

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **A Kóros Immunválasz és a Betegségprogresszió Biomarkerei Krónikus Májbetegségekben**

**Dr. Tornai Dávid**

**Témavezető: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter**  
egyetemi tanár



**DEBRECENI EGYETEM**  
**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**  
**DEBRECEN, 2021**

## Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
2. BEVEZETÉS .....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	7
3.1. A krónikus májbetegségek végállapota: cirrózis .....	7
3.2. Az immunrendszer működésének zavara és a bakteriális fertőzések összefüggése cirrózisban.....	9
3.3. Új markerek a cirrózishoz társuló bakteriális infekciók kimutatására .....	12
3.3.1. Ferritin .....	13
3.3.2. Szolúbilis, Mieloid Sejteken Expresszált Trigger Receptor-1 .....	15
3.4. Primer szklerotizáló kolangitisz (PSC) .....	16
3.5. A pankreatikus glikoprotein 2 (GP2) ellenes IgA autoantitestek.....	19
3.5.1. A pankreatikus glikoprotein 2 ellenes autoantitestek jellemzői és jelentősége .....	19
3.5.2. Az IgA izotípusú autoantitestek keletkezése és klinikai jelentősége.....	20
3.6. Célkitűzések.....	22
4. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	23
4.1. Betegpopulációk.....	23
4.1.1. Májcirrózis.....	23
4.1.2. Primer szklerotizáló kolangitisz .....	27
4.1.3. Kontroll csoportok.....	29
4.2. Laboratóriumi vizsgálatok .....	30
4.2.1. Rutin laboratóriumi diagnosztikai tesztek .....	30
4.2.2. Szérumferritinszint mérése .....	30
4.2.3. Szérum sTREM-1 szint mérése .....	31
4.2.4. Szérum anti-GP2 autoantitest-szint meghatározása .....	31
4.2.5. Az IgA izotípusú anti-GP2 antitestek karakterizálása (IgA1, IgA2 és slgA altípusok).....	32
4.2.6. Szérum totál slgA-szint meghatározása .....	33
4.3. Etikai engedélyek .....	34
4.4. Statisztikai módszerek .....	34

5. EREDMÉNYEK .....	36
5.1. A szérumszint analízise cirrózisos betegek mintáiban .....	36
5.1.1. A ferritinszint összefüggése a különböző klinikai és laboratóriumi paraméterekkel .....	36
5.1.2. Az alacsony ferritinszint összefügg a 2 éven belül bekövetkező dekompenzáció gyakoribb előfordulásával, előzőleg kompenzált cirrózisos betegekben .....	39
5.1.3. A magas ferritinszint összefüggést mutat a BF-ek 2 éven belüli magasabb előfordulási gyakoriságával dekompenzált cirrózisos betegek körében .....	40
5.1.4. A magas ferritinszint összefüggést mutat a cirrózisos járóbetegek 2 éven belül bekövetkező magasabb halálozásával .....	42
5.2. A sTREM-1 biomarker vizsgálata cirrózisos betegek mintáiban .....	46
5.2.1. A sTREM-1 szérumszintje összefüggést mutat a betegség súlyosságával és a bakteriális fertőzés jelenlétével .....	46
5.2.2. A sTREM-1 és a CRP, egy új fertőzés pontrendszerben kombinálva a mérsékelt/súlyos aszcitesz jelenlétével, szignifikánsan nagyobb hatékonysággal azonosítja a BF jelenlétét AD-s betegekben, mint a CRP önmagában .....	50
5.2.3. A magas sTREM-1 koncentráció, a 90 napon belül bekövetkező halálozás független kockázati tényezője BF-ben szenvedő AD-s betegekben .....	53
5.3. A különböző izotípusú anti-GP2 antitestek jelentőségének vizsgálata PSC-s betegekben .....	56
5.3.1. A GP2-specifikus autoantitestek előfordulása jelentősen gyakoribb PSC-ben, mint a kontroll csoportokban .....	56
5.3.2. Az anti-GP2 IgA jelenléte súlyosabb betegségfenotípussal társul PSC-ben .....	57
5.3.3. Az anti-GP2 IgA jelenléte PSC-ben, a betegség súlyosabb lefolyásának kockázatával társul .....	58
5.3.4. Az anti-GP2 IgA antitest jelenléte összefüggést mutat a szekretoros IgA emelkedett koncentrációjával .....	60
5.3.5. Az anti-GP2 IgA antitestek karakterizálása .....	61
6. MEGBESZÉLÉS .....	62
6.1. Mind a csökkent, mind az emelkedett szérumszint jelezhet kóros folyamatokat egyes cirrózisos járóbeteg csoportokban .....	62

6.2. A szérum sTREM-1 szint mérése segítheti a cirrózishoz társuló BF-ek diagnosztikáját és a rövidtávú halálozás előrejelzését.....	66
6.3. Az anti-GP2 IgA autoantitestek a progresszív betegség lefolyás specifikus prognosztikai markerei PSC-ben, és bizonyítékként szolgálnak a bél-máj interakciók jelentőségére .....	71
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	76
8. SUMMARY .....	77
9. TÁRGYSZAVAK.....	78
10. HIVATKOZÁSOK.....	79
13. FÜGGELÉKEK I .....	100
14. FÜGGELÉKEK II .....	101

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACLF: krónikus májbetegségre rakódott akut májelégtelenség (acute-on-chronic liver failure)

AD: akut dekompenzáció

AKI: akut vesekárosodás (acute kidney injury)

ANCA: anti-neutrofil citoplazmatikus antitest

ASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest

AUROC: ROC görbe alatti terület (area under the ROC curve)

BF: bakteriális fertőzés

BT: bakteriális transzlokáció

CAID: Cirrózishoz társuló immundiszfunkció (Cirrhosis Associated Immune Dysfunction)

CARS: kompenzatórikus antiinflammatorikus válasz szindróma (compensatory anti-inflammatory response syndrome)

CCA: kolangiokarcinóma

CD: Crohn-betegség

CI: konfidencia intervallum

CRP: C-reaktív protein

FimH: fimbriális-adhezin H

GP2: glikoprotein 2

HCC: hepatocelluláris karcinóma

HR: kockázati hányados (hazard ratio)

IBD: gyulladós bélbetegség

Ig: immunglobulin

IQR: interkvartilis tartomány

MELD: Model for End-Stage Liver Disease

MRS: Mayo kockázati pontszám

OLTx: ortotopikus májátültetés

PCT: prokalcitonin

+PÉ: pozitív prediktív érték

-PÉ: negatív prediktív érték

PSC: primer szklerotizáló kolangitisz

Q: kvartilis

SC: szekretoros komponens

slgA: szekretoros IgA

SIRS: szisztémás gyulladós válasz szindróma (systemic inflammatory response syndrome)

sHR: al-eloszlási kockázati hányados (sub-distribution hazard ratio)

sTREM-1: szolúbilis Mieloid Sejteken Expresszált Trigger Receptor-1

TLR: toll-like receptor

UC: ulceratív kolitisz

## 2. BEVEZETÉS

A májcirrózissal párhuzamosan patológiás mértékűvé váló bakteriális transzlokáció (BT) és a folyamat előrehaladtával társuló immundiszfunkciós (Cirrhosis Associated Immune Dysfunction – CAID) szindróma meghatározó szerepet játszik a májsugorban szenvedő betegek fertőzésekkel szemben kialakuló fokozott fogékonyságában [1,2]. A bakteriális fertőzések (BF) viszont a cirrózisos betegekben előforduló akut állapotrosszabbodás (akut dekompenzáció – AD) és az ezt követő rövidtávú halálozás leggyakoribb kiváltó tényezői. Ezért májcirrózisban az infekciók korai felismerése és kialakulásuk megbízható előrejelzése kulcsfontosságú a hatékony kezelés és így a szövődmények uralása, a progresszió lassítása és a mortalitás csökkentése szempontjából [3–6].

Azonban a BF-ek diagnosztikája jelentős kihívást jelenthet mind klinikai, mind laboratóriumi szempontból. Ezen betegekben a bakteriális fertőzések akár az esetek felében atípusos tüneteket és klinikai képet mutathatnak, és nem ritkán a szervelégtelenség(ek) kialakulása irányítja csak rájuk a kezelőorvos figyelmét. Ugyanakkor a bakteriális fertőzések korai felismerésére használt klasszikus markerek, mint a C-reaktív protein (CRP) és a prokalcitonin (PCT) májsugoros betegekben kevésbé hatékonyan jelzik az infekció jelenlétét az átlagpopulációhoz képest [7–11].

A BT azonban a krónikus májbetegségek kialakulásában is szerepet játszhat. A jelentősen megnövekedett bakteriális terhelés az adaptív immunválasz károsításán keresztül autoimmun folyamatokat indukálhat. Ilyenkor ugyanis rendkívüli módon fokozódik az antimikrobiális antitestképződés, mely bizonyos genetikai háttér esetén a folyamat kórossá válásához és autoantitestek megjelenéséhez vezethet. Ez a mechanizmus szerepet játszhat az autoimmun etiológiájú krónikus májbetegségek kialakulásában és progressziójában, mint a primer szklerotizáló kolangitisz (PSC) [12,13].

A klinikai kihívások megoldásához új markerek azonosítása szükséges, melyek elősegíthetik az infekciók korai felismerését, előrejelzését, illetve a betegség-mechanizmus jobb megértését, és így a legesendőbb betegek azonosítását. Ez, a terápia hatékonyabb tervezését, és a jelenleginél sokkal egyénre szabottabb betegellátást és gondozást tehet lehetővé. Ezért a szerző, a Debreceni Egyetemen, a Gasztroenterológiai

Tanszék, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet közös munkacsoportjának tagjaként, e hiányos klinikai eszköztár bővítését tűzte ki célul.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A KRÓNIKUS MÁJBETEGSÉGEK VÉGÁLLAPOTA: CIRRÓZIS

A májzsugor a különböző etiológiájú krónikus májbetegségek utolsó, bár önmagában is stádiumokra osztható, dinamikus szakasza, mely világszerte rendkívül gyakran azonosítható a kórházi felvételek és a halálozás háttérében. Globálisan a 11., míg Közép-Európában a 4. leggyakoribb haláloknak számít [14–16]. A Központi Statisztikai Hivatal honlapján közzétett adatok szerint Magyarországon 2019-ben 3303 esetben állapítottak meg májbetegséget a halálozások háttérében. A vírusos hepatitiszek gyógyítása területén elért sikereknek köszönhetően, 1994 és 2013 között csökkenő trend (8712 → 3324) volt megfigyelhető, ami azonban az utóbbi években megtorpant [17]. Ezzel szemben, az egy főre eső alkoholfogyasztás mértéke hazánkban sajnos európai, valamint világviszonylatban is magasnak mondható, és az elmúlt években sem látszott csökkenni. Egyre gyakoribb viszont az elhízás, amely már Magyarországon is a felnőtt lakosság közel egynegyedét súlytja [18]. Emiatt egyes előrejelzések szerint, a jelenleg stagnáló májspecifikus halálozási trend hazánkban akár újra növekedni kezdhet [19].

A kórkép jellemzően a dolgozó korú populációt érinti, ezáltal a korai halálozás miatt elvesztett munkaévek száma cirrózisban jóval magasabb, mint a szív-ér rendszeri betegségek esetében, így nem csak az egészségügy, de a gazdaság számára is jelentős terhet jelent [20]. A betegség előfordulási gyakorisága nem ismert pontosan, melynek egyik oka, hogy kezdeti szakasza tünetmentes, így aluldiagnosztizált. Pedig a májfibrózis/cirrózis korai stádiumban történő felismerésével és a kiváltó ok megszüntetésével a folyamat még visszafordítható lehet [21].

A májcirrózis kialakulásának háttérében legtöbbször alkoholabúzust, a nyugati típusú táplálkozással összefüggő nem alkoholos szteatohepatitist, illetve vírusos eredetű krónikus májgyulladást találunk [22]. Ritkábban azonosítjuk autoimmun folyamatok (primer szklerotizáló kolangitisz [PSC], primer biliáris kolangitisz [PBC], autoimmun hepatitisz) vagy anyagcsere betegségek (Wilson-kór, hemokromatózis) oki szerepét [14].

A krónikus májbetegség nem egy stabil állapot, hanem egy dinamikus folyamat, ami a kompenzált (szövődménymentes), majd a dekompenzált (szövődményes) cirrózis stádiumokon keresztül progrediál a végstádiumú májelégtelenségig, amikor a beteg élete már csak májtranszplantáció révén menthető meg. Májcirrózisban klinikailag hat alcsoport

különböztethető meg az eltérő betegségprogresszió és a várható halálozás kockázata alapján. Az első két (=kompenzált) klinikai stádiumban a betegek tünetmentesek és a betegség-specifikus szövödmények még hiányoznak. A portális vérnyomás már emelkedett lehet (melyet a II-es stádiumban már a nyelőcsővarixok megjelenése is jelez), de nem éri el a kritikus küszöbértéket ( $>12$  Hgmm). Ekkor még mind a dekompenzáció (4-12%), mind pedig a halálozás (1-3,4%) éves kockázata alacsony, a májtranszplantáció nélküli túlélés pedig elérheti akár a 15-20 évet is. Az előrehaladott (III. és IV.; dekompenzált) stádiumban a nagymértékű májsejtpusztulás eredményeként kialakult májfunkciós-elégtelenség, valamint a klinikailag kritikus szintet meghaladó portális hipertenzió következtében megjelennek a tüneteket okozó, betegség-specifikus szövödmények (aszцитез, nyelőcsővarix-vérzés, hepatikus enkefalopátia [HE]). A késői (V. és VI.) stádium pedig már a visszatérő akut események és halmozódó komplikációk szakasza. Az éves halálozás ugrásszerűen növekszik (20-57%), és legfeljebb 3-5 év májtranszplantáció nélküli túlélés várható [23].

Ráadásul, valamilyen akutan fellépő károsító tényező hatására, a krónikus állapotromlás folyamatának bármelyik klinikai stádiumában kialakulhat egy kórházi felvételt szükségessé tevő hirtelen állapotromlás, vagyis akut dekompenzáció (AD). A kiváltó okot azonban az esetek körülbelül egyharmadában nem sikerül meghatározni. Az ezidáig azonosított tényezők az extenzív alkoholfogyasztás, a gasztrointesztinális vérzés, egyes gyógyszerhatások, valamint a vena portae trombózisa, azonban legtöbbször valamilyen bakteriális fertőzés oki szerepe állapítható meg. A leggyakoribb ezek közül az aszцитез jelenlétével szoros összefüggést mutató spontán bakteriális peritonitisz, de a pneumónia vagy a húgyúti infekció is meglehetősen gyakori [3]. AD során, a betegek egy jelentős részében további szervrendszerek működése is elégtelenné válhat, melynek bekövetkezése esetén 50% feletti rövid-távú halálozásról számoltak be. Ezt a klinikai jelenséget, melynek definícióját, stádiumbeosztását és az alapjául szolgáló szervelégtelenségek kritériumrendszerét a CLIF-CANONIC multicentrikus európai prospektív tanulmány dolgozta ki, krónikus májbetegségekre rakódott akut májelégtelenség (acute-on-chronic liver failure, [ACLF]) néven ismeri az irodalom [4]. A CANONIC tanulmányban BF az esetek mintegy harmadának háttérében volt azonosítható, mellyel az ACLF szindróma leggyakoribb kiváltó tényezőjének számít. Ugyanakkor a nem BF

okozta ACLF esetén is a fertőzésekkel szembeni fogékonyság jelentős fokozódását észlelték. Az ACLF diagnózisának időpontjában infekciómentes betegek körülbelül 50%-ában 4 héten belül kialakult valamilyen BF. A BF által kiváltott vagy a későbbiekben fertőzéssel szövődött esetek viszont bizonyítottan súlyosabbak, és a mortalitás is jelentősen magasabb az infekciómentes esetekben tapasztaltakhoz képest [5,6,24]. A BF jelenlétében a cirrózisos páciensek halálozásának kockázata négyszeresére emelkedik, a májbetegség súlyosságától függetlenül. A betegek közel egyharmada a diagnózist követő első hónapban, míg további 30%-uk az azt követő 1 éven belül meghal [25].

### 3.2. AZ IMMUNRENDSZER MŰKÖDÉSÉNEK ZAVARA ÉS A BAKTERIÁLIS FERTŐZÉSEK ÖSSZEFÜGGÉSE CIRRÓZISBAN

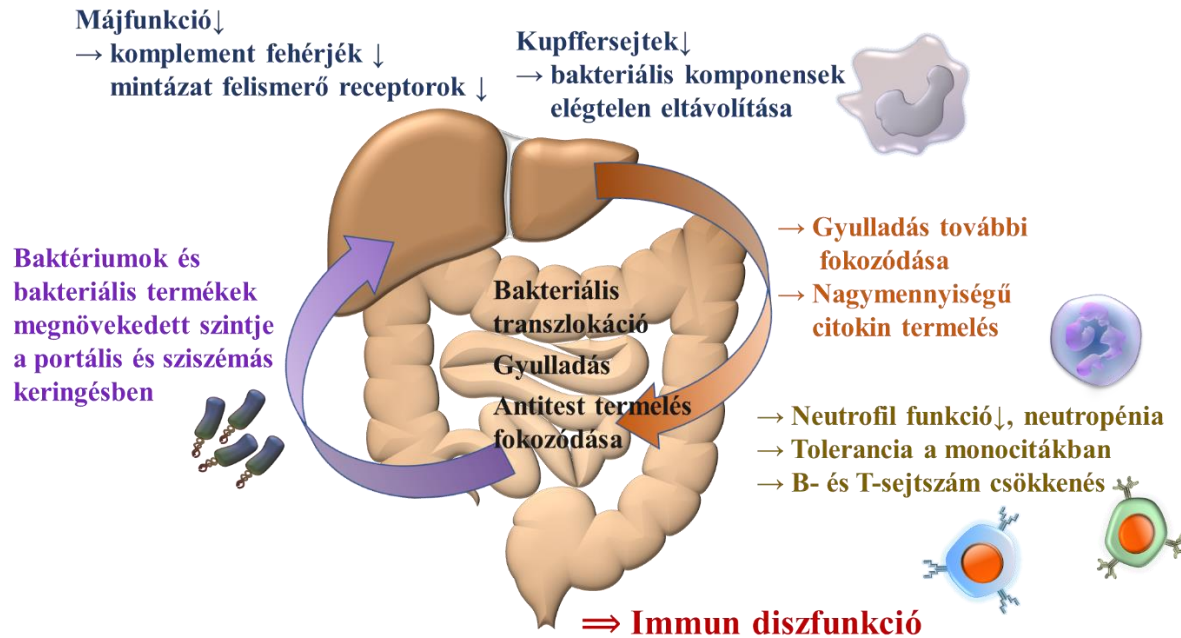
Ahogy az előzőekben láttuk, a BF-ek kiemelt jelentőséggel bírnak mind a májcirrózisos betegek akut állapotromlásának kiváltásában, mind pedig a halálozás incidenciájának jelentős emelésében. Ugyanakkor az előrehaladott májcirrózis maga is egy szerzett immunhiányos állapot, mely az infekciókkal szemben fokozott fogékonyságot és súlyosabb lefolyású epizódokat eredményez, az alapbetegségben nem szenvedő populációhoz képest [26].

A jelenség cirrózis-asszociált immundiszfunkciós (CAID) szindrómaként ismert [1], melyre jellemző a szisztémás gyulladáshoz való válasz (systemic inflammatory response syndrome [SIRS]) és a kompenzatórikus antiinflammatórikus válasz (compensatory anti-inflammatory response syndrome [CARS]) dinamikus együttes jelenléte. Míg a folyamat elején a fokozott gyulladáshoz vezető folyamatok dominálnak, addig a májelégtelenség súlyosbodásával egyre inkább a CARS okozta immunparalízis kerül előtérbe [2,27–29].

