

**PHD ÉRTEKEZÉS
TÉZISEK**

**TRIGLICERID SZINTET BEFOLYÁSOLÓ POLIMORFIZMUSOK
SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA ISCHEMIÁS STROKE
KIALAKULÁSÁBAN**

Járomi Luca

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai Intézet**

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

**Pécs
2010**

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2. BEVEZETÉS	5
2.1. A stroke	5
2.2. Rizikófaktorok.....	8
2.2.1 Hagyományos kockázati tényezők	8
2.2.2 Genetikai tényezők szerepe	12
3. CÉLKITŰZÉSEK	23
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	24
4.1. Vizsgált betegpopuláció	24
4.2. Alkalmazott molekuláris biológiai eljárások.....	26
4.2.1. PCR reakció.....	26
4.2.2. RFLP módszer.....	28
4.2.3. Direkt szekvenálás.....	28
4.3. Statisztikai analízis.....	28
5. EREDMÉNYEK	29
5.1. A GCKR és az APOA5 gének vizsgálata.....	29
5.2 A GALNT2 és MLXIPL génlókuszok vizsgálata	36
5.3. Az ANGPTL3, CILP2 és a TRIB1 génlókuszok vizsgálata	41
6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	45
6.1. Az APOA5 és GCKR gének egyedi és együttes szerepe	45
6.2. A GALNT2 és az MLXIPL génlókuszok szerepe	48
6.3. Az ANGPTL3, CILP2 és a TRIB1 génlókuszok szerepe	50
7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	51
8. PUBLIKÁCIÓS LISTA	52
8.1 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	52
8.2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	53
8.3. IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK.....	55
9. IRODALOMJEGYZÉK	58
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AHA	American Heart Association
ANGPTL3	angiopoietin-like 3
AP	activator protein
APOA5	apolipoprotein A5
BASIC	Brain Attack Surveillance in Corpus Christi project
bHLH	basic helix-loop-helix
bHLH-ZIP	basic helix-loop-helix leucine-zipper
BMI	body mass index – testtömeg index
bp	bázispár
CAD	coronary artery disease
cAMP	ciklikus adenozin monofoszfát
ChoRE	carbohydrate response element - szénhidrát-reszponzibilis elem
ChREBP	carbohydrate response element-binding protein - szénhidrát-reszponzibilis- elem-kötő-fehérje
CI	confidence interval – konfidencia intervallum
CILP2	cartilage intermediate-layer protein 2
CRP	C-reaktív protein
CT	computer tomography – komputer tomográfia
CVD	cardiovascular disease
DGI	Diabetes Genetics Initiative
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotidtrifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetra-acetát
EUSI	European Stroke Initiative
GALNT2	N-acetylgalactosaminyltransferase 2
GCKR	glükokináz-regulátor
GCK	glükokináz enzim
GLUT2	glükóz transzporter
G6PC2	glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein 2
GWAS	genome-wide association study – teljes genom asszociációs tanulmány

HDL	high density lipoprotein
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
LDL	low density lipoprotein
LPL	lipoprotein lipáz enzim
MAP-kináz	mitogen-activated protein kinase – mitogén-aktivált fehérje kináz
MLXIPL	MAX-like-interacting-protein-like
MODY	maturity-onset diabetes of the young
MRI	magnetic resonance imaging – mágneses rezonanciás képalkotó eljárás
MTNR1B	melatonin receptor type 1B
OR	odds ratio – esélyhányados
PCR	polymerase chain reaction – polimeráz láncreakció
PP2A	foszfoprotein-foszfataz 2A
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SEM	standard error of mean
SIS	sugar isomerase – cukor izomeráz enzim
SNP	single nucleotide polymorphism
TIA	transient ischemic attack
TOAST	Trial of Org 10172 of Stroke Treatment
TRIB1	Tribbles 1 gén
UTR	untranslated region – nem transzlálódó régió
VLDL	very low density lipoprotein
WBS	Williams-Beuren Syndrome
WBSR14	Williams-Beuren Syndrome Chromosome Region 14
WHO	World Health Organization - Egészségügyi Világszervezet
YAC	Yeast Artificial Chromosome

2. BEVEZETÉS

A fejlődő országokban a cardiovasculáris és cerebrovasculáris megbetegedések, köztük a stroke kialakulásának gyakorisága rendkívül magas, a mortalitás valamint a morbiditás vezető okai között szerepelnek¹. Az Amerikai Egyesült Államokban a szívbetegségek és a rák után a halálozás harmadik leggyakoribb oka a stroke². A felmérések szerint az USA-ban a cardiovasculáris megbetegedések a népesség 36.3%-át, a coronaria betegségek 15.6%-át, míg a stroke 2.9%-át érintik². Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) jelentése szerint világszerte évente 3.8 millió férfi és 3.4 millió nő veszíti életét coronaria betegségekben, stroke következtében pedig összesen 5.5 millió fő, ebből 1.4 millió ember Európában (WHO 2009). Az előrejelzések alapján 2020-ra az első helyet a szívbetegségek és a stroke foglalja majd el mind a rokkantság, mind a halálozás terén (WHO 2009). Magyarországon évente 18000 ember hal meg stroke-ban (Központi Statisztikai Hivatal, World Health Organization). Mivel a kelet- és közép-európai országokban gyakoribb az agyér-katasztrófák előfordulása, mint a nyugatiakban³, ezért 2004-ben a Mannheim deklaráció keretében hívták fel a figyelmet a stroke megelőzésének fontosságára, a betegség gyógyítására⁴.

2.1. A stroke

A stroke egy multifaktoriális betegség, melynek kialakulásában szerepet játszik számos környezeti és genetikai tényező^{1,5-37}. Napjainkig több tanulmány foglalkozott a lipidanyagcserének a stroke manifesztációjára gyakorolt hatásaival, a triglicerid-szint változásának valamint a lehetséges genetikai faktorok kapcsolatának szerepével, mely meglehetősen forrongó terület^{10,11,15-18,23-25,27-32,34,36}. Kutatásaim során a magyar populációban fellelhető génpolimorfizmusokat és a keringő triglicerid-szint közti összefüggéseket vizsgáltam, valamint ezek esetleges hatásait az ischémias stroke kialakulásában. A European Stroke Initiative (EUSI), valamint az American Heart Association (AHA) stroke-megelőzésre és az akut stroke ellátására vonatkozó irányelveinek megfelelően Magyarországon is számos intézkedés lépett életbe, mely felhívja a lakosság és az egészségügyi ellátórendszerben dolgozók figyelmét az egyes rizikófaktorok és a stroke kapcsolatának jelentőségére; valamint azok korai felismerésére³⁸.

Így próbál hozzájárulni a betegség sikeres kezeléséhez, illetve a primer (kockázati tényezők megelőzése, szűrése, kezelése) és szekunder (az újabb stroke kialakulásának megelőzése, a betegségre hajlamos egyének szűrése, felvilágosítása, kezelése) prevencióhoz (WHO, KSH)³⁸. Ezzel párhuzamosan a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvosi Karának Orvosi Genetikai Intézetében is elindultak erre irányuló kutatások, melynek szerves részébe én is bekapcsolódtam, dolgozatom tárgyát is ez képezi.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) definíciója alapján az agyi érkatasztrófa - stroke - az agyműködés globális vagy fokális zavarával jellemezhető, gyorsan kialakuló klinikai tünetegyüttes, amely 24 órát meghaladóan áll fenn, vagy a beteg halálához vezet és amelynek bizonyíthatóan nincs más oka, mint az agyi érrendszerben, annak vérkeringésében kialakult kóros elváltozások³⁹. A betegség mindkét nemet érinti, 45-85 éves kor között gyakoribb a férfiakban mint a nőkben^{10,20,22}. Azonban a 45 évesnél fiatalabb és 85 évesnél idősebb korosztályban nem találtak jelentős eltérést a stroke tekintetében^{10,20,22,40-44}.

Pathologiai szempontból két csoportot lehet elkülöníteni a stroke típusát illetően: thrombotikus vagy másnéven emboliás eredetű infarctust, valamint a haemorrhagiás stroke-ot^{9,45-48}. Az összes stroke esemény 83%-a ischémias eredetű: atherothrombosis 36%; embolia 24%; lacunaris infarctus 23%; 10%-a intracerebralis haemorrhagia (agyvérzés) és mindössze 7%-a subarachnoidalis haemorrhagia (1. táblázat)^{2,9}.

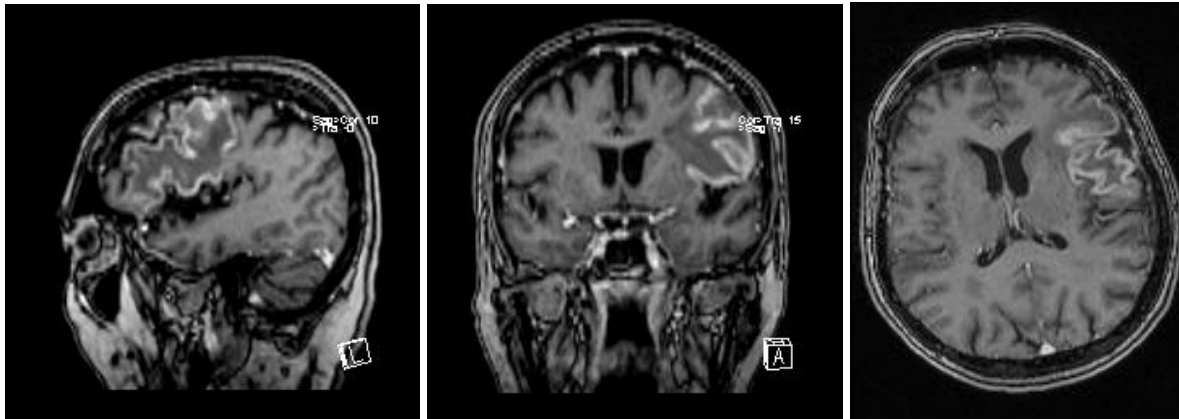
1. Táblázat: A stroke csoportosítása és az egyes típusok megoszlása.

A stroke egyes típusainak előfordulási gyakorisága	
Ischémias eredet	83%
atherothrombosis	36%
embolia	24%
lacunaris infarctus	23%
Intracerebralis haemorrhagia	10%
Subarachnoidalis haemorrhagia	7%

Forrás: GCNKSS, NINDS; USA, 2009 Heart & Stroke Statistical Update.

Valamely főér thromboticus vagy emboliás elzáródása cerebralis infarctust eredményez⁴⁵⁻⁴⁸. Ennek okai lehetnek a transiens ischémias attack - hajlamosító betegségek, valamint a cerebralis artériák atherosclerosis^{1,5,15,23,49,50}.

Az agyi terület kiesése az érintett ér betegségétől, valamint a collaterális keringés mértékétől függ⁴⁵⁻⁴⁸. A neurológiai károsodást fokozza az agyi ischemia excitatoros és egyéb neuropeptideket felszabadító tevékenysége, mely során a neuronokba kalcium áramlik ezáltal előidézve a sejthalált⁵¹⁻⁵³.



1. Ábra: Az ischemiás stroke megjelenése MRI felvételeken. A képeken subacut stádiumú infarctus látható, a széli régiókban a kontrasztanyag halmozódása figyelhető meg.

A lacunaris infarctusok kisméretűek, általában a rövid, penetráló artériák ellátási területén keletkeznek, az alábbi struktúrákat érintve: basalis ganglionok, pons, cerebellum, capsula interna elülső nyúlványa, ritkán a mély cerebralis fehérállomány⁴⁵⁻⁴⁸. Kialakulásának okai lehetnek a nem megfelelően kezelt hypertonia, vagy diabeteses megbetegedés is kiválthatja^{45,46,48}. A lacunaris infarctus következtében kiesett agyi területek gyógyulása gyors, rendszerint 4-6 héten belül a tünetek részben vagy teljes egészében megszűnnek^{45,46,48,51-53}.

Az intracerebralis haemorrhagia leggyakoribb oka a hypertensio, azonban bizonyos esetekben semmiféle specifikus ok nem állapítható meg⁵¹⁻⁵³. A vérzés pathologiai alapját a microaneurysmák alkotják, melyek a 100-300 μm átmérőjű perforáló ereken alakulnak ki^{52,53}. A hypertensiv eredetű intracerebralis haemorrhagia előfordulását tekintve leggyakrabban a basalis ganglionokban, ritkábban a ponsban, a thalamusban, a kisagyban és az agyi fehérállományban figyelhető meg^{45,46,48,49,51-53}.

A subarachnoidealis vérzés a stroke-ok megközelítőleg 7%-át teszi ki⁵². Általában aneurysma vagy arteriovenosus malformatio rupturájából ered, azonban az esetek mintegy 20%-ában nem fedezhető fel a közvetlen ok^{52,53}. A legtöbb aneurysma a circulus arteriosus Willisii elülső részén található meg, többnyire az arteria cerebri media bifurcatióján, valamint

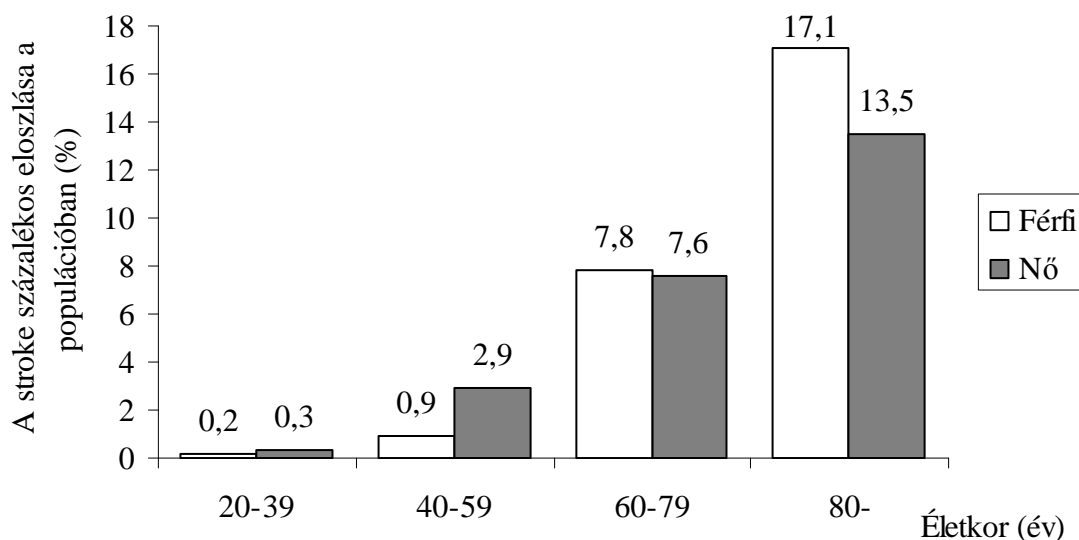
az arteria carotis interna oszlásánál⁵¹⁻⁵³. Az aneurysma ruptuálása hozza létre a subarachnoidealis vérzést. Idegrendszeri tünetek a haematoma következtében alakulhatnak ki, vagy az adott ér ischemiája miatt, ahol az aneurysma rupturált^{45,46,48,51-53}.

2.2. Rizikófaktorok

2.2.1 Hagyományos kockázati tényezők

Az akut ischemiás stroke multifaktoriális eredetű betegség, melynek kialakulásában egyaránt szerepet játszanak nem befolyásolható, valamint befolyásolható kockázati tényezők⁷. A nem befolyásolható rizikófaktorok közé sorolandó a nem, a populációs eredet, az életkor, az örökletes tényezők, valamint a korábbi cerebrovasculáris megbetegedés^{2,7}.

Fiatal korban a férfiak gyakrabban betegszenek meg stroke-ban, mint a nők, viszont ez az arány megfordul az évek előrehaladtával, így a betegség előfordulási gyakorisága a következő férfi/nő: 1.25, 55-64 éves kor között; 1.50, 65-74 éves korban; 1.07, 75-84 éves kor között, majd ez az arány lecsökken 0.76-ra 85 éves kor felett⁵⁴⁻⁶⁰. A nem-kor eloszlást és a betegség kialakulásának valószínűségét a 2. ábra szemlélteti^{33,54-60}.



2. Ábra: A stroke előfordulási gyakorisága az életkor függvényében a két nemben.

Forrás: NCHS, NHLBI. <http://www.nhlbi.nih.gov/>, Heart Disease and Stroke Statistics, 2009 Update, American Heart Association.

Bizonyos etnikai és szocioökonómiai csoportok esetében is magasabb a stroke-ra való hajlam². A színesbőrűek kétszer gyakrabban szenvednek stroke-os megbetegedésben, mint a fehérek. A 45-84 éves korúak között a színesbőrű férfiak megbetegedési aránya 1000 főből 6.6, a színesbőrű nőké 4.9; míg ugyanez az arány a fehér férfiaknál és nőknél alacsonyabb: 3.6 és 2.3².

A BASIC (Brain Attack Surveillance in Corpus Christi project) megfigyelései szerint a mexikói-amerikai népességben magasabb a stroke megbetegedések száma, mint a nem-spanyol populációban². A mexikói-amerikaiak hajlamosabbak az intracerebrális és subarachnoidális haemorrhagiákra valamint az ischémias stroke és TIA (Transient Ischemic Attack) kialakulására, mint a nem-spanyol ajkú fehérek². A 2. táblázat a 100000 főre eső stroke esetek megoszlását mutatja a különböző etnikai csoportok között.

2. Táblázat: Stroke prevalencia és mortalitási ráta 2007. A 2007-es év 100000 főre eső stroke mortalitási rátája és a stroke prevalenciája a különböző etnikai csoportokban.

	Fehér		Színesbőrű		Spanyol/ latin		Ázsiai/ csendes- óceáni szigeteki		Amerikai- indián/ alaszakai származású	
	Férfi	Nő	Férfi	Nő	Férfi	Nő	Férfi	Nő	Férfi	Nő
Stroke mortalitás 2007	44.7	44.0	70.5	60.7	38.0	33.5	41.5	36.3	31.3	37.1
Stroke prevalenciája	2.3%	3.2%	3.9%	4.1%	2.5%	2.2%	NA	NA	NA	NA

Forrás: NCHS, CDC. *Compressed Mortality File: Underlying Cause of Death*; <http://wonder.cdc.gov/mortSQL.html>, NCHS. *Health, United States, 2007*.

További kockázati tényezőnek tekinthető a korábban bekövetkezett cerebrovasculáris vagy cardiovascularis esemény, amely számottevően megnöveli az újabb stroke kialakulásának esélyeit^{7,14,20,30,33}.

A befolyásolható rizikófaktorok közé tartozik a hipertonia, a dohányzás, a túlzott alkoholfogyasztás, a drogfogyasztás, a diabetes mellitus, egyes cardiovascularis betegségek, az obesitas, kedvezőtlen lipid profil, magas koleszterin- és triglicerid-szintek^{8,16,17,21,22,32,33,61}.

A hipertonia a stroke független kockázati tényezője minden korcsoportban^{7,20,32,62-64}, a vérnyomás értékének emelkedésével egyenes arányban nő a stroke-ra való hajlam^{8,16,21,22,32}. Egyes tanulmányok szerint az asszociáció erősebb a systoles vérnyomás és a stroke kialakulása között, vagyis, ha a diastoles érték normális, a systoles érték viszont emelkedik, erősebb asszociáció mutatkozik stroke-kal, mint a diastoles érték emelkedése során^{21,32}. Más vizsgálatok viszont a diastoles érték emelkedésének tulajdonítanak nagyobb jelentőséget a stroke kialakulásában^{16,21,22,32}. A diastoles vérnyomás vizsgálata során kiderült, hogy a stroke kockázata duplázódik, ha 7,5 Hgmm-rel emelkedik a diastoles érték, tekintet nélkül a nemre, azonban az idős korosztályban alacsony vérnyomás mellett is nagy a betegség rizikója⁶⁵⁻⁶⁷.

A dohányzás 2-6-szorosára emelheti a stroke kialakulásának valószínűségét^{7,8,12,16,17,22,32,37}. Az alkoholfogyasztás akár preventív jellegű is lehet a betegségre nézve⁷, viszont túlzott mértékben - ahogy a drogfogyasztás is - növeli a betegség kockázatát^{1,43,68-71}. Szintén a stroke manifesztációját idézi elő független rizikófaktoroként a diabetes mellitus megléte: a kockázat annál nagyobb, minél régebb óta áll fenn a cukorbetegség^{1,6,22,35}.

Az obesitas önállóan vagy esetleg más kockázati tényezők együttes hatásaként növelheti a stroke kialakulásának esélyét^{1,7,13,16,20-22,32,65,68,72,73}. Az ischemiás stroke manifesztációjában egyéb rizikófaktorok is részt vehetnek, így a depresszió, a migrén, a nők esetében a terhesség és a postmenopausalis időszak, a testmozgás hiánya, a plazma fibrinogen-szint, az alvási apnoe, a pitvarfibrillatio, valamint egyre jelentősebb szerepet tulajdonítanak a különböző genetikai faktorok hatásainak is^{11,16,22,24,25,27,29,31,33,34,36,74-88}.

