

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**KERATOCONUS: AZ ÖRÖKLŐDÉS SZEREPE A  
PATOGENEZISBEN ÉS A SZUBKLINIKAI ESETEK  
DIAGNOSZTIKÁJA**

Dr. Kriszt Ágnes

Témavezető: Dr. Takács Lili, PhD



**DEBRECENI EGYETEM**  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019

# KERATOCONUS: AZ ÖRÖKLŐDÉS SZEREPE A PATOGENEZISBEN ÉS A SZUBKLINIKAI ESETEK DIAGNOSZTIKÁJA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. KRISZT ÁGNES általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája  
(Konzervatív Orvostudományok és Klinikai Vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. TAKÁCS LILI, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Vámosi György, PhD  
Dr. Végh Mihály, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Szemészeti Tanszék, Tárgyaló  
2019. június 24. (hétfő) 11 óra 30 perc

Az értekezés bírálói: Dr. Balogh István, PhD  
Dr. Resch Miklós, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Balogh István, PhD  
Dr. Resch Miklós, PhD  
Dr. Vámosi György, PhD  
Dr. Végh Mihály, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,  
2019. június 24. (hétfő) 13:00 óra

## BEVEZETÉS

A keratoconus a szem elülső felszínén elhelyezkedő, óraüveg alakú, sima és átlátszó szaruhártya leggyakoribb, primer és progresszív, kétoldali ektáziája, melynek során a cornea alsó vagy középső, körülírt részén a stroma elvékonyodik és kúp alakban előbóltosul. A centrális részen fokozatosan megnő a szaruhártya törőereje, és egyre kifejezettebbé válik a miópia, a miópiás asztigmia, az irreguláris asztigmia, illetve megjelennek magasabbrendű optikai aberrációk. Minél előrehaladottabb a kórfolyamat, annál gyakoribbak a réslámpás vizsgálat során megfigyelhető jellegzetes klinikai tünetek, melyek közül a kutatásunk szempontjából a legjelentősebbek:

- ◆ a szaruhártya stroma elvékonyodása centrálisan,
- ◆ a Fleischer gyűrű, amely a conust részlegesen, vagy teljesen körbevevő szubepiteliális vaslerakódás,
- ◆ a prominens corneális idegek megjelenése.

A keratoconus (KC) minden népcsoportot érint a világ összes részén. Becsült prevalenciája átlagosan 50 és 230 közé tehető 100.000 főre számítva, és a fejlett országokban a szaruhártya átültetéseknek még mindig az egyik legjelentősebb oka. A folyamat gyakran a tizenéves kor vége felé, vagy a húszas évek elején kezdődik az egyik szaruhártya megbetegedésével és általában különböző mértékben, de végső soron mindkét szemet érinti. A páciens azon szemét, amelyen a jellegzetes klinikai tünetek még nem mutatkoznak, szubklinikai keratoconusnak nevezi az irodalom. Régebben inkább a keratoconus suspect elnevezést használták.

A betegség kóroktanát illetően annyi bizonyos, hogy egy igen komplex, multifaktoriális betegségről van szó, melyben genetikai és környezeti hatások, ezek bonyolult interakciói, sőt epigenetikai mechanizmusok is szerepet játszhatnak. Valószínűleg jópár, egymástól különböző patológiai folyamat vezethet ugyanahhoz a végső közös útvonalhoz, a keratoconus kialakulásához. A genetikai hajlamosító tényezőkkel bíró egyénekben a megfelelő környezeti hatás, mint egy trigger, beindíthatja a betegség kialakulását.

### *Genetikai hatások*

A keratoconus hátterében nyilvánvaló, és igen fontos szerepet töltenek be a genetikai hatások. Általában önállóan jelenik meg, mégis igen sok genetikai eredetű kórral (Down szindróma, osteogenesis imperfecta, Ehlers-Danlos szindróma, mitralis prolapsus) és szembetegséggel (Leber-féle congenitális

amaurosis, diffúz tapetoretinális degeneráció), valamint többféle corneális disztrófiával (Avellino, Fuchs-féle endoteliális, granuláris és poszterior polimorf corneális disztrófia) való együttes előfordulását figyelték meg. Ezen öröklődő, szisztémás betegségek többsége, sőt, feltételezések szerint az izolált keratoconus is, a kötőszövetek abnormalitására vezethető vissza. A genetikai komponens szerepét támasztják alá az ikerpárok, illetve a családfák tanulmányozása során szerzett megfigyelések. Az egypetéjű ikrek között gyakoribb a betegség, mint a kétpetéjűek között, illetve a vérrokonok utódai közt is. Számos tanulmány igazolja a KC betegek családtagjai körében halmozottan előforduló miópia, különböző formájú asztigmatiák és a keratoconus családi halmozódását, mely utóbbi 6-23%-ra becsülhető. A familiális aggregáció tényét megerősítő egyik, újabb tanulmányban, melyben nagyszámú, sporadikus keratoconusos családot vizsgáltak, feltételezték, hogy a hordozó állapot beazonosítható a videokeratográfiai indexek alapján. Ezek a kvantitatív topográfiai indexek, mint szubklinikai fenotípus szerepeltek, melynek alapján komplex szegregáció analízist végeztek.

Keratoconusos betegek rokonainak Placido-koronggal való vizsgálata során Marc Amsler a KC-hoz hasonló, de kevésbé kifejezett szaruhártya topográfiai eltéréseket talált. Ezt a nagy gyakorisággal előforduló jelenséget forme fruste keratoconusnak nevezte el. Bizonyította, hogy a klasszikus és a forme fruste keratoconus ugyanahhoz az entitáshoz tartoznak, amit mindenképp szükséges figyelembe venni a genetikai tanulmányok során. A nevezéktan ugyan nem egységes, de ma már a forme fruste KC helyett is inkább a szubklinikai keratoconus kifejezést használják. A keratoconusos betegek családtagjainak szaruhártya topográfiai vizsgálata az aszimmetrikus corneális mintázatok és a megnövekedett videokeratográfiai indexek halmozódását mutatta.

A keratoconusos betegek rokonai között nagy a prevalenciája a nem diagnosztizált KC-nak és a KC-ra jellemző paramétereknek, ezért nagy óvatosság szükséges ezen személyek esetében a keratorefraktív beavatkozások elbírálásakor. Szubklinikai keratoconushoz hasonló cornea topográfiai eltéréseket figyeltek meg néhány refraktív sebészeti beavatkozásra jelentkező egyénen is, különösen azokon, akiknél később progresszív keratektázia alakult ki. A szubklinikai KC azonosítása tehát nagy jelentőséggel bír a magas rizikójú egyének kiszűrése szempontjából is, ugyanakkor a szubklinikai keratoconus diagnózisa még ma is igen nagy kihívást jelent. Sok tanulmány vizsgálja a keratoconusos családtagokat a

szubklinikai KC-hoz kapcsolódó, nehezen megfogható jellemzők felderítése céljából.

### *A Fleischer gyűrű*

A patognómikus jelek közül az egyik legjelentősebb a nagy gyakorisággal előforduló, réslámpával látható Fleischer gyűrű, amit a bazális epitelsejtek citoplazmájában, illetve a sejtek közötti térben lerakódó vas alkot. Eredete ugyan vitatott, de számos tanulmány utal arra, hogy összefüggés van a vaslerakódás helye és a felszíni epitheliumban történt változás között. Ugyanakkor a corneális epitheliumban a vas metabolizmusának változása előidézhethet vaslerakódást, ami az események láncolata révén keratoconus kialakulásához vezethet, sőt szerepe lehet a post-LASIK keratektázia létrejöttében is.

### *Prominens corneális idegek*

A prominens corneális idegek nemcsak jelei a keratoconusnak, hanem számos ponton részesei a patofiziológiai folyamatoknak, sőt a betegség progressiójában is szerepet játszanak.