A folyamat hátterében számos oki tényező azonosítható. A máj által termelt molekulák között nagy számban található olyan fehérjék, melyek esszenciálisak az immunrendszer megfelelő működéséhez, mint a komplementrendszer tagjai [30] vagy a különböző szolúbilis mintázat felismerő receptor molekulák [31]. A májműködés hanyatlásával ezen fehérjék szintézise nagymértékben csökken. Ugyanakkor a máj szinuszoidjaiban elhelyezkedő Kupffer-sejtek száma is jelentősen megfogyatkozik. Ezen sejtek fontos szerepet játszanak a bélből a keringésbe bejutó baktériumok, valamint bakteriális alkotóelemek (endotoxinok [lipopoliszacharid], peptidoglikán, lipopeptid,

flagellinek, glikopolimerek és bakteriális dezoxiribonukleinsav) kiszűrésében, így elvesztésük, a máj bakteriális filter funkciójának csökkenését eredményezi. Ráadásul a portális nyomás emelkedése miatt a portoszisztémás kollaterális hálózaton keresztül a vér egy bizonyos hányada a májat elkerülve közvetlenül jut a szisztémás keringésbe. Mindezek következtében a gyulladáskeltő részecskék eltávolításának képessége jelentősen károsodik, melyek így a keringésben maradva az immunrendszer állandó stimulálását eredményezik [32,33]. A szervezet erre nagy mennyiségű pro-inflammatórikus citokin (tumornekrózis faktor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , interleukin-6 és -12) és más bioaktív molekulák (pl. nitrogén-monoxid) felszabadításával válaszol [34,35], melyek az érintett szövetekre, köztük a bél hám- és immunsejtjeire súlyosan károsító hatást gyakorolnak. Ennek következtében a bél, mint önálló szervrendszer működése is elégtelenné válhat, miközben a megváltozott intesztinális mikrobiom és a vékonybélben kialakuló bakteriális túlnövekedés együttes hatására a baktériumok és bakteriális termékek még nagyobb mennyiségben jutnak át a béltraktusból a szervezetbe. Mindez circulus vitiosus kialakulásához vezet, és így a BT patológiássá válik [36]. Egészséges egyénekhez képest, a májcirrózisban szenvedő betegekben akár tízszer gyakrabban detektálható a bélből származó baktériumok jelenléte a keringésben, és ezen epizódok lefolyása időben is elhúzódik [37].

Mindez, folyamatosan aktivált állapotban tartja a neutrofil granulocitákat, energetikailag kimerítve őket, így azok további bakteriális stimulusokra nem képesek megfelelő mértékű válaszreakcióra, és fagocita funkciójuk is romlik. Az apoptózis miatt csökkent élettartam és a lépmeagnagyobbodás következtében pedig neutropenia is kialakul [38]. A monociták ugyanakkor tolerancia kialakításával válaszolnak az elhúzódó endotoxinhatásra, működésük és citokinszekréciójuk csökken, úgynevezett immunparalízist eredményezve [2]. Az adaptív immunrendszer károsodását a T- és B-sejtek depléciója jelzi [1,39]. A leírt folyamatokat az **1. ábra** összegzi.



**1. ábra** A bakteriális transzlokáció és az immunfunkciók károsodása krónikus májbetegségekben

Tovább súlyosbítja a képet, hogy a fokozott infekciós kockázat ellenére a fertőzések diagnosztikája sokszor kifejezett kihívást jelent mind klinikai, mind laboratóriumi oldalról [7,8]. Cirrózisos betegekben a BF-ek az esetek kb. felében tünetszegény, aspecifikus klinikai képpel jelentkeznek. A páciensek gyakran szednek nem-szelektív béta-blokkolót, keringésük hiperdinám lehet, vérnyomásuk, a csökkent szisztémás vaszkuláris rezisztencia miatt eleve alacsonyabb, valamint a láz kialakulása is kevésbé gyakori. Ezek következtében a SIRS és a szepszis felismerése is nehézségekbe ütközik és sokszor már csak a szervelegteleniségek kialakulása után, azok kiváltóóának keresése közben ismerik fel őket [9,10].

Jelenleg a CRP és a PCT a BF-ek korai felismerésére használt legerjedtebb laboratóriumi szűrőmarkerek [11]. Azonban ezek a klasszikus paraméterek májcirrózisban, több okból kifolyólag is eltérő viselkedést mutatnak a normál populációhoz képest. Először is, a már említett BT mértéke párhuzamosan fokozódik a májbetegség progressziójával (Child-Pugh C stádiumban a legerőteljesebb) [40]. Az általa fenntartott gyulladásos állapot manifeszt fertőzés nélkül is képes lehet szignifikánsan megemelni az inflammációt jelző markerek szintjét [8,41]. Másodszor, mivel a CRP elsődlegesen a

májban termelődik, a máj funkcionális állapota befolyásolja képződését, következésképpen, előrehaladott májcirrózisban csökken a molekula diagnosztikus pontossága [41]. A marker emelkedésének mértéke tehát nem lesz képes tükrözni az infekció súlyosságát, hiszen minél kifejezettebb a mögöttes májelégtelenség, annál kevésbé képes megemelkedni a CRP szintje egy nyílt BF esetén [42]. Vagyis a marker pont a legesendőbb betegek esetén fogja a legrosszabb teljesítményt mutatni. A PCT koncentrációjára viszont a veseelégtelenség vagy pont annak terápiaja (dialízis) van hatással. Ugyanakkor cirrótisos betegekben gyakori az akut vesekárosodás (acute kidney injury [AKI]) kialakulása, különösen infekciós epizódok esetén [43]. Míg a CRP nagy molekulásúlya (115 kDa) miatt gyakorlatilag nem kerül kiválasztásra a vesén keresztül [44,45], addig a PCT eliminálása döntően renális úton történik, hiszen molekulatömege alig 13 kDa [46]. Emiatt végstádiumú veseelégtelenségben, a kiválasztás zavara következtében, infekció nélkül is emelkedett PCT koncentráció mérhető [47,48]. Ezzel ellentétben, vesepótló kezelést követően, azon molekulák, melyek mérete nem éri el a 60 kDa-t, kifiltrálódnak a dialízis membránon keresztül, így fals-alacsony PCT szint detektálható [49].

### 3.3. ÚJ MARKEREK A CIRRÓZISHOZ TÁRSULÓ BAKTERIÁLIS INFEKCIÓK KIMUTATÁSÁRA

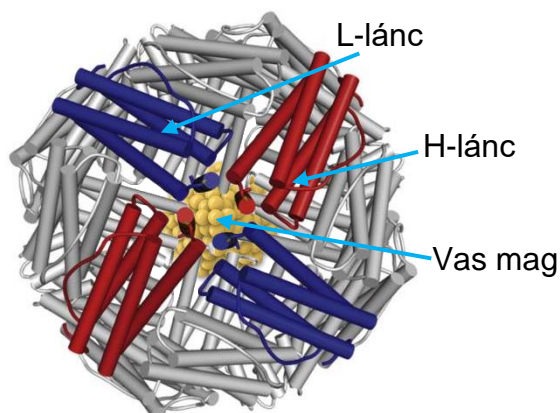
Mint láttuk, a BF és a gyulladáshos reakciók detektálásának klasszikus klinikai és laboratóriumi paraméterei cirrótisban nem működnek kellően hatékonyan. Ezért a BF hatékony korai felismeréséhez és súlyosságának megítéléséhez, valamint megbízható előrejelzéséhez ebben a betegségben további biomarkerekre van szükség [3], hiszen a progresszió lassítása, a szövődmények megelőzése és a mortalitás csökkentése csak a megfelelő eszközök birtokában lehetséges. Másrészt segítségükkel olyan diagnosztikus laboratóriumi panelek kidolgozására nyílhat lehetőség, melyek megbízható támpontot szolgáltatnak az infekciók szempontjából leginkább veszélyeztetett betegcsoport kiválasztásához, akiknek szorosabb követése, illetve szupportív és/vagy profilaktikus antibiotikum terápiaival történő kezelése leginkább indokolt. Az antibiotikum-profilaxis hatékony tervezése pedig az egyre növekvő bakteriális rezisztencia miatt létfontosságú.

Számos nemzetközi kutatólabor, valamint saját munkacsoportunk is tesztel ilyen potenciális biomarkereket, változó eredménnyel. Ilyen próbálkozás volt többek között az sCD163, sCD14, presepsin vagy LBP, de ezek a markerek vagy nem, vagy csak részben váltották be a hozzájuk fűzött reményeket [41,50,51]. Saját kutatásaim során két új, potenciális marker szérumban szintjének vizsgálatát végeztem el: a ferritin, illetve a szolúbilis, mieloid sejteken expresszált trigger receptor-1 (soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 [sTREM-1]).

### 3.3.1. Ferritin

A ferritin elsősorban intracelluláris fehérje, amely molekulánként 4500 vasatom tárolására képes biztonságos, de biológiailag hozzáférhető formában. Huszonnégy alegységből áll, melyeknek két változata létezik (H és L). Ezek szervenként és sejttípusonként változó arányban vesznek részt a molekula felépítésében (**2. ábra**) [52]. Azonban kutatások igazolták, hogy az elsősorban makrofágokból, hepatocitákból és a máj Kupffer sejtjeiből nem kanonikus útvonalon keresztül szekréción keresztül kerülő ferritin túlnyomó része L-alegységből áll [53–55]. A molekula keringésben betöltött szerepe azonban még mindig nem teljesen tisztázott.

Bár a szérumban általában vasszegénynek tekintik, valójában még így is több száz vasatomot tartalmaz, ami igen jelentős mennyiség a transferrin által szállított két atomhoz képest. Ezért egyes tanulmányok a vasszállításban is szerepet tulajdonítanak neki, különösen a szervezet megnövekedett igénye idején [56,57]. Mások a ferritin gyulladáscsökkentő tulajdonságairól számoltak be. A szérumban ugyanis képes kötődni a nagy molekulatömegű kininogénhez, ami megakadályozza a kininogén hasítását és a bradikinin felszabadulás csökkenéséhez vezet [58].



**2. ábra** A ferritin szerkezete

(Készült: Levi S, Rovida E. Neuroferritinopathy: From ferritin structure modification to pathogenetic mechanism. *Neurobiol Dis.* 2015;81:134-143. – 3.D ábra módosításával.)

A mindennapi klinikai gyakorlatban, a szérumferritinszintet a vasháztartás szenzitív indikátoraként használják az alapbetegséggel nem rendelkező populációban. Az alacsony vasszint csökkent, míg a vastúlterheltség magas ferritinkoncentrációt eredményez, a vas-válasz elemek (iron-response elements) és a hozzájuk kötődő fehérjék szabályozása által. Azonban a molekula szintjének értelmezése cirrózisban jóval bonyolultabb, mivel a ferritin egy akut fázis protein, és kibocsájtását a vas mennyiségén kívül a gyulladás is serkenti [59,60], mely a cirrózis gyakori velejárója, különösen a betegség későbbi, dekompenzált szakaszában [2,23]. Ennek megfelelően krónikus májbetegségekben következetesen emelkedett máj- és szérumferritinszintekről számoltak be [61–63].

Ugyanakkor a májcirrózisban szenvedő betegekben vastúlterhelés és vashiányos vérszegénység egyaránt jelentkezhethet [59,64]. A vastúlterhelés, úgy tűnik, hogy legalább részben, a hepatociták csökkent szintetikus kapacitása miatti elégtelen hepcidinszint következménye. Ez a molekula a ferroportin általi vasfelvételt hivatott gátolni az enterociták bazális membránjában, ezért az alacsonyabb hepcidin-koncentráció fokozott vasfelvételhez vezet [65,66]. Ezenkívül a hepcidin szintjére a fertőzés/gyulladás is csökkentő hatással van [66]. Így tehát májcirrózisban a hepcidinszintézis krónikusan (romló májfunkció és BT), illetve akután (fertőzések) is szupresszálódhat, mely a fokozott vasfelszívódás és emelkedett szabad vasszint irányába hat. A májsejtekben, makrofágokban felhalmozódó vas azonban bizonyítottan toxikus hatású, hozzájárul a peroxidáció, valamint az oxidatív stressz fokozódásához, és további májsejtkárosodást válthat ki [67–69].

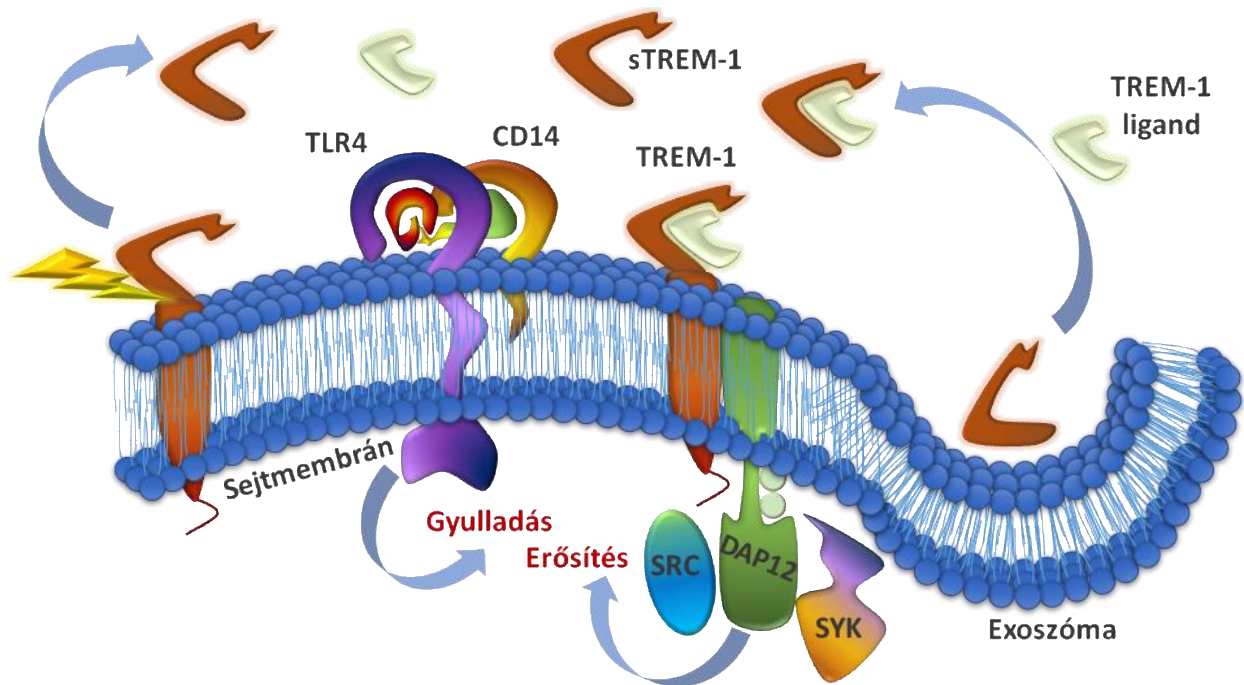
Másrészt viszont, az akut és krónikus vérzés gyakori jelenség cirrózisos betegekben. A magas portális vérnyomás és az instabil hemosztázis növeli a varixvérzés, a portális hipertóniás gasztropátia, a gyomor antrális vaszkuláris ektáziája és a peptikus fekély vérzésének kockázatát. Ráadásul cirrózisos egyéneknél malabszorpció szintén jelen lehet, hozzájárulva a vasraktárak kiürüléséhez [59]. A vashiány ugyanakkor lipid-, glükóz- és egyéb metabolikus-diszfunkciók kialakulásához vezethet, valamint apoptózist indukálhat a sejtekben [70,71].

Mindezen komplex folyamatok tehát tükröződnek a ferritin szérum szintjében. A molekula szerepét már tanulmányozták AD során, ahol összefüggést találtak az

emelkedett koncentráció és a magasabb rövidtávú halálozás között [72–74]. A szérumban a ferritinszint hosszútávú kimenetelekkel való kapcsolata azonban eddig még nem volt vizsgálat tárgya stabil cirrózisos járóbetegben.

### 3.3.2. Szolúbilis, Mieloid Sejteken Expresszált Trigger Receptor-1

A sejtfelszíni receptorok családjába tartozó Mieloid Sejteken Expresszált Trigger Receptor-1 (TREM-1), a toll-like receptorok (TLR) által indított gyulladásos jelet erősíti, tovább fokozva a proinflammatorikus citokinek termelését (**3. ábra**). A molekula neutrofil granulociták, monociták és makrofágok membránján expresszálódik [75,76]. A TREM-1 által indított jelátviteli út a Spleen Tirozin Kináz foszforilációjához és aktivációjához vezet. Ezt a kinázt a különböző májbetegségek gyulladásos folyamatainak fontos szabályozó molekulájaként azonosították, míg az általa indított útvonal gátlása a kórállapotok javulását eredményezte [76–80]. Ezenkívül a TREM-1 szerepéről számos más, gyulladásal járó betegségekben is beszámoltak, mint a szepszis, az ateroszklerózis, a kolitisz, valamint a hepatocelluláris karcinóma (HCC) [81–84]. Bár a TREM-1 ligandja a mai napig ismeretlen, megfigyelések szerint BF során, valamint lipopoliszachariddal vagy lipoteicholsavval való stimuláció hatására megnövekszik a sejtek TREM-1 expressziója [81]. Ugyanakkor, fertőzés alatt, a sejtfelszíni receptor aktivációjával párhuzamosan, a molekula szolúbilis formájának (sTREM-1) szintje is jelentősen megemelkedik a keringésben. A szabad forma keletkezésének módja – eltérő mRNS splice variáns vagy a fehérje proteolitikus hasítódása a sejtfelszínről – jelenleg is vita tárgyát képezi, de mindkét mechanizmus mellett szólnak kísérletes bizonyítékok [85,86]. A sTREM-1 úgynevezett „csali” vagy „csapda” receptorként funkcionál, ugyanis verseng a sejtfelszíni formával az ismeretlen ligandhoz való kötődésért, mely egy negatív visszacsatolási körként gátolja az útvonal aktiválódását [87]. A sTREM-1 szérumban már értékes markernek bizonyult [88,89]. A molekula fő forrását a mieloid sejtek képezik, így a máj funkcionális állapota várhatóan nem befolyásolja a marker diagnosztikai pontosságát, ami cirrózisban jelentős előnyt jelentene a klinikai hasznosíthatóság szempontjából.



### 3. ábra A TREM-1 jelátviteli út és a molekula szolúbilis formájának keletkezése

A TREM-1 ligandkötés hatására a DNAX Activating Protein of 12 kDa (DAP12) - Spleen tirozin kináz (SYK) útvonalon a proinflammatorikus folyamatok erősítését indukálja. A receptor szolúbilis formája (sTREM-1), vagy proteolitikus hasítódás vagy alternatív splicing következtében kerül a keringésbe.

### 3.4. PRIMER SZKLEROTIZÁLÓ KOLANGITISZ (PSC)

A PSC jellegzetessége az intra- és extrahepatikus epeutak krónikus és progresszív gyulladása, mely következtében az epeutak körül fibrózis, bennük kolesztázis alakul ki. A folyamat a parenchima fibrózisához, és a betegek jelentős részében végül cirrózis kialakulásához vezet [90].

Bár a betegség etiológiai háttere kevésbé ismert, úgy tűnik, hogy kialakulásában a bél-máj kölcsönhatásnak fontos szerepe van. Nagy valószínűséggel egyes genetikai faktorok (mint pl. egyes Human Leukocita Antigének) és a mikrobiom kölcsönhatása vezet a felborult immunológiai útvonalak kialakulásához, melynek hátterében ezidáig ismeretlen antigén(ek) hatására kialakuló autoimmunreakció áll. Ez magyarázhatja a kórkép gyakori társulását gyulladós bélbetegséggel (IBD) [12]. A genetikai kutatások által feltárt legtöbb eltérés a T-sejtek funkció zavarát támasztja alá. A béleredetű antigének jelentős

mértékben indukálják az antigénprezentáló sejtek felszínén elhelyezkedő MHC komplexek antigénbemutatását a T-sejtek felé, melyek a klonális expansziót követően mind a béltraktusba, mind pedig a májba eljuthatnak [91]. A kóros T-sejt aktiváció különféle, a fibrózis kialakulásában szerepet játszó citokinin (mint a transzformáló növekedési faktor- $\beta$ ) fokozott felszabadulását eredményezi. A B-sejtek aktiválódását jelzi a BT-hoz kapcsolható szerológia antitestek (pl. anti-neutrofil citoplazmatikus antitest [ANCA]) gyakori megjelenése. Lényegesen kevésbé ismert az egyéb immunsejteknek (természetes ölüsejtek, neutrofil granulociták, makrofágok) szerepe a betegség patogenezisében [92,93].