A szérumlipidek szerepe a stroke kialakulásában máig kutatott kérdés^{1,10,15-18,22-25,27,28,32,34,36,61,88}. A stroke és plazma triglicerid-szint kapcsolatának kutatása közben több ellentmondásos tanulmány született^{10,15,18,23-25,27,28,61}. Egy összefoglaló tanulmány számos olyan vizsgálatot is említ, melyek nem találtak összefüggést a triglicerid-szint emelkedés és a stroke manifesztációja között, azonban több olyan eredményt is közöl, melyben pozitív asszociációra derült fény²³.

A trigliceridek és a high-density-lipoprotein koleszterinek (HDL) szerepét még nem vizsgálták olyan teljesszerűen a stroke kialakulásában, mint a low-density lipoprotein koleszterinek, valamint az összkoleszterinek funkcióját²³.

Habár köztudott, hogy az összkoleszterin a cardiovascularis megbetegedések egyik rizikófaktora⁸⁹, a stroke esetében betöltött szerepe még vitatott^{90,91}. Amíg az emelkedett LDL-szint hajlamosít a non- haemorrhagiás stroke kialakulására¹⁵, mások ennek ellenkezőjét, negatív korrelációt figyeltek meg a HDL-koleszterin és a stroke kifejlődése kapcsán^{92,93}. Számos előretékintő tanulmány hangsúlyozza a pozitív asszociációt az emelkedett plazma triglicerid koncentráció és az ischemiás stroke között^{94,95}, míg más tanulmányok nem találtak konzisztens összefüggést a fentiekben^{33,96}.

Az utóbbi időszak teljes genom asszociációs tanulmányaiban a triglicerid-szintek változásait kapcsolatba hozták egyes génekkel, valamint megkezdték a cerebrovasculáris – így a stroke – megbetegedések genetikai hátterének triglicerid-szint változásokon keresztül történő kutatását is^{18,23-25,27,31}. Vizsgálataink során a különböző gének kapcsolatát elemeztük a lehetséges triglicerid-szint változásokkal, valamint tanulmányoztuk az esetleges összefüggéseket az ischemiás stroke kialakulásával.

2.2.2 Genetikai tényezők szerepe

Az elmúlt évek során megemelkedett a cardio- és cerebrovasculáris betegségek epidemiológiai jelentősége, ezért a hagyományos rizikófaktorok mellett – mint a kor, a nem, a hipertonia, a diabetes mellitus, a dohányzás, az elhízás - megkezdtek az örökletes tényezők vizsgálatát is^{11,18,24,25,27,29,34,88,97-114}. A legújabb kutatások felvetették egyes gének szerepét a betegségek kialakulásában^{11,18,22,24,25,27,29,31,34,36,97-106,108-117}. Számos tanulmányban az emelkedett triglicerid-szint hajlamosító tényezőnek bizonyult mind a cardio-, mind a cerebrovasculáris megbetegedések manifesztációjában^{75,98}, ezért a vizsgálatok kiterjedtek a gének által kifejtett közvetett hatásokra, így a triglicerid-szint változásokra is^{10,18,23-25,27,31,32,74,75,97,98,100,103,105,106,108,111,112,115,118,119}. Bár jelentős számú vizsgálat az emelkedett triglicerid-szintet független rizikófaktorként igazolta a stroke pathogenezisében, a trigliceridek szerepe a betegség kialakulásában továbbra is vitatott²³.

Az APOA5 gén

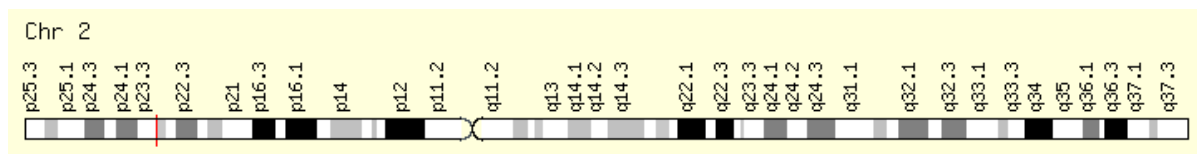
Az apolipoprotein A5 fehérjét 2001-ben azonosították: a gén identifikálásához összehasonlító genomiai analízist alkalmaztak az egér és humán DNS-ben¹²⁰. Az *APOA5* gén a 11q23 kromoszómán helyezkedik el az apolipoprotein család tagjaként, az *APOAI-APOCIII-APOAIV* génklaszter mellett^{18,101,108,115}. A gén négy exont tartalmaz és egy 366 aminosavból álló fehérjét kódol, mely 71%-os homológiát mutat az egér *Apoa5* fehérjéjével, valamint 27%-ban egyezik az emberi *APOA4* gén szekvenciájával^{115,120}. Két transzkriptum jön létre alternatív poliadenilációval, melyek 1.3 és 1.9 kb hosszúságúak¹¹⁵. A 39kDa molekulásúlyú APOA5 protein a májban expresszálódik, ezt követően a VLDL és HDL alkotórészeként a plazmába szekretálódik, ahol központi szabályozó szerepet játszik a triglicerid metabolizmusban^{115,116}.

Az *APOA5* gén polimorf természetének köszönhetően az eddigi kutatásokban megközelítőleg 40 génvariánst azonosítottak, azonban ezek közül a leggyakoribb triglicerid-szint emelő hatású, természetes polimorfizmusok a következők: a T-1131C (rs662799), T1259C (rs2266788), C56G (rs3135506) és az IVS3+G476A (rs2072560). A T-1131C az *APOA5* gén promóter régiójában; a T1259C a 3' nem transzlálódó régiójában; az IVS3+G476A a 3. intronban; míg a C56G a 3. exonban található^{115,120}. A C56G funkcionális következménye a 19-es pozícióban történő szerin-triptofán aminosavcsere, melynek során egy az oldalláncon pozitív töltést hordozó aminosav épül be. Ez a változás befolyásolja az APOA5 fehérje export folyamatát, csökken a protein koncentrációja a plazmában, ezáltal emelkedik a plazma triglicerid-szintje^{111,121}.

Az elmúlt évek kutatásai során bebizonyosodott, hogy a T-1131C, valamint az IVS3+G476A variánsok független rizikófaktorai a metabolikus szindrómának, valamint a hypertrigliceridemiának, továbbá számos cardio- és cerebrovasculáris megbetegedésnek, míg a C56G és T1259C polimorfizmusok a cardio- és cerebrovasculáris betegségcsoportokban bizonyultak kockázati tényezőnek^{24,25,112,120,122-126}.

A GCKR gén

A glükokináz-regulátor gén (*GCKR*) humán cDNS-ét 1995-ben izolálták a humán *GCKR* gént tartalmazó YAC klónokból, valamint határozták meg a gén teljes szekvenciáját; és fluoreszcens *in-situ* hibridizáció segítségével lokalizálták a 2p23.3-p23.2 kromoszómán (3. ábra)¹²⁷.



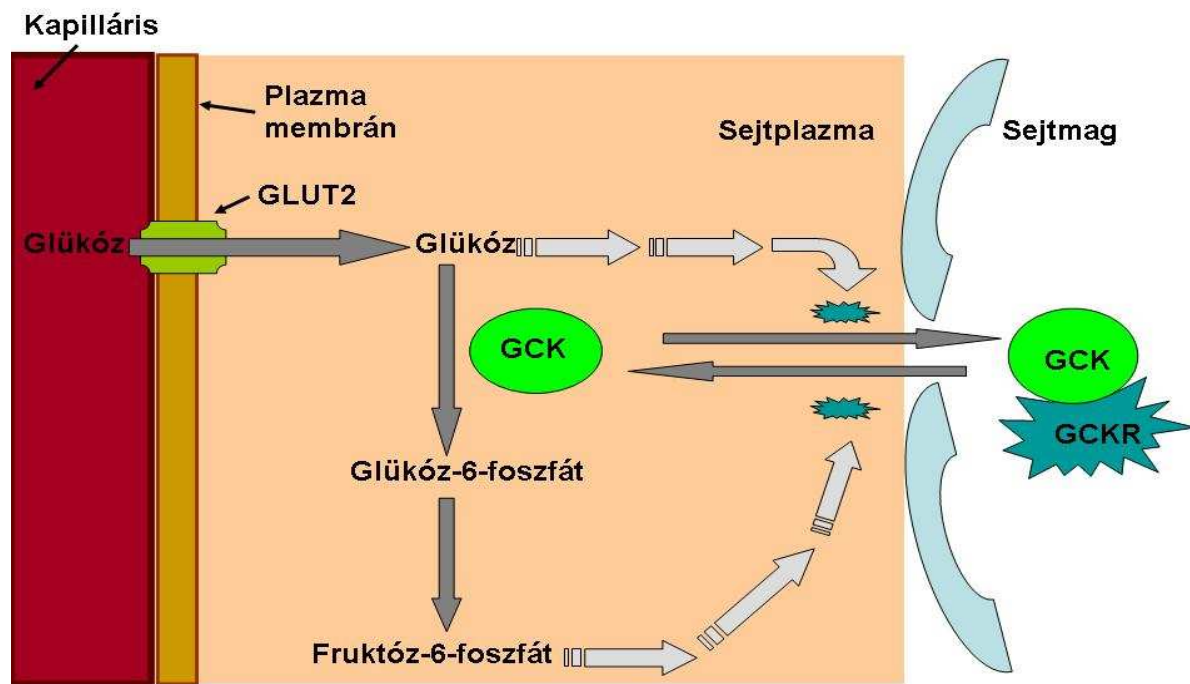
3. Ábra: A GCKR gén lokalizációja a 2. kromoszómán. Az ábrán függőleges piros vonal jelzi a 2p23.3-p23.2 pozícióban elhelyezkedő GCKR gént (forrás: www.ncbi.nih.gov).

A 27 kb hosszúságú glükokináz-regulátor gén 19 exont tartalmaz és egy 625 aminosavból álló fehérjét kódol, mely cukor-izomeráz (SIS= Sugar ISomerase) doménnel rendelkezik^{127-130,131}. A glükokináz regulátor protein (GCKR) 68 kDa molekulásúlyú, a máj glükokináz (GCK) enzimének működését szabályozza¹³²⁻¹⁴⁰.

A glükokináz (hexokináz IV) enzim központi szerepet tölt be a vér glükóz-homeosztázisában, a májsejtek valamint a hasnyálmirigy β -sejtjeinek meghatározó glükóz-foszforilációs enzime^{132-135,137,139-142}. A plazma glükóz-homeosztázisát glükóz-szenzorként kontrollálja: közvetve fokozza az inzulin-szekréción a hasnyálmirigy β -sejtjeiből és a glükóz metabolizmusát a májban^{141,142}.

A GCK enzim működésében a GCKR protein regulátor- és receptorfehérjeként egyaránt szerepet játszik. A májban és a hasnyálmirigy β -sejtjeiben a GCK enzim aktivitását negatívan szabályozza a glükokináz-regulátor protein, mellyel reverzibilisen komplexet képez, amely képes bejutni a sejtmagba. A GCKR protein a sejtmagban a komplexképzés segítségével elkülöníti, stabilizálja illetve védi a GCK enzimet a degradációtól^{130,133,143-146}. Szénhidrát (glükóz és részben fruktóz) bevitelkor a vér magas glükóz koncentrációja mellett (10mM), a glükóz a GLUT2 transzporterrel keresztül belép a májsejtbe, ahol aktiválja a GCK enzimet, aminek következtében a glükóz foszforilálódik¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Éhezés során, amikor a vér glükóz szintje 5 mM alá csökken, a fruktóz-6-foszfát előidézi a GCKR protein által a GCK enzim inhibícióját. A GCKR és a GCK inaktív komplexet képez a sejtmagban, amíg a glükóz

koncentráció meg nem emelkedik a sejtplazmában, a glükóz átáramlik a nukleáris pórusokon, ennek hatására a GCK disszociál a GCKR proteinról és visszaáramlik a sejtplazmába, ahol megkezdődik a glükóz foszforilációjának folyamata, míg a GCKR ligand-kötőhelyét a fruktóz-1-foszfát foglalja el^{137,150}. *In vitro* kísérletek megerősítették, hogy a GCKR mind a GCK protein expresszióját, mind az enzimaktivitást képes fokozni¹⁵¹. A GCK enzim és a GCKR protein működését a 4. ábra szemlélteti.



4. Ábra: A GSK-3R protein és a GSK-3 enzim regulátor működése a sejtmagban és a sejtplazmában. Alacsony glükóz koncentráció mellett és/vagy a fruktóz-6-foszfát jelenlétében a GSK-3-GSK-3R inaktív komplexet alkot a sejtmagban. Megemelkedett glükóz koncentráció hatására a GSK-3-GSK-3R komplex disszociál, és a GSK-3 enzim a sejtplazmában megkezdődik a glükóz foszforilációját.

Az elmúlt években végzett teljes genom asszociációs tanulmányokban (GWAS, genome-wide association study) a *GSK-3R* génben lévő több funkcionális variáns és a hypertrigliceridemia között szoros kapcsolatot fedeztek fel^{128,152-155}.

Fény derült a *GSK-3R* génnek a glükóz- és triglicerid-szintekre gyakorolt inverz összefüggésére is, mely szerint a gén polimorfizmusainak közvetett hatására a plazma triglicerid-szint emelkedése, ezzel egyidejűleg a glükóz szint csökkenése figyelhető meg^{128,152-154}. A glükokináz enzim aktivitásának fokozása (vagy kevésbé hatékony gátlása) segíthet a II-es típusú diabetes terápiás stratégiájában^{145,151,156-160}.

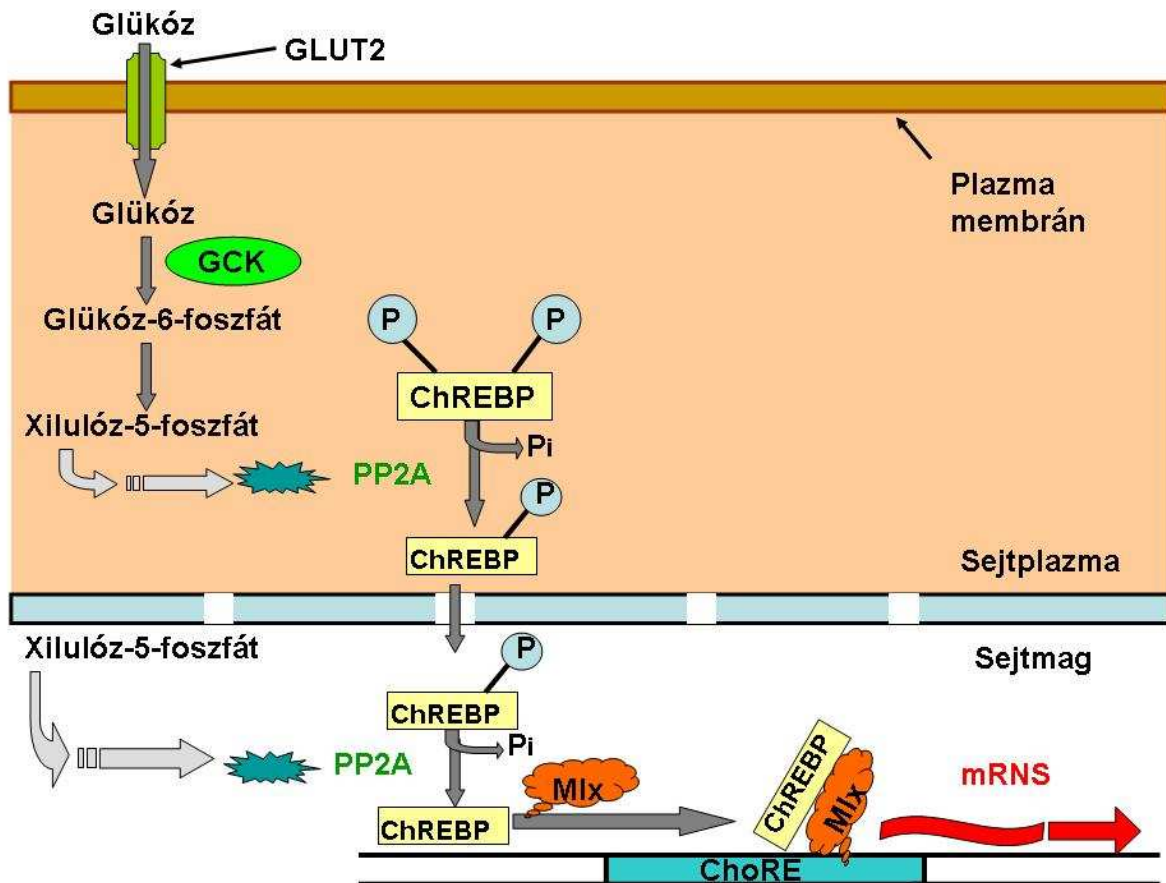
A *GCKR* gén két leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa az intronikus rs780094 variáns és az exonikus rs1260326, mely a 446. aminosav-pozícióban Leu/Pro cserét okozó és splice-site-ot érintő változás^{128,152-155}. Adatok utalnak rá, hogy a *GCKR* gén Leu446 (rs1260326, 1337T) variánsát hordozó személyek védettebbek a II-es típusú diabetes kialakulásával szemben¹⁵⁴. Egy teljes genom asszociációs vizsgálat során a *GCKR* gén rs1260326, 1337T variánsának hordozása szignifikánsan emelkedett plazma triglicerid-szintet mutatott¹¹². Az rs780094 polimorfizmus T alléljének hordozásakor alacsonyabb glükóz-szintet, kisebb mértékű inzulin rezisztenciát, emelkedett triglicerid-szintet és a II-es típusú diabetes kialakulásának kisebb kockázatát figyelték meg¹⁵³. Az rs780094 T alléljének hordozása nem bizonyult rizikófaktornak a koszorúér betegségek kialakulásában¹⁰⁷. Ezt erősítették meg 2008-ban, szintén az rs780094 variáns kapcsán: miszerint nem találtak összefüggést a cardiovasculáris (CVD) megbetegedések kialakulásával, a vizsgálat során emelkedett triglicerid- és C-reaktív protein (CRP) szintet detektáltak, ugyanakkor ez a jelenség egy kedvező metabolikus markerrel is társult, alacsonyabb glükóz koncentrációval¹⁵². Egy holland populációt vizsgáló munkában a *GCK* mellett a *G6PC2* (glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein) és *MTNR1B* (melatonin receptor type 1B) gének kombinált hatásának vizsgálatakor emelkedett plazma glükóz-szintet és a II-es típusú diabetesre való hajlamosítást tapasztaltak, azonban ezeket a hatásokat (sem az emelkedett plazma glükóz-szintet, sem a diabetesre való hajlamot) nem tudták igazolni a *GCKR* gén vizsgálatakor¹⁶¹. Az *APOA5* és *GCKR* gének rizikó alléljeit kombinálva a két gén additív hatását írták le és pozitív összefüggést mutattak ki az éhgyomri triglicerid és hypertrigliceridemia kapcsán¹⁶². A közelmúlt tanulmányai azt mutatják, hogy a különböző lókuszekben található genetikai markerek genotípusára vonatkozó információ kombinálása jelentős prognosztikai értékkel bírhat^{102,110,114,161-164}.

Az MLXIPL génlókusz

A Max-like-interacting-protein-like (*MLXIPL*; vagy carbohydrate response element-binding protein, *ChREBP*) gén 1.5 Mb hosszúságú, melyet 1998-ban első ízben Meng detektált a multisztémás fejlődési rendellenességgel járó Williams-Beuren szindrómában (WBS) a WBSR14 deléciós régióra, a 7q11.23 kromoszómán^{155,165,166}. 2000-ben pontosan jellemezték a gént, mely egy 852 aminosavból álló proteint, egy helix-loop-helix (bHLH) leucin-cipzár szerkezeti (DNS-kötő) elemet tartalmazó transzkripciós faktort kódol, mely a Myc/Max/Mad család tagját képezi¹⁶⁷.

A patkány májából klónozott ChREBP fehérje megközelítőleg 94%-os homológiát mutatott az egér, illetve 82%-os homológiát az emberi megfelelőjével¹⁶⁸. Később megállapították, hogy a patkány ChREBP fehérjéje esszenciális jelentőséggel bír a máj piruvát-kináz génjének aktiválásában¹⁶⁹. A humán ChREBP többféle szövetben expresszálódik, elsősorban a májban, a zsírszövetben, a vesében, valamint az agy- és béltraktus szöveteiben is¹⁷⁰.