A keratoconusos cornea valamennyi rétegében szignifikáns mikrostrukturális eltérések figyelhetők meg, továbbá számos fehérje, citokin, enzim felül-, illetve alulszabályozottságát, valamint a sejtproliferációban és migrációban fontos szerepet betöltő fehérjék, extracelluláris mátrix proteinek és proteoglikánok szintjének változását írták le a kórképben. Mindezek a tényezők is arra utalnak, hogy a keratoconus egy komplex, multifaktoriális betegség.

## CÉLKITŰZÉSEK

Első célkitűzésünk a keratoconus hátterében álló genetikai faktorok tanulmányozása volt, melynek céljából klinikai családvizsgálatot terveztünk. A klinikánkon kezelt, gondozásra járó keratoconusos betegeket családtagjaikkal együtt hívtuk be klinikai, réslámpás és szaruhártya topográfiai vizsgálatra. Hozzájuk korban és nemben illesztett kontroll személyeket rendeltünk, illetve egy alpopuláció esetén a centrális corneális vastagság pachymetriás mérését is elvégeztük. Tudni szeretnénk volna, a populációnkban milyen mértékű a keratoconus családi halmozódása, és a videokeratográfiai paraméterek alapján milyen öröklődési mód a legvalószínűbb. Ennek feltárására komplex szegregáció analízist végeztünk. A komplex szegregáció analízis egy igen hatékony statisztikai módszer egy bizonyos fenotípus öröklődési módjának meghatározására családok adatai alapján, azaz egy jellegzetes tulajdonság családfákon belüli öröklődésének értékelésére. A saját populációnkon végzett komplex szegregáció analízisben nemcsak Mendeli, hanem a nem-Mendeli öröklődésnek megfelelő modelleket is teszteltünk. A topográfiai indexeket, mint folytonos változókat elemeztük és a keratoconus klinikai asszociációit – a Fleischer gyűrű jelenlétét és az egyének nemét – mint kovariánsokat is szerepeltettük az analízisben.

Második célkitűzésként kerestük, hogy a keratoconusra jellegzetes klinikai jelek közül a Fleischer gyűrű, a prominens corneális idegek és a szaruhártya elvékonyodás milyen mértékben fordul elő a betegek, a családtagjaik és esetlegesen az egészséges kontrollok között. Vizsgáltuk ezeknek a jeleknek a korrelációját egymással és a KC-ra jellemző topográfiai indexekkel, a betegek családtagjainak, illetve az egészséges kontrolloknak a körében, annak céljából, hogy vajon ezeknek a klinikai jeleknek a keresése segíthet-e a szubklinikai keratoconus könnyebb azonosításában.

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Valamennyi vizsgálatot a Helsinki Deklaráció elveinek betartása mellett, részletes felvilágosítás után önként jelentkező személyeken végeztük, akik hozzájárulásukat adták a tájékoztatáson alapuló, önkéntes részvételhez. A Debreceni Egyetem Szemklinikáján kezelt, gondozásra járó keratoconusos betegek családjait vizsgáltuk, melyek sporadikusak voltak, és egyik családtagnál sem jelentkeztek a KC-hoz társuló genetikai betegségek. Az egészséges corneájú kontrollokat az egyetem dolgozói, hallgatói, illetve a klinikán vizsgált és kezelt betegek közül választottuk ki. Azok szerepeltek kontrollként, akiknek a szférikus fénytörési hibájuk  $\pm 6D$  alatti, az asztigmatiájuk  $\pm 3D$  alatti volt, és nem volt korábban szaruhártya betegségük, szemműtétük, és a családjukban sem fordult elő keratoconus, cornea betegség, szaruhártya átültetés. A vizsgált egyének mindannyian magyar, kaukázusi eredetűek voltak. Az elemzésekben nem használtuk fel azokat az adatokat, amelyek korábban megsérült, vagy műtéten átesett szemekre vonatkoznak, beleértve a perforáló keratoplasztikát a KC betegek esetén.

### **Vizsgált személyek: keratoconusos családok és kontrollok**

#### *Genetikai, komplex szegregáció analízis vizsgálat*

A genetikai, komplex szegregáció analízis vizsgálatba hatvan, proband alapján kiválasztott, egymással rokon kapcsolatban nem álló, sporadikus KC családot vontunk be. Az összes élő családtag (274) közül 212 fő tudott részt venni vizsgálatunkban, őhozzájuk egyenként, korban és nemben illesztett kontroll személyeket rendeltünk. Mivel az élet első évtizedében igen ritkán fordul elő manifeszt keratoconus és a legfiatalabb probandunk 9 éves volt, a 9 év alatti gyermekeket kizártuk ebből a vizsgálatból.

#### *Klinikai, korrelációs vizsgálat*

A klinikai, korrelációs vizsgálatba 47 családot vontunk be, és hozzájuk 142 egészséges corneájú kontroll személyt rendeltünk. A probandok családtagjai között előfordult két manifeszt KC beteg, és a teljesen egészséges személyek mellett több, szubklinikai keratoconusnak minősíthető eset is. A nem beteg, azaz nem-KC családtagokat elkülönítettük a manifeszt KC betegektől. Azokat vettük be a nem-KC rokonok csoportjába, akiknek a fénytörési hibájuk  $\pm 6D$  alatti, az asztigmatiájuk pedig  $\pm 3D$  alatti volt, és akiknél a keratoconus súlyosságát százalékos formában kifejező, a klinikai gyakorlatban elterjedt, a

későbbiekben megmagyarázott *KISA* és *KSI* indexek sem utaltak manifeszt KC jelenlétére ( $KISA < 100\%$ ,  $KSI < 30\%$ ).

## **Vizsgálati módszerek**

Minden KC proband diagnózisának felállítása klinikai vizsgálat alapján történt, amelynek része volt a látásélesség vizsgálata, a réslámpás vizsgálat, az indirekt oftalmoszkópia és a szaruhártya topográfiás vizsgálat (videokeratográfia). Minden egyes személy (a probandok, a családtagjaik, és a kontrollok) esetében elvégeztük a klinikai, a réslámpás vizsgálatot és a szaruhártya topográfiás vizsgálatot. A klinikai, korrelációs vizsgálatához egy alpopuláción centrális szaruhártya-vastagság mérést is végeztünk. Ennek során 15 keratoconusos beteg 27 szemét, 45 családtag 89 szemét, és 26 kontroll 52 szemét vizsgáltuk ultrahangos cornea pachymeterrel. Ebben a csoportban a hiányzó adatok magyarázata egyoldali szaruhártya-átültetés 3 probandnál, és korábbi szaruhártya sérülés az egyik családtagnál. A réslámpás vizsgálat során nagyon gondosan figyeltük és kerestük az epitéliumban a Fleischer gyűrű, illetve a prominens corneális idegek jelenlétét. A corneális Fleischer gyűrű meglétének kritériuma a legalább 2 mm hosszú, íves, paracentrális, szubepiteliális vas depozitum volt.

### ***Szaruhártya topográfiás (videokeratográfias) vizsgálat***

A szaruhártya topográf a cornea elülső felszínének, görbületének, és törőerejének vizsgálatára szolgáló műszer. Elve hasonló a korábban használt kézi keratoszkópokhoz: az apextől a limbusig 25 koncentrikus gyűrűt vetít a szaruhártyára néhány centiméter távolságból, ami annak felszínéről visszatükröződik. Ezt a képet a műszer gyűrűnként 256 (25x256) ponton detektálja, majd ezekből, a visszfény-gyűrűk torzulásának mértéke alapján előállítja a szaruhártya felszíni térképét színekódolt digitális képek formájában, a vezérlő számítógép szoftverének segítségével. A TMS-4 videokeratoszkóp (Tomey Corporation, Nagoya, Japán) segítségével minden vizsgált személy mindkét szeméről legalább 4-4 felvételt készítettünk, ezek közül a legjobb minőségűt választottuk ki a visszfény-gyűrűk megtekintése alapján, és a továbbiakban ezeknek a felvételeknek az adataival dolgoztunk.