Az endotoxin-expozíció és gyulladás hatására a kolangiociták tight-junction-jei szétválhatnak, mely további károsító tényezők (pl. epesavak) hatásával szemben teszi még sérülékenyebbé ezeket a sejteket [90]. Az epesavak toxikus hatásával szemben normál körülmények között védelmet nyújtó egyéb mechanizmusok is károsodhatnak. Ezek közül az egyik a sejteket a lumen felől takaró bikarbonát réteg, melynek a felépülésében különböző iontranszporterek játszanak szerepet (pl. a cisztikus fibrózis transzmembrán átvitel szabályozó). Ezek, illetve a biliáris epitélium apikális felszínén expresszálandó TGR5 epesav receptor, vagy glikokalix-stabilizáló fukoziltranszferáz enzim működés zavarai, melyek szintén részt vesznek a bikarbonát védelem kialakításában, a védőréteg meggyengülésével járhatnak. Mindez a kolangiociták epesavak okozta sérüléséhez, végül pedig sejthalálához vezethet [94–96]. Ez a folyamat képezi a biokémiai alapját a különböző epesav-bázisú terápiáknak, mint például urzodeoxikólsav vagy nor-urzodeoxikólsav. A károsodott kolangiociták mindezidáig tisztázatlan molekuláris mechanizmusú kereszt-kommunikációja a máj csillagsejtjeivel és a portális miofibroblasztokkal eredményezi az epeutak körüli koncentrikus fibrózis kialakulását PSC-ben, mely epeúti szűkületek kialakulásához, valamint a kolangiocarcinóma (CCA) kockázatának jelentős megnövekedéséhez vezet [97].

A kórképet azonban nehéz diagnosztizálni, mivel nem áll birtokunkban olyan biomarker, mely a PSC-re specifikus lenne. Jellegzetes a kolesztatikus enzimek (alkalikus foszfatáz és gamma-GT) szérum szintjének az emelkedése, melyhez mérsékelt GOT és GPT emelkedés is társulhat. Az immunglobulin (Ig)G és IgM emelkedés, valamint az atípusos P-ANCA jelenléte gyakori a szérumban, illetve egyéb autoantitestek, mint az

ANA és anti-SMA is előfordulhatnak, ezek azonban nem betegség-specifikus eltérések. A PSC diagnózisa a kolangiográfiás kép alapján kerül felállításra, amely többszörös szűkületet és dilatációt mutat, rendszerint olyan betegeknél, akiknél a laboratóriumi vizsgálatok perzisztáló kolesztázist jeleznek. A PSC diagnosztizálásához a noninvazív mágneses rezonancia kolangiográfiát (MRCP) részesítik előnyben az invazív endoszkópiával (ERCP) szemben. Májbiopsziára csak ritkán van szükség, amikor a kis epeutakat érintő variáns gyanúja merül fel. A diagnózis a szklerotizáló cholangitis másodlagos okainak kizárása után mondható ki [98,99]. A PSC klinikai megjelenése ráadásul nem is egységes, hanem öt különböző altípusa különíthető el: a klasszikus nagy epeúti, a kis epeúti, a magas IgG4 szinttel társuló, az autoimmun hepatitisz jellegű hordozó („overlap” szindróma), és a CCA-val társuló forma [100].

A terápiás lehetőségek is korlátozottak. Kuratív gyógyszeres kezelés nem áll rendelkezésre, de sajnos még a betegség progresszióját, valamint a szövődmények és a végstádiumú májelégtelenség kialakulását sem tudjuk megakadályozni. Májcirrózis kifejlődését követően a májátültetés az egyetlen lehetőség, azonban a PSC az esetek egy negyedében kiújul a graftban [90]. Az epeúti szűkületek miatt visszatérő bakteriális cholangitiszek kezelésére a domináns szűkületek tágítása és sztentelése kínál lehetőséget, ez azonban további májkárosodással jár. A PSC-s betegek életkilátásai jelentősen rosszabbak, a halálozás megközelítőleg négyszer gyakoribb, mint az átlagpopulációban [101].

A bél-máj tengely működészavarának részletesebb felderítése segíthet új és hatékonyabb diagnosztikus biomarkerek azonosításában, valamint egy betegség-specifikus terápia kifejlesztésében és a szövődmények kialakulásának előrejelzésében. Ilyen markerek azonosításának céljával, valamint a betegségre jellegzetes szerológiai eltérések (emelkedett immunglobulinszint, atípusos P-ANCA megjelenése) ismeretétől vezérelve, antimikrobiális- és autoantitestek jelenlétét, illetve típusát vizsgáltuk a betegek szérumában. Kutatásaink során bélbaktérium-antigének széles spektrumával szemben (phosphopeptidomannan – ASCA; különböző endotoxinok – EndoCab; több Gram-negatív és Gram-pozitív fehérje – OMP) tudunk fokozott immunválaszt demonstrálni. Azonban, az ezen baktérium-antigének elleni szerológiai válasz tanulmányunkban, nem mutatott összefüggést a PSC progressziójával. Ezen munka közben fordult

érdeklődésünk a pankreatikus glikoprotein 2 (GP2) ellenes autoantitestek és különösen ezek IgA izoformái felé.

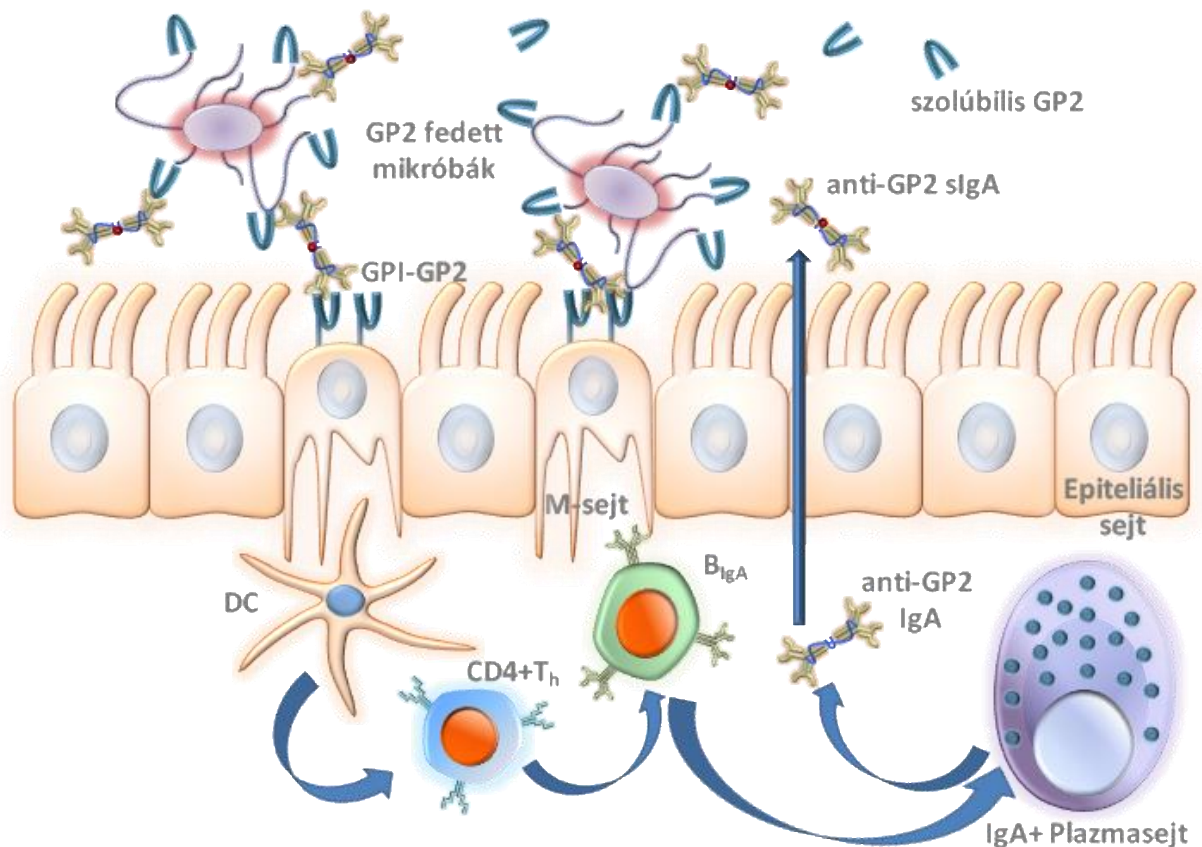
### 3.5. A PANKREATIKUS GLIKOPROTEIN 2 (GP2) ELLENES IgA AUTOANTITESTEK

#### **3.5.1. A pankreatikus glikoprotein 2 ellenes autoantitestek jellemzői és jelentősége**

A GP2 az exokrin hasnyálmirigy zimogén granulumaiból jelentős mennyiségben szekretálódik a pankreásznedvbe és a fimbriális-adhezin H (FimH) komponensű, 1-es típusú bakteriális pilusok szolúbilis receptoraként funkcionál. Ugyanakkor a Peyer-plakkok M-sejtjeinek apikális felszínén a fehérje membránkötött formában is expresszálódik, ahol a mukózális antigének detektálásában játszik szerepet [102–104]. A GP2 így esszenciális jelentőséggel bír a FimH komponensű bélbaktériumokkal szembeni nyálkahártya-immunválasz kialakításában (**4. ábra**). Valószínűleg a kommenzális baktériumokkal szembeni tolerancia és a patogén törzsekre adott immunválasz egyensúlyát hivatott fenntartani [105,106].

A krónikus májbetegségekben patológiás mértéket öltő BT fokozott antimikrobiális antitestképződéssel járhat, mely a folyamat kórossá válása esetén autoantitestek megjelenéséhez vezethet. Nemrégiben, két eltérő megközelítést alkalmazó és egymástól független kutatócsoport [107,108], a 80-as években felfedezett hasnyálmirigy ellenes antitest [109] antigénjeként azonosította a GP2-t, mely szövettani metszeteken indirekt immunfluoreszcens festéssel cseppszerű mintázatot mutatott [108]. A valódi antigén azonban feltehetőleg a bakteriális komponens és a hozzákötődött fehérje komplexe [106].

Az anti-GP2 antitest tehát az úgynevezett hasnyálmirigy-ellenes antitestek egyik típusa. Ezekről az antitestekről ismert, hogy a gyulladássos bélbetegségek közül, a Crohn-betegségben (CD) szenvedő páciensek akár 40%-ában is jelen lehetnek [110]. Saját munkacsoportunk, egy nagyetszámú IBD kohorszt vizsgálva, az irodalomban elsőként számolt be a hasnyálmirigy-ellenes antitestek jelenlétére és a CD különböző extraintesztinális manifesztációinak megjelenése közötti összefüggésről, ideértve a PSC gyakoribb társulását az anti-GP2 antitest pozitív esetekben. Ezenkívül, az antitest IgA izotípusának jelenlétében a penetráló betegségforma is gyakoribb volt [111].



#### 4. ábra A glikoprotein 2 ellenes antitest képződése

A glikoprotein 2 (GP2) az acináris hasnyálmirigy-sejtekből az emésztő enzimekkel együtt szekretálódik a bél lumenébe, ahol opszonizálja a bélben lévő FimH pozitív mikrobákat. A GP2 ezenkívül a Peyer-plakkok M-sejtjeinek felületén is kifejeződik. A molekula ezen formája is kölcsönhatásba lép a FimH-pozitív baktériumokkal, és részt vehet a kötött ligandok az M-sejteken keresztüli transzcitózisában. A dendritikus sejtek (DC) prezentálják az antigéneket a  $T_{\text{helper}}$  sejteknek, amelyek B-sejtek aktivációját és plazmasejtté érését indukálják. A GP2 iránti tolerancia elvesztése után az egyes plazmasejtek által termelt anti-GP2 IgA-t az epiteliális sejtek aktívan szállítják a bél lumenébe.

#### 3.5.2. Az IgA izotípusú autoantitestek keletkezése és klinikai jelentősége

Az IgA izotípusú antitestek különösen fontos szerepet töltenek be a bélnyálkahártya immunvédekezésében. Ezért, bár a szisztémás autoimmun kórképek laboratóriumi kivizsgálása során általában az IgG izotípusú autoantitestek szérumszintje az irányadó, a bél nyálkahártyájának érintettsége esetén, az IgA típusú antimikrobiális- és autoantitestek meghatározása segítséget nyújthat a bélben zajló patológiás folyamatok aktuális állapotának megítélésében és a kórlefordás előrejelzésében. A legjobb példa erre

a cöliákiához társuló anti-endomízium és anti-transzglutamináz IgA autoantitestek, melyek a betegség jóval szenzitívebb markerei, mint a hasonló antigén-specifitású, de IgG izotípusú autoantitestek [112]. A gyulladásos bélbetegségek esetében hasonló a helyzet egy mikroba-specifikus antitest, az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest (ASCA) esetében [113]. Korábban saját vizsgálataink során a cirrózisos betegek szérumban is észleltük ezt a jelenséget az IgG és IgA izotípusú ANCA esetében [114].

A humán szérum össz-IgA mennyiségének túlnyomó része az IgA1 altípusba tartozik, míg az IgA2 szintje ennek csak töredéke. Korábbi tanulmányok alapján az IgA2 arányának megemelkedését és a szekretoros komponens (SC) egyidejű jelenlétét a nyálkahártya eredetű IgA-szekréciónak bizonyító leletnek tekintik [115,116]. Egészséges egyéneknél az SC, a szérum-IgA antitestek kevesebb, mint 1%-án mutatható ki, melyre annak keletkezési mechanizmusa szolgáltat magyarázatot.

A bélnyálkahártya epiteliális sejtjei IgA receptoruk segítségével felveszik a dimer IgA molekulát majd intracelluláris transzportot követően kiválasztják a mukózális felszínre. A folyamat során a receptor egy darabja (SC) lehasad és kovalens kötésben marad az antitesttel, melyek együtt alkotják az úgynevezett szekretoros IgA-t (slgA; **4. ábra**). A lumenbe kiválasztott komplex kettős funkcióval bír. Egyrészt, neutralizál bizonyos mikrobiális antigéneket, megakadályozva azok interakcióját az intesztinális epitéliummal – ezt a folyamatot immunkizárásnak nevezzük. Másrészt, az slgA az antigének fordított irányú transzportjában is részt vesz (a béllumenből az immun szövet felé), mely az immunrendszer funkciója szempontjából kiemelkedő fontosságú folyamat [117,118]. Az slgA antitestek a visszavételt követően a ductus thoracicusba, majd a szisztémás keringésbe is eljutnak, így kimutathatóak a szérumból.

Miután a PSC kialakulása és a bélnyálkahártya károsodása (valamint az ehhez társuló BT) közötti összefüggést számos kísérletes adat támasztja alá, ezért az IgA típusú autoantitest vizsgálatoknak várhatóan ebben a kórképben is jelentősége lehet. Mindezek alapján munkánk során az anti-GP2 antitestek IgG és IgA izotípusú formáit is meghatároztuk és klinikai jelentőségüket értékeltük.

### 3.6. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során 3 különböző biomarkert teszteltünk krónikus májbetegeken. Vizsgáltuk a molekulák alkalmasságát a betegség súlyosságának, illetve prognózisának megítélésre, valamint a társuló bakteriális infekciók kimutatására vagy előrejelzésére.

1. Egy kizárólag járóbetegekből álló cirrózisos kohorszban, 2 éves követés során teszteltük a **ferritin** szérumszintjének összefüggését a betegség súlyosságával, valamint előrejelző képességét a kompenzált betegek dekompenzált stádiumba való progressziójának, a dekompenzált betegekben megjelenő BF-ek, valamint az egész populáció halálozásának tekintetében.
2. Megvizsgáltuk a **sTREM-1** szérumszintjének összefüggését a betegség súlyosságával, a BF-ek jelenlétével és a BF-ben szenvedő betegek 90-napos halálozásával egy olyan cirrózisos kohorszban, amely ambuláns és AD-val hospitalizált betegeket egyaránt tartalmazott.
3. Tízéves követés során vizsgáltuk az **anti-GP2 autoantitestek** különböző izotípusainak előfordulási gyakoriságát egy PSC-s betegeket tartalmazó kohorszban. Továbbá meghatároztuk a marker összefüggését a betegség súlyosságával és felmértük alkalmasságát a transzplantációmentes túlélés idejének előrejelzésében.

## 4. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. BETEGPOPULÁCIÓK

#### 4.1.1. Májcirrózis

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Intézetének Gasztroenterológia Tanszékén 2006 májusa óta történik a gondozott májcirrózisos betegek klinikai adatainak és biológiai mintáinak prospektív gyűjtése. A betegek a tervezett vagy rendkívüli kontrollvizsgálatok alkalmával a hepatológiai járóbeteg-rendelésekről, valamint AD miatti hospitalizáció esetén a fekvőosztályról kerülnek bevonásra a tanulmányokba.

2006 májusa és 2011 októbere között összesen 244, jól karakterizált cirrózisos járóbeteg került beválasztásra, negatív hemokromatózis teszttel. A betegek etiológiai tényezői a következőképpen alakultak: alkohol: 137 beteg, vírus hepatitis: 90 beteg, immunológiai etiológia (PSC, PBC, AIH): 17 beteg. Tizenhárom beteg esetében egynél több etiológiai faktort is azonosítottunk. Ezen betegeinket 2 évig követtük a ferritinszint hosszútávú kimenetelekkel való összefüggését vizsgáló tanulmányunkban. A betegek beválasztáskori klinikai adatait az **1. Táblázat** tartalmazza.

2014 decembere és 2016 júniusa között 172 ambuláns és 97 AD-val hospitalizált beteget választottunk be abba a vizsgálatba, amelyben a sTREM-1 alkalmazásának lehetőségét vizsgáltuk meg a BF diagnózisának felállításában, valamint a fertőzött betegek 90 napos halálozásának előrejelzésében. Ezen betegeink etiológiai tényezői a következőképpen alakultak: alkohol: 95 beteg, vírus hepatitis: 49 beteg, immunológiai etiológia: 46 beteg, nem alkoholos zsírmáj talaján kialakult cirrózis: 20 beteg. Huszonnyolc beteg esetében egynél több etiológiai faktort is azonosítottunk). A követési időszak a fent leírtaknál (2 év, illetve 90 nap) hamarabb csak a következő esetekben került terminálásra: májtranszplantáció, a beteg halála, illetve a követésből való kiesés (amennyiben az adott betegről nem volt elérhető további adat). A betegek beválasztáskori klinikai adatait az **2. Táblázat** tartalmazza.

A cirrózis diagnózisa a klinikai (bőrjelek, tapintáskor észlelt májrigidség, aszcitesz, kollaterális varixok és/vagy hajlamosító tényezők jelenléte, például alkoholfogyasztás, metabolikus szindróma, vírusos hepatitis és autoimmun májbetegség), biokémiai

(emelkedett bilirubin és koagulációs paraméterek, csökkent albumin, koleszterin és kolinészteráz szint és thrombocyta szám), képalkotó eljárások (a máj felszínének egyenetlensége, megnövekedett májdenzitás, inhomogenitás, szplenomegália, aszcitesz ultrahanggal vagy számítógépes tomográfiával), elasztográfia (miután 2009-ben elérhetővé vált Intézetünkben), és ha rendelkezésre állt, szövettani eredmények kombinációján alapult [119]. Ezenkívül 13 beteg esetében a cirrózist sebészek ismerték fel hasi műtét során.