A ChREBP fehérje a szerin és threonin oldalláncokon foszforilált állapotában inaktív, a sejtplazmában található mindaddig, amíg a foszfoprotein-foszfataz 2A (PP2A) egy foszfát csoportot el nem távolít a ChREBP fehérje szerin oldalláncáról, így a ChREBP átkerül a sejtmagba. Egy újabb defoszforilálás után a fehérje heterodimert képez egy partner fehérjével, a Max-like bHLH-ZIP Mlx transzkripciós faktoral. Ezt követően a ChREBP-Mlx komplex kapcsolódik a lipogenezis és triglicerid-szintézis gének promóter régiójában található szénhidrát-reszponzibilis elemhez (carbohydrate response element; ChoRE), ezáltal szabályozva számos enzim szintézisét: a piruvát-kináz, zsírsav-szintáz, acetyl-coenzim-A-karboxiláz enzimeket, melyek közvetve befolyásolják a lipogenezist és a glükóz felhasználását a májban^{170,171-173}. A ChREBP transzkripciós faktor által szabályozott génreguláció folyamatát az 5. ábra mutatja be.



5. Ábra: A ChREBP transzkripciós faktor génregulációjának folyamata. A sejtplazmából a ChREBP fehérjét a PP2A defoszforilálja, ezt követően bekerül a sejtmagba, majd kapcsolódik az Mlx-proteinhez. A ChREBP-Mlx komplex kötődik a ChoRE elem promóter régiójához, ezáltal elindítva a transzkripciót, amely zsírsav-szintézishez vezet.

A pentóz-foszfát ciklus intermedier molekulája a xilulóz-5-foszfát, mely allosztérikusan aktiválja a foszfoprotein-foszfátáz 2A-t. Amikor a vér glükóz koncentrációja megemelkedik, a glükóz belép a májba és itt a GCK enzim foszforilálja¹⁷⁴. Ezután a glükóz-6-foszfát vagy a glikolízisbe vagy a pentóz-foszfát ciklusba kerül be. Az utóbbi folyamat intermediereként keletkező xilulóz-5-foszfát allosztérikusan aktiválja a PP2A molekulát, mely defoszforilálja a ChREBP transzkripciós faktort. A ChREBP ezután irányíthatja a glikolízis és zsírsav-szintézis enzimeinek génexpresszióját¹⁷⁴. A glikolízisben piruvát keletkezik, amelyből oxidáció után létrejön az acetil-koenzim-A molekula, melyet az acetil-CoA-karboxiláz enzim malonil-koenzim-A molekulává alakít; ez utóbbi reakció a zsírsav-szintézis elkötelező lépése. A zsírsav-szintáz komplex zsírsavat állít elő, amely eljut a zsírszövetekbe és trigliceridek formájában raktározásra kerül¹⁷⁴.

A ChREBP-t kódoló *MLXIPL* génnek feltehetően a növekedési szabályozásban is van szerepe¹⁷⁰. A ChREBP fehérje teljes gátlása elhízott egerekben jelentősen csökkentette a

metabolikus szindróma hatásait, így az elhízást, a máj-lipidosist és a glükóz intoleranciát¹⁷⁵.

Az elmúlt évek teljes genom asszociációs tanulmányai a plazma triglicerid-szint változásával összefüggésbe hozták az *MLXIPL* lókuszt is^{112,163,176,177}. Az *MLXIPL* lókuszon belül az rs17145738 és az rs3812316 variánsok major alléljeinek triglicerid-emelő hatásáról már több kutatásban beszámoltak^{112,177}. Egy tanulmány szerint 132, európai, hypertrigliceridémiában szenvedő beteget vizsgáltak, többek között az *MLXIPL* rs17145738, *GALNT2* rs4846914, *TRIB1* rs17321515, *ANGPTL3* rs12130333, *GCKR* rs780094, *APOA5* rs3135506, *APOA5* rs662799 polimorfizmusok hatásait elemezték a triglicerid-szintre nézve¹⁷⁸. Az eredmények alapján az *APOA5* rs3135506, *APOA5* rs662799, *GCKR* rs780094, *TRIB1* rs17321515 és *MLXIPL* rs17145738 allélvariánsok hordozása szignifikáns kapcsolatot mutatott a hypertrigliceridémiával¹⁷⁸. Az OR-értékek szintén szignifikáns összefüggést jeleztek¹⁷⁸. Egy teljes genom asszociációs tanulmányban 30 génvariáns vizsgálatkor elemezték a *GCKR*, *TRIB1*, *MLXIPL*, *ANGPTL3* génvariánsok triglicerid-szintre gyakorolt hatásait¹⁷⁶. A felsorolt gének mindegyike szignifikáns asszociációt mutatott a triglicerid-szint változással¹⁷⁶.

A GALNT2 génlókuszt

A továbbiakban tárgyalt *GALNT2*, *ANGPTL3*, *CILP2*, valamint a *TRIB1* génlókusztok metabolikus szerepe kevésbé karakterizált, kutatásaink alapját ezen génlókusztok vizsgálatában a teljes genom asszociációs tanulmányok eredményei képezték.

1995-ben humán placentából izolálták az UDP-N-acetil-alfa-D-galaktózamin: polipeptid-N-acetil-galaktóz-aminil-transzferáz (*GALNT2*) fehérjét, amit GalNAc-T2-nek neveztek el¹⁷⁹. Az izolált fehérje aminosav szekvenciája alapján tervezett primerek felhasználásával, PCR reakcióval azonosították a *GALNT2* cDNS-ét, ami egy 571 aminosavat tartalmazó, hozzávetőlegesen 64 kDa molekulásúlyú fehérjét kódol¹⁷⁹. FISH módszer segítségével meghatározták a *GALNT2* (N-acetylgalactosaminyltransferase 2) kromoszómális elhelyezkedését, valamint további vizsgálatokkal megállapították, hogy a *GALNT2* gén 16 exonból áll, és az 1q41-q42 kromoszómán helyezkedik el¹⁸⁰. A *GALNT2* az O-kapcsolt oligoszacharidok bioszintézise során egy N-acetil galaktózamint kapcsol a szerin vagy treonin oldalláncok hidroxilcsoportjához¹⁷⁹.

Az elmúlt években készült teljes genom asszociációs tanulmányokban számos genetikai faktort azonosítottak, melyek kapcsolatban állnak a plazma triglicerid-szint változásaival, úgy mint a *GALNT2* és az *MLXIPL* lókusztok^{112,163,177}. Az rs4846914 a *GALNT2* gén intronikus variánsa, melynek minor G allélje kapcsolatot mutatott a plazma magas triglicerid koncentrációjával¹⁶³. 132 európai hypertrigliceridémias beteget vizsgáltak meg, a *GALNT2* rs4846914 génvariáns és a hypertrigliceridémia között szignifikáns összefüggést találtak¹⁷⁸.

Az *ANGPTL3*, *CILP2* és *TRIB1* génlókuszok

Az utóbbi években a teljes genom asszociációs tanulmányokban leírták az *ANGPTL3*, *CILP2* és *TRIB1* lókuszok triglicerid-szint módosító hatását^{112,163}. A tanulmányozott polimorfizmusok: rs16996148 (*CILP2* lókusz), rs17321515 (*TRIB1* lókusz) és az rs12130333 (*ANGPTL3* lókusz) asszociációt mutattak az alacsonyabb triglicerid-szinttel^{112,163}. Az emelkedett triglicerid-szint kapcsolatban állhat egyes vasculáris megbetegedések kialakulásával, számos esetben a triglicerid-szint emelkedés és az egyes polimorfizmusok között pozitív összefüggést mutattak ki a multigénikus vasculáris megbetegedésekre nézve^{10,18,23-25,27,31,32,74,75,97,98,100,103,105,106,108,111,112,115,118,119}. Azonban jóval kevesebb információ áll rendelkezésünkre a triglicerid-szint csökkentő természetes variánsok cardiovascularis betegségekkel való funkcionális kapcsolatáról^{163,176}.

Az *ANGPTL3* (angiopietin-like 3) gén az 1p31 kromoszómán helyezkedik el, angiopietin szerkezettel rendelkezik, növekedési faktor család tagja, valamint az endotheliumra specifikus gén¹⁸¹. A hypolipidemia lókuszát egérben 2002-ben írták le, ami egy egyedülálló angiopietin-like lipoprotein modulátor¹⁸², ezt később az *ANGPTL3* génként azonosították¹⁸¹. Az *ANGPTL3* kizárólag a májban expresszálódik¹⁸¹, majd a keringő lipoprotein-lipáz inhibitora lesz¹⁸³⁻¹⁸⁵, ezáltal szabályozza a plazma triglicerid-szintjét és a HDL-szintet (high-density lipoprotein)^{183,184,186}. Az *ANGPTL3* gén szerepet játszik a triglicerid-metabolizmusban, amit alátámaszt az a megfigyelés is, hogy Fs122, FsQ192 és az FsK455 frameshift mutációi kapcsolatot mutatnak a csökkentett plazma triglicerid-szinttel¹⁸⁷. Ugyanakkor összefüggést detektáltak az rs16996148 (*CILP2* lókusz), rs17321515 (*TRIB1* lókusz) és az rs12130333 (*ANGPTL3* lókusz) variánsok és a dyslipidemia között¹⁷⁶. Egy ettől független tanulmányban a fenti eredményeket megerősítették, és ezeket a lókuszokat kapcsolatba hozták a koszorúér betegségek kialakulásával¹¹².

Jóval kevesebbet tudunk a cartilage intermediate-layer protein (CILP) fehérjéről és a human tribbles-1 génről (*TRIB1*). A *CILP2* gén a 19p13.11 kromoszómán helyezkedik el, az általa kódolt fehérje immunoglobulin domént tartalmaz, szekvenciájának egyik szakasza GHB (glycoprotein hormon beta) lánc homológiát mutat. A fehérje szerepe a lipid metabolizmusban egyelőre még tisztázatlan¹⁸⁸. Egy tanulmányban a kaukázusi populáció vizsgálata során az rs16996148 polimorfizmus triglicerid-szint csökkentő funkcióját írták le¹⁶³.

Kiss-Tóth munkatársaival 2004-ben azonosította a human tribbles-1 gént (*TRIB1*), mely a 8q24 kromoszómán található¹⁸⁹. A *TRIB1* protein-kináz-C-vel és p38 β -MAP-kináz 11-el homológ elemeket tartalmaz, a Tribbles fehérje család tagja, mely elősegíti a proteozóma-függő fehérje lebontást¹⁹⁰. Egy ázsiai maláj populációban azt találták, hogy az rs17321515 polimorfizmus kapcsolatban állt az emelkedett összkoleszterin és az LDL-koleszterin-szinttel, valamint magasabb kockázatot mutatott a coronaria szívbetegségekre és a cardiovascularis megbetegedésekre¹⁰⁹.

Kutatásainkban előtérbe helyeztük azon szempontokat, melyek szerint a fenti géneket még nem vizsgálták cerebrovasculáris megbetegedések kapcsán, ezért a magyar populációban tanulmányoztuk az *ANGPTL3*, *CILP2* és *TRIB1* lókuszok triglicerid metabolizmusra gyakorolt közvetett hatásait, valamint esetleges kapcsolatát az ischémias stroke kialakulásával.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Kutatásaink egyik célja volt, hogy megvizsgáljuk az *APOA5*: T-1131C (rs662799), T1259C (rs2266788), C56G (rs3135506) és IVS3+G476A (rs2072560), a *GCKR*: C1337T (rs1260326) és *GALNT2* (rs4846914) gének, valamint az *MLXIPL/TBL2* (rs17145738 és rs3812316) és az *ANGPTL3* (rs12130333), *CILP2* (rs16996148), *TRIB1* (rs17321515) lókuszok funkcionális variánsainak alléleloszlását a magyar ischemiás stroke-os betegpopulációban.
2. Mivel a magyar ischemiás stroke-kal rendelkező betegcsoportokban ezidáig nem kutatták az *APOA5*, *GCKR* gének lehetséges genetikai kombinációinak hatásait a triglicerid-szint változásra nézve, mind a betegcsoportokban, mind a kontrollokban, valamint lehetséges összefüggéseit az ischemiás stroke kialakulásában, így vizsgálataink ennek elemzésére is kiterjedtek.
3. A *GALNT2* (rs4846914) génvariáns és az *MLXIPL/TBL2* (rs17145738 és rs3812316), lókusz polimorfizmusainak hatásait, valamint ezek lehetséges asszociációit a triglicerid-szint változásokkal és az ischemiás stroke megbetegedésben betöltött esetleges hajlamosító szerepét szintén nem tisztázták még a magyar betegpopulációban, ezt tűztük ki következő kutatási célunkként.
4. Végül megvizsgáltuk az *ANGPTL3* (rs12130333), *CILP2* (rs16996148), *TRIB1* (rs17321515) génlókuszokat, melyek a szakirodalom szerint összefüggést mutattak a plazma triglicerid-szint csökkenésével. Ezek alapján tisztázni kívántuk ezen génvariánsok lehetséges összefüggéseit az ischemiás stroke betegség kórfolyamatában.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vizsgált betegpopuláció

A kutatásokban részt vevő ischemiás stroke-os betegek, valamint a kontroll egyének egyaránt Intézetünk biobankjából kerültek a vizsgálatokba, mely tagja az Nemzeti Biobank Hálózatnak (www.biobanks.hu) és a össz-európai Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI) program részét képezi (<http://bbmri.eu/bbmri/>). A Biobank működése az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatás-Etikai Bizottságának (ETT TUKEB) engedélyével és támogatásával történik. A minták, a személyes- és klinikai adatok gyűjtése, valamint a DNS kutatási célokra való felhasználása az 1975. évi Helsink Deklaráció követelményeinek teljes mértékben eleget tesz.

A vérminták gyűjtése 2001. óta történik a biobankunkba. Az összes beteg korábban megállapított stroke, vagy akutan fellépő ischemiás stroke miatt került szakorvosi ellátásra. Minden egyes beteg részletes klinikai vizsgálaton vett részt, mely tartalmazta az orvosi és családi előzményeket, az esetleges vasculáris rizikófaktorok becslését, az általános fizikai és neurológiai állapotfelmérést, a széleskörű laboratóriumi és elektrokardiográfiás vizsgálatokat, az extracraniális és transcraniális Doppler-szonográfiát az agyat ellátó artériákról, valamint transthoratikus és/vagy transesophagiális echokardiográfiát, ahol szükséges volt. A mágneses rezonanciás képalkotó eljárás vizsgálatait (magnetic resonance imaging; MRI) a tünetek megjelenése után két napon belül elvégezték, hogy az érintett területet pontosan definiálni tudják. Mindazon betegeket, akiknek MRI felvétele nem volt megfelelően értékelhető, vagy a vizsgálat időtartama alatt exitáltak, kizártuk a tanulmányból.

Munkánk során a stroke csoportosításakor az 1993-ban kialakított TOAST - féle (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) klinikai klasszifikációt vettük alapul, mely a következő: I. nagy ér eredetű atherosclerosis; II. cardioembolia; III. kis eres occlusio; IV. egyéb etiológia alapján meghatározott stroke és V. ismeretlen etiológiájú stroke alcsoportok¹⁹¹.

A betegek alapos neurológiai és MRI elemzés után három stroke alcsoportba lettek besorolva, a klasszifikáció alapját a TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment)¹⁹¹ követelményrendszere képezte. Az első alcsoportot a nagyér infarctust szenvedett betegek alkotják (nagyér betegek), ahol az MRI felvételeken legalább 1.5 cm

átmérőjű corticális vagy cerebelláris léziók és/vagy agytörzsi infarctusok, vagy féloldali subcorticális infarctusok jelentkeztek.

A következő csoportba azok a betegek tartoznak, akik MRI felvételein kísér elzáródás, illetve 1.5 cm átmérőnél kisebb subcorticális féloldali vagy agytörzsi infarctus volt megfigyelhető. A harmadik csoportot azok az egyének képezik, akiknél a TOAST csoportosításnak megfelelően cardioembolia, egyéb etiológia vagy nem tisztázott etiológia miatt bekövetkezett stroke-os állapotot detektáltak és MRI felvételeiken egy vagy több lacunáris és nagyér infarctus volt kimutatható. A betegek ily módon történő csoportba rendezése a statisztikai szempontból alacsony esetszámok miatt volt szükséges.

A vizsgálatba bevont kontroll csoport tagjai (anamnéziséjük alapján) nem szenvedtek stroke eseményben, MRI és CT felvételeiken neurológiai elváltozás nem volt megfigyelhető. A betegekhez korban illeszkedő, egészséges személyek kiválasztása random módon történt.

A *GCKR* és *APOA5* gének vizsgálatában összesen 513 stroke-os beteg (207 ffi/306 nő, átlagéletkor: 65.1 ± 0.62 év; kísér: $n=232$, 91 ffi/141 nő, átlagéletkor: 65.1 ± 0.96 év; nagyér: $n=139$, 57 ffi/82 nő, átlagéletkor: 66.5 ± 1.21 év; kevert: $n=142$, 59 ffi/83 nő, átlagéletkor: 63.8 ± 1.06 év) és 172 kontroll egyén (49 ffi/123 nő, átlagéletkor: 56.5 ± 1.20 év) vett részt. A *GALNT2* és *MLXIPL* gének vizsgálata során összesen 467 ischémias stroke-os beteggel (186 ffi/281 nő, átlagéletkor: 64.91 ± 0.65 év; kísér: $n=212$, 83 ffi/129 nő, átlagéletkor: 64.95 ± 0.99 év; nagyér: $n=127$, 51 ffi/76 nő, átlagéletkor: 66.35 ± 1.29 év; kevert: $n=128$, 52 ffi/76 nő, átlagéletkor: 63.46 ± 1.11 év) és 156 kontroll egyénnel (44 ffi/112 nő, átlagéletkor: 56.49 ± 1.29 év) dolgoztunk. Az *ANGPTL3*, *CILP2* és *TRIB1* lókuszok analízisébe összesen 459 stroke-os beteget (178 ffi/281 nő, átlagéletkor: 65.1 ± 0.64 év; kísér: $n=183$, 65 ffi/118 nő, átlagéletkor: 65.2 ± 1.05 év; nagyér: $n=135$, 55 ffi/80 nő, átlagéletkor: 66.4 ± 1.23 év; kevert: $n=141$, 58 ffi/83 nő, átlagéletkor: 63.8 ± 1.06 év) és 168 kontroll egyént (48 ffi/120 nő, átlagéletkor: 56.4 ± 1.20 év) vontunk be. Munkánk során a rendelkezésünkre álló DNS vizsgálati minták egy része elfogyott, ez magyarázza az egyes polimorfizmusok esetén a különböző mintaszámokat.

4.2. Alkalmazott molekuláris biológiai eljárások

4.2.1. PCR reakció

Vizsgálatainkat EDTA-val alvadásgátolt perifériás vér fehérvérsejtjeiből rutin kisózásos módszerrel kinyert DNS mintákon végeztük el¹⁹². A DNS adott szekvenciájára specifikus, általunk tervezett szintetikus oligonukleotid primerek (Metabion International AG, Martinsried, Germany) segítségével, polimeráz láncreakció (PCR) során történt az amplifikáció. A vizsgálathoz szükséges reakcióelegy végtérfogata minden esetben 50 µl volt, mely 200 µM dNTP oldatot, 1 U Taq polimeráz enzimet (10 U/µl), 5 µl puffer oldatot (500 mM KCl, 14 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCL; 9,0 pH), 0,2 mM specifikus primerpárt tartalmazott, ehhez 1 µg DNS templátot alkalmaztunk. A primerszekvenciák és a PCR-RFLP körülmények a 3. táblázatban találhatóak .