## **Topográfias (videokeratográfias) indexek**

A TMS-4 szoftver által megadott, és az azokból általunk kiszámított videokeratográfias indexeket használtuk fel a további analízisekhez.

*Genetikai, komplex szegregáció analízis vizsgálatához használt indexek*

1.) *KISA: Keratoconus Százalékos Index*, négy különböző index kombinációjával írja le a keratoconusra tipikus topográfus jellemzőket.

$$KISA = \frac{K \cdot (I - S) \cdot AST \cdot SRAX}{300} \times 100$$

A képletben *K*: centrális cornea törőerő, *I-S*: Inferior-Szuperior Dioptria Aszimmetria Index, *AST*: a reguláris asztigmia fokát mutató index, *SRAX*: az elferdült radiális tengely szöge, az irreguláris asztigmatát jellemzi. A fenti képlet alapján számítottuk ki a *KISA* indexet. Az eredeti közleményben meghatározott (*KISA*: <60% egészséges, 60-100% szubklinikai KC, >100% KC) értékeket használtuk a családi halmozódás statisztikákhöz a vizsgált egyénekre nézve. Elvégeztük a *KISA* index természetes alapú logaritmikus transzformációját, hogy normál eloszlást kapjunk ( $\ln(KISA)$ ). A komplex szegregáció analízishez további lineáris transzformációt alkalmaztunk: az  $\ln(KISA)+3$ , mint input paraméter szerepelt a *KISA* folytonos változóként történő analízise során.

2.) *KSI: Keratoconus Súlyosság-Index*, 10 különböző videokeratográfias indexet, mint input paramétert használ egy, a KC szűrésére kidolgozott, klasszifikációs neurális hálózathoz. Százalékos formában fejezi ki a betegség súlyosságát a következőképpen: >30% manifeszt KC-ra utal, míg >15% a szubklinikai KC szemekre jellemző. A *KSI* index értékét kiszámította a szaruhártya topográfhoz kapcsolódó program.

3.) *6 mm Fourier Aszimmetria Index*: Egy matematikai módszerrel, a Fourier harmonikus függvénysor-analízissel a topográfias képek nyers cornea-törőerő adatai felbonthatók trigonometrikus függvények sorozatára. A cornea törőerő-márixot ez az analízis négy indexre bontja fel, amelyeket a centrumtól 3 mm-re, ill. 6 mm-re eső visszfény-gyűrűn belül eső területre számít ki a szaruhártya topográf szoftvere. KC esetén az *Aszimmetria Index*nek van a legnagyobb jelentősége, ezt használtuk fel vizsgálatainkhoz. A *6 mm Fourier Aszimmetria Index* a Fourier sorban az első felharmonikus, az úgynevezett „decentrációs” komponens. Az 1-20. visszfény-gyűrűk közötti területre

számítva ez nagyjából megfelel a cornea centrális 6 mm-es részének. A *6 mm Fourier Aszimmetria Index* 10x-es szorzata szerepelt a folytonos változóként történő analízis során, mint input paraméter. Az egyének jobb és bal szemére vonatkozó index-párok közül minden személyhez azt rendeltük hozzá, ami a nagyobb érték volt. Az operált szemek topográfiai indexeit nem használtuk fel.

*Klinikai, korrelációs vizsgálatokhoz használt indexek*

1.) *KISA: Keratoconus Százalékos Index*

2.) *KSI: Keratoconus Súlyosság-Index*

3.) *3 és 6 mm Fourier Aszimmetria Index*: a Fourier sorban az első felharmonikus, az 1-9. és 1-20. visszfény-gyűrűk közötti területre számítva, ami nagyjából megfelel a cornea centrális 3 mm-es, illetve 6 mm-es részének.

4.) *I-S: Inferior-Superior Dioptria Aszimmetria Index*. Értéke pozitív, és negatív is lehet attól függően, hogy az alsó, vagy a felső cornea-fél a „meredekebb”, a nagyobb törőerejű, ezért az *I-S* index abszolútértékét vettük minden szemre.

## **Az adatok statisztikai analízise**

### ***Genetikai, komplex szegregáció analízis vizsgálat***

A SigmaStat program 3.5-ös verzióját használtuk a probandok és rokonaik mellé illesztett kontrollok esetén annak igazolására, hogy a KC családtagokhoz korban és nemben valóban illeszkednek.  $\alpha=0,05$ -öt tekintettük szignifikancia-szintnek. ANOVA vizsgálatot végeztünk annak megállapítására, hogy a *KSI*, *KISA* és *6 mm Fourier Aszimmetria* indexek képesek-e elkülöníteni egymástól a KC, a nem-KC családtagok, és az egészséges egyének szemeit. A 60 keratoconusos családfa analízisét a S.A.G.E. programcsomag segítségével végeztük el: S.A.G.E. 6.1.0 (2010): Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, <http://darwin.cwru.edu/sage/>. A családok elemzésére, a családfák struktúrájára vonatkozó általános statisztikákhoz a PEDINFO programot használtuk.

### ***Komplex szegregáció analízis***

A komplex szegregáció analízis a legfőbb statisztikai eszköz egy patológiás, vagy nem patológiás vonás öröklődési módjának elemzésére. A 60 KC család komplex szegregáció analízisét a S.A.G.E. 6.1.0 (2010) programcsomag SEGREG programjának segítségével végeztük el a következőképpen: A videokeratográfiai indexek, mint folytonos változók:

$\ln(KISA)+3$ ,  $KSI$ , és  $6\text{ mm Fourier Aszimmetria Index} \times 10$  szerepeltek input paraméterként.

A folytonos változók analíziséhez a Bonney-féle A osztályú regresszív modellt használtuk, amely azt feltételezi, hogy egy egyén fenotípusa kizárólag az ő saját szüleinek a fenotípusa és genotípusa révén függ az ősök fenotípusától. A testvérek csak a közös szülők révén függenek egymástól. A komplex szegregáció analízisben egy lehetséges major lókus szegregációja során tekintetbe kell vennünk azt, hogy egy vagy több paraméter egy úgynevezett latens, nem mérhető minőségi faktornak a függvénye: ez az  $u=AA, AB$  vagy  $BB$ , amit az egyén típusának hívunk. Hogyha a szegregáció Mendeli, akkor ez a típus a megfigyelt fenotípus háttérében álló feltételezett genotípust jelképezi, és a szegregáció egyetlen, két alléllal ( $A, B$ ) bíró autoszomális lókus révén valósul meg, ahol  $A$  jelenti a hipotetikus betegség-allélt. Az  $A$  és  $B$  allél gyakoriságát  $qA$ -val, és  $1-qA$ -val jelöljük. Feltételezzük, hogy a típusok eloszlása a populációban Hardy-Weinberg egyensúlyban van, ezért a típusok populációs gyakorisága  $qA$ -val definiálható. Az  $AA, AB$  és  $BB$  típusú egyének feltehetően átadják az  $A$  komponenst (az  $A$  allélt, ha a típus genotípus is egyben) utódaiknak a következő transzmissziós valószínűséggel:  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{AB}$  és  $\tau_{BB}$ . Ezt tekintve, a típus legjobban az egyén utódainak várható eloszlását megadva definiálható, ezért a típust általános fogalomként használjuk, figyelembe véve különböző formájú, egymástól elkülönülő transzmissziókat, Mendelieket és nem-Mendelieket egyaránt. Az egyes típusokhoz társított átlagértékek, melyek a vizsgálatban szereplő jellegzetes tulajdonságra vonatkoznak,  $\mu_{AA}$ ,  $\mu_{AB}$  és  $\mu_{BB}$  jelölést kaptak, és hozzájuk egyetlen közös varianciát (szórásnégyzetet) becsültünk. A multifaktoriális komponens figyelembe vételéhez reziduális familiális korrelációkat definiáltunk rokonpárok között a következőképpen:  $\rho_{FM}$  a familiális korrelációt jelöli házaspárok tagjai között (apa és anya, father and mother),  $\rho_{PO}$  a szülők és gyermekeik között (parent-offspring),  $\rho_{FO}$ : apák és gyermekeik között (father-offspring),  $\rho_{MO}$ : anyák és gyermekeik között (mother-offspring),  $\rho_{SS}$ : testvér-testvér párok között (sib-sib). 8 különböző modellt alkalmaztunk a topográfias indexekre vonatkozóan a családtagok közötti eltérések forrásának felderítésére.