## 1. Táblázat

*A ferritin vizsgálatába bevont cirrózisos betegek adatai*

Betegek	Összes n=244	Kompenzált n=101	Dekompenzált n=143
Kor (év) #	56 (49-65)	54 (49-64)	57 (51-65)
Nem (f/n)	124/120	47/54	77/66
Alkoholos etiológia *	137 (56,1%)	36 (35,6%)	101 (70,6%)
Child-Pugh stádium *			
A	153 (62,7%)	97 (96,0%)	56 (39,2%)
B	80 (32,8%)	4 (4,0%)	76 (53,1%)
C	11 (4,5%)	0 (0,0%)	11 (7,7%)
MELD pontszám#	11 (8-14)	9 (7-12)	12 (9-14)
Bilirubin (µmol/L) #	26 (15-42)	18 (13-30)	30 (19-51)
Albumin (g/L) #	38 (33-42)	42 (37-45)	36 (31-40)
Kreatinin (µmol/L) #	67 (54-83,5)	62 (52-76)	70 (55-88)
INR#	1,17 (1,09-1,31)	1,11 (1,05-1,21)	1,22 (1,12-1,36)
FVS (10 <sup>3</sup> /ml) #	5,26 (4,19-7,14)	5,55 (4,25-7,85)	5,24 (4,05-6,89)
CRP (mg/L) #	3,84 (1,19-7,94)	1,41 (0,50-3,95)	5,67 (2,58-9,87)
Anémia °*	98 (40,2%)	23 (22,8%)	75 (52,4%)
Előző varix vérzés *	59 (24,2%)	0 (0,0%)	59 (41,3%)
Aszcitesz °*	88 (36,1%)	0 (0,0%)	88 (61,5%)
Társbetegség °*	127 (52,0%)	47 (46,5%)	80 (55,9%)
HCC °*	26 (10,7%)	12 (11,9%)	14 (9,8%)

*MELD, model for end stage liver disease; INR, international normalized ratio; FVS: fehérvérsejt szám; CRP, C-reaktív protein; HCC, hepatocelluláris karcinóma; # medián (interkvartilis régió); \* n (%); ° jelenléte*

Az aktuális és anamnesztikus klinikai adatok a betegek dokumentációjának áttekintése után, előre meghatározott kérdéssor segítségével kerültek rögzítésre a tanulmányokba való beválasztáskor. Az ezzel egyidőben végzett rutin laboratóriumi

vizsgálatokhoz szükséges mintavételkor történt a kutatáshoz szükséges biológiai anyagok (szérum, plazma, teljes vér) begyűjtése is.

## 2. Táblázat

*A sTREM-1 vizsgálatába bevont cirrózisos betegek adatai*

Betegek	Járóbetegek n=172	Fertőzés mentes AD- s betegek n=41	AD-s betegek bakteriális fertőzéssel n=56
Kor (év) #	60 (50-67)	61 (56-67)	60 (54-65)
Nem (f/n)	97/75	29/12	26/30
Alkoholos etiológia *	95 (55%)	30 (73%)	39 (70%)
Child- A	129 (75,0%)	7 (17,1%)	2 (3,6%)
Pugh B	39 (22,7%)	27 (65,8%)	24 (42,8%)
stádium* C	4 (2,3%)	7 (17,1%)	30 (53,6%)
MELD pontszám #	10 (8-12)	13 (11-16)	17 (14-26)
Bilirubin (µmol/L) #	20,4 (12,0-34,0)	38,8 (19,6-59,2)	49,8 (26,8-134,0)
Albumin (g/L) #	40 (34-45)	31 (28-33)	26 (22-31)
Kreatinin (µmol/L) #	62 (53-84)	71 (54-104)	104 (66-193)
INR #	1,17 (1,00-1,32)	1,23 (1,16-1,44)	1,41 (1,18-1,82)
FVS (10 <sup>3</sup> /mL) #	5,89 (4,30-7,73)	6,09 (4,58-9,38)	9,49 (6,96-13,17)
CRP (mg/L) #	4,1 (1,5-7,7)	14,5 (4,8-22,3)	39,3 (18,4-68,8)
Aszcitesz °*	40 (23,3%)	31 (75,6%)	53 (94,6%)
Társbetegség °*	77 (44,8%)	26 (63,4%)	36 (64,3%)
HCC °*	10 (5,8%)	4 (9,8%)	3 (5,4%)
Fertőzés helye *	Pneumonia	-	9 (16,1%)
	UTI	-	28 (50%)
	SBP	-	21 (37,5%)
	Más	-	11 (19,6%)
	Többszörös	-	12 (21,4%)

*AD: akut dekompenzáció; MELD: model for end stage liver disease; FVS: fehérvérsejt szám; INR: international normalized ratio; CRP: C-reaktív protein; HCC, hepatocelluláris karcinóma; UTI, húgyúti infekció; SBP, spontán bakteriális peritonitisz*

*# medián (interkvartilis régió); \* n (%); ° jelenléte*

Az alábbi betegségtörténetre vonatkozó adatok kerültek rögzítésre: életkor a diagnózis felállításakor, májcirrózis etiológiája, nyelőcsővarixok jelenléte, korábbi AD epizód(ok) típusa és időpontja, hepatocelluláris karcinóma (HCC) és más szervrendszereket érintő társbetegségek fennállása (malignus betegségek, krónikus veseelégtelenség, pangásos szívelégtelenség, iszkémiás szívbetegség, cerebrovaszkuláris és perifériás érbetegség, krónikus tüdőbetegség, cukorbetegség),

illetve a májcirrózissal összefüggésben alkalmazott gyógyszeres terápia. A májbetegség súlyosságát a Child-Pugh [120] és a MELD (Model for End-Stage Liver Disease) pontrendszer [121] segítségével mértük fel, valamint a betegség klinikai stádiuma is meghatározásra került (kompenzált/dekompenzált állapot) [23].

AD-val jelentkező betegek esetében rögzítettük annak fajtáját, mely egy vagy több szövődmény egyidejű fennállását jelenthette a következők közül: hirtelen felszaporodó aszcitesz, heveny gasztrointesztinális vérzés, akut HE, valamint BF. A hirtelen felgyülemelő aszcitesznek a Nemzetközi Aszcitesz Klub meghatározása alapján a II/III. stádiumú hasvíz megjelenését tekintettük [122], míg az akut HE-t ideggyógyászati ok nélkül kialakult heveny neurológiai állapotromlásként definiáltuk egy megelőzően ép tudatú betegben [123]. A gasztrointesztinális vérzések diagnosztizálására minden esetben felső panendoszkópiát végeztünk, és a vérzésforrás nyelőcsővarix-eredetét a Baveno kritériumok alapján állapítottuk meg. E szerint a nyelőcsővarixokat fogadtuk el vérzésforrásként, amikor az endoszkópia alkalmával, a varixokból származó aktív vérzés volt látható (lövellő vagy folyamatosan szivárgó), illetve, ha a varixokon a közelmúltban lezajlott vérzés jelei láthatóak (fehér fibrin csomó vagy átfedő vérrög). A varixokat tekintettük vérzésforrásnak akkor is, amikor úgynevezett „vörös jelek” (vérzés rizikófaktorai) voltak láthatóak a varixokon, és vér volt a gyomorban más vérzési forrás hiányában, vagy jelen voltak a felső GI vérzés klinikai tünetei [124]. A fertőzések jelenlétének megállapítása az infekcióra utaló klinikai tünetek, a képalkotó vizsgálatok (hasi ultrahang, mellkasröntgen), és a laboratóriumi leletek, mint a CRP, PCT, fehérvérsejtszám, a vizeletüledék-vizsgálat, valamint hasvíz jelenléte esetén, az aszciteszminta neutrofilszám meghatározásának eredményeire alapozva történt. A kapott leletek függvényében mikrobiológiai vizsgálatot is végeztünk az adott fertőzés lokalizációjának megfelelően. Szepszis, illetve azonosítatlan infekcióforrás esetén hemokultúrát vettünk. A következő laboratóriumi eredmények támogatták a BF diagnózisát: >10,8 G/L fehérvérsejtszám (vagy leukopéniás betegekben a korábbi stabil érték megduplázódása) magas (>76%) neutrofil granulocita aránnyal, valamint >10 mg/L szérum CRP- és/vagy >0,15 µg/L PCT-értékkel [41]. A BF-ek további jellemzését a hagyományos kritériumoknak megfelelően végeztük [125–128]. Az alábbi BF típusok kerültek azonosításra: (1) Spontán bakteriális peritonitisz (SBP): aszcitesz neutrofil

granulocitaszám:  $>250/\text{mm}^3$  és/vagy pozitív eredményű aszcitesztenyésztés, másodlagos abdominális fertőzésforrás kizárásával; (2) Húgyúti infekció: dysuriás panaszok, pyuria (vizelet fehérvérsejtszám  $>10/\text{mm}^3$ ), és/vagy pozitív vizelettenyésztési lelet; (3) Tüdőgyulladás: köhögés, pozitív eredményű mellkasröntgen, valamint köpettenyésztés alapján; (4) Egyéb: bőr-, lágyrész, valamint epeúti fertőzések, endokarditisz, gasztroenteritisz, osteomyelitisz; (5) Ismeretlen eredetű BF-ek: infekciós tünetek, valamint pozitív hemokultúra ellenére sem egyértelműen azonosítható lokalizációjú fertőzőgóc. Ezenkívül az AD-s betegekben meghatároztuk a CLIFF-AD pontszámot [129] valamint az esetlegesen kialakuló ACLF grádusát [4].

A betegek követése során szintén rögzítésre került a kórházi felvételt szükségessé tevő AD epizód(ok) időpontja és típusa, valamint a BF jelenléte, melyeket a gondozó gasztroenterológus a fent ismertetett eljárás alapján értékelt. Az adatokat egy elektronikus adatbázisban tároltuk. A vizsgálati időszak végén, minden klinikai adatot kinyertünk további analízis céljából.

#### **4.1.2. Primer szklerotizáló kolangitisz**

A PSC ritka előfordulására tekintettel ezen betegek mintáinak és klinikai adatainak gyűjtését a Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinikával és I.sz. Gyermekklinikával, valamint a Pécsi Tudományegyetemmel együttműködve végeztük. 2006 januárja és 2007 decembere között összesen 65 (55 felnőtt és 10 gyermekek), jól karakterizált PSC-s beteget tudtunk bevonni.

A PSC kórisméjének felállítását a klinikai, laboratóriumi és képalkotó vizsgálatok (többszörös szűkület és dilatáció a mágneses rezonancia- vagy endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfiás képen), illetve szükség esetén, szövettani vizsgálat eredményeire alapoztuk [130]. A különféle eredetű szekunder szklerotizáló kolangitiszben, valamint az egyidejűleg malignus betegségben is szenvedő személyek minden esetben kizárásra kerültek. A klinikai adatok átfogó összegyűjtését a betegek dokumentációjának áttekintése révén, valamint előre meghatározott kérdéssor segítségével végeztük a tanulmányba való beválasztáskor. Az ezzel egyidőben megkért rutin laboratóriumi vizsgálatokhoz szükséges mintavételkor történt a kutatáshoz szükséges biológiai anyagok (szérum, plazma, teljes vér) begyűjtése is, valamint a

módosított Mayo kockázati pontszám [MRS] is ekkor került meghatározásra [131]. Az alábbi betegség történetre vonatkozó adatok kerültek rögzítésre: életkor a diagnózis felállításakor, betegségfennállás időtartama, PSC típusa (nagy, vagy kis epeutak érintettsége), társuló IBD jelenléte, illetve annak típusa, overlap szindróma fennállása, a cirrózis és a portális hipertenzió szövődményeinek jelenléte (pl. aszcitesz, HE, nyelőcsővarixok jelenléte/vérzése), előzetesen történt ortotopikus májátültetés (OLTx), társbetegségek és a gyógyszeres terápia (pl. urzodeoxikólsav, szteroid, immunszuppresszív-, valamint biológiai szerek). A betegek beválasztáskori klinikai adatait a **3. Táblázat** tartalmazza.

### 3. Táblázat

*A GP2 vizsgálatába bevont PSC-s betegek adatai*

PSC-s betegek (n=65)	
Életkor (év) #	23 (17–37)
Nem (f/n)	46/19
Gyermek *	10 (15,4%)
Betegség lefolyás hossza (év) #	6 (2–8)
Mayo kockázati pontszám #	-0,564 (-1,142–0,174)
Albumin (g/L) #	43 (40–46)
Bilirubin (µmol/L) #	15 (11–23)
GPT (U/L) #	52 (32–100)
GOT (U/L) #	42 (28–69)
γGT (U/L) #	154 (63–320)
ALP (U/L) #	566 (326–822)
INR#	1,0 (1,0–1,2)
Vérlemezke (10 <sup>9</sup> /L) #	257 (187–321)
Cirrózis <sup>°*</sup>	14 (20,3%)
Gyulladásos bélbetegség <sup>°*</sup>	52 (73,9%)
Crohn-betegség <sup>°*</sup>	17 (32,7%)
Ulceratív Kolitisz <sup>°*</sup>	35 (67,3%)
Overlap szindróma <sup>°*</sup>	9 (13,8%)
Kis epevezeték PSC *	5 (7,7%)

*ALP: alkalikus foszfatáz, GPT: glutamát-piruvát transzamináz, GOT: glutamát-oxálacetát transzamináz, γGT: γ-glutamil-transzferáz, INR: international normalized ratio.*

*# medián (interkvartilis régió); \* n (%); ° jelenléte*

A PSC-s betegek követése alatt az ambuláns kontroll látogatások, illetve a kórházi bennfekvések során a gondozó gasztroenterológus rögzítette a laboratóriumi, a képalkotó és az endoszkópos vizsgálatok eredményét, a szövődmények típusát (cirrózis, a biliáris traktus daganata [epeúti karcinoma, epehólyag daganat], epeúti gyulladás vagy kolorektális daganat) és idejét, valamint a gyógyszeres kezelést. Ha a májbetegség szövődményeinek következtében a beteg meghalt vagy annak megelőzésére OLTx-et hajtottak végre azt egységesen kedvezőtlen betegségkimenetelként definiáltuk (összetett végpont). A követési időszak 10 évig vagy az összetett végpont bekövetkeztéig, esetlegesen a követésből való kiesésig tartott (amennyiben az adott betegről nem volt elérhető további adat). A gyűjtött adatokat egy elektronikus adatbázisban tároltuk. A vizsgálati időszak végén, minden klinikai adatot kinyertünk további analízis céljából.

#### **4.1.3. Kontroll csoportok**

A PSC-s betegeinket vizsgáló tanulmányunkban két betegcsoport (gyulladásos bél betegségben [IBD] és krónikus májbetegségben szenvedő páciensek), valamint egészséges egyének szolgáltak kontrollként.

Az egészséges kontrollcsoportba 100 (férfi/nő: 45/55), rendszeres debreceni véradót választottunk be, az életkor egyeztetésével (életkor: 30 év [21-40]). Ezen személyeknek semmilyen gasztrointesztinális vagy májbetegségük nem volt.

Az IBD kontrollcsoport, egy, a kutatócsoportunk korábbi tanulmányaiba bevont pácienseket tartalmazó kohorszból állt. (CD: 257, férfi/nő: 109/148, életkor: 25 [19-33] év és ulceratív kolitisz [UC]: 170, férfi/nő: 78/92, életkor: 34 [23-44] év) [132].

A krónikus májbetegségek kontrollcsoport primer biliáris kolangitiszes, de cirrózisban nem szenvedő (PBC, n=102, férfi/nő: 4/98, életkor: 59 [52-66] év), krónikus hepatitisz C infekcióval bíró (chrHCV, n=119, férfi/nő: 50/69, életkor: 55 [47-65] év), valamint alkoholos májcirrózisban szenvedő (aLC, n=267, férfi/nő: 147/120, életkor: 58 [51-66] év) páciensekből állt. A PBC diagnózisa a kolesztázis biokémiai bizonyítékain, a szérumban jelenlévő anti-mitokondriális antitestek és/vagy PBC-specifikus anti-mitokondriális-M2 antitest pozitivitáson, valamint a hisztológiai eredményeken alapult, az extrahepaticus kolesztázis kizárása mellett [133]. A krónikus HCV infekció diagnózisát a pozitív HCV ribonukleinsav lelet, az emelkedett májfunkciós tesztek, és a májbiopsziás eredmény alapján mondtuk ki. A cirrózis kórisméjét - a fent részletesen leírásra került

módon - klinikai, biokémiai, képalkotó és amennyiben mód volt rá, hisztológiai leletek alapján állítottuk fel.

## 4.2. LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK

### **4.2.1. Rutin laboratóriumi diagnosztikai tesztek**

A rutin laboratóriumi paraméterek (májenzimek, máj- és vesefunkciós tesztek, CRP, vérkép) a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében kerültek meghatározásra. A glutamát-piruvát transzamináz, glutamát-oxálacetát transzamináz, alkalikus foszfatáz,  $\gamma$ -glutamil-transzferáz, kolinészteráz, urea, kreatinin és CRP tesztek mérése egy Cobas c702 készülék (Roche, Bázél, Svájc) segítségével történt. A vérkép paraméterek – köztük a hemoglobin koncentráció és a hematokrit – meghatározásához ADVIA 2120-as hematológiai automatát (Siemens Healthineers, Erlangen, Németország) használtunk. A familiáris hemakromatózis kimutatása, a HFE gén polimorfizmusának (HFE p.C282Y) molekuláris genetikai vizsgálatával történt.

A betegek bevételekor gyűjtött natív és citráttal alvadásgátolt vérmintákat, késedelem nélkül lecentrifugáltuk (3000xg, 10 perc) és a szérumot, valamint a plazmát - 70°C-on tároltuk a további vizsgálatok elvégzéséig.

### **4.2.2. Szérumferritinszint mérése**

A szérumferritin-szintek meghatározását szintén rutin laboratóriumi egységünk végezte, Cobas e602 automata (Roche) segítségével. Mivel az irodalomban nincs a cirrózisos populációra vonatkozó elfogadott kórosan alacsony, illetve magas ferritinérték meghatározva, a különböző kimenetek egységes értékeléséhez a kohorsz alsó és felső 25%-os percentilértékei alapján osztottuk betegeinket alacsony (első kvartilis [Q1]), közepes (IQR [Q2-3]), illetve magas (negyedik kvartilis [Q4]) ferritinszinttel rendelkező csoportokba.

A szérumferritinszint és a vércépzés összefüggésének vizsgálatához betegeinket, hemoglobin- és hematokritértékük alapján, anémiás és nem anémiás csoportokba soroltuk. Laboratóriumunkban a hemoglobin és a hematokrit normáltartománya nőknél 115-150 g/L, illetve 0,35-0,47, míg férfiaknál 130-165 g/L, valamint 0,39-0,50. Ha ezen

paraméterek közül legalább az egyik alacsonyabb volt, mint a hozzátartozó referenciatartomány alsó határa, úgy az adott beteget a vérszegény csoportba soroltuk.

#### **4.2.3. Szérum sTREM-1 szint mérése**

A sTREM-1 szérum koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható enzim kapcsolt immunoszorbens esszével (ELISA) határoztuk meg, a gyártó (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Cat.#: DY1278B) utasításai szerint, a következő módosításokkal: a lemezek fedéséhez karbonát-bikarbonát puffert használtunk, a másodlagos antitestek inkubációja során pedig kecske szérum helyett, ekvivalens dózisú borjú szérumalbumint [BSA, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat.#: SH30574)] alkalmaztunk. A szérummintákat duplikátumban mértük ugyanazon a lemezen és a későbbi statisztikai analízisekhez az értékek matematikai átlagait használtuk. A mérések közötti variációs koefficiens 9%, az analitikai érzékenység 7 pg/mL volt.

#### **4.2.4. Szérum anti-GP2 autoantitest-szint meghatározása**

Az IgA és IgG típusú anti-GP2 antitestek jelenlétét a betegek és kontrollok szérumában, kereskedelmi forgalomban kapható, sejt-alapú indirekt immunfluoreszcens (IIF) esszé segítségével detektáltuk, a teszthez mellékelt útmutató utasításai szerint (CIBD Mosaic, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Németország). Az értékelés Eurostar Plus mikroszkóp alatt „Bluelight LED” alkalmazásával történt (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG). Minden mérésnél pozitív és negatív kontroll mintákat is futtattunk. A gyártó ajánlásának megfelelően, az 1:10-szeres vagy ennél nagyobb hígításnál miért specifikus fluoreszcens jelet tekintettünk pozitívnak. Ezen eredményeket ELISA teszt (anti-GP2 IgA, GA Generic Assays, Dahlewitz/Berlin, Németország) segítségével is megerősítettünk. Az IIF és az ELISA tesztek között 96,4% egyezést mértünk, valamint a konkordancia együtttható értéke ( $\kappa=0,625$ ) is jó egyezést mutatott.

#### **4.2.5. Az IgA izotípusú anti-GP2 antitestek karakterizálása (IgA1, IgA2 és sIgA altípusok)**

Az IgA izotípusú anti-GP2 antitestek karakterizálására saját fejlesztésű, GP2 fehérjével fedett gyöngy-alapú, áramlási citometriás immunoesszét használtunk, anti-GP2 IgA-ra pozitív CD-s beteg- és negatív egészséges kontrollminták bevonásával. Az antigént a GA Generic Assays (Dahlewitz/Berlin, Németország) biztosította a gyöngyök fedéséhez (Prof. Dr. Dirk Roggenbuck szívességéből).