3. Táblázat: A vizsgált polimorfizmusok PCR-RFLP kondíciói.

Gén	SNP	Forward primer	Reverse primer	Annealing hőm. (°C)	PCR termék mérete (bp)	Restriktációs endonukleáz neve	Ősi genotípus fragmentumai (bp)	Heterozigóta genotípus fragmentumai (bp)	Mutáns genotípus fragmentumai (bp)
APOA5	T-1131C rs662799	CCCCAGGAACTGGAGCGACCTT	TTCAAGCAGAGGGAAGCCTGTA	55	398	<i>MseI</i>	22, 109, 267,	22, 109, 267, 289	109, 289
	T1259C rs2266788	TCAGTCCTTGAAAGTGGCCT	ATGTAGTGGCACAGGCTTCC	64	287	<i>BseGI</i>	122, 165	35, 87, 122, 165	35, 87, 165
	C56G rs3135506	AGAGCTAGCACCGCTCCTTT	TAGTCCCTCTCCACAGCGTT	64	256	<i>Cfr13I</i>	79, 177	26, 79, 151, 177	26, 79, 151
	IVS+G476A rs2072560	CTCAAGGCTGTCTTCAG	CCTTTGATTCTGGGGACTGG	62	280	<i>MnlI</i>	25, 114, 141	25, 41, 73, 114, 141	25, 41, 73, 141
GCKR	C1337T rs1260326	TGCAGACTATAGTGGAGCCG	CATCACATGGCCACTGCTTT	60	231	<i>HpaII</i>	18, 63, 150	18, 63, 150, 213	18, 213
MLXIPL	rs17145738	ATGGTCCAGGAGTCTGCCC	AGCCATCGTGCCTAGCTAAA	60	615	<i>TaaI</i>	49, 113, 253	49, 113, 253, 366	49, 366
	rs3812316	CCATCCCAGCCATCCCT	TTCTCCAGTGTGGTCCCGT	60	239	<i>BspLI</i>	16, 17, 203	16, 17, 26, 177, 203	16, 17, 26, 177
GALNT2	rs4846914	CTGTGCCTTCTGGGACTGCTA	AGTGAGGAAGGACTATGAGATGATG	57	200	<i>HpyF3I</i>	19, 74, 107	19, 74, 107, 126	74, 126
CILP2	rs16996148	TCTCATCATTCACCCATCCA	AATGTGTGTTCTCCCAAGCC	58	466	<i>HinIII</i>	184, 283	47, 184, 235, 283	47, 184, 235
TRIB1	rs17321515	AAGGAAGGGTTAGGTAGACCAATTA	GACACCAGCTGTAGAGAACCAAATA	57	596	<i>FspBI</i>	56, 90, 450	56, 90, 450, 541	56, 541
ANGPTL3	rs12130333	TTTCTAAACCTTGGTATCTTCATTTG	CATTTTCATGGTTGCTTTGTAATTT	58	372	<i>DraI</i>	79, 294	26, 79, 268, 294	26, 79, 268

4.2.2. RFLP módszer

A restrikciós endonukleázokkal (Fermentas Inc., Burlington, ON, Canada) történő emésztéshez 1 U specifikus enzimet, 10-15 µl PCR-terméket, 10x puffert és steril desztillált vizet alkalmaztunk. Az inkubálás a restrikciós enzim hőmérsékleti igényeinek megfelelően történt. A módszerek megtervezésénél figyelembe vettük, hogy a felszorzozni kívánt DNS szakaszban az allélfüggő, feltételes hasítási hely mellett legyen egy obligát hasítási hely, melynek segítségével ellenőrizhettük az enzim megfelelő működését (3. táblázat).

4.2.3. Direkt szekvenálás

A DNS szekvencia meghatározása, eredményeink hitelességének igazolása néhány minta direkt szekvenálásával történt, egy ABI Prism 3100 Avant típusú automata szekvenáló készüléken (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A szekvenciák analízise a Winstar genetikai programcsomag (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) segítségével történt.

4.3. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket az SPSS 15.0 programcsalád (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) segítségével végeztük el. Az összes klinikai adat átlag \pm SEM értéként van feltüntetve. Kolmogorov-Smirnov-teszt segítségével állapítottuk meg a változók eloszlását. Normál eloszlás esetén paraméteres próbákat, míg a nem-normál eloszlású változóknál nem-paraméteres próbákat alkalmaztunk. Kruskal-Wallis-teszttel az egyes csoportok értékei közti tényleges különbségeket tudtuk megvizsgálni. Normál eloszlású, diszkrét változók esetében χ^2 -tesztet használtunk a csoportok klinikai és laboratóriumi paramétereinek közötti különbségek páronkénti összehasonlításához, valamint a két gén közti specifikus kombinációk esélyhányadosának (Odds Ratio, OR) számításánál. Student-féle páros t-teszttel dolgoztunk normál eloszlású, folytonos változók esetében, két csoport paramétereinek vizsgálatához, míg a nem-normál eloszlású változók esetén Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk.

Ugyanakkor a Mann-Whitney-tesztet használtuk a klinikai paraméterek különbségeinek összevetésére a betegcsoport és a kontroll csoport között. A logisztikus regresszió modelljével dolgoztunk a korreláció analízis során és az esélyhányadosok pontos megadásánál. A szignifikancia (p) határértéke $p=0.05$, míg a konfidencia intervallum (CI) 95%-os volt minden egyes számításnál.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A GCKR és az APOA5 gének vizsgálata

A betegek és kontroll egyének legfontosabb klinikai jellemzőit és az általános laboratóriumi eredményeiket a 4. táblázat foglalja össze. A korábbi stroke klasszifikációnak megfelelően a betegek három csoportra lettek felosztva. Az ischemiás stroke főbb rizikófaktora, úgy mint az összkoleszterin és a szérum triglicerid-szint értékei szignifikáns különbséget mutattak: az egyes stroke alcsoportokban ezek az értékek szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontroll csoportban ($p < 0.05$).

4. Táblázat: Az APOA5 és GCKR gének vizsgálatába bevont betegek és kontroll egyének klinikai és laboratóriumi paraméterei.

	Stroke-os betegcsoport				Kontroll (n=172)
	Kisér (n=232)	Nagyér (n=139)	Kevert (n=142)	Összes beteg (n=513)	
Nem (férfi/nő)	91/141	57/82	59/83	207/306	49/123
Életkor (év)	65.1 ± 0.96	66.5 ± 1.21	63.8 ± 1.06	65.1 ± 0.62	56.5 ± 1.20
BMI (kg/m ²)	25.2 ± 0.13	24.8 ± 0.24	24.8 ± 0.14	24.9 ± 0.95	23.9 ± 0.16
Triglicerid (mmol/l)	1.67 ± 0.04*	1.78 ± 0.06*	1.76 ± 0.06*	1.73 ± 0.03*	1.53 ± 0.04
Összkoleszterin (mmol/l)	5.85 ± 0.08*	5.96 ± 0.11*	5.90 ± 1.12*	5.89 ± 0.06*	5.37 ± 0.07

* $p < 0.05$
Az értékek ± SEM-ként szerepelnek.

A genotípus profilokat az 5. táblázat tartalmazza. Az alléloszlást tanulmányozva, minden érték mind az egyes stroke alcsoportokban, mind a kontroll csoportban megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúly követelményeinek. Az allélfrekvenciákban szignifikáns eltérést figyeltünk meg az *APOA5* gén promóter régiójában található T-1131C variáns, az intronikus IVS3+G476A variáns és a harmadik exonban található C56G variáns esetében (5. táblázat).

A szignifikáns eltérés az egyes stroke alcsoportokban a következő: -1131C minor allél legalább kétszer gyakrabban fordul elő az összes stroke alcsoportban és az összes stroke-os betegben, mint a kontroll csoportban ($p < 0.05$).

Az IVS+476A szintén szignifikánsan magasabb arányban volt megtalálható a stroke alcsoportokban és az összes stroke-os betegben, mint a kontrollokban. Az 56G mutáns allél szignifikáns emelkedést mutatott a nagy eres, a kevert eres csoportokban, valamint az összes stroke-os csoportban is a kontroll egyedekhez viszonyítva. Bináris logisztikus regresszióval megállapítottuk az egyes stroke alcsoportokban a minor alléleket hordozó egyedek esélyhányadosát (OR), amely alapján kiderült, hogy mely polimorfizmus hordozása hajlamosíthat stroke kialakulására. Az összes variáns esetében, minden egyes stroke alcsoport minor allél-hordozása hajlamosít az ischemiás stroke kialakulására, egyetlen kivétellel: a C56G variáns nem mutatott szignifikáns emelkedést a kis eres alcsoportban a kontrollokhoz képest (6. táblázat). A T1259C polimorfizmus egyik stroke alcsoportban sem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll egyedekhez viszonyítva.

A *GCKR* gén rs1260326 (C1337T) variánsa hasonló allélfrekvenciát mutatott mind a stroke alcsoportokban, mind a kontroll csoportban.

A triglicerid-szintek értékeit a 6. táblázat tartalmazza. Az összes *APOA5* variáns esetében azok az egyedek, amelyek hordozták a -1131C, 1259C és IVS+G476A minor alléleket, a nem-hordozókhoz képest a triglicerid-szintekben szignifikáns emelkedést mutattak, mind a stroke-os, mind a kontroll csoportokban. Ezzel ellentétben a *GCKR* gén minor allélje, a 1337T allél nem mutatott semmiféle összefüggést a triglicerid-szint változásokkal, sem a stroke-os betegekben, sem a kontrollokban. Az esélyhányados értékeket a 6. táblázat foglalja össze. Az OR értékeket a kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin-szint, ischemiás szívbetegség, hipertensio, diabetes mellitus, dohányzás- és alkoholfogyasztás a csoportok között fennálló különbségeire korrigáltuk. Vizsgálataink során a korrigált OR értékek azt mutatják, hogy a -1131C, 56G és az IVS+476A minor allélek hordozása független rizikófaktor az ischemiás stroke kialakulásában (6. táblázat). Ha a fenti OR értékeket korrigáljuk a triglicerid-szint csoportok közötti különbségeire is, ez a pozitív korreláció ugyanígy megfigyelhető. Ezzel ellentétben sem az *APOA5* 1259C allél, sem a *GCKR* gén 1337T allél hordozása nem mutatott asszociációt a stroke manifesztációjával, sem hajlamosító- sem védő hatását nem tudtuk igazolni.

5. Táblázat: Az APOA5 és GCKR gének egyes variánsainak alléleloszlása a beteg és kontroll csoportokban.

	Stroke-os betegcsoport								Kontroll (n=172)	
	Kisér (n=232)		Nagyér (n=139)		Keverd (n=142)		Összes beteg (n=513)		TT	TC+CC
APOA5	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC
T-1131C	(n=197)	(n=30+5)	(n=118)	(n=19+2)	(n=119)	(n=19+4)	(n=434)	(n=68+11)	(n=159)	(n=12+1)
C allél frekvencia	8.62%*		8.27%*		9.51%*		8.77%*		4.07%	
T1259C	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC
	(n=190)	(n=40+2)	(n=113)	(n=25+1)	(n=112)	(n=28+2)	(n=415)	(n=93+5)	(n=145)	(n=27+0)
C allél frekvencia	9.48%		9.71%		11.27%		10.0%		7.85%	
IVS+G476A	GG	GA +AA	GG	GA +AA	GG	GA +AA	GG	GA +AA	GG	GA +AA
	(n=201)	(n=30+1)	(n=125)	(n=14+0)	(n=121)	(n=20+1)	(n=447)	(n=64+2)	(n=163)	(n=9+0)
A allél frekvencia	6.90%*		5.04%*		7.75%*		6.63%*		2.62%	
C56G	CC	CG +GG	CC	CG +GG	CC	CG +GG	CC	CG +GG	CC	CG +GG
	(n=205)	(n=25+2)	(n=118)	(n=21+0)	(n=121)	(n=20+1)	(n=444)	(n=66+3)	(n=160)	(n=12+0)
G allél frekvencia	6.25%		7.55%*		7.75%*		7.02%*		3.49%	
GCKR	CC	CT+TT	CC	CT+TT	CC	CT+TT	CC	CT+TT	CC	CT+TT
C1337T	(n=55)	(n=125+52)	(n=34)	(n=77+28)	(n=34)	(n=77+31)	(n=123)	(n=279+111)	(n=48)	(n=80+44)
T allél frekvencia	49.4%		47.8%		48.9%		48.8%		48.8%	
*p<0.05 vs. kontroll csoport.										

6. Táblázat: Az APOA5 és GCKR génvariánsok triglicerid értékeinek változása a genotípus függvényében és a polimorfizmusok vizsgálata logisztikus regressziós analízissel.

<i>APOA5</i>	Stroke-os betegcsoport								Kontroll (n=172)	
	Kisér (n=232)		Nagyér (n=139)		Kevert (n=142)		Összes beteg (n=513)		TT	TC+CC
T-1131C	TT (n=197)	TC+CC (n=30+5)	TT (n=118)	TC+CC (n=19+2)	TT (n=119)	TC+CC (n=19+4)	TT (n=434)	TC+CC (n=68+11)	TT (n=159)	TC+CC (n=12+1)
Triglicerid (mmol/l)	1.68±0.04	1.97±0.15*	1.73±0.06	2.11±0.20*	1.72±0.06	1.99±0.17*	1.70±0.03	1.92±0.09*	1.51±0.04	1.84±0.12*
OR[#]	1.937 [#] (1.026 – 4.541)		2.813 [#] (1.114 – 7.104)		3.533 [#] (1.421 – 8.781)		2.929 [#] (1.418 – 6.051)			
T1259C	TT (n=190)	TC+CC (n=40+2)	TT (n=113)	TC+CC (n=25+1)	TT (n=112)	TC+CC (n=28+2)	TT (n=415)	TC+CC (n=93+5)	TT (n=145)	TC+CC (n=27+0)
Triglicerid (mmol/l)	1.67±0.04	1.97±0.12*	1.73±0.07	2.00±0.14*	1.71±0.06	1.94±0.14*	1.69±0.03	1.89±0.07*	1.50±0.04	1.69±0.07*
OR[#]	1.211 (0.616 – 2.381)		1.204 (0.560 – 2.588)		1.952 (0.932 – 4.091)		1.466 (0.838 – 2.566)			
IVS+G476A	GG (n=201)	GA +AA (n=30+1)	GG (n=125)	GA +AA (n=14+0)	GG (n=121)	GA +AA (n=20+1)	GG (n=447)	GA +AA (n=64+2)	GG (n=163)	GA +AA (n=9+0)
Triglicerid (mmol/l)	1.67±0.04	2.05±0.16*	1.73±0.06	2.28±0.21*	1.70±0.06	2.09±0.17*	1.69±0.03	2.00±0.09*	1.52±0.04	1.80±0.11*
OR[#]	2.439 [#] (1.272 – 6.120)		1.888 [#] (1.252 – 5.464)		3.893 [#] (1.445 – 10.489)		3.173 [#] (1.408 – 7.150)			
C56G	CC (n=205)	CG +GG (n=25+2)	CC (n=118)	CG +GG (n=21+0)	CC (n=121)	CG +GG (n=20+1)	CC (n=444)	CG +GG (n=66+3)	CC (n=160)	CG +GG (n=12+0)
Triglicerid (mmol/l)	1.64±0.03	1.95±0.13*	1.74±0.06	2.02±0.14*	1.73±0.06	1.91±0.12*	1.69±0.03	1.96±0.08*	1.52±0.04	1.66±0.05*
OR[#]	2.156 (0.836 – 5.561)		2.873 [#] (1.086 – 7.601)		2.939 [#] (1.079 – 8.010)		2.316 [#] (1.059 – 5.067)			
GCKR C1337T	CC (n=55)	CT+TT (n=125+52)	CC (n=34)	CT+TT (n=77+28)	CC (n=34)	CT+TT (n=77+31)	CC (n=123)	CT+TT (n=279+111)	CC (n=48)	CT+TT (n=80+44)
Triglicerid (mmol/l)	1.63±0.06	1.68±0.04	1.79±0.12	1.78±0.07	1.94±0.12	1.70±0.06	1.76±0.06	1.72±0.03	1.58±0.09	1.51±0.04
OR[#]	1.585 (0.867 – 2.899)		1.231 (0.638 – 2.374)		0.976 (0.498 – 1.914)		1.289 (0.790 – 2.104)			

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek. A triglicerid – szint értékei mmol/l-ben értendők. *p<0.05 vs. nem hordozó egyének: minden egyes variáns esetében az első oszlop (T1259C variáns: „TT”; IVS+G476A variáns: „GG”; C56G variáns: „CC”; C1337T variáns: „CC”). [#]Korrigált OR érték (95% CI): kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin, ischémias szívbetegség, hipertensio, diabetes mellitus, dohányzás- és alkoholfogyasztási szokásokban fennálló különbségekre korrigálva. *p<0.05 vs. kontroll csoport.

Az egyes lókuszok önálló genetikai analízisén kívül, a *GCKR* gén C1337T variánsának és az *APOA5* polimorfizmusainak speciális kombinációit is elemeztük, az eredményeket a 7. táblázat foglalja össze. Az önálló *APOA5* genotípusokat a *GCKR* gén C1337T genotípusával kombinálva tanulmányoztuk. Négy csoportot képeztünk az összes *APOA5* variánsból a következőképpen: NH_{C1337T}-NH_{T-1131C}; NH_{C1337T}-H_{T-1131C}; H_{C1337T}-NH_{T-1131C} és H_{C1337T}-H_{T-1131C}, ahol az „NH” (nem hordozó) jelöli a vad genotípust; a „H” (hordozó) a variáns minor allél hordozását. A genotípusok speciális kombinációjában – összehasonlítva az egyedi esélyhányados értékeivel – az OR értékek jelentős emelkedést mutattak az egyes csoportokban, szignifikánsan hajlamosítottak a stroke kialakulására. A stroke relatív kockázata emelkedett volt a H_{C1337T}-H_{T-1131C} kis ér-, nagy ér-, kevert ér etiológiájú csoportokban és az összes stroke-os betegben; a H_{C1337T}-H_{IVS+G476A} a kis ér-, a kevert ér csoportokban és az összes stroke-os betegben; a H_{C1337T}-H_{C56G} nagy ér-, a kevert ér csoportokban, valamint az összes stroke-os betegben (7. táblázat). A H_{C1337T}-H_{T-1131C} esetében alacsonyabb OR értékek mutatkoztak az összes stroke-os betegben, valamint a nagy ér és kevert ér etiológiájú csoportokban. A többi kombinációban nem tudtuk detektálni a betegségre való hajlamosítást. Habár az egyedi *APOA5* variánsok szignifikáns asszociációt mutattak az emelkedett nem-éhgyomri triglicerid-szinttel az összes stroke alcsoportban, a specifikus genotípus kombinációkban csak a H_{C1337T}-H_{T1259C}, H_{C1337T}-H_{IVS+G476A} (kis ér, összes stroke-os beteg) és a H_{C1337T}-H_{C56G} (összes stroke-os beteg) csoportoknál jelentkezett hasonló hatás (7. táblázat).

7. Táblázat: Az APOA5 és GCKR génvariánsok specifikus kombinációjának hatás-vizsgálata és logisztikus regressziós analízise.

		<i>GCKR</i> C1337T - <i>APOA5</i> T-1131C		<i>GCKR</i> C1337T - <i>APOA5</i> T1259C		<i>GCKR</i> C1337T - <i>APOA5</i> IVS+G476A		<i>GCKR</i> C1337T - <i>APOA5</i> C56G	
		NH _{C1337T} -NH _{T-1131C}	H _{C1337T} -H _{T-1131C}	NH _{C1337T} -NH _{T1259C}	H _{C1337T} -H _{T1259C}	NH _{C1337T} -NH _{IVS+G476A}	H _{C1337T} -H _{IVS+G476A}	NH _{C1337T} -NH _{C56G}	H _{C1337T} -H _{C56G}
Kísér (n=232)		(n=47)	(n=25)	(n=44)	(n=31)	(n=48)	(n=24)	(n=50)	(n=22)
	TG	1.65±0.05	1.79±0.13	1.67±0.06	1.88±0.10*	1.67±0.06	1.92±0.12*	1.60±0.06	1.96±0.16
	OR [#]	1	2.809* (1.189-6.631)	1	1.483 (0.727-3.028)	1	4.400* (1.545-12.533)	1	2.200 (0.918-5.272)
Nagyér (n=139)		(n=28)	(n=15)	(n=27)	(n=19)	(n=30)	(n=10)	(n=31)	(n=18)
	TG	1.73±0.13	1.96±0.26	1.70±0.14	1.96±0.18	1.71±0.12	2.22±0.29	1.77±0.12	2.02±0.16
	OR [#]	1	2.619* (1.010-6.790)	1	1.481 (0.665-3.303)	1	2.993 (0.911-9.447)	1	2.903* (1.155-7.297)
Kevert (n=142)		(n=27)	(n=16)	(n=25)	(n=21)	(n=27)	(n=14)	(n=30)	(n=17)
	TG	1.84±0.13	1.84±0.20	1.83±0.13	1.80±0.16	1.84±0.13	1.98±0.22	1.93±0.13	1.89±0.14
	OR [#]	1	2.897* (1.124-7.467)	1	1.768 (0.797-3.923)	1	4.563* (1.477-14.096)	1	2.833* (1.117-7.186)
Összes beteg (n=513)		(n=102)	(n=65)	(n=96)	(n=71)	(n=105)	(n=48)	(n=111)	(n=57)
	TG	1.72±0.05	1.86±0.09	1.72±0.06	1.88±0.08*	1.73±0.05	2.00±0.10*	1.74±0.06	1.95±0.09*
	OR [#]	1	2.780* (1.267-6.102)	1	1.557 (0.832-2.913)	1	4.023* (1.501-10.783)	1	2.568* (1.173-5.622)
Kontroll (n=172)		(n=44)	(n=9)	(n=40)	(n=19)	(n=44)	(n=5)	(n=45)	(n=9)
	TG	1.53±0.09	1.68±0.10	1.54±0.10	1.63±0.08	1.55±0.09	1.70±0.18	1.57±0.09	1.61±0.06

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek. A triglicerid – szint értékei mmol/l-ben értendők.
 „NH”: hordozza a vad genotípust; „H”: legkevesebb egy variáns allélt hordoz az alsó indexben jelölt SNP-ből.
[#]OR a „NH-NH” genotípushoz lett viszonyítva, (95% CI). *p<0.05.