1.) Az analízist egy *általános*, korlátozások nélküli modellel kezdtük, ahol minden paramétert szabadon becsült a program oly módon, hogy azok a legjobban illeszkedjenek az adatainkra. Ez egy teljes, vagyis multifaktoriális modell, ami magában foglalja egy major gén, további gének (poligénes öröklődés), és a környezet hatását. Az adatainkra legjobban illeszkedő

általános modellt hasonlítottuk össze 7 különböző modellel, melyekbe a transzmisszió módjára vonatkozó, eltérő korlátozásokat integráltunk, és ennek megfelelően bizonyos paramétereket meghatározott értékekre fixáltunk a modellben. A paraméterek becslésmódjának megfelelő változtatásával, vagy fixálásával építettük fel az egyes specifikus modelleket. Az *általános* modell tekinthető az alternatív hipotézisnek, melynek maximális valószínűségét a 7, null hipotézisként használt korlátozott modell maximális valószínűségéhez hasonlítottuk. Ezekkel az összehasonlításokkal próbáltuk felderíteni, hogy az adatainkra ráilleszhető-e valamilyen „öröklésmenet”, szabályszerűség, amellyel azok magyarázhatóak lennének. A specifikus modellek a következők voltak:

- 2.) *sporadikus* modell,
- 3.) *környezeti* modell,
- 4.) *Mendeli major gén* modell,
- 5.) *poligénes* modell,
- 6.) *nem-Mendeli major gén (MG)* modell,
- 7.) *kevert* modell, azaz *nem-Mendeli major gén+poligénes faktor* modell
- 8.) *nem-Mendeli major gén+környezeti faktor* modell (MG+környezeti).

A kovariáns analízisben a corneális Fleischer gyűrű jelenléte (1: jelen van, 0: nincs), és a személyek neme (1: férfi, 0: nő) szerepelt, mint bináris változó. A poligénes varianciát az FPMM (Finite Polygenic Mixed Model) programmal becsültük, ami a S.A.G.E. 6.1.0 (2010) programcsomag SEGREG programjának része.

A paramétereket a maximális valószínűségi módszerrel (maximum likelihood method) becsültük.

A modellek összehasonlítására két kritériumot használtunk:

- 1.) A hipotézisek tesztelése a *valószínűségi hányados* (likelihood ratio) *kritérium* alapján történt, melyben minden egyes, korlátokkal bíró modellt az *általános*, korlátozások nélküli modellel hasonlítottuk össze. A valószínűségi hányados próba (likelihood ratio test, *LRT*) úgy számolható, mint a  $-2\ln(L)$  értékek különbsége bármely korlátos (null hipotézis) modell, és a korlátozás nélküli *általános* (alternatív hipotézis) modell között

$$LRT = -2\Delta\ln(L) = -2\ln(L)_{\text{korlátos modell}} - [-2\ln(L)_{\text{általános modell}}],$$

ahol  $L$  az egyes modellek maximális valószínűsége. Ennek eloszlása aszimptotikusan a  $\chi^2$  statisztikának felel meg, a szabadságfoka pedig egyenlő

az összehasonlított modellekben lévő, egymástól független paraméterek számának különbségével.

A valószínűségi változóink értékét tehát úgy számítottuk ki, hogy minden egyes specifikus modell  $-2\ln(L)$  értékéből kivontuk az *általános* modell  $-2\ln(L)$  értékét, majd a megfelelő  $\chi^2$  statisztikai táblázatban leolvastuk a hozzá tartozó  $p$  értéket. A szignifikancia-szintnek itt is  $\alpha=0,05$ -öt tekintettük. Miután arra kerestük a választ, hogy az adatainkra legjobban illeszkedő *általános*, korlátozások nélküli, de mindent magában foglaló teljes modellhez képest van-e a hét közül egy, vagy több olyan specifikus, korlátokkal bíró modell, ami szintén illeszkedik az adatainkra, ezért a  $p>0,05$  esetén, tehát az *általános* modelltől „szignifikánsan nem eltérő” modell esetén mondhattuk ki azt, hogy azt a bizonyos specifikus modellt „elfogadjuk”, mert az szintén illeszkedik az adatainkra.  $p>0,1$  jelentette a legjobb illeszkedést. Ha egy modellre a valószínűségi hányados próba alapján azt kaptuk, hogy az *általános* modellhez képest  $p<0,05$ , azt a modellt nem “fogadtuk el”, mert ez a  $p$  érték azt jelenti, hogy az a bizonyos specifikus modell szignifikánsan eltér az adatainkra legjobban illeszkedő *általános* modelltől, tehát ez a modell nem alkalmas arra, hogy magyarázatot adjon az adataink alapján valószínűsíthető “öröklésmenetre”, szabályszerűsége.

2.) Emellett *Akaike információs kritériumát* (Akaike's Information Criterion, *AIC*) használtuk, hogy az adatokra nézve egyenlő mértékben valószínű modellek közül ( $p>0,05$ ) kiválasszuk a „legtakarékosabbat”.

Mivel  $AIC = -2\ln(L)+2n$ , ahol  $n$  a becsült paraméterek száma, a „legtakarékosabb” modellnek azt tekinthetjük, amelynek az *AIC* értéke a legkisebb szám. A  $-2\ln(L)$ , és az *AIC* értékeket a SEGREG program adta meg az analízis eredményei között. Miután a családokat a probandok alapján választottuk ki, egyszerű családfaanalízist végeztünk, azaz minden egyes családfa valószínűségét kizárólag a proband betegségére, mint feltételre alapoztuk.

### ***Klinikai, korrelációs vizsgálat***

A statisztikák számításához minden vizsgált személy jobb és bal szemének adatait felhasználtuk, kivéve az operált és korábban sérült szemekre vonatkozókat. A KC családtagokra nézve a korrelációs statisztikák három sorozatát vizsgáltuk, azaz, hogy a Fleischer gyűrű jelenléte, a centrális szaruhártya-vastagság adatok, és a prominens corneális idegek jelenléte hogyan korrelál egymással, és a topográfias (videokeratográfias) indexekkel.

A kontroll személyek adataiból is elvégeztük a korrelációs statisztikákat, viszont, mivel túl kevés egyén corneáján találtunk Fleischer gyűrűt vagy prominens idegeket, ezek az eredmények nem bizonyultak értékelhetőnek. A Fleischer gyűrű jelenlétét, és a prominens comeális idegek jelenlétét bináris változókként vizsgáltuk. A centrális szaruhártya-vastagság és a topográfiai indexek folytonos változókként szerepeltek az analízisben. A változók közötti korrelációkat a Pearson-féle korrelációs statisztikával számoltuk, meghatároztuk a  $p$  értéket és a korrelációs koefficiens ( $r$ ). A vizsgált csoportok paraméter értékeit  $t$ -próbával, és *Mann-Whitney-féle rangösszeg* próbával hasonlítottuk össze. A statisztikák kiszámítására a SigmaStat program 3.5-ös verzióját használtuk, és  $\alpha=0,05$ -öt vettük szignifikancia-szintnek.