A kereskedelmi forgalomból származó (Polysciences Inc., Warrington, PA, US),  $1,4 \times 10^7$  polisztirén gyöngyöt 3-szor mostuk, majd szobahőmérsékleten, 16 órán keresztül, 0,1 M karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,5) hígított, 60  $\mu\text{g}$  GP2 proteinnel fedtünk. Két mosási lépést követően, a gyöngyöket 1%-os BSA (HyClone, Logan, UT, USA) tartalmú PBS-ben blokkoltuk az aspecifikus kötődés kivédése érdekében. Az így előkészített gyöngyök 50  $\mu\text{L}$  szuszpenzióját,  $5 \times 10^6$  részecske/mL koncentrációban  $+4^\circ\text{C}$ -on 30 percig inkubáltuk együtt az 1:5 arányban (0,1% BSA-t tartalmazó PBS-ben) előre hígított beteg és a kontroll szérum mintákkal (50  $\mu\text{L}$ ). Ezután a gyöngyöket 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-sel kétszer mostuk, majd jelöletlen, monoklonális egér anti-humán IgA1-et (30  $\mu\text{g/mL}$ , Antibodies-Online, Aachen, Németország), IgA2-öt (30  $\mu\text{g/mL}$ , RayBiotech, Norcross, GA, USA) vagy SC-t (100  $\mu\text{g/mL}$ , HyTest, Turku, Finnország) detektáló antitestekkel 30 percig inkubáltuk. A nem kötődött primer antitesteket két mosási lépés segítségével távolítottuk el. A jel erősítésére, 100  $\mu\text{L}$  fikoeritrinnel (PE) jelölt poliklonális kecske anti-egér antitestet (1  $\mu\text{g/mL}$ ; DAKO, Glostrup, Dánia) alkalmaztunk. Az inkubáció ismét 30 percig tartott  $+4^\circ\text{C}$ -on, majd a mintákat standard eljárás szerint mostuk és centrifugáltuk. Eltávolítottuk a felülúszót, majd 400  $\mu\text{L}$  1%-os paraformaldehidben oldottuk vissza pelletet. A mintákat áramlási citométerrel mértük le (Cytomics FC500, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A gyöngyök kapuzását az előre és oldalra irányuló fényszórási paraméterek alapján végeztük és meghatároztuk a medián PE jel intenzitást (FL2). Az adatok rögzítését és elemzését Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter) segítségével végeztük. A gyöngyök auto-fluoreszcenciájának és a másodlagos antitest esetleges aspecifikus kötődésének korrekciója céljából minden beteg szérumából kontroll mintákat készítettünk, melyekből az IgA1/IgA2/SC specifikus antitesteket kihagytuk, de minden más lépés az előzőekben leírtaknak megfelelően történt. Ezen minták

háttérintenzitás értékeit kivontuk a tényleges minták medián fluoreszcenciaintenzitás értékeiből.

Mivel célunk az össz-anti-GP2 IgA koncentráció meghatározása volt az egyedi minták esetében, mely a gyakorlatban az IgA1 és IgA2 altípusok összegét jelentette, szükséges volt az anti-IgA1 és -2 antitestek által emitált fluoreszcens jel standardizálására. Meghatározott antigénkötő kapacitású (3.448; 19.426; 82.751; valamint 276.941), így ismert mennyiségű anti-egér antitesttel fedett Quantum™ Simply Cellular® (QSC) mikrogöngyöket (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, USA) használtunk az előzőleg említett egér anti-humán IgA1, illetve IgA2 antitestek megkötésére, amikhez a megadott hígításban hozzáadtuk a PE-jelölt kecske anti-egér antitest konjugátumot. A minták analizálását áramlási citométerrel végeztük. A göngyök medián fluoreszcenciaintenzitását az ismert antigénkötő kapacitás függvényében ábrázoltuk, és ezen kalibrációs görbék segítségével határoztuk meg a GP2-fedett bead-ek felszínéhez, a szérumból kikötődött anti-GP2 antitestek mennyiségét. Az így megállapított IgA1, valamint IgA2 antigénkötő kapacitás értékek összeadásával számítottuk ki az össz-anti-GP2 IgA antitest szinteket. Az egészséges és beteg kontrollok szérumból így meghatározott totál anti-GP2 IgA antigénkötő kapacitás értékeket az ELISA módszerrel mért koncentrációkhoz hasonlítva erős korrelációt ( $r=0,879$ ,  $p<0,001$ ) tapasztaltunk. Az ELISA módszer szerinti negatív minták áramlási citometriával mért átlag + 2SD értéke adta ezen módszernél a pozitivitás határaként szolgáló 9.425-ös antigénkötő kapacitás küszöbértéket. Minden minta, melyet ELISA módszerrel pozitívnak találtunk a vizsgált antitestre nézve, áramlási citometriával mérve ezen küszöbérték feletti eredményt mutatott, alátámasztva a két módszer teljes megfeleltethetőségét. Az anti-GP2 IgA antitesteken található SC pozitivitás küszöbértékének (0,101) meghatározása a kontrollcsoport medián fluoreszcenciaintenzitás értékeinek átlag + 2SD-je alapján történt.

#### **4.2.6. Szérumból totál sIgA-szint meghatározása**

A totál sIgA koncentráció meghatározása egy házilag beállított szendvics ELISA módszer segítségével történt PSC-s betegek és egészséges kontrollok szérumból. A lapos aljú, nagy kötőkapacitású mikrotiter lemezeket (Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár, Magyarország) 3 µg/mL poliklonális birka anti-humán sIgA antitesttel

(Antibodies-Online GmbH, Aachen, Németország) fedtük karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,6) egy éjszakán át inkubálva +4°C-on. Ezt követte egy blokkolási lépés, 0,02% Tween-20-at tartalmazó PBS-ben hígított 1%-os BSA (Sigma-Aldrich, Mo, USA) oldat alkalmazásával. A szérumokat hígítottuk (1:128) és duplikátumban vittük fel, majd egy órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Hasonlóan jártunk el az ismert koncentrációjú, humán kolosztrum eredetű sIgA-ból (Athens Research & Technology, Athens, GA, USA) készült, kalibrációs görbeként használt hígítási sorral is. Öt mosási lépést követően egy 1:5000 hígítású (1% BSA-t tartalmazó 7,4-es pH-jú PBS-ben)  $\alpha$ -lánc specifikus anti-humán IgA-hoz konjugált torna peroxidázt (Sigma-Aldrich, Mo, USA) adtunk a lemezekhez és szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk. Tetrametil-benzidin dihidroklorid (Sigma–Aldrich, Schnelldorf, Németország) szubsztrát szolgáltatva a színreakciót, amelyet kénsavval (2M) állítottuk le, és egy Labsystem Multiscan MS lemez olvasó (Thermo Scientific, Budapest, Hungary) segítségével 450 nm hullámhosszon azonnal lemértünk. Az eredmények kiszámítása a Genesis szoftver (Thermo Scientific) által, 4-paraméteres logisztikus görbeillesztés alkalmazásával történt. Az intra-esszé variációs koefficiens 4,6%-nak, míg az inter-esszé variációs koefficiens 15,2%-nak adódott. A detektációs limit 0,03  $\mu\text{g/mL}$  volt.

A szerológiai vizsgálatok a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében történtek a klinikai adatok előzetes ismerete nélkül.

#### 4.3. ETIKAI ENGEDÉLYEK

A vizsgálati protokollokat (DEOEC-RKEB/IKEB 5306-9/2011, 3515-2011, 3885/2012/EKU [60/PI/2012], 3880/2012/EKU [59/PI/2012]) a Debreceni Egyetem regionális és intézményi kutatásetikai bizottsága, valamint a Nemzeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság hagyta jóvá. A betegek, vagy törvényes képviselőjük, minden esetben felvilágosítást kapott a vizsgálat természetéről és írásos beleegyező nyilatkozat aláírásával járultak hozzá a vizsgálatban való részvételhez.

#### 4.4. STATISZTIKAI MÓDSZEREK

A folyamatos változók eloszlását Shapiro-Wilk W-teszt segítségével vizsgáltuk. Az adatok, medián (interkvartilis [25-75 percentilis] tartomány [IQR]) vagy esetszám (%) formában kerültek összegzésre. Két csoport összehasonlítását Mann-Withney U-teszttel,

3 vagy több csoport esetén a Kruskal Wallis H-teszttel végeztük Dunn féle post-hoc teszt alkalmazásával. A párosított mintákat Wilcoxon rang teszttel hasonlítottuk össze. Spearman korrelációt használtunk a folyamatos változók közötti összefüggés felméréséhez. ROC analízis segítségével vizsgáltuk a folyamatos változók diszkriminációs képességét, a görbe alatti területet meghatározásával. A vizsgált csoportokat legnagyobb hatékonysággal elválasztó küszöbérték azonosítására Youden módszert alkalmaztunk. A ROC görbékét DeLong módszere szerint vetettük össze. A diagnosztikus hatékonyságot az összesített pontosság, szenzitivitás, specificitás, pozitív prediktív érték (+PÉ) és negatív prediktív érték (-PÉ) megadásával határoztuk meg. A görbe belső validálásához bootstrapping technikát alkalmaztunk.

A túlélés esélyének becslését Kaplan-Meier módszer alkalmazásával számoltuk, log-rank tesztet használva az összehasonlításhoz. Cox-regresszióval állapítottuk meg a változók hatását a halálozás bekövetkeztére. Amikor több lehetséges, egymással „versengő” kimenetel is jelen volt, a vizsgált esemény incidenciájának becslését Aalen-Johansen módszer segítségével vizsgáltuk, míg az összehasonlításhoz Gray-tesztet használtunk. A különböző faktorok ezen események időbeli bekövetkezésére gyakorolt hatását Fine-Gray regresszióval határoztuk meg. Független rizikófaktorok azonosításához backward eliminációs stratégiával kombinált többváltozós analíziseket alkalmaztunk. Az adott faktorok hatásának mértékét Cox-regressziónál kockázati hányadosként (hazard ratio, [HR]), Fine-Gray regresszió esetében al-eloszlási kockázati hányadosként (sub-distribution hazard ratio, [sHR]) fejeztük ki, a 95%-os megbízhatósági tartomány (confidence interval, [CI]) megadásával. Kompozit pontszám létrehozásához logisztikus regressziót használtunk backward eliminációs stratégiát követve.

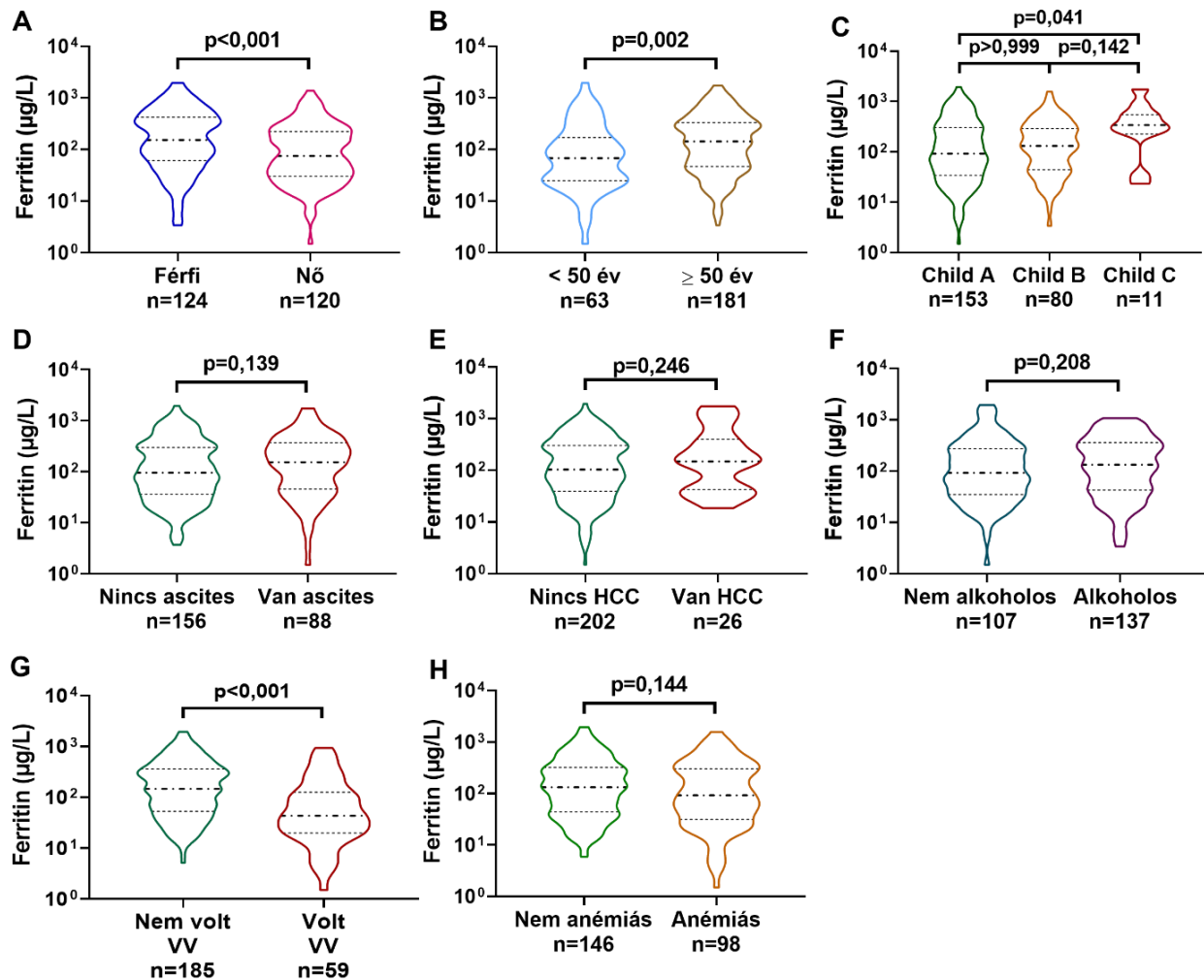
A Fine-Gray regresszió és a Gray teszt kivitelezéséhez az R szoftver 4.0.2-es változatát használtuk, az EZR csomaggal, valamint az R commander és az RcmdrPlugin.EZR kiegészítőkkal. A ROC görbék összehasonlítását, bootstrapping módszerrel történő belső validálását, valamint a Youden-index meghatározását a MedCalc program (Ostend, Belgium) segítségével végeztük. Minden más statisztikai elemzés, valamint az adatok ábrázolása az SPSS Statistics (V.25, IBM, Armonk, NY, USA) és a Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) programok alkalmazásával történt.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. A SZÉRUMFERRITINSZINT ANALÍZISE CIRRÓZISOS BETEGEK MINTÁIBAN

#### **5.1.1. A ferritinszint összefüggése a különböző klinikai és laboratóriumi paraméterekkel**

Cirrózisos járóbetegeinkben a ferritin szérum szintje 1,5 és 1954,6 µg/L között változott. Magasabb ferritinszinteket mértünk a férfiakban a nőkhöz képest [medián (IQR): 152,6 (60,9–420,4) vs. 75,0 (30,3–223,5) µg/L,  $p < 0,001$ ; **(5.A ábra)**] és az  $\geq 50$  éves betegekben a fiatalabbakhoz képest [medián (IQR): 142,9 (47,0-333,0) vs. 67,9 (24,8-170,8) µg/L,  $p = 0,002$ ; **(5.B ábra)**]. Amikor betegeinket a Child-Pugh stádiumok szerinti betegség súlyosság alapján osztályoztuk, [medián (IQR): A: 92,0 (34,2-303,4); B: 131,1 (44,2-289,0); C: 340,1 (227,1-548,4) µg/L] csak az A és a C csoport között figyeltünk meg statisztikailag szignifikáns különbséget [ $p = 0,041$ ; **(5.C ábra)**]. Továbbá nem észleltük a szérumferritinszintek szignifikáns különbségét aszcitesz jelenlétében vagy anélkül [medián (IQR): 153,4 (45,4-370,7) vs. 95,0 (36,3-297,0) µg/L,  $p = 0,139$ ; **(5.D ábra)**], HCC jelenlétében vagy hiányában [medián (IQR): 149,1 (42,7-399,6) vs. 103,8 (39,3-301,4) µg/L,  $p = 0,246$ ; **(5.E ábra)**], valamint alkoholos vagy más etiológia esetén [medián (IQR): 133,2 (42,7-363,1) vs. 92,0 (35,0-271,9) µg/L,  $p = 0,208$ ; **(5.F ábra)**]. Kiemelendő viszont, hogy a ferritinszint szignifikánsan alacsonyabb volt azokban a betegekben, akiknél korábban jelentkezett varixvérzéses epizód, összehasonlítva azokkal, akiknek ilyen eseményük nem volt [medián (IQR): 43,1 (19,8-125,6) vs. 146,6 (52,7-358,3) µg/L,  $p < 0,001$ ; **(5.G ábra)**]. Amikor azonban pácienseinket a vérszegénység jelenléte vagy hiánya szerint kategorizáltuk - a Betegek és Módszerek részben leírtak szerint - nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között [medián (IQR): 92,5 (31,2-301,4) vs. 132,4 (43,8-320,0) µg/L,  $p = 0,144$ ; **(5.H ábra)**].



### 5. ábra Szérumferritin-szintek a különböző betegség jellemzők szerint

A ferritinszint magasabb volt a férfiakban (A) és az idősebbekben (B), mint a nőkben vagy fiatalabb betegekben. A betegség súlyossága szerint csak a Child-Pugh C és a Child-Pugh A stádiumok között volt szignifikáns eltérés (C). Nem különböztek a sTREM-1 szintek aszcitesz (D) vagy hepatocelluláris carcinoma (HCC) jelenléte (E), sem pedig alkoholos etiológia (F) esetében. Azon betegek szérumferritin-szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, akiknek kórtörténetében varixvérzés (VV) szerepelt (G), míg az alacsony hemoglobín- és/vagy hematokritszint által definiált anémiában (H) szenvedő vagy anélküli betegek ferritinszintje között nem volt különbség.

Ezt követően a szérumferritinszint és más laboratóriumi paraméterek összefüggését, mint folyamatos változókat vizsgáltuk. A ferritin szintje korrelált a vashomeosztázis és a májfunkció markereivel kompenzált és dekompenzált betegeknél egyaránt. A szervezet gyulladásos állapotát jelző CRP és a fehérvérsejtszám, valamint a

betegség súlyosságát mérő Child-Pugh és MELD pontszámok csak a dekompenzált betegek esetében korreláltak a ferritinszinttel. A nem parametrikus korrelációkat a **4. Táblázatban** foglaltuk össze.