A *GCKR* gén C1337T polimorfizmusa asszociációt mutat triglicerid-szint változással és hajlamosíthat a diabetes mellitus kialakulására. A 1337T allél hordozása emelkedett triglicerid-szinttel, de alacsonyabb éhgyomri plazma glükóz-szinttel társul; a dyslipidemiára való hajlam magasabb, viszont a hyperglycemiára való hajlam csökken. Az általunk tanulmányozott populációban a diabeteses egyedeknél emelkedett hajlamot figyeltünk meg az ischémias stroke kialakulására (8. táblázat). Következésképpen, megvizsgáltuk a *GCKR* gén C1337T variánsának hatását a diabetes mellitusban szenvedő stroke betegekben; a *GCKR* gén minor allélje (1337T) homozigóta formában két stroke alcsoportban is (kis ér etiológiájú csoport, az összes stroke-os beteg) rizikófaktornak bizonyult a stroke manifesztációjának viszonylatában, azonban a statisztikailag alacsony mintaszám miatt messzemenő következtetéseket ezekből az eredményekből nem vonhatunk le (8. táblázat).

8. Táblázat: A *GCKR* gén C1337T variánsának vizsgálata logisztikus regressziós analízissel cukorbetegségben szenvedő ischémias stroke-os betegekben.

	Diabetes mellitus-os stroke betegek			
	Kisér (n=47; 20.3%)	Nagyér (n=35; 25.2%)	Kevert (n=40; 28.2%)	Összes beteg (n=122; 23.8%)
Korrigált OR[#]	3.69* (1.805 – 7.546)	4.537* (2.145 – 9.59)	6.157* (2.916 – 13.005)	4.395* (2.284 – 8.459)
Korrigált OR[#] a <i>GCKR</i> gén rs1260326 variánsának homozigóta genotípusára	5.278* (1.091 – 25.54)	4.229 (0.796 – 22.468)	3.591 (0.693 – 18.613)	4.855* (1.16 – 21.315)

*p<0.05.
[#]Korrigált OR értékek: nem, szérum összcholeszterin, triglicerid szintekben fennálló különbségekre korrigálva.

5.2 A GALNT2 és MLXIPL génlókuszok vizsgálata

A tanulmányozott populáció általános klinikai paramétereit a 9. táblázat tartalmazza. Mind a triglicerid-szint mind az összkoleszterin-szint értékek szignifikánsan magasabbak voltak a stroke betegpopulációban, mint a kontroll csoportban.

9. Táblázat: A GALNT2 és MLXIPL génvariánsok vizsgálatában részt vevő stroke-os betegek és kontroll egyének klinikai és laboratóriumi paramétereit.

	Stroke-os betegcsoport				Kontroll (n=156)
	Kisér (n=212)	Nagyér (n=127)	Kevert (n=128)	Összes beteg (n=467)	
Nem (férfi/nő)	83/129	51/76	52/76	186/281	44/112
Életkor (év)	64.95 ±0.99	66.35 ±1.29	63.46 ±1.11	64.91±0.65	56.49±1.29
BMI (kg/m ²)	25.2±0.13	24.72±0.26	24.78±0.15	24.9±0.10	23.88±0.18
Triglicerid (mmol/l)	1.68±0.03*	1.80±0.06*	1.77±0.06*	1.74±0.03*	1.55±0.04
Összkoleszterin (mmol/l)	5.87±0.08*	5.93±0.11*	5.88±0.13*	5.89±0.06*	5.31±0.07
*p<0.05 vs. kontrollcsoport Az értékek ± SEM-ként szerepelnek.					

A vizsgált SNP-ek allélfrekvencia-eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúly elvárásainak a beteg és kontroll csoportokban egyaránt (10. táblázat). A megfigyelt allélfrekvenciákban nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és a kontrollok között egyik polimorfizmus esetében sem. Eredményeink egyezést mutattak az európai eredetű kaukázusi populáció közölt allélfrekvencia-adataival (www.hapmap.org). A 11. táblázat tartalmazza a logisztikus regressziós számítás eredményeit, mely során az OR értékek korrigálása után (kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin-szint, ischémias szívbetegség, hipertensio, diabetes mellitus, dohányzás- és alkoholfogyasztás) kiderült, hogy a vizsgált populációban sem az rs4846914-G sem az rs17145738-C sem az rs3812316-C variánsok nem hajlamosítanak ischémias stroke kialakulására még homozigóta formában sem. Ahhoz, hogy minden egyes polimorfizmus rizikó alléljének önálló hatását elemezni tudjuk, a genotípusoknak megfelelően vizsgáltuk a triglicerid- és összkoleszterin-szinteket az összes stroke-os betegben, valamint az egyes alcsoportokban.

Összevetettük az egyes lipidértékeket a stroke-os betegekben a normál és a hetero- illetve homozigóta hordozók csoportjaiban. Azonban a populációs mintában egyik variánsnál sem tudtunk detektálni szérumban triglicerid és összkoleszterin-szint értékekben bekövetkezett változást (12. táblázat). Az rs17145738, rs3812316 és az rs4846914 polimorfizmusoknál az átlag vér lipid koncentráció nem különbözött szignifikánsan a heterozigóta és homozigóta hordozókban a nem-hordozókhoz képest, egyik stroke-os betegcsoportban sem.

10. Táblázat: A *GALNT2* és az *MLXIPL* génlókuszok variánsainak alléleloszlása az egyes stroke alcsoportokban és a kontroll egyénekben.

	Stroke-os betegcsoport								Kontroll (n=156)	
	Kisér (n=212)		Nagyér (n=127)		Kevert (n=128)		Összes beteg (n=467)			
<i>GALNT2</i> rs4846914	AA (n=70)	AG+GG (n=96+46)	AA (n=36)	AG+GG (n=64+27)	AA (n=49)	AG+GG (n=57+22)	AA (n=155)	AG+GG (n=217+95)	AA (n=55)	AG+GG (n=76+25)
G allél frekvencia	44.34%		46.46%		39.46%		43.58%		40.39%	
<i>MLXIPL</i> rs17145738	TT (n=4)	TC+CC (n=54+154)	TT (n=2)	TC+CC (n=28+97)	TT (n=2)	TC+CC (n=23+103)	TT (n=8)	TC+CC (n=105+354)	TT (n=3)	TC+CC (n=40+113)
C allél frekvencia	85.37%		87.40%		89.45%		87.04%		85.25%	
<i>MLXIPL</i> rs3812316	GG (n=5)	GC+CC (n=44+163)	GG (n=2)	GC+CC (n=25+100)	GG (n=4)	GC+CC (n=18+106)	GG (n=11)	GC+CC (n=87+369)	GG (n=3)	GC+CC (n=34+119)
C allél frekvencia	87.26%		88.58%		89.84%		88.32%		87.17%	
*p<0.05 vs. kontroll csoport.										

11. Táblázat: A GALNT2 és az MLXIPL génlókuszok variánsainak logisztikus regressziós analízise.

	Stroke-os betegcsoport			
	Kísér (n=212)	Nagyér (n=127)	Kevert (n=128)	Összes beteg (n=467)
GALNT2 rs4846914 OR				
G allél hordozók	1.021 (0.579-1.802)	1.801 (0.928-3.497)	1.277 (0.667-2.446)	1.318 (0.821-2.116)
GG homoizigóták	1.104 (0.548-2.225)	1.202 (0.565-2.560)	1.214 (0.545-2.705)	1.174 (0.653-2.112)
MLXIPL rs17145738 OR				
C allél hordozók	3.933 (0.347 – 44.609)	1.238 (0.119 – 12.855)	2.058 (0.146 – 28.985)	1.877 (0.299 – 11.777)
CC homoizigóták	1.435 (0.762-2.702)	1.047 (0.524-2.093)	1.264 (0.616-2.593)	1.229 (0.734-2.055)
MLXIPL rs3812316 OR				
C allél hordozók	1.015 (0.138-7.459)	1.238 (0.119 – 12.855)	0.226 (0.031-1.654)	0.682 (0.141-3.295)
CC homoizigóták	1.825 (0.962-3.597)	1.085 (0.537-2.194)	1.653 (0.771-3.544)	1.354 (0.793-2.313)

[#]Korrigált OR érték (95% CI): kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin, ischémias szívbetegség, hipertensio, diabetes mellitus, dohányzás- és alkoholfogyasztási szokásokban fennálló különbségekre korrigálva. *p<0.05.

12. Táblázat: A GALNT2 és az MLXIPL génlókuszok polimorfizmusainak lipidparaméterekre gyakorolt hatása a genotípus függvényében.

		<i>GALNT2</i> rs4846914			<i>MLXIPL</i> rs17145738			<i>MLXIPL</i> rs3812316		
		Triglicerid	Összkoleszterin	Triglicerid	Összkoleszterin	Triglicerid	Összkoleszterin			
Stroke betegcsoport	Kísér (n=212)	AA n=70	1.69±0.06	5.74±0.13	TT n=4	1.73±0.06	5.78±0.88	GG n=5	1.6±0.10	5.24±0.23
		AG n=96	1.70±0.06	5.98±0.13	TC n=54	1.73±0.07	5.96±0.12	GC n=44	1.67±0.08	6.04±0.13
		GG n=46	1.63±0.06	5.84±0.16	CC n=154	1.67±0.04	5.84±0.1	CC n=163	1.69±0.04	5.84±0.09
		AG+GG n=96+46	1.68±0.04	5.94±0.09	TC+CC n=54+154	1.68±0.03	5.87±0.08	GC+CC n=44+163	1.68±0.03	5.89±0.08
	Nagyér (n=127)	AA n=36	1.64±0.09	6.08±0.21	TT n=2	1.05±0.15	6.15±0.75	GG n=2	1.05±0.15	6.15±0.75
		AG n=64	1.83±0.10	5.73±0.15	TC n=28	1.91±0.17	5.91±0.23	GC n=25	1.94±0.19	5.7±0.22
		GG n=27	1.96±0.14	6.22±0.28	CC n= 97	1.79±0.07	5.94±0.13	CC n=100	1.79±0.07	5.99±0.13
		AG+GG n=64+27	1.87±0.08	5.88±0.13	TC+CC n=28+97	1.81±0.06	5.93±0.11	GC+CC n=25+100	1.82±0.06	5.93±0.11
	Kévert (n=128)	AA n=49	1.77±0.09	6.05±0.24	TT n=2	1.50±0.10	8.55±0.05	GG n=4	2.1±0.24	7.40±1.4
		AG n=57	1.79±0.1	5.81±0.17	TC n=23	1.52±0.11	5.78±0.32	GC n=18	1.53±0.13	6.01±0.38
		GG n=22	1.69±0.12	5.64±0.21	CC n=103	1.83±0.07	5.85±0.14	CC n=106	1.79±0.07	5.79±0.13
		AG+GG n=57+22	1.76±0.08	5.77±0.14	TC+CC n=23+103	1.77±0.06	5.83±0.12	GC+CC n=18+106	1.76±0.06	5.83±0.12
	Összes beteg (n=467)	AA n=155	1.71±0.04	5.92±0.11	TT n=8	1.50±0.11	6.56±0.61	GG n=11	1.7±0.18	6.19±0.57
		AG n=217	1.77±0.05	5.87±0.08	TC n=105	1.73±0.07	5.91±0.11	GC n=87	1.72±0.07	5.94±0.12
		GG n=95	1.74±0.06	5.90±0.12	CC n=354	1.75±0.03	5.87±0.07	CC n=369	1.75±0.03	5.87±0.07
		AG+GG n=217+95	1.76±0.04	5.88±0.07	TC+CC n=105+354	1.74±0.03	5.88±0.06	GC+CC n=87+369	1.74±0.03	5.88±0.06
Kontroll (n=156)	AA n=55	1.63±0.08	5.31±0.12	TT n=3	1.47±0.15	4.97±0.98	GG n=3	1.47±0.15	4.97±0.98	
	AG n=76	1.49±0.05	5.30±0.11	TC n=40	1.55±0.08	5.21±0.15	GC n=34	1.53±0.09	5.28±0.16	
	GG n=25	1.55±0.50	5.37±0.15	CC n=113	1.56±0.05	5.37±0.08	CC n=119	1.56±0.05	5.34±0.08	
	AG+GG n=76+25	1.51±0.04	5.32±0.09	TC+CC n=40+113	1.55±0.04	5.32± 0.07	GC+CC n=34+119	1.55±0.04	5.32±0.07	

Az értékek ± SEM-ként szerepelnek. *p<0.05 vs. nem hordozó egyének, minden egyes variáns esetében az első sor: rs4846914: „AA”; rs1714573: „TT”; rs3812316: „GG”. A triglicerid és összkoleszterin – szint értékei mmol/l-ben értendők.

5.3. Az ANGPTL3, CILP2 és a TRIB1 génlókuszok vizsgálata

A vizsgált ischemiás stroke-os betegek és kontroll csoport főbb jellemzőit, általános laboratóriumi paramétereit a 13. táblázat tartalmazza. A kontrollokhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb szérumszintű összkoleszterin- és triglicerid-szintet detektáltunk az összes stroke alcsoportban, valamint az összes stroke-os betegben. A variánsok allélfrekvencia eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúly követelményeinek, a betegekben és a kontrollokban egyaránt (14. táblázat). A vizsgált rs16996148, rs17321515, rs12130333 variánsok allélfrekvenciáinak összehasonlítása során nem tudtunk szignifikáns eltérést kimutatni az egyes stroke alcsoportok, az összes stroke-os beteg és a kontrollok között egyik polimorfizmus esetében sem.

A 15. táblázat a stroke alcsoportok és kontroll egyének szérumszintű triglicerid- és összkoleszterin-szint adatait foglalja össze. A vizsgált funkcionális variánsok hordozása és a szérumszintű triglicerid- és összkoleszterin-szint között nem találtunk összefüggést. A minor allélt (rs16996148-T, rs17321515-G, rs12130333-T) hordozókban, a szintén nem tudtunk megfigyelni szignifikáns változást a betegség kockázatára nézve az OR értékek (16. táblázat) korrigálása után (kor, nem, BMI, szérumszintű összkoleszterin-szint, ischemiás szívbetegség, hipertensio, diabetes mellitus, dohányzás- és alkoholfogyasztás).

13. Táblázat: Az rs12130333 (ANGPTL3 lókusz), rs16996148 (CILP2 lókusz) és rs17321515 (TRIB1 lókusz) variánsok kapcsán vizsgált betegek és kontrollok klinikai és laboratóriumi paramétereit.

	Stroke-os betegcsoport				Kontroll (n=168)
	Kisér (n=183)	Nagyér (n=135)	Kevert (n=141)	Összes beteg (n=459)	
Nem (férfi/nő)	65/118	55/80	58/83	178/281	48/120
Életkor (év)	65.2 ± 1.05	66.4 ± 1.23	63.8 ± 1.06	65.1 ± 0.64	56.4 ± 1.20
BMI (kg/m ²)	25.2 ± 0.14	24.7 ± 0.24	24.8 ± 0.14	25.0 ± 0.10	23.9 ± 0.17
Triglicerid (mmol/l)	1.68 ± 0.04*	1.79 ± 0.06*	1.76 ± 0.06*	1.74 ± 0.03*	1.53 ± 0.04
Összkoleszterin (mmol/l)	5.86 ± 0.09*	5.93 ± 0.11*	5.90 ± 0.12*	5.89 ± 0.06*	5.37 ± 0.07

*p<0.05 vs. kontrollcsoport
Az értékek ± SEM-ként szerepelnek.

14. Táblázat: Az rs12130333-ANGPTL3-, rs16996148-CILP2- és rs17321515-TRIB1- polimorfizmusok alléloszlása a stroke-os betegekben és a kontroll csoportban.

	Stroke-os betegcsoport								Kontroll (n=168)	
	Kisér (n=183)		Nagyér (n=135)		Kevert (n=141)		Összes beteg (n=459)		GG	TG+TT
CILP2 rs1699614	GG n=152	TG+TT n=29+2	GG n=117	TG+TT n=18+0	GG n=124	TG+TT n=17+0	GG n=393	TG+TT n=64+2	GG n=145	TG+TT n=21+2
T allele frequency	9.0%		6.67%		6.03%		7.41%		7.44%	
TRIB1 rs1732151	AA n=46	GA+GG n=98+39	AA n=34	GA+GG n=79+22	AA n=34	GA+GG n=65+42	AA n=114	GA+GG n=242+103	AA n=54	GA+GG n=75+39
G allele frequency	48.1%		45.6%		52.8%		48.8%		45.5%	
ANGPTL3 rs1213033	CC n=118	TC+TT n=59+6	CC n=92	TC+TT n=39+4	CC n=91	TC+TT n=45+5	CC n=301	TC+TT n=143+15	CC n=114	TC+TT n=44+10
T allele frequency	19.4%		17.4%		19.5%		18.9%		19.0%	
*p<0.05 vs. kontroll csoport.										

15. Táblázat: Az rs12130333-ANGPTL3, rs16996148-CILP2 és rs17321515-TRIB1 polimorfizmusok hatásának vizsgálata a lipidparaméterek változásaira nézve.

	Stroke-os betegcsoport								Kontroll (n=168)	
	Kisér (n=183)		Nagyér (n=135)		Kevert (n=141)		Összes beteg (n=459)			
CILP2 rs16996148	GG n=152	TG+TT n=29+2	GG n=117	TG+TT n=18+0	GG n=124	TG+TT n=17+0	GG n=393	TG+TT n=64+2	GG n=145	TG+TT n=21+2
Triglicerid (mmol/l)	1.68±0.04	1.66±0.10	1.77±0.06	1.89±0.19	1.79±0.06	1.56±0.15	1.74±0.03	1.70±0.08	1.55±0.04	1.43±0.08
Összkoleszterin (mmol/l)	5.87±0.09	5.80±0.21	5.99±0.12	5.58±0.31	5.86±0.12	6.18±0.36	5.90±0.06	5.84±0.16	5.38±0.08	5.30±0.20
TRIB1 rs17321515	AA n=46	GA+GG n=98+39	AA n=34	GA+GG n=79+22	AA n=34	GA+GG n=65+42	AA n=114	GA+GG n=242+103	AA n=54	GA+GG n=75+39
Triglicerid (mmol/l)	1.75±0.08	1.65±0.04	1.77±0.10	1.79±0.07	1.70±0.11	1.78±0.06	1.74±0.06	1.73±0.03	1.51±0.05	1.54±0.05
Összkoleszterin (mmol/l)	5.73±0.19	5.90±0.09	5.99±0.18	5.91±0.13	5.65±0.26	5.98±0.13	5.79±0.12	5.93±0.07	5.31±0.13	5.40±0.09
ANGPTL3 rs12130333	CC n=118	TC+TT n=59+6	CC n=92	TC+TT n=39+4	CC n=91	TC+TT n=45+5	CC n=301	TC+TT n=143+15	CC n=114	TC+TT n=44+10
Triglicerid (mmol/l)	1.70±0.05	1.63±0.06	1.79±0.08	1.78±0.10	1.78±0.07	1.73±0.08	1.75±0.04	1.70±0.05	1.51±0.05	1.58±0.06
Összkoleszterin (mmol/l)	5.90±0.12	5.78±0.12	5.98±0.13	5.84±0.19	5.76±0.15	6.15±0.19	5.88±0.08	5.91±0.09	5.38±0.09	5.35±0.13

Az értékek ± SEM-ként szerepelnek. *p<0.05 vs. nem hordozó egyének, minden egyes variáns esetében az első sor: rs16996148: „GG”; rs17321515: „AA”; rs12130333: „CC”. A triglicerid és összkoleszterin – szint értékei mmol/l-ben értendők.

16. Táblázat: Az rs12130333-ANGPTL3, rs16996148-CILP2 és rs17321515-TRIB1 variánsok hordozásának vizsgálata az ischemiás stroke-os betegcsoportokban a logisztikus regresszió statisztikai modelljével.