## EREDMÉNYEK

### Genetikai, komplex szegregáció analízis vizsgálat

#### ***A családfák leíró statisztikai elemzése***

Hatvan sporadikus, azaz nem familiális keratoconusos családfát vontunk be vizsgálatainkba, akik egymással rokoni kapcsolatban nem állnak. A családok átlagos mérete és szórása 4,57 ( $\pm 1,55$ ) fő volt. Családonként a tagok száma minimum 3, maximum 11 fő volt, a testvérek száma pedig 1-4 között mozgott. A családfák többsége, 44 (73,33%) csak szülőkből és gyermekeikből álló szűk család, viszont 16 (26,67%) három generációs volt. Az összes élő családtag (274) közül 212 tudott részt venni a részletes klinikai és szaruhártya topográfiai vizsgálaton, 100 férfi (47,17%) és 112 nő (52,83%).

A *KISA* index alapján 11 elsőfokú rokon (hét szülő és négy testvér) esetében találtunk korábban nem diagnosztizált KC-t. Populációnkban a manifeszt keratoconus becsült prevalenciája 7,6% volt (11/145, 95% konfidencia intervallum, CI: 3,3-11,9), ami 33-152-szer nagyobb, mint a KC átlagos populációs prevalenciája (0,05-0,23%). Ezek az adatok a KC családi halmozódására utalnak, és a betegség kialakulásában a genetikai faktorok szerepét támasztják alá. A Fleischer gyűrű is mutatott családi halmozódást: a KC betegek között 65,9%-ban, családtagjaik között pedig 25,3%-ban fordult elő. A nem beteg rokonokra vonatkozó arány elég jelentős mértékű, ezért is tartottuk fontosnak a későbbiekben ennek alaposabb vizsgálatát.

#### ***A videokeratográfiai KC indexek eloszlása, illetve a KC és egészséges szemek elkülönítésére való alkalmassága***

Az ANOVA analízis alapján mindhárom index (*KSI*, *KISA*, *6 mm Fourier Aszimmetria Index*) szignifikánsan elkülönítette egymástól a KC, nem-KC családtag, és egészséges kontroll csoportokat ( $p < 0,001$ ). A páronkénti összehasonlításnál azt tapasztaltuk, hogy a *KISA* és a *6 mm Fourier Aszimmetria Index* minden csoportot elválasztott egymástól ( $p < 0,05$ ), azonban a *KSI* a KC-t a kontrolltól és a nem-KC családtagtól elkülönítette, a nem-KC családtagot a kontrolltól viszont nem. A kiválasztott cornea topográfiai indexek eloszlása a vizsgált populációra nézve a következő volt:

1.) Az  $\ln(KISA)+3$  bimodális eloszlást mutat. Az irodalmi határértékek a *KISA* index esetén a szubklinikai és a manifeszt KC-ra: 60 és 100, ugyanezek a

transzformált  $\ln(KISA)+3$  paraméterre: 7,1 és 7,6. Ezek nagyon közel vannak egymáshoz a logaritmikus transzformációnak köszönhetően, és mindkettő elválasztja a normált a betegtől. A normál populáció log-normális eloszlást mutat, amit a logaritmikus transzformáció utáni Gauss-hoz hasonló görbe tanúsít.

2.) Egy ehhez hasonló bimodalitás látható a *6 mm Fourier Aszimmetria Index* esetén. Az adataink alapján feltételezett kritikus érték elválasztja egymástól a KC betegeket, és a nem-KC egyéneket. Az eloszlási hisztogramon az első minimum ezen a helyen van, utána ismét emelkedik a relatív gyakoriság. Az eloszlási hisztogramnak az első része, amely a feltételezett kritikus érték elé esik, jelképezi a nem beteg populációt. Ennek a hisztogramról becsülhető átlagértéke jól korrelál a komplex szegregáció analízisben az egészséges populációra illesztett adatokkal és jó egyezést mutat az eredeti közleményben közölt értékekkel. Mind a *KISA*, mind a *6 mm Fourier Aszimmetria Index* eloszlása folytonosságot mutat az alacsony és magas, betegségekre jellemző értékek között.

3.) Ezzel szemben a *KSI* három csoportot különít el: a normált, a szubklinikai KC-t, és a KC-t, amint Smolek és Klyce definiálták az eredeti cikkükben. Ennek alapján jelöltük be a javasolt kritikus értékeket (15 és 30).

### ***Komplex szegregáció analízis***

Mindhárom paraméter (*KSI*, *KISA* és *6 mm Fourier Aszimmetria Index*) folytonosságot mutat az egészségestől a szubklinikai keratoconuson át a betegig, ezért az indexeket folytonos változókként elemeztük. A komplex szegregáció analízis során engedélyeztük a programnak, hogy átlagot becsüljön a beteg és nem beteg corneákra nézve azért, hogy a lehetséges legjobb illesztést érjük el minden esetre, a korábban közölt irodalmi kritikus értékektől függetlenül.

A *KISA* index esetén a „legtakarékosabb” illesztési modellnek a *nem-Mendeli major gén (MG) +környezeti hatás* modellje bizonyult, habár ez nem különbözik szignifikánsan a többi elfogadott és nem-Mendeli major gént (MG) magában foglaló modelltől (kizárólag *MG* vagy *MG poligénes komponenssel*) ( $p>0,1$ ). A *KSI* és a *6 mm Fourier Aszimmetria Index* analízise során a *nem-Mendeli major gén (MG)* modell bizonyult a „legtakarékosabbnak”. Ugyanakkor a *sporadikus*, a *poligénes* és a *Mendeli major gén* modelleket következetesen elvetettük minden egyes indexre nézve ( $p<0,001$ ). A *KISA* és



a *6 mm Fourier Aszimmetria Index* esetében a *környezeti* modellt is elfogadtuk.

Annak ellenére, hogy a vizsgálatainkba olyan családokat válogattunk be, ahol a probandon kívül senki másnál nem volt ismert KC, azonosítottunk négy, két generációs családot, ahol mindkét generációban találtunk a betegségben érintett személyeket, ily módon feltételezhető volt a Mendeli domináns öröklődés. Annak érdekében, hogy elimináljuk ezeknek a családfáknak az összezavaró hatását, megismételtük a komplex szegregáció analízist ennek a négy családnak a kizárásával. A megmaradó 56 család esetén a *nem-Mendeli major gén* modell maradt a „legtakarékosabb” illesztési modell minden indexre nézve egységesen, habár az *AIC* értékek alacsonyabbak voltak, utalva a családok közötti heterogenitás csökkenésére. A fentebb említett négy családfát külön is megvizsgáltuk, ennek összesen 16 tagjára vonatkozóan megkíséreltük lefuttatni a komplex szegregáció analízist. A rendkívül kevés adat miatt nem kaptunk értékelhető eredményeket, tehát nem sikerült bizonyítanunk, hogy ezeknél a családoknál valóban domináns lehet-e a KC öröklődése. Amikor kizárólag a 20 évet betöltött családtagokat vettük be a komplex szegregáció analízisbe – feltételezve, hogy erre a korra már teljes mértékben manifesztálódik a betegség – szintén a *nem-Mendeli major gén* maradt az elfogadott modell. A *KSI* és a *KISA* index esetében a *nem-Mendeli MG* volt a „legtakarékosabb” modell, és ennek a valószínűsége megnövekedett ahhoz az illesztéshez képest, ahol a 20 évesnél fiatalabb családtagokat is bevontuk. Ez összecseng azzal, hogy várhatóan a tünetek jobban manifesztálódnak egy későbbi életkorban. A *6 mm Fourier Aszimmetria Index* esetén a *nem-Mendeli MG+poligénes hatás* lett a „legtakarékosabb” modell, habár csökkent annak a valószínűsége, hogy ez ugyanolyan jól illeszkedik az adatokra, mint az *általános* modell ( $p < 0,05$ ).

A Fleischer gyűrű jelenléte, mint kovariáns a komplex szegregáció analízisben nagy mértékben növelte a „legtakarékosabb” *nem-Mendeli major gén* modell illeszkedését minden indexünkre nézve. A *nem*, mint kovariáns a *KSI* esetében minimálisan csökkentette a *MG* modell illeszkedését, viszont a *KISA* és a *6 mm Fourier Aszimmetria* indexeknél a kovariánsként használt *nem* valamelyest elősegítette az illeszkedést. A Fleischer gyűrű jelenléte ezekben az analízisekben is erőteljes hatással bírt, ez is megerősítette azt a feltételezésünket, hogy érdemes lenne alaposabban utánajárni az esetleges jelentőségének.