#### 4. Táblázat

*A ferritinszint Spearman korrelációja a rutin laboratóriumi paraméterekkel*

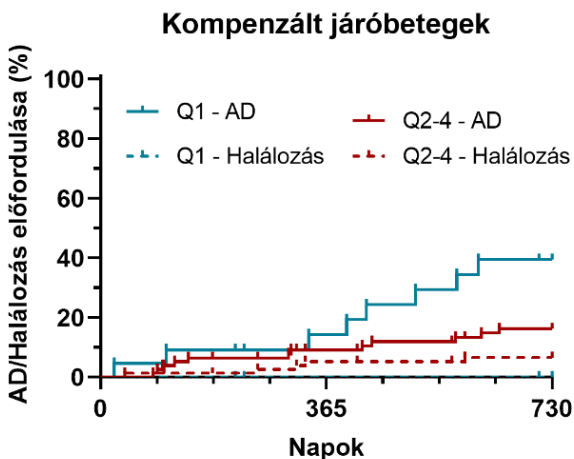
Betegek	Összes		Kompenzált		Dekompenzált	
	r	p	r	p	r	p
MELD pontszám	0,107	0,104	-0,018	0,868	0,287	<b>0,001</b>
Child-P. pontszám	0,144	<b>0,027</b>	0,117	0,263	0,336	<b>&lt;0,001</b>
Albumin	-0,018	0,777	0,048	0,635	-0,136	0,107
Bilirubin	0,125	0,053	0,080	0,426	0,247	<b>0,003</b>
Kreatinin	0,175	<b>0,007</b>	0,201	0,051	0,186	<b>0,027</b>
INR	-0,044	0,503	-0,167	0,109	0,124	0,140
GPT	0,236	<b>&lt;0,001</b>	0,173	0,088	0,271	<b>0,002</b>
GPT	0,228	<b>&lt;0,001</b>	0,203	<b>0,045</b>	0,244	<b>0,005</b>
γGT	0,225	<b>&lt;0,001</b>	0,328	<b>0,001</b>	0,133	0,131
CRP	0,127	0,062	0,071	0,522	0,229	<b>0,008</b>
FVS	0,174	<b>0,011</b>	0,060	0,599	0,256	<b>0,003</b>
Neutrofil szám	0,108	0,120	0,019	0,868	0,182	<b>0,040</b>
Limfocita szám	0,166	<b>0,017</b>	0,097	0,391	0,212	<b>0,016</b>
sCD163	0,170	<b>0,011</b>	0,223	<b>0,033</b>	0,124	0,154
IgG	-0,179	<b>0,006</b>	-0,246	<b>0,014</b>	-0,132	0,122
IgA	0,104	0,112	0,066	0,518	0,193	<b>0,023</b>
Hemoglobin	0,313	<b>&lt;0,001</b>	0,264	<b>0,008</b>	0,370	<b>&lt;0,001</b>
Hematokrit	0,300	<b>&lt;0,001</b>	0,290	<b>0,004</b>	0,327	<b>&lt;0,001</b>
MCH	0,510	<b>&lt;0,001</b>	0,360	<b>&lt;0,001</b>	0,634	<b>&lt;0,001</b>
MCV	0,487	<b>&lt;0,001</b>	0,312	<b>0,002</b>	0,629	<b>&lt;0,001</b>
Életkor	0,149	<b>0,020</b>	0,175	0,080	0,148	0,078

*ALP: alkalikus foszfatáz; GPT: glutamát-piruvát transzamináz; GOT: glutamát-oxálacetát transzamináz; CRP: C-reaktív protein; γGT: γ-glutamil-transzferáz; INR: international normalized ratio; MCH: 1 vörösvértest (vvt) átlagos hemoglobin tartalma; MCV: 1 vvt átlagos korpuszkuláris térfogata; MELD: model for end stage liver disease; FVS: fehérvérsejt szám.*

### 5.1.2. Az alacsony ferritinszint összefügg a 2 éven belül bekövetkező dekompenzáció gyakoribb előfordulásával, előzőleg kompenzált cirrózisos betegekben

A 244 cirrózisban szenvedő beteg közül 143 egyén (58,6%) tapasztalta valamilyen dekompenzációs esemény (aszцитез, varixvérzés, HE) megjelenését a felvételt megelőzően (dekompenzált betegek) és 101 (41,4%) páciens kórtörténete volt mentes ezektől az eseményektől (kompenzált betegek).

A kompenzált cirrózisos betegek esetében, 2 éves követéses vizsgálat során meghatároztuk a szérumferritinszint összefüggését a dekompenzált klinikai stádium kialakulásával. A korábban kompenzált betegek közül 20-nál (19,8%) regisztráltunk legalább egy ilyen eseményt. Első dekompenzációs epizódként 15 betegnél regisztráltunk aszцитезt, 8-nál HE-t, míg 6-nál varixvérzés jelentkezett. Ezek közül, három esetben mindhárom esemény egyidejűleg alakult ki, 2 esetben az aszцитез HE-val kombinálódott, míg egy esetben aszцитез és varixvérzés jelentkezett egyszerre. Az alacsony (Q1) ferritinszint, a 2 éves követés során, az első dekompenzációs esemény gyakoribb megjelenésével (39,4%) társult a magasabb (Q2-4) értékekhez képest [16,2%;  $p=0,023$ ; (6. ábra)].



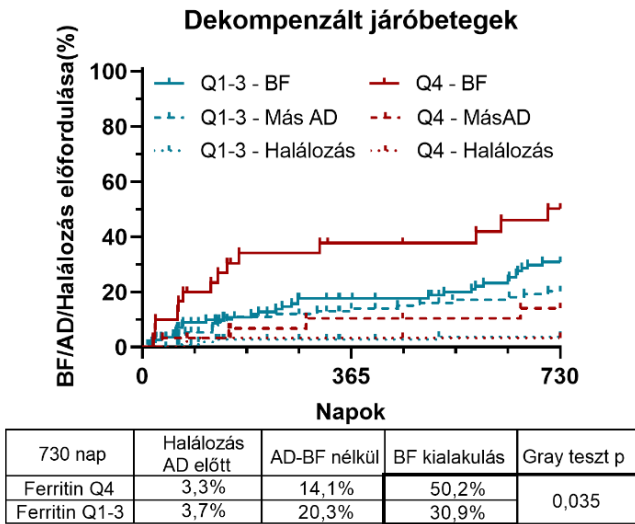
730 nap	Halálozás AD előtt	AD kialakulás	Gray teszt p
Ferritin Q1	0,0%	39,4%	0,023
Ferritin Q2-4	6,5%	16,2%	

**6. ábra** Az alacsony ferritinszint összefügg a dekompenzált klinikai stádium kialakulásával a 2 éves követés alatt, kompenzált cirrózisos betegekben

Az Alan-Johansen analízis alapján, amely kompetíciós tényezőként veszik figyelembe a halálozást, az alacsony (Q1) szérumferritinszint összefügg az első akut dekompenzáció kialakulásának megnövekedett gyakoriságával a 2 éves követés alatt a korábban kompenzált betegekben.



a populációban kompetíciós tényezőként vettük figyelembe a mortalitáson kívül a BF-sel nem szövődött AD eseményeket is. A betegek emelkedett gyulladási állapotával összhangban, a magas (Q4) ferritinszint társult a BF megjelenésének megnövekedett előfordulási gyakoriságával (50,2%) a 2 éves követés alatt, szemben az alacsonyabb (Q1-3) értékekkel [30,9%,  $p=0,035$ ; (7. ábra)].



**7. ábra** A magas ferritinszint összefügg a bakteriális fertőzések gyakoribb előfordulásával a 2 éves követés alatt dekompenzált cirrózisos betegekben

Dekompenzált járóbetegekben a magas (Q4) ferritinszint összefügg a bakteriális fertőzések (BF) kialakulásának megnövekedett gyakoriságával. A BF nélküli akut dekompenzációt és a halálozást egyaránt kompetíciós eseményként vettük számításba.

Egyváltozós Fine-Gray regressziós analízisben az 50 éves vagy annál idősebb kor, a női nem, az aszcitesz jelenléte, a korábbi BF-es epizód, a  $>10$  mg/L CRP-szint és magas (Q4) szérumszint-ferritin-koncentráció [sHR: 1,991 (95%CI: 1,054-3,758),  $p=0,034$ ] mutattak összefüggést a BF gyakoribb kialakulásával (6. Táblázat). Többváltozós Fine-Gray regressziós modellben a női nemet, az aszcitesz jelenlétét, az előző BF epizódot és a magas (Q4) szérumszint-ferritin-koncentrációt [sHR: 2,335 (95%CI: 1,193-4,568),  $p=0,013$ ] találtuk független rizikófaktornak a BF gyakoribb kialakulásában a 2 éves követés alatt (6. Táblázat).

## 6. Táblázat

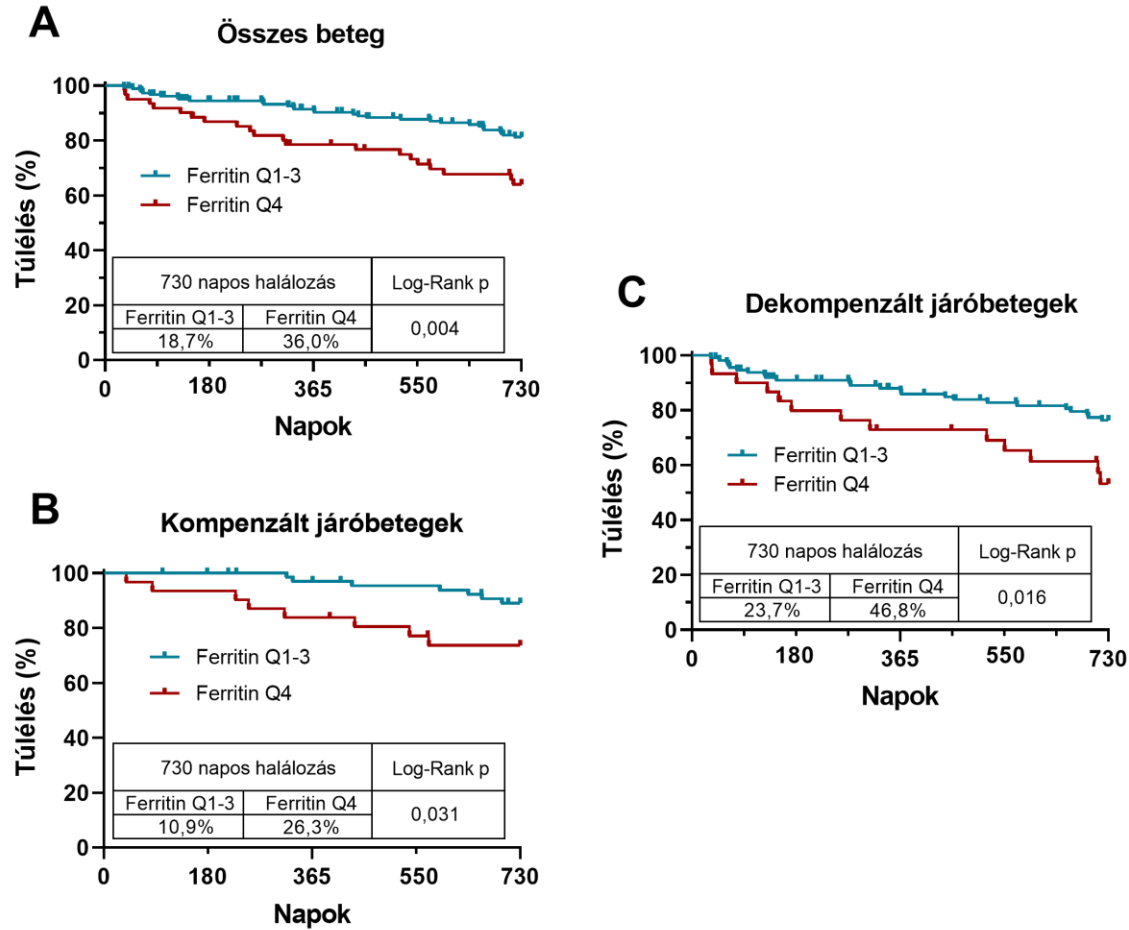
*A bakteriális fertőzések kialakulása dekompenzált cirrózisos betegekben, 2 éves követési időszak alatt*

Dekompenzált betegek						
730-napos BF kialakulás	Egyváltozós Fine-Gray regresszió			Többváltozós Fine-Gray regresszió		
	sHR	CI (95%)	p	sHR	CI (95%)	p
Életkor (≥50)	3,297	1,206-9,016	0,020	2,362	0,846-6,597	0,100
Nem (női)	2,099	1,150-3,832	0,016	2,347	1,284-4,288	0,006
Alkoholos etiológia	1,568	0,759-3,243	0,220			
MELD (5-pont emelkedés)	1,239	0,811-1,895	0,320			
Child-Pugh stádium	A	Referencia				
	B	1,398	0,913-2,141	0,120		
	C	2,036	0,667-6,220	0,212		
Társbetegség	1,241	0,678-2,272	0,480			
HCC	1,366	0,516-3,614	0,530			
Aszcitesz	2,105	1,099-4,031	0,025	1,902	1,013-3,571	0,045
Előző varix vérzés	0,922	0,520-1,636	0,780			
Előző bakteriális fertőzés	2,348	1,279-4,310	0,006	2,560	1,374-4,768	0,003
CRP (≥10)	2,068	1,089-3,929	0,026	1,577	0,767-3,243	0,220
Anémia	1,316	0,732-2,365	0,360			
Magas ferritinszint	1,991	1,054-3,758	0,034	2,335	1,193-4,568	0,013

*MELD: model for end stage liver disease; HCC: hepatocelluláris karcinóma; CRP: C-reaktív protein; sHR: al-eloszlási kockázati hányados; CI: konfidencia intervallum*

### 5.1.4. A magas ferritinszint összefüggést mutat a cirrózisos járóbetegek 2 éven belül bekövetkező magasabb halálozásával

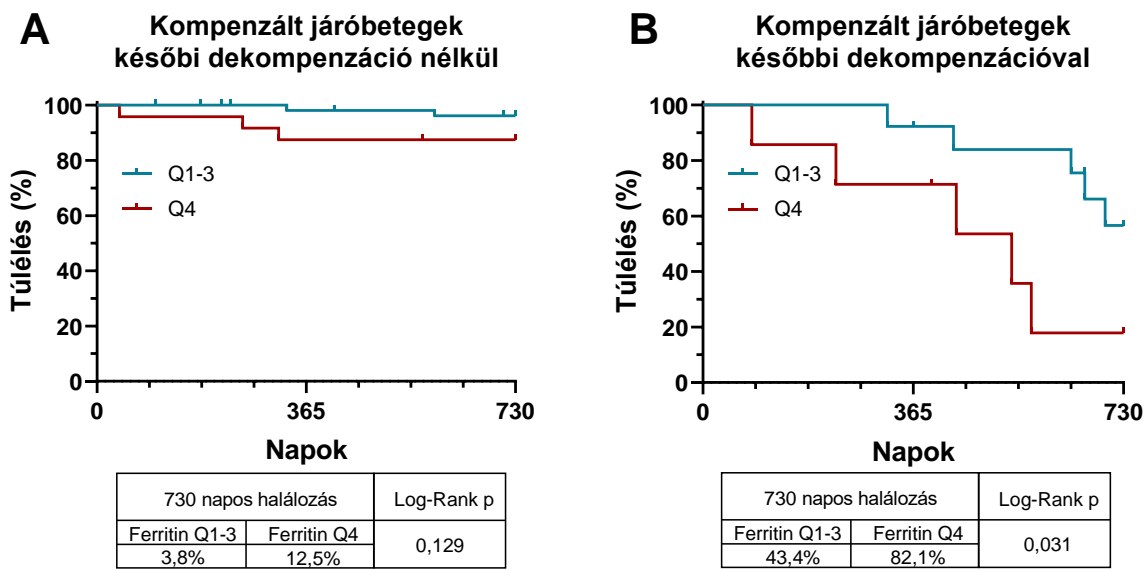
A szérumferritinszint és a halálozás lehetséges összefüggését a teljes kohorszban, valamint a kompenzált és a dekompenzált betegpopulációban külön is megvizsgáltuk. Kaplan-Meier-analízis során minden csoportban a magas ferritinszintek és a megnövekedett halálozás összefüggését állapítottuk meg (**8. A-C ábra**).



**8. ábra** A magas szérumszint minden betegcsoportban összefüggést mutat a 2 éves mortalitással

A Kaplan-Meier analízisek a halálozás gyakoribb előfordulását mutatják magas (Q4) ferritinszint esetén az egész kohorszban (A), valamint a kompenzált (B) és dekompenzált (C) betegcsoportokban külön is.

Ugyanezt az összefüggést találtuk akkor is, amikor a kompenzált betegeket felosztottuk aszerint, hogy ki dekompenzálódott követés alatt és ki nem. Mindkét alcsoportban a mortalitás nagyobb gyakoriságot mutatott a magas (Q4) ferritinszinttel rendelkező betegeknél. Azonban ez az összefüggés csak a dekompenzálódó betegek esetében érte el a statisztikai szignifikanciát, a kompenzált stádiumban maradó betegek esetében megfigyelt alacsony halálozási arány miatt (9. ábra).



**9. ábra** A magas szérumban lévő ferritinszint összefüggést mutat az első dekompenzációs eseményt követő fokozott 2 éves mortalitással

*Kaplan-Meier analízisben a magasabb (Q4) ferritinszint összefüggését mutat a nagyobb halálozási gyakorisággal azon korábban kompenzált betegekben, akik a követés során dekompenzálódtak. Azoknál a betegeknél, akik továbbra is kompenzált stádiumban maradtak, csak egy tendenciát detektáltunk.*

Egyváltozós Cox regressziós analízissel vizsgálva a magas (Q4) ferritinszintek minden csoportban összefüggést mutattak a 2 éves mortalitással [teljes populáció: HR: 2,209 (95%CI: 1,269-3,844),  $p=0,005$ ; kompenzált: HR: 2,903 (95%CI: 1,052-8,012),  $p=0,040$ ; dekompenzált: HR: 2,251 (95%CI: 1,146-4,424),  $p=0,019$ ; (**7. Táblázat**)].

Többváltozós Cox regressziós modellben a magas (Q4) ferritinszint a 2 éves mortalitás független kockázati tényezője volt a teljes betegpopulációban [HR: 2,143 (95%CI: 1,174-3,910),  $p=0,013$ ], a betegség súlyosság és a HCC jelenléte mellett. (**7.A Táblázat**). Amikor kompenzált és dekompenzált csoportokra osztottuk betegeinket, ezt az összefüggést csak a kompenzált cirrózis csoportban figyelhettük meg (HR: 4,367 (95%CI: 1,466-13,009),  $p=0,008$ , (**7.B Táblázat**)), míg a dekompenzált betegeknél a klinikai faktorokat erősebb tényezőnek találtuk a halálozás előrejelzésében (**7.C táblázat**).

## 7. Táblázat

Cox regressziós analízis a 2 éves halálozás előrejelzésére, minden járóbeteg csoportban

A							
Összes beteg							
730 napos halálozás	Egyváltozós Cox regresszió			Többváltozós Cox regresszió			
	HR	CI (95%)	p value	HR	CI (95%)	p value	
Életkor (≥50 év)	4,341	1,565-12,040	0,005	2,669	0,945-7,541	0,064	
Nem (női)	0,98	0,569-1,688	0,941				
Alkoholos etiológia	1,341	0,762-2,358	0,309				
MELD (5-pont emelkedés)	2,029	1,482-2,776	<0,001	1,758	1,201-2,572	0,004	
Child-Pugh stádium	A	Referencia					
	B	2,936	1,167-5,223	<0,001	2,617	1,408-4,861	0,002
	C	4,834	1,817-12,857	0,002	1,950	0,625-6,079	0,250
Dekompenzált stádium	2,021	1,109-3,683	0,022	0,969	0,428-2,194	0,940	
Társbetegség	2,244	1,245-4,046	0,007	1,270	0,665-2,429	0,469	
HCC	5,642	3,064-10,388	<0,001	8,827	4,423-17,618	<0,001	
CRP (≥10 mg/L)	3,021	1,674-5,450	<0,001	1,567	0,799-3,076	0,191	
Anémia	1,969	1,141-3,400	0,015	1,420	0,810-2,490	0,221	
Magas ferritinszint	2,209	1,269-3,844	0,005	2,143	1,174-3,910	0,013	

B						
Kompenzált betegek						
730 napos halálozás	Egyváltozós Cox regresszió			Többváltozós Cox regresszió		
	HR	CI (95%)	p value	HR	CI (95%)	p value
Életkor (≥50 év)	2,886	0,651-12,791	0,163			
Nem (női)	0,583	0,207-1,638	0,306			
Alkoholos etiológia	1,235	0,439-3,469	0,689			
MELD (5-pont emelkedés)	2,135	0,936-4,869	0,071	2,595	1,088-6,188	0,032
Child-Pugh B	0,047	0,000-5,234	0,606			
Társbetegség	1,947	0,692-5,476	0,207			
HCC	4,691	1,593-13,809	0,005	9,211	2,854-29,731	<0,001
CRP (≥10 mg/L)	1,789	0,404-7,929	0,444			
Anémia	2,506	0,890-7,057	0,082	1,333	0,424-4,184	0,623
Magas ferritinszint	2,903	1,052-8,012	0,040	4,367	1,466-13,009	0,008