		Stroke-os betegcsoport			
		Kisér (n=183)	Nagyér (n=135)	Kevert (n=141)	Összes beteg (n=459)
CILP2 rs16996148	Korrigált OR [#]	1.641 (0.762 - 3.534)	0.824 (0.341 - 1.993)	0.598 (0.230 - 1.551)	1.050 (0.556 - 1.983)
TRIB1 rs17321515	Korrigált OR [#]	1.640 (0.885 - 3.036)	1.718 (0.876 - 3.370)	1.656 (0.859 - 3.195)	1.563 (0.965 - 2.533)
ANGPTL3 rs12130333	Korrigált OR [#]	0.927 (0.512 - 1.677)	1.260 (0.681 - 2.334)	0.941 (0.490 - 1.805)	1.078 (0.669 - 1.737)

[#]Korrigált OR érték (95% CI): kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin, ischemiás szívbetegség, hipertensio, diabetes mellitus, dohányzás- és alkoholfogyasztási szokásokban fennálló különbségekre korrigálva. *p<0.05.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. Az APOA5 és GCKR gének egyedi és együttes szerepe

Hosszú idő óta a trigliceridek szerepe a különböző cerebrovasculáris betegségekben, beleértve az ischemiás stroke-ot is a kutatások középpontjában áll¹⁰. Az eredmények továbbra is vitatottak, a triglicerid emelkedés mechanizmusának feltérképezése már elkezdődött, így lehetőség nyílt az *APOA5* és *GCKR* gének lehetséges szerepének tisztázására^{15,16,32,33}. A posztgenomikus korszak kezdete óta számos új gént azonosítottak, melyek hatással vannak a triglicerid metabolizmusra, így az *APOA5* gén variánsai is^{18,24,25,111,115}. Ezek a polimorfizmusok -pl. C56G- képesek befolyásolni a protein transzkripciót, ami másodlagosan módosíthatja az *APOA5* és a lipoprotein lipáz közötti interakciót, végül a keringésben lévő triglicerid-szintek emelkedéséhez vezet^{113,115,121}. Az *APOA5* gén leggyakrabban előforduló variánsai közül a T-1131C, T1259C, C56G és az IVS3+G476A polimorfizmusokról már számos populációban bebizonyosodott, hogy előfordulásuk és az emelkedett triglicerid-szintek között kapcsolat van, valamint néhány variáns ezek közül a cardio- és cerebrovasculáris megbetegedések független rizikófaktora is^{18,24,25,101,111,115}. Jelenlegi vizsgálatainkban meg tudtuk erősíteni a korábbi kutatások eredményeit, miszerint van összefüggés az egyes polimorfizmusok és a triglicerid-szint emelkedés valamint a stroke kialakulása között.

Saxena és munkatársai több polimorfizmust azonosítottak, köztük a *GCKR* gén variánsát is, melyek összefüggésben állnak a megemelkedett triglicerid-szinttel¹⁵³. A *GCKR* génben bekövetkező aminosav-csere a protein működését befolyásolja, egy megnövekedett gátló aktivitást eredményez, mely révén a GCKR a fruktóz-1-foszfáttal szembeni csökkent szenzitivitásának köszönhetően a glükokináz fokozott regulációjához vezet, ami diabetesre hajlamosíthat.

A Diabetes Genetics Initiative (DGI) teljes genom asszociációs tanulmánya a II-es típusú diabetes és a mennyiségi metabolikus jellegek kapcsán egy intronikus polimorfizmust írt le, a *GCKR* gén rs780094 variánsát¹⁵³. Ez a SNP asszociációt mutatott az alacsonyabb éhgyomri glycemával, a kisebb inzulin rezisztenciával, valamint kisebb valószínűséggel alakult ki a II-es típusú diabetes a minor allélt hordozó egyedekben¹⁵³.

Korábban már kiderült, hogy az rs780094 variáns erős kapcsoltságban áll egy másik, nem-szinoním *GCKR* variánssal (rs1260326)¹⁵⁴. Az rs1260326 (Leu446Pro) összefüggésben áll az emelkedett plazma triglicerid-szinttel, védhet az éhgyomri glycemiával és az insulinemiával szemben¹⁵⁴. Egy tanulmány szerint a *GCKR* gén rs1260326 variánsának T minor allélje védő szerepet tölthet be a diabetes mellitus II-es típusával szemben¹⁵⁴. Annak ellenére, hogy az rs1260326 T minor allélje emelkedett triglicerid-szinttel társult és magasabb rizikóval a dyslipidemiára, a hordozókban mégis alacsonyabb éhgyomri glükóz-szint és kisebb kockázat jelentkezett a hyperglycemiára¹⁵⁴. Más kutatócsoportok a *GCKR* gén és az emelkedett triglicerid-szint közötti viszonyt vizsgálták és mindkét SNP esetében pozitív asszociációt tudtak kimutatni, mind az rs780094, mind az rs1260326 esetében^{112,163}.

A magyar populációban, az ischemiás stroke-os betegekben a *GCKR* gén szerepét ezidáig nem kutatták, ezért tanulmányunk egyik célja volt, hogy megvizsgáljuk a génvariáns, valamint a lehetséges összefüggéseket a genotípus és a triglicerid-szintek változásai között. Célunk volt továbbá a triglicerid-szintek és a stroke kialakulására való hajlam vizsgálata a *GCKR* és *APOA5* génvariánsok genotípus kombinációinak esetében.

Az *APOA5* gén T-1131C, IVS+G476A és C56G polimorfizmusa esetén szignifikáns allélfrekvencia eltérést figyelhettünk meg a stroke-os betegekben a kontroll csoporttal összehasonlítva, valamint asszociációt mutattak a szignifikánsan emelkedett triglicerid-szintekkel a stroke-os betegekben a kontrollokkal egybevetve és szoros összefüggést detektálhattunk az ischemiás stroke manifesztációjával is. Ezzel szemben a *GCKR* gén rs1260326 variánsának vizsgálatakor, nem tudtunk szignifikáns eltérést detektálni az allél frekvenciában a kontroll csoporttal összehasonlítva, és szignifikáns triglicerid-szint eltérést sem találtunk. Az általunk tanulmányozott populációban a *GCKR* gén rs1260326 variánsa nem hajlamosított az ischemiás stroke megbetegedésre. Ugyanakkor az összes stroke-os alcsoportban megfigyelhetővé vált az alacsony mintaszám ellenére, hogy a diabetes mellitusban szenvedő betegek szignifikánsan magasabb hajlammal rendelkeznek az ischemiás stroke megbetegedésre. Tanulmányozták a *GCKR* gén rs780094 és az *APOA5* gén T-1131C és C56G polimorfizmusainak additív illetve szinergisztikus hatásait, és pozitív asszociációt találtak az emelkedett éhgyomri triacylglycerol-szinttel és hypertrigliceridemiával¹⁶². Az *APOA5* és *GCKR* gének rizikó alléljeit kombinálva a két gén additív hatását írták le és pozitív összefüggést mutattak ki az éhgyomri triacylglycerol és hypertrigliceridemia.

Munkánk során a *GCKR* (rs1260326) és az *APOA5* gén variánsainak (T-1131C, T1259C, IVS+G476A és C56G) genotípus kombinációit vizsgálva, szignifikáns összefüggéseket tudtunk kimutatni, - mind a triglicerid-szintekben, mind az OR értékekben az ischémias stroke-ra nézve – összehasonlítva a gének önálló hatásaival.

Összefoglalva eddigi eredményeinket, megállapítható, hogy az *APOA5* gén minor alléljei esetében magasabb allélfrekvenciát tudtunk kimutatni a stroke-os betegekben, mint a kontroll csoportban, valamint a tanulmányozott variánsok és a triglicerid-szint emelkedés között szignifikáns összefüggést tudtunk detektálni. Az *APOA5* polimorfizmusok lehetséges rizikófaktorként mutatkoztak a magyar populációban az ischémias stroke manifesztációjában a vizsgálatok során. A *GCKR* gén esetében semmiféle triglicerid-szint emelő hatást sem figyeltünk meg, valamint a betegségre való hajlamot sem tudtuk igazolni, így elmondható, hogy a *GCKR* gén a magyar populációban nem bizonyult független rizikófaktornak az ischémias stroke kialakulására nézve. Az *APOA5* és *GCKR* gének négy kombinációjának vizsgálata során azt találtuk, hogy a különböző alcsoportokban ezen gének kombinációja emelkedett hajlamot mutatott a stroke manifesztációjában.

6.2. A GALNT2 és az MLXIPL génlókuszok szerepe

Több tanulmány hangsúlyozza a pozitív asszociációt az emelkedett plazma triglicerid koncentráció és az ischemiás stroke között^{94,95}.

Az általunk tanulmányozott SNP-ek, az *MLXIPL* génlókusz rs17145738 és rs3812316 variánsainak és a *GALNT2* gén rs4846914 polimorfizmusának^{112,163,177} triglicerid-szint emelő szerepét már korábban leírták, és azok független rizikófaktorként jelennek meg a cardiovascularis betegségekben^{118,193}, valamint az ischemiás stroke pathogenezisét előidéző atherosclerosisban is van jelentőségük¹. Az *MLXIPL* gén rs17145738 variánsa a különböző populációkban asszociációt mutatott az emelkedett triglicerid-szinttel, így az európai, dél-ázsiai és a kínai populációban¹⁹⁴ és egy olasz populációban is¹⁹⁵, azonban a HDL-koleszterinrel való korrelációt Kathiresan és munkatársai nem tudták megerősíteni¹⁶³. Eredményeinkben nem tudtunk az rs17143758 polimorfizmus és a triglicerid vagy koleszterin-szint között asszociációt felfedni, valamint nem találtunk nagyobb hajlamot a variánsok kapcsán a stroke manifesztációjára sem.

Az *MLXIPL* gén rs3812316 variánsának vizsgálatakor a különböző kutatócsoportok eltérő eredményekre jutottak. A japán populációban igazolni tudták a polimorfizmus és az emelkedett triglicerid-szint közötti korrelációt¹⁹⁶, azonban a közép-európai populációban nem tudták megismételni ezeket az eredményeket¹⁹⁷. A magyar populáció vizsgálata hasonló eredménnyel zárult, szintén nem tudtunk korrelációt kimutatni az rs3812316 és a plazma triglicerid-szint koncentrációja, valamint az összkoleszterin-szint értékek között, illetve a stroke-ra való hajlamosítás között.

Az rs3812316 SNP az *MLXIPL* glükóz indukálta aktivációjáért felelős, evolúciósan konzervált doménjében található¹⁹⁸, erősen kapcsolatos az rs17145738 variánst tartalmazó régióval. Azt, hogy vizsgálataink során a két *MLXIPL* variáns közül egyiknél sem találtunk összefüggést a SNP-ek és a triglicerid-szintek, valamint a stroke manifesztációja között, a két polimorfizmus kapcsoltsága megerősíti.

A harmadik variáns, a *GALNT2* rs4846914 változata, melyet triglicerid-szint emelő és HDL-koleszterin-szint csökkentő polimorfizmusként írtak le¹⁶³. A későbbi kutatások megerősítették a HDL-koleszterin-szint változásokkal való összefüggését, de a triglicerid-szinttel való asszociációját nem tudták alátámasztani^{194,199}.

Jelenlegi kutatásainkban mi sem találtunk az rs4846914 és a plazma triglicerid-, vagy az összkoleszterin-szint között asszociációt. Ugyanakkor ez a polimorfizmus nem bizonyult hajlamosító faktornak az ischémias stroke-ra sem. Vélhetőleg a genetikai és környezeti tényezők interakciója együttesen befolyásolja az eredményeket a különböző populációkban. Mindent egybevetve, eredményeink azt sugallják, hogy a magyar stroke-os betegekben az rs17145738, rs3812316 és az rs4846914 polimorfizmusok nincsenek asszociációban a plazma emelkedett triglicerid koncentrációjával, és nem hajlamosítanak az ischémias stroke kialakulására sem.

6.3. Az ANGPTL3, CILP2 és a TRIB1 génlókuszok szerepe

Vizsgálataink célja volt, hogy tisztázzuk három, újonnan leírt variáns lehetséges összefüggését az ischemiás stroke kialakulására való hajlammal, és a triglicerid-értékkel a magyar populációban^{112,163}. A tanulmányozott polimorfizmusokat, az rs16996148 (*CILP2* lókusz), az rs17321515 (*TRIB1* lókusz) és az rs12130333 (*ANGPTL3* lókusz) már korábban leírták triglicerid-szint csökkentő variánsokként^{112,163}.

Korábban már felfedezték az rs16996148 (*CILP2* lókusz), az rs17321515 (*TRIB1* lókusz) és az rs12130333 (*ANGPTL3* lókusz) polimorfizmusok és a dyslipidemia közötti asszociációt¹⁷⁶. Willer és kollégái egy ettől független tanulmányban ezeket az eredményeket megerősítették és kimutatták a coronaria betegségre való összefüggést is¹¹².

A magyar populációban az *ANGPTL3* lókusz rs12130333 variánsának szerepét vizsgáltuk az ischemiás stroke-os betegcsoportban. Annak ellenére, hogy ez a polimorfizmus intergénikus, mivel erősen kapcsolt a triglicerid-szint csökkenéssel asszociációt mutató *ANGPTL3* génnel^{163,183,200}, feltételeztük, hogy ez az asszociáció a triglicerid-szint csökkenésre fenn áll az rs12130333 variáns esetében is.

Jóval kevesebb ismeretanyaggal rendelkezünk a cartilage intermediate-layer proteinről (*CILP*) és a human tribbles-1 génről (*TRIB1*). Egy teljes genom asszociációs tanulmányban az rs16996148 polimorfizmust a *CILP2* génlókusz mellett triglicerid-szint csökkentő variánsként detektálták¹⁶³. Azonban ezt az eredményt sem a japán¹⁹⁶, sem az általunk vizsgált magyar populációban nem tudtuk alátámasztani, mert a variáns a vizsgálatok szerint nem mutatott asszociációt a plazma triglicerid koncentrációinak változásával, és a stroke-ra való hajlammal.

A humán tribbles-1 génlókusz elemzése során, az rs17321515 polimorfizmus esetében sem tudunk semmiféle kapcsolatot megfigyelni a triglicerid-szint változás és az ischemiás stroke manifesztációja között. Összegzésként elmondhatjuk, hogy a magyar ischemiás stroke-os betegpopulációban nem találtunk szignifikáns korrelációt az analizált variánsok és a triglicerid-szint változások között.

7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- I. Az *APOA5* gén természetes variánsainak vizsgálata során megállapítottuk, hogy minden stroke-os csoportban és a kontroll egyénekben is szignifikánsan magasabb plazma triglicerid-szint jelent meg a -1131C, 56G, IVS3+476A és 1259C allélek hordozásakor.
- II. A *GCKR* gén 1337T alléljének hordozásakor egyik stroke csoportban sem mutatkozott plazma triglicerid-szint eltérés, sőt a *GCKR* allélek több esetben az *APOA5* gén polimorfizmusainak triglicerid-szint emelő hatását is lerontották.
- III. Az *APOA5* gén -1131C és az IVS3+476A allélek hordozása független rizikófaktorként jelentkezett minden stroke-os csoportban. A C56G variáns esetében is a fenti megfigyeléseket tettük, a kísér etiológiájú csoport kivételével. Az *APOA5* gén T1259C polimorfizmusa és a *GCKR* gén C1337T variánsa nem bizonyult hajlamosító tényezőnek az ischémias stroke kialakulásában.
- IV. Az *APOA5* és *GCKR* gének természetes genotípus kombinációk minor alléljének hordozása hajlamosít a különböző stroke alcsoportokban a stroke kialakulására a következő kombinációkban: *GCKR* C1337T - *APOA5* T-1131C; *GCKR* C1337T - *APOA5* IVS+G476A ; *GCKR* C1337T - *APOA5* C56G. A *GCKR* C1337T - *APOA5* T1259C genotípus kombináció nem bizonyult független kockázati tényezőnek.
- V. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az *MLXIPL* génlókusz rs17145738 és rs3812316, valamint a *GALNT2* génlókusz rs4846914 polimorfizmusai ischémias stroke-os betegekben nem társulnak emelkedett plazma triglicerid koncentrációval, és nem hajlamosítanak az ischémias stroke kialakulására.
- VI. Az *ANGPTL3* lókusz rs12130333, a *CILP2* lókusz rs16996148 és a *TRIB1* lókusz rs17321515 variánsai nem mutattak szignifikáns összefüggést sem a triglicerid-szint változásokkal, sem az ischémias stroke-ra való hajlammal a magyar populációban.

8. PUBLIKÁCIÓS LISTA

8.1 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Járomi L, Csöngéi V, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyarai L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. Functional variants of glucokinase regulatory protein and apolipoprotein A5 genes in ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2010, Oct 22.
IF: 2.061 (2008)
2. Polgár N, Járomi L, Csöngéi V, Maász A, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALTN2 and MLXIPL in ischemic stroke patients. *Eur J Neurol.* 2010, Febr 10.
IF: 2.732 (2008)
3. Járomi L, Csöngéi V, Polgár N, Rappai G, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Sáfrány E, Sipeky C, Magyarai L, Melegh B. Triglyceride level-influencing functional variants of the ANGPTL3, CILP2 and TRIB1 loci in ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2010 (Közlés alatt.).
IF: 1.435 (2008)

8.2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Kocsis, M., **Járomi, L.**, Putnoky, P., Kozma P., Borhidi, A., Genetic diversity among twelve grape cultivars indigenous to the Carpathian Basin revealed by RAPD markers, *Vitis*, 2005, 44(2):87-91. IF: 1.012 (2005)
2. Magyari, L, Bene, J., Komlósi, K, Talián, G, Faragó, B, Csöngéi, V, **Járomi, L**, Sáfrány, E, Sipeky, C., Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B., Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C Combination Defined TC Haplotype in Hungarian Ulcerative Colitis Patients, *Pathology Oncology Research*, 2007, 13(1):53-56. IF: 1.241 (2007)
3. Maász, A., Kiszfali, P., Horvatovich, K., Mohás, M., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., **Járomi, L.** Magyari, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B., Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, *Journal of Pathology Oncology Research*, . 2007, 13(3):243-7. IF: 1.272 (2007)
4. Faragó, B., Magyari, L., Sáfrány, E., Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Horvatovich, K., Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Gyetvai, Á., Szekanecz Z., Czirják, L., Melegh, B., Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis, *Ann Rheum Dis* Published, doi:10.1136/ard.2007.072819; 2008 Feb;67(2):248-50. IF: 6.411 (2008)
5. Maasz, A., Kiszfali, P., **Járomi L.**, Horvatovich, K., Szolnoki, Z., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Sipeky, C., Hadarits, F., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke, *Circulation Journal*, 2008, 72(7):1065-70. IF: 2.373 (2008)
6. Lakner, L., Csöngéi, V., Sarlos, P., **Járomi, L.**, Sáfrány, E., Varga, M., Orosz, P., Magyari, L., Bene, J., Miheller, P., Tulassay, Z., Melegh, B. IGR2096a_1 T and IGR2198a_1 C alleles on IBD5 locus of chromosome 5q31 region confer risk for Crohn's disease in Hungarian patients. *Int.J.Colorectal Dis.*, 2009, 24(5):503-507. IF: 1.767 (2008)
7. Sipeky, Cs., Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Sáfrány, E., Polgar, N., Lakner, L., Szabó, M., Takács, I., Melegh, B. Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) haplotypes in average Hungarian and in Roma population samples. *Pharmacogenomics*, 2009 Jun;10(6):1025-32. IF: 3.551 (2008)
8. Sáfrány, E., Pazár, B., Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Polgar, N., Sipeky, Cs., Horváth, F. I., Zeher, M., Poór, Gy., Melegh, B. Variants of the IL23R gene are associated with ankylosing spondylitis but not with Sjögren syndrome in Hungarian population samples. *Scandinavian J. of Immunology*, 2009 Jul;70(1):68-74. IF: 2.186 (2008)

9. Sáfrány, E., Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Maász, A., Magyar, L., Sipeky, Cs., Melegh, B., Mitochondrial DNA and its mutations: novel fields in a new era (in Hungarian: A mitokondriális DNS és mutációi: újabb ismeretek egy új területen), Hungarian Medical Journal (in Hungarian: Orvosi Hetilap), 2007, 148(21):971-978.

10. Lakner L, Csöngéi V, Magyar L, Varga M, Miheller P, Sarlós P, Orosz P, Bári Z, Takács I, **Járomi L.**, Sáfrány E, Sipeky C, Bene J, Tulassay Z, Döbrönte Z, Melegh B., Possible role of selected IGR and SLC22A4/SLC22A5 loci in development of inflammatory bowel diseases, Hungarian Medical Journal (in Hungarian: Orvosi Hetilap), 2008, 149(7):325-8. 2009 Jul 19;150(29):1375-80.

