 200 healthy controls (10.8% vs 5.5%, $p < 0.05$). The AA genotype was also significantly over-represented among patients exhibiting OCB in the CSF. Multiple regression analysis revealed that presence of the AA genotype provides a two-fold risk for the development of MS and for the presence of oligoclonal bands in the CSF. No such differences were observed when HLA-DR15-positive (n=84) or negative (n=132) subgroups were separated and compared to healthy subjects. Nor did we find any significant differences when female patients were separately analyzed, and no association was found with secondary progressive disease course.

Discussion:

Our data indicate that a genetic association exists between relapsing-remitting MS and the C2370A polymorphism of the *IL23R* gene. The AA genotype provides a two-fold risk for developing MS and oligoclonal bands in the CSF. The susceptibility was independent from HLA-DR15 status. Since association of the A2370A genotype with other autoimmune diseases was also described, our data also suggest that the *IL23R* may represent a novel common autoimmunity gene.

6.5 Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis

Concordance rate in MS for monozygotic (MZ) twins is 25-30%, while it is 2-5% for dizygotic (DZ) twins suggesting the possible involvement of not a single but multiple susceptibility genes in development of MS. Regulation of multiple susceptibility genes is controlled through the combinatorial action of multiple signalling and multiple transcription factors that form molecular network of genes. We performed microarray analysis of peripheral blood T cells isolated from the genetically homogeneous population of Hungarian monozygotic concordant and discordant MS twins. Molecular network of the differentially expressed genes was than analyzed by a comprehensive information platform.

In 3 of the 4 monozygotic twin-pairs both siblings were ill (concordant twins), in one case we had discordant twins with one MS patient and one healthy subject. All subjects were females, 33 ± 5 years old and the mean disease duration of 6 ± 5 years. All patients exhibited a typical RR disease course, except for one patient who had CIS. The patients showed a relatively mild EDSS score of 1.3 ± 0.8 . By microarray analysis, we identified 50-100 differentially expressed genes (DEG) in T cells between each MS twin pair. Then, we compared the genes of the discordant and concordant twins, and selected a panel of 34 genes that were listed in 50 differentially expressed genes of the discordant twin (MR/healthy subject) but were not included in 100 DEG of the concordant (MS/MS) twin pairs. In that way we

investigated in the genetically homogeneous population the gene expression typical for MS. We further extracted a set of 20 DEG by a cut-off point greater or equal to two-fold difference between the discordant pair. Further 43 genes were identified, that are directly linked to 20 DEG, with the computer-analysis. The search of 43 genes illustrated a complex molecular network composed of 39 nodes. By statistical analysis, the generated network showed the most significant relationship with gene regulation by the Ets transcription factor family, the gene regulation by the nuclear factor NF- κ B, the Myc/Mad family, the IFN-regulatory factor (IRF), and the estrogen receptor (ER) family.

Discussion:

Our data propose the logical hypothesis that aberrant regulation of the complex transcriptional regulatory network might contribute to development of pathogenic T cells in MS. The Ets family transcription factor controls the expression of a wide range of target genes essential for cell proliferation, differentiation, transformation, and apoptosis. The NF- κ B family acts as a central regulator of innate and adaptive immune responses, cell proliferation and apoptosis. It has more than 150 target genes, and is overexpressed in macrophages and oligodendrocytes of MS plaques. The IRF (interferone regulatory factors) together with NF- κ B is part of the IFN- β gene enhancome, an important regulatory factor of the immune response, cell growth and apoptosis.