A „legtakarékosabb” *nem-Mendeli major gén* modellekben a becült allél frekvencia meglehetősen magas, a penetrancia pedig alacsony volt. Másrészt viszont azok a fenotípusok, amelyek látszólag nem hordozzák a betegség alléljét, mégis bizonyos valószínűséggel továbbadhatják a beteg fenotípust. A major gén hatás a poligénes komponenssel (*kevert modell*) szintén minden index esetében elfogadott, habár a poligénes hatásnak köszönhető becült heritabilitás alacsony volt, és ennek megfelelően a poligénes hatásnak tulajdonítható varianciát elhanyagolható mértékűnek becültük. A *MG* modellekre vonatkozóan, a szigorúan domináns vagy recesszív modellekre korlátozva a paramétereket, nem kaptunk elfogadható átlagértékeket, tehát a háttérben álló major génhatásnak a domináns vagy recesszív voltáról nem sikerült információt szereznünk.

## **Klinikai, korrelációs vizsgálat**

### ***A vizsgált populáció jellemzői***

A kontrollok nem különböznek szignifikánsan a KC családok tagjaitól kor ( $p = 0,11$ ), és nembeli eloszlásukat ( $p = 0,153$ ) tekintve. A keratoconusos betegek 71,7%-ában találtunk Fleischer gyűrűt, prominens corneális idegeket pedig 15,2%-ban. A KC betegek családtagjai körében 30,8%-ban figyeltünk meg Fleischer gyűrűt, prominens idegeket pedig 14,5%-ban. A kontroll egyének esetében érdekes módon kis mértékben ugyan, de jelen voltak ezek a klinikai jelek: 2,1%-ban találtunk Fleischer gyűrűt és 2,8%-ban prominens corneális idegeket. Néhány KC családtag topográfias felvételein minimális, a KC-ra gyanús corneális mintázat figyelhető meg, mely Fleischer gyűrű jelenlétéhez társul, viszont a *KSI* index a szubklinikai KC-ra vonatkozó küszöbértékét még nem éri el az ő esetükben. Bizonyos kontroll személyek szaruhártyáján Fleischer gyűrű fordult elő prominens idegekkel, illetve a Fleischer gyűrű kritériumait el nem érő vaslerakódás prominens corneális idegekkel együtt. Ezeknek az egyéneknek a cornea mintázata aszimmetrikus, és igen kis mértékben ugyan, de a keratoconusra jellemző mintázatokra hasonlít.

### ***Korrelációs statisztikák a keratoconusos betegek rokonai körében***

A KC betegek családtagjai esetén szignifikáns negatív korreláció áll fenn a Fleischer gyűrű jelenléte és a centrális corneális pachymetria adatok között ( $r$

= -0,234). Minden topográfias index szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a Fleischer gyűrűvel. Ezek a korrelációs eredmények arra utalnak, hogy a Fleischer gyűrű a KC betegek rokonai körében a vékonyabb és aszimmetrikusabb corneákon fordul elő. A prominens corneális idegek esetén szignifikáns pozitív korrelációt kaptunk az összes topográfias indexre, kivéve az *I-S*-re. A prominens idegek és a centrális szaruhártya pachymetria adatok közötti szignifikáns negatív korreláció azt jelzi, hogy a prominens idegek nagyobb valószínűséggel jelennek meg a vékonyabb corneákon ( $r = -0,235$ ). A centrális cornea pachymetria értékek negatív korrelációt mutattak minden vizsgált topográfias indexre nézve ( $r < -0,3$  minden indexre, és a legerősebb korrelációt a *Fourier Aszimmetria* indexekre kaptuk: a 3 mm-esre  $r = -0,425$ , a 6 mm-esre  $r = -0,427$ .) Nem észleltünk szignifikáns korrelációt a Fleischer gyűrű és a prominens idegek között ezekre a szaruhártyákra, ami arra utal, hogy a prominens idegek és a Fleischer gyűrű nem nagy gyakorisággal fordul elő ugyanazokban az egyéneknél.

### ***A családtagok csoportonkénti összehasonlítása t-próbával***

A korrelációs statisztikákkal összhangban szignifikáns különbségeket találtunk *t*-próbával a keratoconusos betegek rokonai között abban a tekintetben, hogy rendelkeznek-e a KC-ra jellemző klinikai tünetekkel, vagy sem. Azokban a rokonokban, ahol megtalálható a Fleischer gyűrű, szignifikánsan vékonyabb a cornea és magasabbak a topográfias indexek értékei azokhoz a családtagokhoz képest, akiknél nincs Fleischer gyűrű. A prominens corneális idegekkel rendelkező családtagok esetén szignifikánsan nagyobb a *KSI*, a 3 és 6 mm *Fourier Aszimmetria* indexek értéke, mint azoknál, akiknél nincsenek prominens idegek. Miután a Fleischer gyűrű és a prominens idegek nem gyakran jelennek meg együttesen a corneán, az a *t*-próba, amelyben a prominens idegekkel rendelkezőket az összes többi családtaggal hasonlítjuk össze – akik magukban foglalják a Fleischer gyűrűvel bíró, vékonyabb és aszimmetrikusabb corneájú egyéneket is – csak a *KSI* és a *Fourier Aszimmetria* indexek esetén eredményez szignifikáns különbséget. Ennek megfelelően, amikor a prominens idegekkel rendelkezőket azokkal hasonlítottuk össze, akiknek a szaruhártyáján nincsenek sem prominens idegek, sem Fleischer gyűrű, szignifikáns különbségeket kaptunk minden paraméterre a *KISA* index kivételével.

A 142 kontroll egyén közül egynél csak Fleischer gyűrűt találtunk, kettőnél Fleischer gyűrűt és prominens corneális idegeket is, kettőnél pedig csak prominens idegeket. Az esetek ilyen alacsony száma miatt ebben a populációban a korrelációs statisztikák eredményei nem megbízhatóak. Az 5 db, Fleischer gyűrűvel és prominens idegekkel rendelkező kontrollt elkülönítettük a többi 137 kontrolltól, és a két csoportra *t*-próbát (*Mann-Whitney rangösszeg* próbát) végeztünk, melynek eredménye alapján a *KSI* ( $p=0,048$ ) és a *KISA* ( $p=0,012$ ) indexek értéke szignifikánsan nagyobb, viszont a szaruhártya nem vékonyabb a Fleischer gyűrűvel és prominens idegekkel rendelkező kontrollokra, mint azokra nézve, akiknek nincsenek ilyen jelek a corneán ( $p>0,1$ ).