11. Horvatovich, K., Orkenyi, M., Bíró, E., Pongrácz, K., Kiszfali, P., Talián, G., Csöngéi, V., **Járomi L.**, Sáfrány, E., Harangi, F., Sulyok, E., Melegh, B., Pseudo-Bartter syndrome in a case of cystic fibrosis caused by C1529G and G3978A compound heterozygosity, Hungarian Medical Journal (in Hungarian: Orvosi Hetilap), 2008, 149(7):325-8.

12. Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Sáfrány, E., Sipeky, C., Magyar, L., Faragó, B., Bene, J., Polgar, N., Lakner, L., Sarlos, P., Varga, M., Melegh, B. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. World J. Gastroenterol., 2010, 16(2):176-83. IF: 2.081 (2008)

13. Sáfrány, E., Hobor, R., Jakab, L., Tarr, T., Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Sipeky, Cs., Valasek, A., Zeher, M., Fust, G., Czirjak, L., Melegh, B. Interleukin-23 receptor gene variants in Hungarian systemic lupus erythematosus patients. Inflamm Res., 2010 Feb;59(2):159-64. IF: 1.457 (2008)

14. Horvatovich K, Bokor S., Baráth Á., Kiszfali, P., **Járomi L.**, Répásy, J., Endreffy, E., Molnár, D., Melegh B. Haplotype analyses of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. Int. J. Pediatr. Obes. 2010. IF: 3.984 (2008) (közlés alatt).

Összesített impakt faktor: 33,553.

8.3. IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

1. Kocsis, M., **Járomi, L.**, Kozma, P., Borhidi, A., Characterization of Hungarian grapevine cultivars using molecular markers, 14th Federation of European Societies of Plant Biology, Cracow (Poland), 23rd-27th August 2004
2. **Járomi, L.**, Maász, A., Szolnoki, Z., Kisfali, P., Horvatovich, K., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th -19th June 2007.
3. Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Maász, A., Magyarai, L., Horvatovich, K., Faragó, B., Takács, I., Melegh, B., Polymorphisms of the MDR1 gene in Hungarian Roma population samples, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th - 19th June 2007.
4. Maász, A., Horvatovich, K., Kisfali, P., Mohás, M., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., **Járomi, L.**, Magyarai, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B., Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th -19th June 2007.
5. Sipeky, Cs., Csöngéi, V., Faragó, B., Horvatovich, K., **Járomi, L.**, Magyarai, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Polimorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th -19th June 2007.
6. Sáfrány, E., Faragó, B., Csöngéi, V., Magyarai, L., Maász, A., Sipeky, Cs., **Járomi, L.**, Horvatovich, K., Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th -19th June 2007.
7. Faragó, B., Magyarai, L., Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Sáfrány, E., Horvatovich, K., Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th -19th June 2007.
8. Magyarai, L., Faragó, B., Sáfrány, E., Csöngéi, V., Horvatovich, K., **Járomi, L.**, Sipeky, Cs., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A variant in inflammatory disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th -19th June 2007.

9. Kisfali, P., Mohás, M., Horvatovich, K., Maász, A., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., **Járomi, L.**, Magyarai, L., Sáfrány, E., Sipeky, cs., Wittman, I., Melegh, B., Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome, European Human Genetics Conference, Nice (France), 16th-19th June 2007.
10. Maász, A., Kisfali, P., **Járomi, L.**, Szolnoki, Z., Hadarits, F., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke, European Human Genetics Conference, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
11. Sipeky, Cs., Csöngéi, V., Faragó, B., Horvatovich, K., **Járomi, L.**, Kisfali, P., Maász, A., Magyarai, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Haplotype profile of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) as determinant of warfarin sensitivity in Roma population, European Human Genetics Conference, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
12. Sáfrány, E., Csöngéi, V., **Járomi, L.**, Magyarai, L., Maász, A., Sipeky, Cs., Zeher, M., Melegh, B., Interleukin-23 receptor (IL23R) gene polymorphisms in patients with Sjögren syndrome, European Human Genetics Conference, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
13. Csöngéi, V., Magyarai, L., Sáfrány, E., Faragó, B., **Járomi, L.**, Sipeky, Cs., Takács, I., Orosz, P., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A variant in inflammatory disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis, European Human Genetics Conference, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
14. **Járomi, L.**, Csöngéi, V., Magyarai, L., Talián, G., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Lakner, L., Melegh, B., Prevalence of IGR2198A_1 and IGR2096A_1 genetic variants in Hungarian patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, European Human Genetics Conference, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
15. Magyarai, L., Talián, G., Csöngéi, V., Bene, J., Komlósi, K., **Járomi, L.**, Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Melegh, B., Prevalence of IGR2230A_1 genotypes in Hungarian Crohn's disease and ulcerative colitis patients, European Human Genetics Conference, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
16. **Járomi, L.**, Csöngéi, V., Magyarai, L., Talián, G., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Chikhi, M., Lakner, L., Melegh, B., IGR2198a_1 és IGR2096a_1 genetikai variánsainak vizsgálata magyar Crohn betegekben, MHGT Conference, Pécs (Hungary), 11st - 13rd July 2008.
17. Magyarai, L., Talián, G., Csöngéi, V., Bene, J., Komlósi, K., **Járomi, L.**, Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Papp, E., Melegh, B., IGR2230A_1 genotípus vizsgálata magyar Morbus Crohnos és colitis ulcerosás betegpopulációban, MHGT Conference, Pécs (Hungary), 11st - 13rd July 2008.

18. Csöngei, V., Magyar, L., Sáfrány, E., Faragó, B., **Járomi, L.**, Sipeky, Cs., Takács, I., Orosz, P., Tóth, D., László, Z., Oksai, J., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A és ATG16L1 T300A kapcsolatának vizsgálata magyar Crohn betegekben, MHGT Conference, Pécs (Hungary), 11st - 13rd July 2008.
19. **Járomi, L.**, Csöngei, V., Sáfrány, E., Faragó, B., Magyar, L., Horvatovich, K., Maász, A., Sipeky, Cs., Melegh, B., Analysis of GCKR and ApoA5 genes in Hungarian patients with ischemic stroke, European Human Genetics Conference, Vienna (Austria), 23rd - 26th May 2009.
20. Sipeky, Cs., Sáfrány, E., Csöngei, V., **Járomi, L.**, Kisfali, P., Maász, A., Polgár, N., Bene J., Takács, I., Melegh, B., Comparison of VKORC1 haplotype profile and CYP2C9 polymorphisms as determinants of coumarin dose in Hungarian and Roma population samples, European Human Genetics Conference, Vienna (Austria), 23rd - 26th May 2009.
21. Sipeky, Cs., Csöngei, V., Faragó, B., Horvatovich, K., **Járomi, L.**, Maász, A., Magyar, L., Kisfali, P., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Vitamin K epoxide reductase haplotypes in Roma and average Hungarian samples, Fourth Santorini Conference Biologie Prospective, Santorini (Greece), 21st -23rd Sep 2008. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Vol.46. No.8., 2008.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Mackay, J. & Mensah, G. A. The Atlas of Heart Disease and Stroke. 2004. World Health Organization, Geneva, 2004.
2. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics 2009.
3. Bonita, R., Stewart, A, Beaglehole, R. International trends in stroke mortality: 1970-1985. *Stroke* 1990;**21**:989-992.
4. Bogousslavsky J, Hennerici MG, Kaste M, *et al.* The Mannheim Declaration of Stroke in Eastern Europe. Accepted at the 13th European Stroke Conference, Mannheim-Heidelberg, Germany, May 12-15, 2004. *Cerebrovasc Dis.* 2004;**18**(3):248.
5. Amarenco, P., Cohen, A, Tzourio, C *et al.* Atherosclerotic disease of the aortic arch and the risk of ischemic stroke. *N.Engl.J.Med.* 1994;**331**:1474-1479.
6. Barrett-Connor, E., Khaw, K T. Diabetes mellitus: an independent risk factor for stroke? *Am.J.Epidemiol.* 1988;**128**:116-123.
7. Bereczki, D., Mihalka, L, Fekete, I *et al.* The Debrecen Stroke Database: demographic characteristics, risk factors, stroke severity and outcome in 8088 consecutive hospitalised patients with acute cerebrovascular disease. *Int.J.Stroke* 2009;**4**:335-339.
8. Ellekjaer, E. F., Wyller, T B, Sverre, J M, Holmen, J. Lifestyle factors and risk of cerebral infarction. *Stroke* 1992;**23**:829-834.
9. Eschenfelder, C., Zeller, J A, Stingle, R. [Stroke: causes and classification]. *Hamostaseologie.* 2006;**26**:298-308.
10. Freiberg, J. J., Tybjaerg-Hansen, A, Jensen, J S, Nordestgaard, B G. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *JAMA* 2008;**300**:2142-2152.
11. Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B G, Schnohr, P, Tybjaerg-Hansen, A. Single nucleotide polymorphism in the low-density lipoprotein receptor is associated with a threefold risk of stroke. A case-control and prospective study. *Eur.Heart J.* 2004;**25**:943-951.
12. Gill, J. S., Shipley, M J, Tsementzis, S A *et al.* Cigarette smoking. A risk factor for hemorrhagic and nonhemorrhagic stroke. *Arch.Intern.Med.* 1989;**149**:2053-2057.
13. Gillman, M. W., Cupples, L A, Millen, B E, Ellison, R C, Wolf, P A. Inverse association of dietary fat with development of ischemic stroke in men. *JAMA* 1997;**278**:2145-2150.
14. Goldstein, L. B., Perry, A. Early recurrent ischemic stroke. A case-control study. *Stroke* 1992;**23**:1010-1013.

15. Hachinski, V., Graffagnino, C, Beaudry, M *et al.* Lipids and stroke: a paradox resolved. *Arch.Neurol.* 1996;**53**:303-308.
16. Haheim, L. L., Holme, I, Hjermann, I, Leren, P. Risk factors of stroke incidence and mortality. A 12-year follow-up of the Oslo Study. *Stroke* 1993;**24**:1484-1489.
17. Haheim, L. L., Holme, I, Hjermann, I, Leren, P. Smoking habits and risk of fatal stroke: 18 years follow up of the Oslo Study. *J.Epidemiol.Community Health* 1996;**50**:621-624.
18. Havasi, V., Szolnoki, Z, Talian, G *et al.* Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. *J.Mol.Neurosci.* 2006;**29**:177-183.
19. Humphrey, P. Stroke and transient ischaemic attacks. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1994;**57**:534-543.
20. Jorgensen, H. S., Nakayama, H, Reith, J, Raaschou, H O, Olsen, T S. Stroke recurrence: predictors, severity, and prognosis. The Copenhagen Stroke Study. *Neurology* 1997;**48**:891-895.
21. Keli, S., Bloemberg, B, Kromhout, D. Predictive value of repeated systolic blood pressure measurements for stroke risk. The Zutphen Study. *Stroke* 1992;**23**:347-351.
22. Khaw, K. T. Epidemiology of stroke. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1996;**61**:333-338.
23. Labreuche, J., Touboul, P J, Amarenco, P. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis* 2009;**203**:331-345.
24. Maasz, A., Kisfali, P, Jaromi, L *et al.* Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circ.J.* 2008;**72**:1065-1070.
25. Maasz, A., Kisfali, P, Szolnoki, Z, Hadarits, F, Melegh, B. Apolipoprotein A5 gene C56G variant confers risk for the development of large-vessel associated ischemic stroke. *J.Neurol.* 2008;**255**:649-654.
26. Norris, J. W., Zhu, C Z. Stroke risk and critical carotid stenosis. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1990;**53**:235-237.
27. Pedro-Botet, J., Senti, M, Nogues, X *et al.* Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke. Role of lipoprotein(a), triglyceride-rich lipoproteins, and apolipoprotein E polymorphism. *Stroke* 1992;**23**:1556-1562.
28. Ridker, P. M., Stampfer, M J, Hennekens, C H. Plasma concentration of lipoprotein(a) and the risk of future stroke. *JAMA* 1995;**273**:1269-1273.

29. Ridker, P. M., Hennekens, C H, Lindpaintner, K *et al.* Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N.Engl.J.Med.* 1995;**332**:912-917.
30. Rothwell, P. M., Coull, A J, Silver, L E *et al.* Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet* 2005;**366**:1773-1783.
31. Saidi, S., Slamia, L B, Ammou, S B, Mahjoub, T, Almawi, W Y. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with ischemic stroke involving large-vessel disease and its relation to serum lipid levels. *J.Stroke Cerebrovasc.Dis.* 2007;**16**:160-166.
32. Salonen, J. T., Puska, P, Tuomilehto, J, Homan, K. Relation of blood pressure, serum lipids, and smoking to the risk of cerebral stroke. A longitudinal study in Eastern Finland. *Stroke* 1982;**13**:327-333.
33. Simons, L. A., McCallum, J, Friedlander, Y, Simons, J. Risk factors for ischemic stroke: Dubbo Study of the elderly. *Stroke* 1998;**29**:1341-1346.
34. Szolnoki, Z., Somogyvari, F, Kondacs, A *et al.* Evaluation of the modifying effects of unfavourable genotypes on classical clinical risk factors for ischaemic stroke. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 2003;**74**:1615-1620.
35. Tuomilehto, J., Rastenyte, D, Jousilahti, P, Sarti, C, Vartiainen, E. Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke. Prospective study of the middle-aged Finnish population. *Stroke* 1996;**27**:210-215.
36. Wiklund, P. G., Nilsson, L, Ardnor, S N *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke: replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts. *Stroke* 2005;**36**:1661-1665.
37. You, R. X., Thrift, A G, McNeil, J J, Davis, S M, Donnan, G A. Ischemic stroke risk and passive exposure to spouses' cigarette smoking. Melbourne Stroke Risk Factor Study (MERFS) Group. *Am.J.Public Health* 1999;**89**:572-575.
38. Magyar Stroke Társaság, EU parliament. Agyérbetegségek. *Agyérbetegségek* 2004;**2004**;10(4):2-3.:
39. Walt G. WHO's World Health Report 2003. *BMJ* 2004;**328**:6:
40. Bamford, J., Sandercock, P, Dennis, M *et al.* A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community: the Oxfordshire Community Stroke Project 1981-86. 1. Methodology, demography and incident cases of first-ever stroke. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1988;**51**:1373-1380.
41. Bamford, J., Sandercock, P, Dennis, M, Burn, J, Warlow, C. A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community: the Oxfordshire Community Stroke Project--1981-86. 2. Incidence, case fatality rates and overall outcome at one year of cerebral infarction, primary intracerebral and subarachnoid haemorrhage. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1990;**53**:16-22.

42. Chung CS, C. LR. Stroke and other neurovascular disorders in *Textbook of Clinical Neurology*. (2007).
43. Goldstein LB. Prevention and management of stroke. in *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. (2007).
44. Zivin JA. Hemorrhagic cerebrovascular disease. in *Cecil Medicine*. (2007).
45. Caplan LR. *Stroke: A Clinical Approach*(1993).
46. Fisher, M. Potentially effective therapies for acute ischemic stroke. *Eur.Neurol.* 1995;**35**:3-7.
47. Grosset, D. G. What have drugs to offer the patient with acute stroke? *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1992;**33**:467-472.
48. Pessin, M. S., Estol, C J, Lafranchise, F, Caplan, L R. Safety of anticoagulation after hemorrhagic infarction. *Neurology* 1993;**43**:1298-1303.
49. Bateman, B. T., Schumacher, H C, Boden-Albala, B *et al.* Factors associated with in-hospital mortality after administration of thrombolysis in acute ischemic stroke patients: an analysis of the nationwide inpatient sample 1999 to 2002. *Stroke* 2006;**37**:440-446.
50. Chambless, L. E., Folsom, A R, Davis, V *et al.* Risk factors for progression of common carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987-1998. *Am.J.Epidemiol.* 2002;**155**:38-47.
51. Haley, E. C., Jr., Kassell, N F, Torner, J C. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. The North American experience. *Stroke* 1992;**23**:205-214.
52. Kopitnik, T. A., Samson, D S. Management of subarachnoid haemorrhage. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1993;**56**:947-959.
53. Nichols, D. A. Endovascular treatment of the acutely ruptured intracranial aneurysm. *J.Neurosurg.* 1993;**79**:1-2.
54. Arnold, A. M., Psaty, B M, Kuller, L H *et al.* Incidence of cardiovascular disease in older Americans: the cardiovascular health study. *J.Am.Geriatr.Soc.* 2005;**53**:211-218.
55. Borrell, L. N., Diez Roux, A V, Rose, K, Catellier, D, Clark, B L. Neighbourhood characteristics and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Int.J.Epidemiol.* 2004;**33**:398-407.
56. Eigenbrodt, M. L., Rose, K M, Couper, D J *et al.* Orthostatic hypotension as a risk factor for stroke: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study, 1987-1996. *Stroke* 2000;**31**:2307-2313.
57. Fitzpatrick, A. L., Kuller, L H, Ives, D G *et al.* Incidence and prevalence of dementia in the Cardiovascular Health Study. *J.Am.Geriatr.Soc.* 2004;**52**:195-204.

58. Rosano, C., Newman, A B, Katz, R, Hirsch, C H, Kuller, L H. Association between lower digit symbol substitution test score and slower gait and greater risk of mortality and of developing incident disability in well-functioning older adults. *J.Am.Geriatr.Soc.* 2008;**56**:1618-1625.
59. Rose, K. M., Carson, A P, Catellier, D *et al.* Women's employment status and mortality: the atherosclerosis risk in communities study. *J.Womens Health (Larchmt.)* 2004;**13**:1108-1118.
60. Sturgeon, J. D., Folsom, A R, Longstreth, W T, Jr. *et al.* Risk factors for intracerebral hemorrhage in a pooled prospective study. *Stroke* 2007;**38**:2718-2725.
61. Lindstrom, E., Boysen, G, Nyboe, J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *BMJ* 1994;**309**:11-15.
62. Staessen, J. A., Kuznetsova, T, Stolarz, K. Hypertension prevalence and stroke mortality across populations. *JAMA* 2003;**289**:2420-2422.
63. Whelton, P. K. Epidemiology of hypertension. *Lancet* 1994;**344**:101-106.
64. Wolf-Maier, K., Cooper, R S, Banegas, J R *et al.* Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 2003;**289**:2363-2369.
65. Collins, R., MacMahon, S. Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease. *Br.Med.Bull.* 1994;**50**:272-298.
66. Hakala, S. M., Tilvis, R S, Strandberg, T E. Blood pressure and mortality in an older population. A 5-year follow-up of the Helsinki Ageing Study. *Eur.Heart J.* 1997;**18**:1019-1023.
67. Langer, R. D., Criqui, M H, Barrett-Connor, E L, Klauber, M R, Ganiats, T G. Blood pressure change and survival after age 75. *Hypertension* 1993;**22**:551-559.
68. Goldstein, L. B., Adams, R, Becker, K *et al.* Primary prevention of ischemic stroke: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke* 2001;**32**:280-299.
69. Kurth, T., Moore, S C, Gaziano, J M *et al.* Healthy lifestyle and the risk of stroke in women. *Arch.Intern.Med.* 2006;**166**:1403-1409.
70. Lemaitre, R. N., Weiss, N S, Smith, N L *et al.* Esterified estrogen and conjugated equine estrogen and the risk of incident myocardial infarction and stroke. *Arch.Intern.Med.* 2006;**166**:399-404.
71. Reynolds, K., Lewis, B, Nolen, J D *et al.* Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2003;**289**:579-588.

72. Shinton, R., Shipley, M, Rose, G. Overweight and stroke in the Whitehall study. *J.Epidemiol.Community Health* 1991;**45**:138-142.
73. Shinton, R., Sagar, G, Beevers, G. Body fat and stroke: unmasking the hazards of overweight and obesity. *J.Epidemiol.Community Health* 1995;**49**:259-264.
74. KANNEL, W. B., DAWBER, T R, KAGAN, A, REVOTSKIE, N, STOKES, J, III. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann.Intern.Med.* 1961;**55**:33-50.
75. Meigs, J. B., Nathan, D M, D'Agostino, R B, Sr., Wilson, P W. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2002;**25**:1845-1850.
76. Wannamethee, G., Shaper, A G. Physical activity and stroke in British middle aged men. *BMJ* 1992;**304**:597-601.
77. Kida, Y. Age and sex as independent risk factors for stroke among patients with atrial fibrillation. *JAMA* 2003;**290**:2937.
78. Wang, T. J., Massaro, J M, Levy, D *et al.* A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *JAMA* 2003;**290**:1049-1056.
79. Wassertheil-Smoller, S., Hendrix, S L, Limacher, M *et al.* Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. *JAMA* 2003;**289**:2673-2684.
80. Rapp, S. R., Espeland, M A, Shumaker, S A *et al.* Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;**289**:2663-2672.
81. Gillum, R. F., Mussolino, M E, Ingram, D D. Physical activity and stroke incidence in women and men. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am.J.Epidemiol.* 1996;**143**:860-869.
82. Manson, J. E., Gaziano, J M, Spelsberg, A *et al.* A secondary prevention trial of antioxidant vitamins and cardiovascular disease in women. Rationale, design, and methods. The WACS Research Group. *Ann.Epidemiol.* 1995;**5**:261-269.
83. Buring, J. E., Hebert, P, Romero, J *et al.* Migraine and subsequent risk of stroke in the Physicians' Health Study. *Arch.Neurol.* 1995;**52**:129-134.
84. Whisnant, J. P. Modeling of risk factors for ischemic stroke. The Willis Lecture. *Stroke* 1997;**28**:1840-1844.
85. Wolf, P. A., Abbott, R D, KANNEL, W B. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991;**22**:983-988.
86. Cheng, T. O. Stroke and atrial fibrillation. *Stroke* 1991;**22**:1086.