CONCLUSIONS

1. The long-term combined (PRE-AZA) therapy in moderately severe and severe generalized myasthenia gravis (MGFA Class III-V) is well tolerated, safe and effective treatment. The long-term treatment with AZA has a steroid sparing effect: steroid treatment could be discontinued in the majority of our cases. The adverse effects were due to steroid treatment in most of the patients.
2. We examined and proved for the first time that the number of recidive crises decreases in patients treated with PRE-AZA on long-term. This observation supports the necessity of long-term immunosuppressive treatment (PRE-AZA) after a myasthenic crisis.
3. LHON can be differential-diagnostic issue in MS, and can occur with MS or MS-like syndromes.
4. The decrease in disease activity and halt of progression in MS can be achieved only with long-term, continuous disease modifying treatment. We proved that after the discontinuation of treatment results in an increase of relapses.
5. Our study is the first epidemiological study of Hungarian familial MS cases. According to our data the prevalence of familial MS is about 2%.
6. The twin and association studies are of great importance in the genetic research of autoimmune neuroimmunological diseases. To address this issue we established DNA and tissue banks in MS and MG.
7. We studied for first time the frequency of the HLA-DRB1*1501 genotype in the Hungarian MS population.
8. We showed that the *CTLA4* CT60 SNP is not associated with MS, while the 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene doubles the risk of RRMS and of OGP in the CSF.
9. We identified aberrant transcriptional regulatory networks in CD3+ T cells of MS twins.

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I have to thank my father because I would never start this long work without his love, support, confidence and the promise I have made to him. I express my special thanks to my supervisor, Associate Professor Zsolt Illés for the efficient support and comprehensive knowledge. His thoroughness was of an indispensable help in completing this work. Almost everything I know about curing, neurology, and clinical studies I have learned from Professor Sámuel Komoly. His humanity and professional attitude was decisive in my professional life. I cordially thank him for everything. I wish to express my thanks everybody who has contributed to the studies: Ágnes Péterfalvi, László Szereday, József Pál, Béla Meleg (PTE), Katalin Rajczy (Budapest), Bernhard Greve, Arthur Melms (Tübingen), Angela Vincent (Oxford), Takashi Yamamura (Tokyo), Attila Tordai (Budapest), Veronika Karcagi, Rita Horváth (Budapest), Krisztina Bencsik, Zsanett Friczka-Nagy, Péter Klivényi (SZOTE). My husband, Gyula Pánczél has been giving me not only the necessary support, but has helped efficiently to cope with both the professional and computer issues. My children missed me often because of the extra work, I want to apologise now, and I wish to thank them for the touching encouragement. Without the help of my mother in the background I would never manage to finish my work. I wish to express my gratitude to the director of our hospital, Gábor Gerő, who has given me the opportunity and time for the scientific work. I want to thank all my medical colleagues who took their part in this work by their help and by replacing me when I was absent due to science. Special thanks to Krisztián Kása, Gábor Lovas, Judit Matolcsi, Margó Jakab, László Fornádi, and Györgyi Szabó. I thank Ildikó Bérczy for proof-reading the thesis. Finally, I thank my patients, as this work couldn't be established without them.

PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

Full length articles

Impact factor of publications related to the Thesis: 19.664

1. Horváth R, Abicht A, Shoubridge EA, Karcagi V, **Rozsa C**, Komoly S, Lochmüller H. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) presenting as demyelinating disease of the CNS. **J Neurol**, 2000, 247:65-67
IF 2,061
2. P. Klivenyi, E Karg, **Cs Rozsa**, R Horvath S Komoly, I Nemet, S Turi, L Vecsei. α -Tocopherol/lipid ratio in blood is decreased in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and asymptomatic carriers of the 11778 mtDNA mutation. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 2001, 70:359-362
IF 3,024
3. **C. Rozsa**, Lovas G, Fornadi L, Szabo G, Komoly S. Safety of long-term combined immunosuppressive treatment in myasthenia gravis – analysis of adverse effects of 163 patients. **Eur J Neurol**, 2006, 9:947-952
IF 2,437
4. Fricska-Nagy Z, Bencsik K, Rajda C, Füvesi J, Honti V, Csépany T, Dobos E, MátyásK, **Rózsa C**, Komoly S, Vécsei L. Epidemiology of familial multiple sclerosis in Hungary. **Mult Scler**, 2007, 13:260-261
IF 2,773
5. Bencsik K, Fricska-Nagy Z, Csépany T, Mátyás K, Dobos E, **Rózsa C**, Semjén J, Rajda C, Füvesi J, Török M, Vécsei L. Effects of interrupted immunomodulant therapy on the neurological state of multiple sclerosis patients. **J Neurol Sci**, 2007, 260: 296-297
IF 2,412
6. Greve B, Simonenko R, Illes Z, Peterfalvi A, Mycko MP, **Rozsa C**, Selmaj KW, Bauer P, Berger K, Weissert R.. Multiple sclerosis and the putative autoimmunity SNP CT60: no association in patients from Germany, Hungary and Poland. **Mult Scler**, 2008, 14: 153-158
IF 2,773
7. Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A, Magyar L, Farago B, Pozsonyi E, **Rozsa C**, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Neurosci Lett**, 2008, 431:36-38
IF 2,092
8. Satoh J, Illes Z, Peterfalvi A, Tabunoki H, **Rozsa C**, Yamamura T. Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis. **Neurosci Lett**, 2007, 422:30-33
IF 2,092