## MEGBESZÉLÉS

A genetikai, komplex szegregáció analízis vizsgálat során kimutattuk, hogy a keratoconusos családokban halmozottan fordulnak elő patológiásan magas *KISA* index értékek. A komplex szegregáció analízis bizonyította, hogy a *KISA*, *KSI*, és a *6 mm Fourier Aszimmetria* indexek öröklődésében leginkább a nem-Mendeli major gén (MG) hatás érvényesül. Eredményeink egyértelműen hangsúlyozzák a KC genetikai hátterét, azon belül is a major génhatás szerepére utalnak. Habár a nem-Mendeli MG volt a „legtakarékosabb” illesztési modell az analízis során, az eredmények kis mértékű eltérést mutattak a vizsgált indexektől függően. Analízisünkben az eloszlási hisztogramok azt mutatták, hogy minél komplexebb egy index, annál hatékonyabban választja el egymástól a KC és nem-KC egyének csoportjait. A *KSI* megkülönböztet egy közbülső csúcsot is, ami valószínűleg a szubklinikai KC eseteknek felel meg. Ezzel párhuzamosan a *KSI* szolgáltatja a leginkább konzekvens, a legkiegyensúlyozottabb szegregációs eredményeket, utalva a nem-Mendeli major génhatásra minden analízisben. A *KISA* és a *6 mm Fourier Aszimmetria* indexek esetén a környezeti modellt is elfogadtuk a MG modellek mellett, de ez kevésbé bizonyult „takarékosnak”. A sporadikus, a poligénes és a Mendeli major gén modelleket viszont következetesen elvetettük minden egyes indexre nézve. Eredményeink ugyanakkor hangsúlyozzák a KC diagnosztikájában használt vizsgálati módszerek jelentőségét is genetikai tanulmányok tervezése esetén. A modern cornea tomográfiás eljárások, amelyek a szaruhártya-vastagságot, és a cornea anterior-poszterior elevációját is számításba veszik, további segítséget nyújthatnak a KC öröklődésének meghatározásában. A Fleischer gyűrű és a *nem* bevonásával végzett kovariáns analízis véleményünk szerint azt mutatta ki, hogy azokat a faktorokat, amelyek befolyásolják a KC topográfiai jellemzőit és a Fleischer gyűrű kialakulását, ugyanazon genetikai determinánsok vezérik. Másrészt, a *nem* befolyással bírhat a corneális aszimmetriára, mivel javította azoknak az indexeknek az illesztését (*6 mm Fourier Aszimmetria* és *KISA*), amelyek hangsúlyt fektetnek a szaruhártya aszimmetriájára. Mindazonáltal, a KC kialakulásában jelentős, populációtól függő különbségek létezhetnek a nemek befolyásoló szerepére nézve is, hiszen bizonyos tanulmányok egyértelműen férfi, vagy női dominanciáról számolnak be. Az FPMM analízis során becsült igen alacsony poligénes variancia arra utal, hogy a KC penetranciájában megfigyelhető variabilitás inkább környezeti, mintsem poligénes hatásnak tulajdonítható. Analízisünkben a MG hatáshoz sem

domináns, sem recesszív modellt nem tudunk illeszteni, ami szintén inkább a környezeti vagy epigenetikus faktorok jelentőségére utal a betegség kialakulásában, mintsem a genetikai interakciókra. Összességében adataink azt mutatják, hogy a KC háttérben álló komplex, nem-Mendeli major génhatást valószínűleg egy viszonylag gyakori allél-variáns örökítheti át, melynek a penetranciája alacsony, ugyanakkor nagyon nagy mértékben befolyásolják a környezeti faktorok, és csak kis mértékben más egyéb gének hatásai. Eredményeink ugyanakkor nem zárják ki a genetikai heterogenitást. Hasonlóan számos komplex betegséghez, itt is feltételezhető, hogy különböző gének károsodása végső soron egy hasonló betegség-fenotípust alakít ki. Adataink, miszerint a KC egy komplex, nem-Mendeli betegség, összhangban állnak számos kutató és klinikus széles körben elfogadott nézetével. Viszont a mi munkánk az első, amely a KC komplex, nem-Mendeli öröklődését illetően nyilvánvaló bizonyítékkal szolgál. Azt ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy ez a tanulmány több sporadikus család vizsgálatán alapszik, ezért különbözik a nagy, többgenerációs családok vizsgálatától, mely bevett gyakorlat az örökletes, családfákban előforduló KC esetén. Ennek az örökletes KC-nak valószínűleg másfajta genetikai eredete lehet, és a feltételezett öröklődési módja túlnyomóan autoszomális domináns. A komplex, nem-Mendeli öröklődés háttérére vonatkozóan számos genetikai mechanizmust közöltek. Egyik a változó expresszivitás, vagyis az a jelenség, hogy a KC génhatás más szaruhártya-görbületi vagy fénytörési hibát is (pl. asztigmia, miópia) okozhat. Kétféles öröklődést is feltételeztek korábban KC családokban, vagyis azt, hogy két különböző gén hibája egyidejűleg szükséges a betegség kialakításához. Ráadásul a komplexitás adódhat epigenetikai befolyásból is a genetikai mechanizmusok mellett, ilyen például a szabályozó RNS-ek hatása és a DNS metilációs státusza. Ugyanazon metabolikus útvonal mentén lévő proteinek kereszt-kommunikációja lehet az egyike azoknak a fehérje-interakcióknak, melyek befolyásolják a penetranciát. A komplex öröklődés, mely viszonylag alacsony genotípus-fenotípus korrelációt eredményez, igen nehézzé teszi a sporadikus KC családokban a kapcsoltsági vizsgálatok értékelését, ezért más megközelítések sokkal célravezetőbbek a KC háttérnek tanulmányozása céljából ezekben a családokban. Ennek ellenére a ritka Mendeli öröklődést mutató családokban a kapcsoltsági analízis sikeresen azonosíthat géneket, melyek a KC kialakulásában szerepet játszhatnak; bár az alacsony genotípus-fenotípus korreláció még az ilyen esetekben is megnehezítheti az analízist. A betegség komplexitása miatt a

teljes genom szekvenálás, a gondosan megtervezett, a teljes genomra kiterjedő asszociációs tanulmányok, az új generációs szekvenálási technikák – mint a WES: teljes exom szekvenálás (whole exome sequencing), WGS: teljes genom szekvenálás (whole genome sequencing), a célzott szekvenálás (targeted sequencing) –, az epigenetikai tanulmányok, és a transzkriptóm, proteóm, vagy útvonal analízisek lehetnének inkább célravezetőek a KC kialakulásához vezető közös útvonalak felderítéséhez

A keratoconusra jellemző klinikai jelek vizsgálata során még a nem beteg rokonok corneáin is megfigyeltük a Fleischer gyűrű, és a prominens idegek jelenlétét. A Fleischer gyűrű volt a leginkább figyelemre méltó, amely majdnem minden harmadik, nem beteg rokon esetében előfordult, hasonlóan az enyhe KC-ban észlelt előfordulási arányához. A manifeszt KC betegek 71,7%-ában találtunk Fleischer gyűrűt, ami a korábbi tanulmányok eredményeivel (57%-87%) jó egyezést mutat. Még az egészséges kontroll populációban is, ugyan ritkán, de előfordultak prominens corneális idegek (2,8%), Fleischer gyűrű (2,1%) és corneális aszimmetria. A családtagok és az egészséges kontrollok corneáján nagyon nagy gondossággal kerestük a Fleischer gyűrű esetleges jelenlétét, és ugyan sokuknál előfordult, de általában halvány volt. A szerzők legjobb tudása szerint ez a tanulmány az első, melyben a Fleischer gyűrű és a prominens idegek jelenlétét vizsgálták KC páciensek nem beteg családtagjainak corneáján. A korrelációs statisztikák és a *t*-próbák eredményei alapján a Fleischer gyűrű és a prominens idegek jelenléte a KC-ra jellemző tulajdonságokhoz társul, tehát vékonyabb és aszimmetrikusabb azoknak a családtagoknak a corneája, akiknél megtalálhatóak ezek a jelek, mint azoké, akiknél nem. Azon kontroll egyének corneái, akiknél megtalálhatóak a prominens idegek és a Fleischer gyűrű, jobban hasonlítanak a KC corneákra (amint a szignifikánsan magasabb *KSI* és *KISA* értékek mutatják), de nem vékonyabbak a többi normál corneához képest. Érdekes módon a Fleischer gyűrű és a prominens idegek nem mindig jelentek meg együtt, ugyanazonokon a corneákon. Jól ismert a tény, hogy ezek a jelek nem egyenlő gyakorisággal fordulnak elő KC-ban. Úgy tartják, hogy a KC egy komplex betegség, melynek patogenezisében mind genetikai, mind környezeti faktorok szerepet játszanak. A Fleischer gyűrű feltehetőleg a KC epitelsejtek oxidatív stresszre adott, megváltozott válaszreakciójának következményeképpen jön létre. A KC-ban a corneális idegek számos ponton részesei a betegség patofiziológiai folyamatainak és szerepet játszanak a progresszióban is. Az újabb in vivo