C		Dekompenzált betegek					
730 napos halálozás		Egyváltozós Cox regresszió			Többváltozós Cox regresszió		
		HR	CI (95%)	p value	HR	CI (95%)	p value
Életkor (≥50 év)		5,303	1,275-22,051	0,022	2,608	0,602-11,308	0,200
Nem (női)		1,317	0,691-2,509	0,403			
Alkoholos etiológia		0,964	0,466-1,993	0,921			
MELD (5-pont emelkedés)		1,833	1,271-2,643	0,001	1,639	1,096-2,452	0,016
Child-Pugh stádium	A	Referencia					
	B	3,940	1,620-9,582	0,002	2,514	1,003-6,301	0,049
	C	6,024	1,831-19,815	0,003	1,888	0,493-7,227	0,353
Társbetegség		2,196	1,063-4,538	0,034	1,479	0,657-3,327	0,344
HCC		8,225	3,810-17,756	<0,001	8,058	3,461-18,759	<0,001
Aszcitesz		3,461	1,518-7,891	0,003	1,526	0,589-3,953	0,384
Előző varix vérzés		0,212	0,088-0,51	0,001	0,310	0,126-0,762	0,011
Előző bakt. fertőzés		1,532	0,800-2,937	0,198			
CRP (≥10)		2,922	1,500-5,693	0,002	2,192	1,086-4,427	0,029
Anémia		1,432	0,743-2,762	0,284			
Magas ferritinszint		2,251	1,146-4,424	0,019	1,016	0,436-2,371	0,970

MELD: model for end stage liver disease; HCC: hepatocelluláris karcinóma; CRP: C-reaktív protein; HR: kockázati hányados; CI: konfidencia intervallum

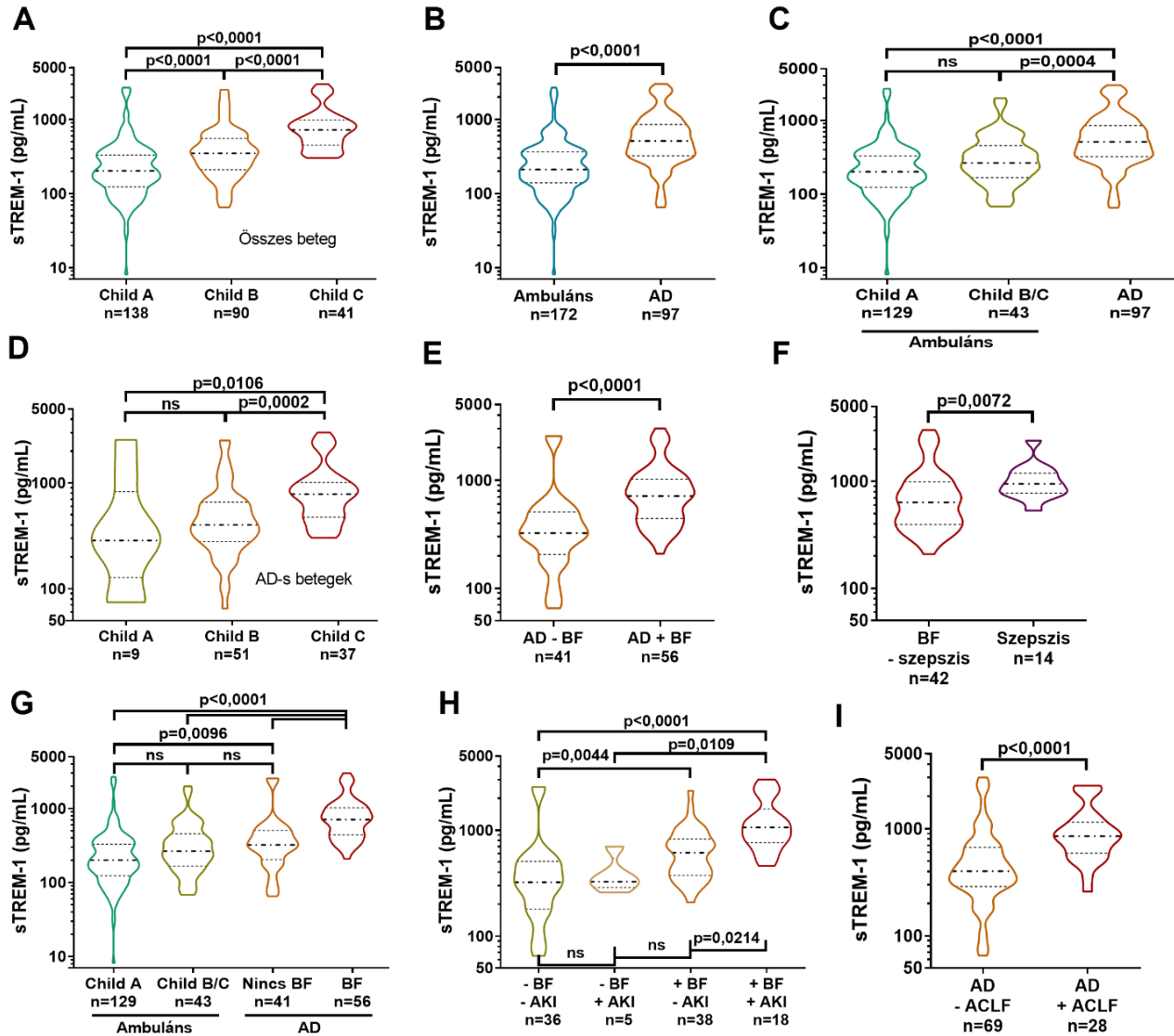
## 5.2. A sTREM-1 BIOMARKER VIZSGÁLATA CIRRÓZISOS BETEGEK MINTÁIBAN

### 5.2.1. A sTREM-1 szérumszintje összefüggést mutat a betegség súlyosságával és a bakteriális infekció jelenlétével

A sTREM-1 szérum koncentráció 8 és 3016 pg/mL között változott a teljes populációban, és a Child-Pugh szerinti betegség súlyossággal párhuzamosan növekvő tendenciát mutatott [A: medián (IQR): 203 (124-332), B: 350 (211-555), C: 725 (452-986) pg/mL;  $p < 0,0001$  (**10.A ábra**)]. Hasonlóan, AD betegekben szignifikánsan magasabb sTREM-1 szintet mértünk, mint az ambuláns betegekben [medián (IQR): 509 (323-850) vs. 211 (130-366) pg/mL;  $p < 0,0001$  (**10.B ábra**)]. Ez az emelkedés a járóbetegek betegség súlyosságától függetlenül kimutatható volt [Child-Pugh A: medián (IQR): 202 (123-330) pg/mL,  $p < 0,0001$ ; Child-Pugh B&C: medián (IQR): 265 (167-455) pg/mL,  $p = 0,0004$ ; (**10.C ábra**)], míg az ambuláns betegek két csoportja között nem tapasztaltunk különbséget. Ugyanezt a megfigyelést tettük, mikor a járóbetegeket klinikai stádium szerint kategorizáltuk [kompenzált: medián (IQR): 190 (123-325) pg/mL,  $p < 0,0001$ ; dekompenzált: medián (IQR): 235 (148-397) pg/mL,  $p < 0,0001$  (az AD-s betegekhez

képest; az ábrát nem mutatjuk)]. Az AD-s páciensek közül a Child-Pugh C súlyosságú egyéneknél szignifikánsan magasabb sTREM-1 szinteket mértünk, mint a Child-Pugh A vagy B stádiumú betegek esetében [medián (IQR): A: 286 (128-830), B: 401 (279-659), C: 787 (475-1013) pg/mL,  $p=0,0106$  és  $p=0,0002$ ; (**10.D ábra**)]. Továbbá szignifikánsan megnövekedett sTREM-1 koncentrációt észleltünk BF-ben szenvedő AD-s betegekben [medián (IQR): 711 (442-1026) pg/mL] a fertőzéssel nem komplikált AD-s esetekhez képest [medián (IQR): 323 (205-507) pg/mL,  $p<0,0001$ ] (**10.E ábra**). A BF-ben szenvedő betegek közül további emelkedést mértünk azokban, akiben szepszis is kialakult [medián (IQR): 636 (395-989) vs. 946 (774-1192) pg/mL,  $p=0,0072$  (**10.F ábra**)]. Azonban BF hiányában, az AD esetek csak a Child-Pugh A súlyosságú [ $p=0,0096$ ; (**10.G ábra**)] vagy a kompenzált klinikai stádiumú [ $p=0,0087$ ; (az ábrát nem mutatjuk)] ambuláns-csoportokhoz képest mutattak megnövekedett sTREM-1 szintet.

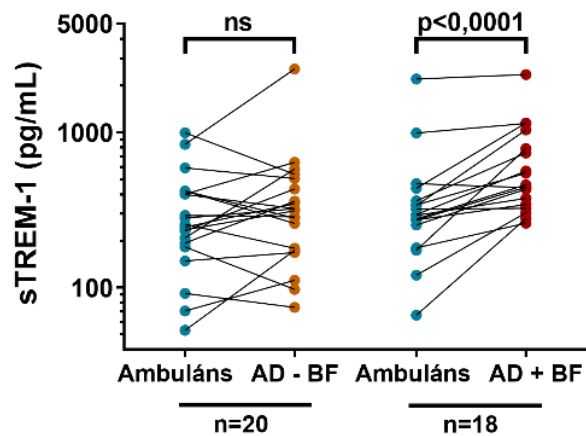
Ezenkívül, magasabb sTREM-1 szintet mértünk azon BF-ben szenvedő betegek mintáiban, akiknél felvételnél akut vesekárosodást (AKI) diagnosztizáltunk [medián (IQR): 1062 (764-1583) pg/mL], a fertőzött, de AKI-ban nem szenvedő [medián (IQR): 612 (376-827) pg/mL,  $p=0,0214$ ], valamint az AKI-tól és BF-től is mentes [medián (IQR): 323 (181-508) pg/mL,  $p<0,0001$  (**10.H ábra**)] páciensekhez képest. Végül, azon betegek mintáiban, akiknél a bennfekvés során ACLF alakult ki, magasabb sTREM-1 szinteket detektáltunk, mint a szervelegtelenséggel nem társuló AD-s páciensek esetében. [medián (IQR): 850 (589-1149) vs. 401 (288-669) pg/mL,  $p<0,0001$  (**10.I ábra**)].



**10. ábra** A sTREM-1 szintje a betegség súlyosság és a bakteriális fertőzés jelenléte szerint májcirrózisban szenvedő betegeknél.

A sTREM-1 szint emelkedett: a Child-Pugh szerinti betegség súlyossággal párhuzamosan (A); akut dekompenzációban (AD) szenvedő betegeknél az összes járóbeteghez (B), valamint azok betegség súlyosság szerint felosztott kategóriáihoz képest (C); AD-s betegek esetén a Child-Pugh C stádiumban a kevésbé súlyos esetekhez képest (D); bakteriális fertőzésben (BF) szenvedő AD-s betegekben a BF nélküli AD-s betegekhez képest (E); szepszisben szenvedő betegeknél a szepszis nélküli, de BF-ben szenvedő betegekhez képest (F); a BF-ben nem szenvedő AD-s betegekben kizárólag a Child-Pugh A kategóriájú járóbetegekhez képest (G); BF-ben plusz akut vesekárosodásban (AKI) szenvedő betegeknél, a BF-ben vagy AKI-ban nem szenvedő betegekhez képest (H); és krónikus májbetegségre rakódott akut májelégtelenségben (ACLF) szenvedő betegeknél az ACLF nélküli AD-s betegekhez képest (I).

Harmincnyolc betegről két alkalommal is – ambuláns vizit, valamint AD miatti hospitalizáció (18 AD fertőzéssel, 20 nélküle) – vettünk mintát. A minták párosított elemzése során, a BF-ben szenvedő betegek sTREM-1 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az ambuláns vizit alkalmával vett saját mintájukban detektáltnál [medián (IQR): 294 (235-381) vs. 452 (338-849) pg/mL,  $p < 0,0001$ ], míg a fertőzéssel nem szövődött esetekben nem tapasztaltunk hasonló emelkedést (**11. ábra**).



**11. ábra** A sTREM-1 szintek intraperszonális változásai ambuláns vizit és akut dekompenzációs (AD) kórházi felvétel során bakteriális fertőzéssel vagy anélkül.

Az sTREM-1 szint csak bakteriális fertőzés jelenlétében emelkedik meg szignifikánsan AD-epizód alatt, ugyanazon betegek ambuláns látogatás során kapott értékeihez képest.

Szignifikáns korrelációt találtunk a sTREM-1 koncentráció, valamint a gyulladás, a károsodott vese- és májfunkció laboratóriumi markerei, illetve a májbetegség súlyosságát becsülő pontszámok (Child-Pugh, MELD és CLIF-AD) között. Megjegyzendő, hogy minden összefüggést erősebbnek találtunk az AD-s populációban, mint a járóbetegekben. A nem parametrikus korrelációkat a **8. Táblázat** foglalja össze.

## 8. Táblázat

A sTREM-1 értékek Spearman korrelációja a rutin laboratóriumi paraméterekkel

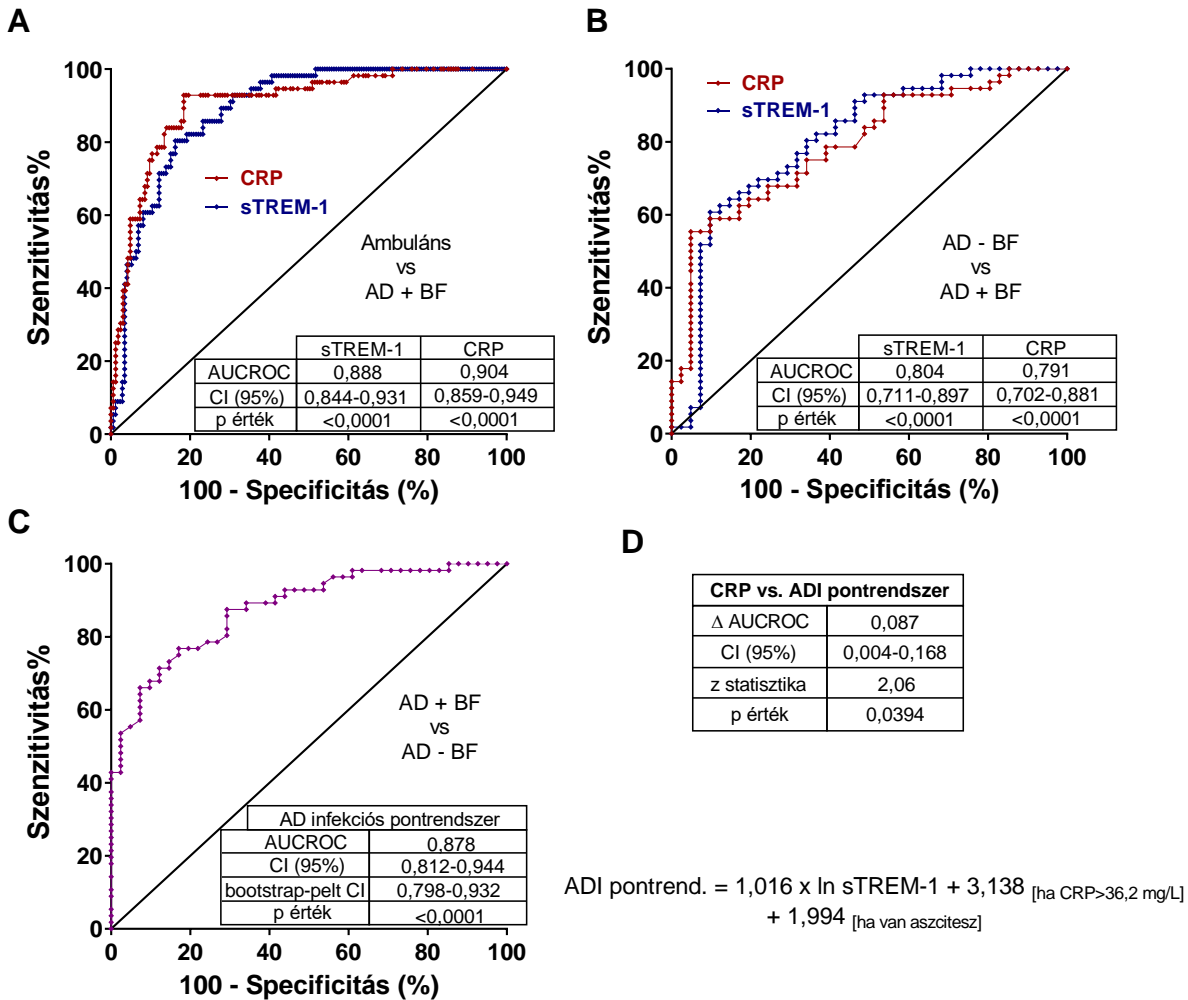
Betegek	Összes		Ambuláns		Akutan dekompenzált	
	r	p	r	p	r	p
FVS	0,442	>0,001	0,308	>0,001	0,436	>0,001
Neutrofil	0,446	>0,001	0,252	0,004	0,452	>0,001
Monocita	0,366	>0,001	0,195	0,025	0,270	0,008
CRP	0,515	>0,001	0,281	>0,001	0,468	>0,001
Bilirubin	0,247	>0,001	0,001	0,994	0,226	0,027
Albumin	-0,459	>0,001	-0,158	0,048	-0,381	>0,001
INR	0,234	0,004	-0,193	0,143	0,248	0,016
Kreatinin	0,445	>0,001	0,335	>0,001	0,494	>0,001
Urea	0,461	>0,001	0,174	0,043	0,530	>0,001
GOT	0,243	>0,001	0,016	0,842	0,281	0,007
GPT	0,097	0,131	-0,018	0,824	0,278	0,007
ALP	0,212	>0,001	0,143	0,076	0,190	0,075
CHE	-0,425	>0,001	-0,154	0,056	-0,326	0,006
LDH	0,295	>0,001	0,070	0,398	0,361	0,001
Child-Pugh pont	0,477	>0,001	0,152	0,047	0,417	>0,001
MELD pont	0,405	>0,001	0,111	0,147	0,472	>0,001
CLIF-AD pont					0,564	>0,001

AD: akut dekompenzáció; ALP: alkalikus foszfatáz; GPT: glutamát-piruvát transzamináz; GOT: glutamát-oxálacetát transzamináz; CHE: kolin észteráz; CRP: C-reaktív protein; INR: international normalized ratio; LDH: laktát dehidrogenáz; MELD: model for end stage liver disease; FVS: fehérvérsejt szám.

### 5.2.2. A sTREM-1 és a CRP, egy új infekciós pontrendszerben kombinálva a mérsékelt/súlyos aszcitesz jelenlétével, szignifikánsan nagyobb hatékonysággal azonosítja a BF jelenlétét AD-s betegekben, mint a CRP önmagában

Következő lépésként megvizsgáltuk a sTREM-1 és a CRP diagnosztikus pontosságát a cirrózisos betegek BF-einek kimutatásában. Referenciapontként, ROC analízis segítségével, először összehasonlítottuk a két marker teljesítményét a BF-ben szenvedő AD-s betegek, valamint az ambuláns betegek megkülönböztetésében. Mind a sTREM-1 [AUROC: 0,888 (95%CI: 0,844-0,931),  $p < 0,0001$ ; összesített pontosság: 81,2% szenzitivitás: 80,4%, specificitás: 83,7%, +PÉ & -PÉ: 61,6% és 92,9%; a >429 pg/mL-es legjobb diszkriminációs határértéknél], mind a CRP [AUROC: 0,904 (95%CI: 0,859-0,949),  $p < 0,0001$ ; összesített pontosság: 85,6%, szenzitivitás: 92,9%, specificitás: 81,6%, +PÉ & -PÉ: 63,4% és 97,1%; a >9,1 mg/L-es legjobb diszkriminációs határértéknél]

diagnosztikus teljesítménye kiváló volt. Bár a CRP hatékonysága minimálisan - nem szignifikánsan - nagyobbak bizonyult (12.A ábra).



**12. ábra** A sTREM-1 és CRP-szint bakteriális fertőzést azonosító képessége cirrózisos betegekben, külön-külön, valamint összetett pontszámként.

ROC analízis alapján a CRP és a sTREM-1 kiváló eredménnyel azonosítja a bakteriális fertőzést (BF) az ambuláns betegek vs. akután dekompenzált (AD) BF-ben szenvedő betegek összevetésben (A). Azonban mindkét molekula diszkriminációs ereje jelentősen csökken, mikor a kontrollcsoport BF-ben nem szenvedő AD-s betegekből áll (B). Az új AD-infekciós (ADI) pontrendszer ROC analízisének értékei megközelítik az eredeti (referencia [A]) ROC görbe értékeit (C). Feltüntettük az ADI pontrendszer, bináris logisztikus regresszióval számított egyenletét. Az ADI pontszám diagnosztikus képessége AD betegekben szignifikánsan jobb, mint a CRP-é önmagában (D).