9. **Rózsa C**, Mikor A, Kasa K, Illes Z, Komoly S. Long-term effects of combined immunosuppressive treatment on myasthenic crisis. **Submitted**.

Citable abstracts and posters presented at international and Hungarian conferences

1. **Rózsa C**, Fornadi L, Szabo G, Komoly S. Side effects of long-term immunosuppressive treatment in myasthenia gravis – follow-up of 163 patients. J Neurol, 2003, 250;Suppl.2
2. **Rózsa C**, Fornádi L, Szabó G, S. Komoly S. Evidence of safety of combined immunosuppressive treatment of myasthenia gravis in a large patient population. Eur J Neurol 2006, 10 (S1):120
3. **Rózsa C**, Panczel G, Krupai F, Kaposzta Z, Komoly S. Combined immunosuppressive treatment after myasthenic crisis – effects on the long-term outcome. J Neurol, 2006, 253(Suppl 2): II/107
4. Illes Z, Faragó B, Péterfalvi Á, Magyar L, Pozsonyi É, **Rózsa C**, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19. Magy Immunol/Hun Immunol, 2007, 6:21
5. Illes Z, Greve B, Simonenko R, Péterfalvi Á, Hamdi N, Mycko MP, Selmaj KW, **Rózsa C**, Rajczy K, Bauer P, Berger K, Weissert R. Multiple sclerosis and the CTLA4 autoimmunity polymorphism CT60 in patients from Germany, Hungary and Poland. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19. Magy Immunol/Hun Immunol, 2007, 6:22
6. Satoh J, Péterfalvi Á, Tabunoki H, **Rózsa C**, Yamamura T, Illés Z. T cell gene expression profiling of monozygotic twins suggests a role of aberrant transcriptional regulatory network in the pathogenesis of multiple sclerosis. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19. Magy Immunol/Hun Immunol, 2007, 6:39
7. **Rózsa C**, Vincent A, Lang B, Arányi Z, Kovács GG, Komoly S, Illés Z. Paraneoplastic chronic demyelinating neuropathy and Lambert-Eaton myasthenic syndrome associated with multiple anti-neural antibodies and small-cell lung cancer. A Magyar Immunológiai Társaság XXXVI. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2007. Október 17-19. Magy Immunol/Hun Immunol, 2007, 6:38
8. Illes Z, Farago B, Peterfalvi A, Magyar L, Pozsonyi E, **Rózsa C**, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. ECTRIMS, Prague, 2007.október 11-14. Mult Scler, 13(Suppl 2):S202