87. Candelise, L., Pinardi, G, Morabito, A. Mortality in acute stroke with atrial fibrillation. The Italian Acute Stroke Study Group. *Stroke* 1991;**22**:169-174.
88. Woo, J., Lau, E, Lam, C W *et al.* Hypertension, lipoprotein(a), and apolipoprotein A-I as risk factors for stroke in the Chinese. *Stroke* 1991;**22**:203-208.
89. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;**106**:3143-3421.
90. Amarenco, P., Steg, P G. The paradox of cholesterol and stroke. *Lancet* 2007;**370**:1803-1804.
91. Lewington, S., Whitlock, G, Clarke, R *et al.* Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 2007;**370**:1829-1839.
92. Amarenco, P., Labreuche, J, Touboul, P J. High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis* 2008;**196**:489-496.
93. Rizos, E., Mikhailidis, D P. Are high density lipoprotein (HDL) and triglyceride levels relevant in stroke prevention? *Cardiovasc.Res.* 2001;**52**:199-207.
94. Patel, A., Barzi, F, Jamrozik, K *et al.* Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Circulation* 2004;**110**:2678-2686.
95. Tanne, D., Koren-Morag, N, Graff, E, Goldbourt, U. Blood lipids and first-ever ischemic stroke/transient ischemic attack in the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Registry: high triglycerides constitute an independent risk factor. *Circulation* 2001;**104**:2892-2897.
96. Wannamethee, S. G., Shaper, A G, Ebrahim, S. HDL-Cholesterol, total cholesterol, and the risk of stroke in middle-aged British men. *Stroke* 2000;**31**:1882-1888.
97. Baroni, M. G., Berni, A, Romeo, S *et al.* Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC.Med.Genet.* 2003;**4**:8.
98. Izar, M. C., Fonseca, F A, Ihara, S S *et al.* Risk Factors, biochemical markers, and genetic polymorphisms in early coronary artery disease. *Arq Bras.Cardiol.* 2003;**80**:379-395.
99. Kathiresan, S., Melander, O, Anevski, D *et al.* Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N.Engl.J.Med.* 2008;**358**:1240-1249.

100. Ma, X., Bacci, S, Mlynarski, W *et al.* A common haplotype at the CD36 locus is associated with high free fatty acid levels and increased cardiovascular risk in Caucasians. *Hum.Mol.Genet.* 2004;**13**:2197-2205.
101. Martinelli, N., Trabetti, E, Bassi, A *et al.* The -1131 T>C and S19W APOA5 gene polymorphisms are associated with high levels of triglycerides and apolipoprotein C-III, but not with coronary artery disease: an angiographic study. *Atherosclerosis* 2007;**191**:409-417.
102. Morrison, A. C., Bare, L A, Chambless, L E *et al.* Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am.J.Epidemiol.* 2007;**166**:28-35.
103. Ordovas, J. M., Civeira, F, Genest, J, Jr. *et al.* Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991;**87**:75-86.
104. Paulweber, B., Friedl, W, Krempler, F, Humphries, S E, Sandhofer, F. Genetic variation in the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1988;**73**:125-133.
105. Seidelmann, S. B., Li, L, Shen, G Q, Topol, E J, Wang, Q K. Identification of a novel locus for triglyceride on chromosome 1p31-32 in families with premature CAD and MI. *J.Lipid Res.* 2008;**49**:1034-1038.
106. Souverein, O. W., Jukema, J W, Boekholdt, S M, Zwinderman, A H, Tanck, M W. Polymorphisms in APOA1 and LPL genes are statistically independently associated with fasting TG in men with CAD. *Eur.J.Hum.Genet.* 2005;**13**:445-451.
107. Stark, K., Reinhard, W, Grassl, M *et al.* Common polymorphisms influencing serum uric acid levels contribute to susceptibility to gout, but not to coronary artery disease. *PLoS.One.* 2009;**4**:e7729.
108. Szalai, C., Keszei, M, Duba, J *et al.* Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;**173**:109-114.
109. Tai, E. S., Sim, X L, Ong, T H *et al.* Polymorphisms at newly identified lipid-associated loci are associated with blood lipids and cardiovascular disease in an Asian Malay population. *J.Lipid Res.* 2009;**50**:514-520.
110. Trichopoulou, A., Yiannakouris, N, Bamia, C *et al.* Genetic predisposition, nongenetic risk factors, and coronary infarct. *Arch.Intern.Med.* 2008;**168**:891-896.
111. Vaessen, S. F., Schaap, F G, Kuivenhoven, J A *et al.* Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J.Lipid Res.* 2006;**47**:2064-2070.

112. Willer, C. J., Sanna, S, Jackson, A U *et al.* Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat.Genet.* 2008;**40**:161-169.
113. Yang, Y., Ruiz-Narvaez, E, Niu, T, Xu, X, Campos, H. Genetic variants of the lipoprotein lipase gene and myocardial infarction in the Central Valley of Costa Rica. *J.Lipid Res.* 2004;**45**:2106-2109.
114. Yiannakouris, N., Trichopoulou, A, Benetou, V *et al.* A direct assessment of genetic contribution to the incidence of coronary infarct in the general population Greek EPIC cohort. *Eur.J.Epidemiol.* 2006;**21**:859-867.
115. Pennacchio, L. A., Rubin, E M. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2003;**23**:529-534.
116. Groenendijk, M., Cantor, R M, De Bruin, T W, Dallinga-Thie, G M. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2001;**157**:1-11.
117. Lee, J. C., Weissglas-Volkov, D, Kyttala, M *et al.* USF1 contributes to high serum lipid levels in Dutch FCHL families and U.S. whites with coronary artery disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007;**27**:2222-2227.
118. Nordestgaard, B. G., Benn, M, Schnohr, P, Tybjaerg-Hansen, A. [Non-fasting triglycerides and risk of for myocardial infarction and death among women and men]. *Ugeskr.Laeger* 2007;**169**:3865-3868.
119. Miller, N. E., Miller, G J. Letter: High-density lipoprotein and atherosclerosis. *Lancet* 1975;**1**:1033.
120. Pennacchio, L. A., Olivier, M, Hubacek, J A *et al.* An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;**294**:169-173.
121. Wright, W. T., Young, I S, Nicholls, D P *et al.* SNPs at the APOA5 gene account for the strong association with hypertriglyceridaemia at the APOA5/A4/C3/A1 locus on chromosome 11q23 in the Northern Irish population. *Atherosclerosis* 2006;**185**:353-360.
122. Yamada, Y., Kato, K, Hibino, T *et al.* Prediction of genetic risk for metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2007;**191**:298-304.
123. Maasz, A., Kisfali, P, Horvatovich, K *et al.* Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol.Oncol.Res.* 2007;**13**:243-247.
124. Martin, S., Nicaud, V, Humphries, S E, Talmud, P J. Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. *Biochim.Biophys.Acta* 2003;**1637**:217-225.
125. Talmud, P. J., Hawe, E, Martin, S *et al.* Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum.Mol.Genet.* 2002;**11**:3039-3046.

126. Kao, J. T., Wen, H C, Chien, K L, Hsu, H C, Lin, S W. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum.Mol.Genet.* 2003;**12**:2533-2539.
127. Warner, J. P., Leek, J P, Intody, S, Markham, A F, Bonthron, D T. Human glucokinase regulatory protein (GCKR): cDNA and genomic cloning, complete primary structure, and chromosomal localization. *Mamm.Genome* 1995;**6**:532-536.
128. Vaxillaire, M., Vionnet, N, Vigouroux, C *et al.* Search for a third susceptibility gene for maturity-onset diabetes of the young. Studies with eleven candidate genes. *Diabetes* 1994;**43**:389-395.
129. Hayward, B. E., Dunlop, N, Intody, S *et al.* Organization of the human glucokinase regulator gene GCKR. *Genomics* 1998;**49**:137-142.
130. Hayward, B. E., Fantes, J A, Warner, J P *et al.* Co-localization of the ketohexokinase and glucokinase regulator genes to a 500-kb region of chromosome 2p23. *Mamm.Genome* 1996;**7**:454-458.
131. Wilson, J. E. Hexokinases. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 1995;**126**:65-198.
132. Van Schaftingen, E., Detheux, M, Veiga, d C. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J.* 1994;**8**:414-419.
133. Van Schaftingen, E., Veiga-da-Cunha, M, Niculescu, L. The regulatory protein of glucokinase. *Biochem.Soc.Trans.* 1997;**25**:136-140.
134. Shiota, M., Galassetti, P, Monohan, M, Neal, D W, Cherrington, A D. Small amounts of fructose markedly augment net hepatic glucose uptake in the conscious dog. *Diabetes* 1998;**47**:867-873.
135. de, l., I, Mukhtar, M, Seoane, J, Guinovart, J J, Agius, L. The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J.Biol.Chem.* 2000;**275**:10597-10603.
136. Van Schaftingen, E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur.J.Biochem.* 1989;**179**:179-184.
137. Vandercammen, A., Van Schaftingen, E. The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur.J.Biochem.* 1990;**191**:483-489.
138. Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F, Davies, D R, Vandercammen, A, Van Schaftingen, E. Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets. *Eur.J.Biochem.* 1990;**190**:539-545.
139. Vandercammen, A., Van Schaftingen, E. Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur.J.Biochem.* 1991;**200**:545-551.

140. Detheux, M., Vandekerckhove, J, Van Schaftingen, E. Cloning and sequencing of rat liver cDNAs encoding the regulatory protein of glucokinase. *FEBS Lett.* 1994;**339**:312.
141. Agius, L., Peak, M, Newgard, C B, Gomez-Foix, A M, Guinovart, J J. Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis. *J.Biol.Chem.* 1996;**271**:30479-30486.
142. Wang, H., Iynedjian, P B. Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;**94**:4372-4377.
143. Farrelly, D., Brown, K S, Tieman, A *et al.* Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;**96**:14511-14516.
144. Grimsby, J., Coffey, J W, Dvorozniak, M T *et al.* Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice. *J.Biol.Chem.* 2000;**275**:7826-7831.
145. Futamura, M., Hosaka, H, Kadotani, A *et al.* An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *J.Biol.Chem.* 2006;**281**:37668-37674.
146. Agius, L., Peak, M, Van Schaftingen, E. The regulatory protein of glucokinase binds to the hepatocyte matrix, but, unlike glucokinase, does not translocate during substrate stimulation. *Biochem.J.* 1995;**309** (Pt 3):711-713.
147. Bosco, D., Meda, P, Iynedjian, P B. Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *Biochem.J.* 2000;**348 Pt 1**:215-222.
148. Chu, C. A., Fujimoto, Y, Igawa, K *et al.* Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2004;**286**:G627-G634.
149. Brown, K. S., Kalinowski, S S, Megill, J R, Durham, S K, Mookhtiar, K A. Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* 1997;**46**:179-186.
150. Van Schaftingen, E., Davies, D R. Fructose administration stimulates glucose phosphorylation in the livers of anesthetized rats. *FASEB J.* 1991;**5**:326-330.
151. Slosberg, E. D., Desai, U J, Fanelli, B *et al.* Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 2001;**50**:1813-1820.
152. Orho-Melander, M., Melander, O, Guiducci, C *et al.* Common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. *Diabetes* 2008;**57**:3112-3121.

153. Saxena, R., Voight, B F, Lyssenko, V *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007;**316**:1331-1336.
154. Vaxillaire, M., Cavalcanti-Proenca, C, Dechaume, A *et al.* The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population. *Diabetes* 2008;**57**:2253-2257.
155. Veiga-da-Cunha, M., Delplanque, J, Gillain, A *et al.* Mutations in the glucokinase regulatory protein gene in 2p23 in obese French caucasians. *Diabetologia* 2003;**46**:704-711.
156. Grimsby, J., Sarabu, R, Corbett, W L *et al.* Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 2003;**301**:370-373.
157. Efanov, A. M., Barrett, D G, Brenner, M B *et al.* A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology* 2005;**146**:3696-3701.
158. Magnuson, M. A., Jetton, T L. Evolutionary conservation of elements in the upstream glucokinase promoter. *Biochem.Soc.Trans.* 1993;**21**:160-163.
159. Matschinsky, F. M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996;**45**:223-241.
160. Matschinsky, F. M., Glaser, B, Magnuson, M A. Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* 1998;**47**:307-315.
161. Reiling, E., van 't, R E, Groenewoud, M J *et al.* Combined effects of single-nucleotide polymorphisms in GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B on fasting plasma glucose and type 2 diabetes risk. *Diabetologia* 2009;**52**:1866-1870.
162. Perez-Martinez, P., Corella, D, Shen, J *et al.* Association between glucokinase regulatory protein (GCKR) and apolipoprotein A5 (APOA5) gene polymorphisms and triacylglycerol concentrations in fasting, postprandial, and fenofibrate-treated states. *Am.J.Clin.Nutr.* 2009;**89**:391-399.
163. Kathiresan, S., Melander, O, Guiducci, C *et al.* Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat.Genet.* 2008;**40**:189-197.
164. Tam, C. H., Ma, R C, So, W Y *et al.* Interaction effect of genetic polymorphisms in glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) on metabolic traits in healthy Chinese adults and adolescents. *Diabetes* 2009;**58**:765-769.
165. Meng, X., Lu, X, Li, Z *et al.* Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum.Genet.* 1998;**103**:590-599.

166. Meng, X., Lu, X, Morris, C A, Keating, M T. A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. *Genomics* 1998;**52**:130-137.
167. de Luis, O., Valero, M C, Jurado, L A. WBSR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog. *Eur.J.Hum.Genet.* 2000;**8**:215-222.
168. Kawaguchi, T., Osatomi, K, Yamashita, H, Kabashima, T, Uyeda, K. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 2002;**277**:3829-3835.
169. Kawaguchi, T., Takenoshita, M, Kabashima, T, Uyeda, K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;**98**:13710-13715.
170. Cairo, S., Merla, G, Urbinati, F, Ballabio, A, Reymond, A. WBSR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum.Mol.Genet.* 2001;**10**:617-627.
171. Ma, L., Sham, Y Y, Walters, K J, Towle, H C. A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein Mlx in DNA binding and glucose-regulated transcription. *Nucleic Acids Res.* 2007;**35**:35-44.
172. Ma, L., Robinson, L N, Towle, H C. ChREBP*Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J.Biol.Chem.* 2006;**281**:28721-28730.
173. Uyeda, K., Repa, J J. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006;**4**:107-110.
174. Postic, C., Dentin, R., Denechaud. P.-D. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu.Rev.Nutr.* 2007;**179**-192.
175. Iizuka, K., Horikawa, Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr.J.* 2008;**55**:617-624.
176. Kathiresan, S., Willer, C J, Peloso, G M *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat.Genet.* 2009;**41**:56-65.
177. Kooner, J. S., Chambers, J C, Aguilar-Salinas, C A *et al.* Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat.Genet.* 2008;**40**:149-151.
178. Wang, J., Ban, M R, Zou, G Y *et al.* Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Hum.Mol.Genet.* 2008;**17**:2894-2899.
179. White, T., Bennett, E P, Takio, K *et al.* Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J.Biol.Chem.* 1995;**270**:24156-24165.

180. Bennett, E. P., Weghuis, D O, Merkx, G *et al.* Genomic organization and chromosomal localization of three members of the UDP-N-acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family. *Glycobiology* 1998;**8**:547-555.
181. Conklin, D., Gilbertson, D, Taft, D W *et al.* Identification of a mammalian angiopoietin-related protein expressed specifically in liver. *Genomics* 1999;**62**:477-482.
182. Koishi, R., Ando, Y, Ono, M *et al.* Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat.Genet.* 2002;**30**:151-157.
183. Shimizugawa, T., Ono, M, Shimamura, M *et al.* ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 2002;**277**:33742-33748.
184. Ono, M., Shimizugawa, T, Shimamura, M *et al.* Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *J.Biol.Chem.* 2003;**278**:41804-41809.
185. Yoshida, K., Shimizugawa, T, Ono, M, Furukawa, H. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J.Lipid Res.* 2002;**43**:1770-1772.
186. Merkel, M., Eckel, R H, Goldberg, I J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J.Lipid Res.* 2002;**43**:1997-2006.
187. Romeo, S., Yin, W, Kozlitina, J *et al.* Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J.Clin.Invest* 2009;**119**:70-79.
188. Johnson, K., Farley, D, Hu, S I, Terkeltaub, R. One of two chondrocyte-expressed isoforms of cartilage intermediate-layer protein functions as an insulin-like growth factor 1 antagonist. *Arthritis Rheum.* 2003;**48**:1302-1314.
189. Kiss-Toth, E., Bagstaff, S M, Sung, H Y *et al.* Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J.Biol.Chem.* 2004;**279**:42703-42708.
190. Priya Dedhia, K. K., W. S. P. Trib1 and Trib2 but Not Trib3 Degrade C/EBP α and Induce Acute Myelogenous Leukemia. Acute Myeloid Leukemia - Biology and Pathophysiology Poster II . 2008.
191. Adams, H. P., Jr., Bendixen, B H, Kappelle, L J *et al.* Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993;**24**:35-41.
192. Miller, S. A., Dykes, D D, Polesky, H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;**16**:1215.

193. Bansal, S., Buring, J E, Rifai, N *et al.* Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007;**298**:309-316.
194. Lanktree, M. B., Anand, S S, Yusuf, S, Hegele, R A. Replication of genetic associations with plasma lipoprotein traits in a multiethnic sample. *J.Lipid Res.* 2009;**50**:1487-1496.
195. Murray, A., Cluett, C, Bandinelli, S *et al.* Common lipid-altering gene variants are associated with therapeutic intervention thresholds of lipid levels in older people. *Eur.Heart J.* 2009;**30**:1711-1719.
196. Nakayama, K., Bayasgalan, T, Yamanaka, K *et al.* Large scale replication analysis of loci associated with lipid concentrations in a Japanese population. *J.Med.Genet.* 2009;**46**:370-374.
197. Vrablik, M., Ceska, R, Adamkova, V *et al.* MLXIPL variant in individuals with low and high triglyceridemia in white population in Central Europe. *Hum.Genet.* 2008;**124**:553-555.
198. Li, M. V., Chang, B, Imamura, M, Pongvarin, N, Chan, L. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes* 2006;**55**:1179-1189.
199. Prediction of Cardiovascular Disease Outcomes and Established Cardiovascular Risk Factors by Genome-Wide Association Markers. *Circulation:Cardiovascular Genetics* 2009;**2:7-15**:
200. Koster, A., Chao, Y B, Mosior, M *et al.* Transgenic angiotensin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology* 2005;**146**:4943-4950.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Melegh Béla Professzor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy csatlakozhassak a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Doktori Iskolájában a Multidisziplináris Orvostudományok keretén belül zajló „Humán molekuláris genetika” PhD képzéséhez. Szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította és segítette. Hasznos tanácsai, útmutatásai, meglátásai lehetővé tették számomra, hogy számos kongresszuson részt vehessek, valamint közleményeim megjelenjenek.

Köszönettel tartozom dr. Szolnoki Zoltánnak, aki közreműködött a minták gyűjtésével, a betegadatok feldolgozásával, statisztikai értékelésével kapcsolatban.

Köszönetemet fejezem ki dr. Komáromy Hedvig doktornőnek, aki segítségemre volt az MRI felvételek megfelelő értékelésében, ellátott hasznos szakmai tanácsaival.

Köszönöm dr. Berenténé dr. Bene Juditnak és dr. Polgár Noéminek a munkám során nyújtott szakmai támogatást, tudományos segítséget. Köszönöm továbbá intézetünk PhD hallgatóinak szakmai és emberi segítségét, a támogatást, amit kutatásaim alkalmával kaptam.

Hálával tartozom Papp Edit és Oksai Judit asszisztensnőknek, akik tanulmányaim alatt hozzáértő, lelkiismeretes munkájukkal és szakmai tapasztalatukkal segítettek.

Végül köszönöm Nagymamám és Édesanyám megértő türelmét, szeretetét és bátorítását.