corneális konfokális mikroszkópiás tanulmányok következetesen azt mutatják, hogy a szubbazális idegek morfológiája erőteljes abnormalitást mutat, még az enyhe KC-ban is. Ez azzal magyarázható, hogy a KC corneákban az ideg-növekedési faktor (NGF) receptor expresszió szabályozása módosult. Ezek a különböző etiológiai faktorok magyarázatot adhatnak arra, hogy a Fleischer gyűrű és a prominens idegek miért nem mindig együtt jelennek meg a KC és szubklinikai KC corneákon. Nem számítottunk rá, hogy Fleischer gyűrűt találunk egészséges kontrollok corneáján. Mindamelllett a szubklinikai KC-ról azt feltételezzük, hogy inkomplett, csak részben kifejlődött KC, tehát az egészséges kontrollok közt lehetséges, hogy előfordul. Egy nemrég megjelent tanulmány beszámol egy vizsgált személyről, akinél kétoldali Fleischer gyűrűt figyeltek meg, de topográfiával csak enyhe aszimmetriája mutatkozott, a centrális cornea-vastagsága átlagos volt, kiskokú miópiája volt stabil fénytöréssel, a legjobb korrigált látásélessége normális volt, csakúgy, mint a retinoszkópiás reflexei. Ennek a szubklinikai KC-nak tekintett páciensnek a példája arra utal, hogy a corneális Fleischer gyűrű előfordulhat pozitív családi anamnézis és a KC-ra tipikus topográfiás jelek megléte nélkül is. A KC családtagoknál gyakran figyeltünk meg minimális topográfiás eltéréseket, melyek a Fleischer gyűrű és a prominens corneális idegek jelenlétével társultak. Tanulmányunkban az egyik vizsgált paraméter az ultrahangos pachymeterrel mért centrális cornea vastagság volt. Kizárólag a centrális szaruhártya-vastagság mérése megbízhatatlan a KC diagnózisát illetően, mindazonáltal a csökkent centrális cornea-vastagság egy jó indikátora lehet a KC-hoz való hasonlóságnak, és a topográfiás indexekkel együtt ez a paraméter megerősíti azt, hogy a Fleischer gyűrű és a prominens idegek hajlamosak a KC-hoz jobban hasonlító corneákon előfordulni. Ugyanakkor a jövőbeli tanulmányok szempontjából igen hasznos a hátsó corneális felszín vizsgálata pachymetriával együtt, a modern diagnosztikus módszerek segítségével (pl. Scheimpflug képalkotás, Orbscan), hiszen a KC legkorábbi jelei ezekkel a technikákkal pontosabban kimutathatóak, és a korrelációk még nagyobb jelentőséget nyernek a poszterior topográfiás információkkal kiegészítve. A bonyolult képalkotó technikák ellenére a szubklinikai KC diagnózisa még ma is igen nagy kihívást jelent. Ugyanakkor a szubklinikai KC egyének azonosítása nagy jelentőséggel bír a genetikai tanulmányok, és a refraktív sebészeti beavatkozások előtt a magas rizikójú egyének kiszűrése szempontjából is. Eredményeink alapján javasolható a Fleischer gyűrű és a



prominens idegek gondos keresése a corneán, mely a kérdéses esetekben segíthet eldönteni, hogy megállapíthatjuk-e a szubklinikai keratoconus tényét.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A keratoconus (KC) a szaruhártya leggyakoribb, primer és progresszív, kétoldali ektáziája, melynek során a cornea alsó vagy középső, körülírt részén a stroma elvékonyodik és kúp alakban előbottosul. Kialakulásában a környezeti hatások mellett szerepet játszanak a genetikai faktorok is. A feltételezett öröklési mód megállapítása céljából sporadikus KC családok klinikai és szaruhártya topográfias adatait felhasználva komplex szegregáció analízist végeztünk. 60 proband alapján kiválasztott 212 családtag, és hozzájuk korban és nemben illesztett 212 fős kontrollcsoport adatai alapján vizsgáltuk a családi halmozódás mértékét, és a cornea topográfias paraméterek eloszlását. A S.A.G.E. statisztikai programcsomag segítségével komplex szegregáció analízist végeztünk, vizsgálva a *KSI*, *KISA* és *6 mm Fourier Aszimmetria* indexek szegregációját önállóan, illetve a Fleischer gyűrű és a *nem*, mint kovariánsok felhasználásával. Teszteltünk Mendeli, és nem-Mendeli öröklődési módokat is. A *KISA* index alapján populációnk erőteljes családi halmozódást mutatott. Minden topográfias paraméter elkülönítette egymástól a KC, a nem-KC családtag és a normál kontrollok csoportjait. A legtakarékosabb illesztési modellként elfogadott hipotézis minden index esetében nem-Mendeli major gén jelenlétére utalt. A Fleischer gyűrű, mint kovariáns javította a nem-Mendeli major gén modell illeszkedését. A Mendeli, a sporadikus és a poligénes modelleket következetesen elvetettük. Megvizsgáltuk a KC jól ismert klinikai jellemzői közül a Fleischer gyűrű, a prominens idegek, és a szaruhártya-elvékonyodás jeleit 117 nem beteg családtagon, és 142 egészséges kontrollon. Pearson-féle korrelációt és *t*-próbát végeztünk, melynek során a Fleischer gyűrű, a prominens idegek és a centrális szaruhártya-vastagság adatait hasonlítottuk össze egymással, és a topográfias indexekkel (*KSI*, *KISA*, *3 és 6 mm Fourier Aszimmetria*, *I-S*). Azoknak a nem beteg KC családtagoknak, akiknek a corneáján Fleischer gyűrűt, vagy prominens idegeket találtunk, vékonyabbnak és aszimmetrikusabbnak bizonyult a szaruhártyájuk, mint azoknak, akiken nem találtuk meg ezeket a klinikai jeleket. Az egészséges családtagok között viszonylag gyakran találtunk Fleischer gyűrűt, és prominens idegeket. A kontrollok között ugyan ritkán, de mégis megtaláltuk ezeket a jeleket, ami arra utal, hogy előfordulnak szubklinikai KC esetek a normál populációban is, és ezeknek a személyeknek a corneája a *t*-próbák alapján jobban hasonlított a KC-ra, mint a többi kontrollé. A komplex szegregáció analízis eredményei szerint az öröklődésnek erőteljes szerepe van a keratoconusban, amely valószínűleg nem-Mendeli major génhatás által valósul meg. A sporadikus KC családokban az alacsony genotípus-fenotípus korreláció megnehezíti a kapcsoltsági vizsgálatokat, ezért a teljes genomra kiterjedő asszociációs tanulmányok, az új generációs szekvenálási technikák, az epigenetikai- és útvonal-analízisek több hasznos információt nyújthatnak a betegség patogenezisééről. A Fleischer gyűrű, és a prominens idegek gondos keresése a corneán segíthet egy kérdéses esetben dönteni, hogy szubklinikai KC-t diagnosztizáljunk-e, vagy sem.



Nyilvántartási szám: DEENK/170/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kriszt Ágnes  
Neptun kód: NO8LTN  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kriszt, Á.**, Losonczy, G., Berta, A., Takács, L.: Presence of Fleischer ring and prominent corneal nerves in keratoconus relatives and normal controls.  
*Int. J. Ophthalmol.* 8 (5), 922-927, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2015.05.12>  
IF: 0.939
2. **Kriszt, Á.**, Losonczy, G., Berta, A., Vereb, G., Takács, L.: Segregation analysis suggests that keratoconus is a complex non-mendelian disease.  
*Acta Ophthalmol.* 92 (7), 562-568, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/aos.12389>  
IF: 2.844

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,783**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,783**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.05.02.