9. Satoh J-I, Péterfalvi Á, Tabunoki H, **Rózsa C**, Yamamura T, Illés Z. Monozygota ikerpárok T sejtjeinek gén expressziós vizsgálata a sclerosis multiplex patogenezisében aberráns jelátviteli hálózatra utal. Neurogenetika a klinikai gyakorlatban. A Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság konferenciája. Velence, 2007. szeptember 7-8.
10. Illés Z, Greve B, Simonenko R, Péterfalvi Á, Hamdi N, Mycko MP, Selmaj KW, **Rózsa C**, Rajczy K, Bauer P, Berger K, Weissert R. Sclerosis multiplex és a CTLA4 CT60 polimorfizmusa német, magyar és lengyel betegekben. Neurogenetika a klinikai gyakorlatban. A Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság konferenciája. Velence, 2007. szeptember 7-8.
11. Illés Z, Faragó B, Péterfalvi Á, Magyar L, Pozsonyi É, **Rózsa C**, Komoly S, Meleg B. Az IL-23 receptor gén 3'UTR C2370A alléja relapszó-remittáló sclerosis multiplex-szel asszociált. Neurogenetika a klinikai gyakorlatban. A Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság konferenciája. Velence, 2007. szeptember 7-8.
12. **Rózsa C** and Illés Z. Paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome and CIDP associated with multiple antineural antibodies and small-cell lung cancer. Pécs-Tübingen Neuroimmunology Days 2007, Pécs, 2007. április 13-14.
13. **Rózsa C**, Vincent A, Arányi Z, Kovacs GG, Komoly S, Illés Z. Paraneoplastic chronic demyelinating neuropathy and Lambert-Eaton myasthenic syndrome associated with multiple anti-neural antibodies and small-cell lung cancer; 18th Meeting of the European Neurological Society Nice, 7 - 11 June 2008

PUBLICATIONS UNRELATED TO THE THESIS

Articles

1. **Rózsa C**, Kis G, Komoly S, and the Hungarian Myasthenia Thymoma Research Group. Myasthenia in a patient with sarcoidosis and schizophrenia. **Clin Neurosci/Idegy Szle**, 2004, 57(7-8):242-244
2. **Rózsa C**, Aranyi Z, Vincent A, Kovacs GG, Komoly S, Illes Z. Paraneoplastic CIDP and LEMS associated with multiple antineural antibodies and small-cell lung cancer. **Clin Neurosci/Idegy Szle**, 2008, 61:325-328
3. **Rózsa C**, Asbót R, Barsi P, Blaskó G, Komoly S. Medialis thalamus lágyulás, pitvari septum aneurysma és thrombocyta-hyperaggregabilitás együttes előfordulása – esetismertetés. **Clin Neurosci/Idegy Szle**, 1994, 47:9-10

4. Folyovich A, **Rózsa C**, Horváth G, Kenéz J. Tranziens ischaemiás attack tüneteivel kezdődő intracerebralis cavernoma esete. **Lege Artis Medicinae**, 1992, 2:1144-1149
5. **Rózsa C**. Myasthenia gravis. **Focus Medicinae**, 2003, 5:11-14
6. Komoly S, **Rózsa C**. Myasthenia gravis etiológia és epidemiológia, diagnózis és terápia. **Medical Digest**, 2004, 1:2-4
7. Csaplár M, Juhász M, Múzes Gy, Jakab C, Arányi Z, **Rózsa C**., Molnár B, Komoly S, Pápay J, Zágoni T, Herszényi L, Tulassay Z. Coeliakia és myasthenia gravis együttes előfordulása. **Orv Hetil**, 2006, 147:841-844
8. **Rózsa C**. A neuromuscularis transzmisszió zavarai. **Orvosképzés** 2006, 5:350-352
9. **Rózsa C**. Myasthenia gravis. **Háziorvos Továbbképző Szemle** 2007, 4:269-275

Chapters

1. **Rózsa C**. Myasthenia gravis. Vitalitás Betegségenciklopédia, Neurológia (Szerk.: Komoly S) Springer, 2002, 775-778
2. **Rózsa C**. Lambert-Eaton myasthenia szindróma. Vitalitás Betegségenciklopédia, Neurológia (Szerk.: Komoly S), Springer, 2002, 761
3. **Rózsa C**. Autoimmun neuromyotonia. Vitalitás Betegségenciklopédia, Neurológia. (Szerk.: Komoly S), Springer, 2002, 716
4. **Rózsa C**. Depresszió, fatigue és fájdalom sclerosis multiplexben. Vécsei-Komoly (szerk), Sclerosis multiplex. Therapia Kiadó Budapest, 2003