Ugyanakkor, amikor ezeket a markereket a fertőzésben szenvedő és nem szenvedő AD-s betegek elválasztására használtuk, mindkét marker diszkriminatív ereje jelentősen esett. Mivel azonban a CRP-é többet csökkent ( $\Delta$ AUROC: CRP: -0,113; sTREM-1: -0,084), ebben az összevetésben a sTREM-1 mutatott nem szignifikánsan ugyan, de jobb teljesítményt [sTREM-1: AUROC: 0,804 (95%CI: 0,711-0,897),  $p < 0,0001$ , összesített pontosság: 73,2%, szenzitivitás: 60,7%, specificitás: 90,2%, +PÉ & -PÉ: 89,5% és 62,7%; a  $>642$  pg/mL-es legjobb diszkriminációs határértéknél; CRP: AUROC: 0,791 (95%CI: 0,702-0,881),  $p < 0,0001$ , összesített pontosság: 72,2%, szenzitivitás: 55,4%, specificitás: 95,1%, +PÉ & -PÉ: 93,9% és 60,9%; a  $>36,2$  mg/L-es legjobb diszkriminációs határértéknél; (12.B ábra és 9. Táblázat)].

## 9. Táblázat

*A sTREM-1 és a CRP bakteriális fertőzést diagnosztizáló képessége akután dekompenzált (AD) cirrózisos betegekben, külön, illetve kombinációban*

Paraméter	Összesített pontosság	Szenzitivitás	Specificitás	+PÉ	-PÉ	+LR	-LR
CRP	72,2%	55,4%	95,1%	93,9%	60,9%	11,35	0,47
sTREM-1	73,2%	60,7%	90,2%	89,5%	62,7%	6,22	0,44
Legalább egy + marker	77,3%	71,4%	85,4%	87,0%	68,6%	4,88	0,33
ADI pontrend.	79,4%	76,8%	82,9%	86%	72,3%	4,50	0,28

+PÉ: pozitív prediktív érték; -PÉ: negatív prediktív érték; +LR: pozitív valószínűségi ráta; -LR: negatív valószínűségi ráta; CRP: C-reaktív protein; sTREM-1: szolubilis mieloid sejteken expresszált trigger receptor-1; ADI pontrend.: AD infekciós pontrendszer

Hogy fokozzuk az egyedi markerek diagnosztikus hatékonyságát, bináris logisztikus regresszió segítségével kombináltuk őket. A legjobb eredményt a sTREM-1 természetes logaritmusának (ln) és a CRP legjobb diszkriminációs határértékének egyesítésével kaptuk. Egy klinikai faktor, a mérsékelt/súlyos (tehát fizikai vizsgálattal detektálható) aszcitesz jelenlétét is a modellhez adva az új AD infekció (ADI) pontrendszer ( $= 1,016 \times \ln(\text{sTREM-1}) + 3,138_{[\text{ha CRP} > 36,2 \text{ mg/L}]} + 1,994_{[\text{ha aszcitesz jelen van}]}$ ) szignifikánsan magasabb AUROC értéket ért el, mint a rutinszerűen alkalmazott CRP önmagában [AUROC: 0,878 (95%CI: 0,812-0,944),  $p < 0,0001$ , összesített pontosság:

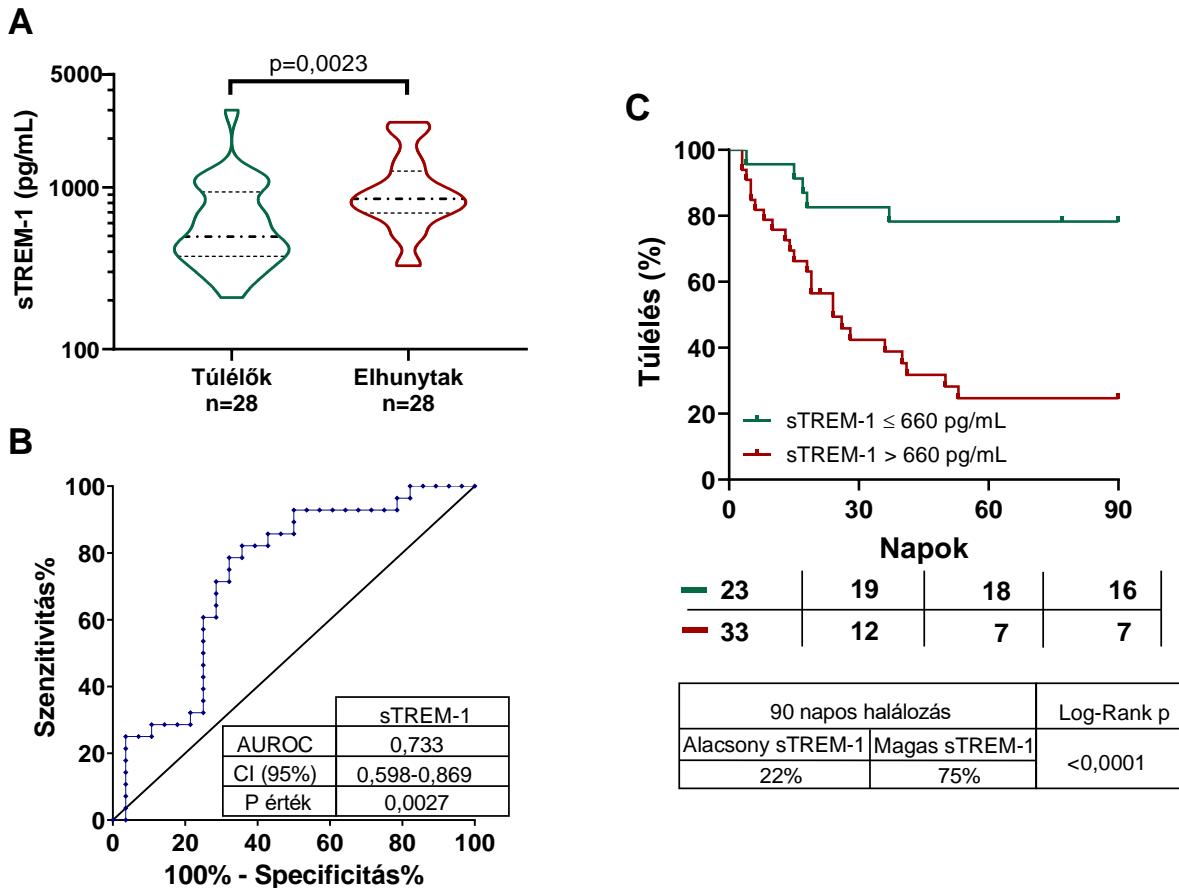
79,4%, szenzitivitás: 76,8%, specificitás: 82,9%, +PÉ & -PÉ: 86,0% és 72,3%; a >8,38-as legjobb diszkriminációs határértéknél;  $\Delta$ AUROC: 0,087 (95%CI: 0,004-0,168);  $p=0,0394$  (**11.C-D ábra** és **9. Táblázat**]). Végül az ADI pontrendszer ROC görbéjének CI-át bootstrap megközelítést alkalmazva belső validálásnak vetettük alá, ami megerősítette az új pontrendszer diagnosztikus megbízhatóságát (a 95%CI a bootstrap analízis során: 0,798-0,932). A két marker kombinációjának másik, egyszerűbb megközelítése az, hogy az infektív eseteket "legalább egy pozitív teszt a kettőből" elv alapján definiáljuk (a fent azonosított küszöbértékek alapján). Ez a fajta bináris pontozás nem elemezhető ROC analízissel, de az összesített pontosság (77,3%), szenzitivitás (71,4%), specificitás (85,4%), +PÉ (87,0%) és -PÉ (68,6%) meghatározhatóak, és meglehetősen hasonlóak az ADI pontrendszer paramétereikhez (**9. Táblázat**).

### **5.2.3. A magas sTREM-1 koncentráció, a 90 napon belül bekövetkező halálozás független kockázati tényezője BF-ben szenvedő AD-s betegekben**

Az ötvenhat, BF-ben szenvedő beteg közül huszonnyolc (50%) halt meg a felvételt követő 90 napban. A beválasztáskori sTREM-1 szintek szignifikánsan magasabbak voltak a követési időszak során elhunytakban, mint a túlélőkben [medián (IQR): 497 (376-938) vs. 850 (695-1261) pg/mL,  $p=0,0023$ ; (**13.A ábra**)]. A sTREM-1 szint 90 napos mortalitást előrejelző pontosságát a BF-ben szenvedő betegekben ROC-analízis segítségével állapítottuk meg [AUROC: 0,733 (95%CI: 0,598-0,869),  $p=0,0027$ ]. A sTREM-1 legjobb, Youden-index által becsült, diszkriminatív küszöbértéke >660 pg/mL volt, 82,1% szenzitivitás, 64,3% specificitás, 69,7% +PÉ és 78,3% -PÉ mellett (**13.B ábra**). Ezt a küszöbértéket alkalmazva Kaplan-Meier-analízisben, a magas (>660 pg/mL) sTREM-1 koncentrációjú betegek 90 napos halálozásának kockázata szignifikánsan magasabb volt, mint az alacsony sTREM-1 szinttel rendelkezőké [Log-Rank  $p<0,0001$  (**13.C ábra**)].

A különböző klinikai pontrendszereket úgy alkották meg, hogy a mortalitás bekövetkezésének esélyével párhuzamosan emelkedjenek, így folyamatos változóként jó becslést adjanak a halálozás várható esélyéről. Másrészt viszont, a klinikus szemszögéből nézve, egy egyszerű határérték - a pozitív/negatív kimeneteleket "bináris" formában meghatározó megközelítés - hasznosabb lehet az egyedi markerek tekintetében, a módszer egyszerűsége miatt. Hogy elkerüljük a folyamatos változók és a

legjobb diszkriminációs határértékek összehasonlításából adódó statisztikai torzítást, a MELD és a CLIF-AD pontrendszerek, valamint a CRP és a sTREM-1 prediktív teljesítményét mind folyamatos, mind kategorikus változóként (a legjobb diszkriminatív értéküket alapul véve) meghatároztuk.



**13. ábra** A magas sTREM-1 szint összefüggést mutat a bakteriális fertőzésben szenvedő cirrózisos betegek 90 napos halálozásával

A sTREM-1 szint magasabb az elhunytakban a túlélőkhöz képest (A). A sTREM-1 koncentráció 90 napos mortalitást előrejelző képességét ROC analízis segítségével vizsgáltuk bakteriális fertőzésben szenvedő cirrózisos betegekben (B). Kaplan-Meier-elemzés alapján, a magas sTREM-1 szint (>660 pg/ml; a ROC analízis Youden indexe által meghatározva) szignifikánsan összefügg a magasabb rövid távú halálozás gyakoribb előfordulásával bakteriális fertőzésben szenvedő cirrózisos betegekben. Az adott napokon feltüntettük az analízisben még jelen lévő, betegek számát (C).

Az egyváltozós Cox-regressziós analízis során mind a  $\ln(\text{sTREM-1})$  [HR: 2,606 (95%CI: 1,468-4,627),  $p=0,001$ ], mind a magas (>660 pg/mL) sTREM-1 szint [HR: 5,095 (95%CI: 1,920-13,524),  $p=0,001$ ] összefüggést mutatott a 90 napos halálozással, a

következő klinikai tényezők mellett: MELD és CLIF-AD pontrendszerek, valamint magas értékek (>18 és >60), ACLF grádus, tüdőgyulladás (mint a fertőzés helye), másodlagos fertőzés megjelenése, ln(CRP) és magas CRP szint (>36,5 mg/L), míg a a gasztro-intesztinális vérzés éppen nem érte el a szignifikancia határát (**10. Táblázat**).

## 10. Táblázat

*A bakteriális fertőzésben szenvedő cirrózisos betegek 90 napos halálzásának egy- és többváltozós Cox regressziós analízise*

90 napos halálzás	Egyváltozós Cox regresszió			Többváltozós Cox modell 1			Többváltozós Cox modell 2			
	HR	CI (95%)	p	HR	CI (95%)	p	HR	CI (95%)	p	
MELD pontszám	1,062	1,030-1,096	<0,001	0,972	0,915-1,033	0,366				
MELD >18	3,405	1,594-7,271	0,002				1,017	0,326-3,170	0,977	
CLIF-AD pontsz.	1,067	1,036-1,098	<0,001	1,025	0,967-1,086	0,409				
CLIF-AD >60	4,694	2,090-10,544	<0,001				1,112	0,268-4,624	0,884	
0	(Referencia)									
1	2,027	0,394-5,224	0,366	1,526	0,325-7,164	0,592	1,697	0,355-8,108	0,507	
2	5,534	2,087-14,679	0,001	4,000	1,445-11,075	0,008	4,841	1,730-13,548	0,003	
3	10,133	3,875-26,500	<0,001	7,677	2,882-20,448	<0,001	5,61	1,957-16,081	0,001	
Életkor	0,977	0,941-1,014	0,221							
Nem (női)	1,042	0,495-2,193	0,913							
Alkoholos etiológia	1,456	0,619-3,428	0,390							
Társbetegség	0,628	0,297-1,329	0,224							
Előző fertőzés	0,831	0,395-1,748	0,625							
Előző AD	0,915	0,590-1,419	0,691							
HCC	2,280	0,680-7,642	0,182							
Fertőzés helye	Pneumonia	2,444	1,029-5,808	0,043	0,974	0,345-2,748	0,960	0,926	0,349-2,461	0,878
	UTI	1,201	0,571-2,524	0,630						
	SBP	0,957	0,441-2,073	0,910						
	Más	0,719	0,273-1,894	0,505						
	Többszörös	1,649	0,723-3,762	0,235						
Szeepszis	1,512	0,683-3,347	0,308							
Szekunder infekc.	2,638	1,228-5,667	0,013	1,951	0,792-4,802	0,146	2,029	0,838-4,912	0,117	
Aszcitesz	3,994	0,541-29,473	0,174							
HE	1,259	0,599-2,650	0,543							
GI vérzés	2,873	0,987-8,369	0,053	2,879	0,831-9,972	0,095	3,127	0,929-10,528	0,066	
NSBB	1,383	0,657-2,914	0,393							
PPI	2,147	0,999-4,612	0,050	1,437	0,527-3,920	0,479	1,224	0,502-2,986	0,657	
ln(CRP)	1,468	1,007-2,140	0,046	1,055	0,633-1,758	0,838				
CRP >36.5 mg/L	2,762	1,211-6,299	0,016				0,800	0,302-2,122	0,654	
ln(sTREM-1)	2,606	1,468-4,627	0,001	2,014	0,982-4,132	0,056				
sTREM-1 >660pg/mL	5,095	1,920-13,524	0,001				2,941	1,009-8,573	0,048	

HR: kockázati hányados; CI: konfidencia intervallum; MELD: model for end stage liver disease; ACLF: krónikus májbetegségre rakódott akut májelégtelenség; AD: akut dekompenzáció; HCC: hepatocelluláris karcinóma; SBP: spontán bakteriális peritonitisz; UTI: húgyúti fertőzés; HE: hepatikus encefalopátia; GI: gasztrointesztinális; NSBBs: nem-szelektív béta-blokkolók; PPI: proton-pumpa inhibitorok; CRP: C-reaktív protein; ln: természetes alapú logaritmus

Az első többváltozós Cox regressziós modellünkben – amely a fent említett tényezőket folyamatos változóként tartalmazta – csak az ACLF grádus maradt a 90 napos mortalitás független kockázati tényezője, azonban az ln(sTREM-1) is közel szignifikáns kockázati tényezőnek bizonyult [HR: 2,014 (95%CI: 0,982-4,132), p=0,056], mint a második legerősebb prediktor. A kategorikus változókat tartalmazó második többváltozós Cox regressziós modellben az ACLF grádus mellett a magas sTREM-1 szint [HR: 2,941 (95%CI: 1,009-8,573), p=0,048] is a BF-sel szövődött AD-s epizódok során bekövetkező 90 napos mortalitás független előrejelzője maradt (**10. Táblázat**).

### 5.3. A KÜLÖNBÖZŐ IZOTÍPUSÚ ANTI-GP2 ANTITESTEK JELENTŐSÉGÉNEK VIZSGÁLATA PSC-s BETEGEK BEN

#### **5.3.1. A GP2-specifikus autoantitestek előfordulása jelentősen gyakoribb PSC-ben, mint a kontroll csoportokban**

Az anti-GP2 antitestre pozitív esetek szinte kizárólag IgA izotípusúak voltak, IgG pozitivitást kizárólag a CD kontrollok 7%-ában találtunk. Összesen a PSC-s páciensek 30,8%-a (20/65) volt pozitív GP2-specifikus IgA autoantitest jelenlétére, mely szignifikánsan gyakoribb az egészséges [0,0%, p<0,001] és a beteg [CD: 6,2%, UC: 0,0%, aLC: 4,9%, chrHCV: 4,2% és PBC: 3,9%; mindegyik esetben p<0,001] kontroll csoportokban tapasztalt előfordulásokhoz képest. A különböző beteg és egészséges csoportokban előforduló GP2 specifikus antitest pozitívítás gyakoriságokat az **11. Táblázatban** összegeztük.

#### **11. Táblázat**

*A GP2 ellenes autoantitestek a PSC-s betegekben és különböző kontroll csoportokban*

Betegek		Anti-GP2 IgA	Anti-GP2 IgG
<b>PSC (n=65)</b>		<b>20 (30,8%)</b>	<b>0 (0%)</b>
Gyulladásos bél betegség n=427	CD (n=257)	16 (6,2%) *	18 (7%) #
	UC (n=170)	0 (0%) *	0 (0%)
Krónikus májbetegség n=488	aLC (N = 267)	13 (4,9%) *	0 (0%)
	chr HCV (N = 119)	5 (4,2%) *	0 (0%)
	PBC (N = 102)	4 (3,9%) *	0 (0%)
Egészséges kontrollok		0 (0%) *	0 (0%)

PSC: primer szklerotizáló kolangitisz, CD: Crohn-betegség, UC: ulceratív kolitisz, aLC: alkoholos májcirrózis, chr HCV: krónikus hepatitisz C vírus, PBC: primer biliáris kolangitisz,  
\*  $p < 0,001$ ; #  $p = 0,030$  az azonos izotípusú PSC csoporthoz képest

### 5.3.2. Az anti-GP2 IgA jelenléte súlyosabb betegségfenotípussal társul PSC-ben

A PSC-s betegek klinikai és laboratóriumi paramétereit az anti-GP2 IgA státuszuk szerint elemeztük és az eredményeket a **12. Táblázat**ban összegeztük. Az anti-GP2 IgA nem mutatott összefüggést a diagnóziskori életkorral és a nemmel. Számos súlyosabb betegségre utaló klinikai és laboratóriumi paramétert jelentősen emelkedettnek találtunk az anti-GP2 IgA antitest pozitív esetekben. Ezen páciensek betegségfolyása szignifikánsan rövidebb [4 (2-7) vs. 7 (3-10) év,  $p = 0,027$ ], MRS-e magasabb volt. Az összes májenzim jelentősen emelkedett, míg az albuminszint csökkent volt az anti-GP2 IgA pozitív betegekben a negatívokhoz képest. A cirrózis is magasabb előfordulást mutatott az anti-GP2 IgA pozitívitás esetén [35% vs. 11,1%;  $p = 0,022$ ], míg az IBD társulásának arányát és a bélbetegség típusát függetlennek találtuk az autoantitest státusztól.

## 12. Táblázat

A PSC-s betegek klinikai és laboratóriumi paramétereit az anti-GP2 IgA pozitívitás szerint

Betegek	Anti-GP2 IgA		P
	Negatív (n = 45)	Pozitív (n = 20)	
Férfi nem *	31 (68,9%)	15 (75%)	0,617
Cirrózis jelenléte *	<b>5 (11,1%)</b>	<b>7 (35%)</b>	<b>0,022</b>
IBD jelenléte *	38 (77,6%)	14 (70%)	0,638
Ulceratív kolitisz *	23 (46,9%)	12 (60%)	0,138
Crohn-betegség *	15 (30,6%)	2 (10%)	0,606
Életkor (év) *	23 (17–37)	23,5 (18–33)	0,764
Betegség időtartama (év) #	<b>7 (3–10)</b>	<b>4 (2–7)</b>	<b>0,027</b>
Albumin (g/L) #	<b>45 (42–47)</b>	<b>40 (39–43)</b>	<b>0,001</b>
Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ ) #	15 (11–20)	17 (11–34)	0,383
GOT (U/L) #	<b>32 (25–43)</b>	<b>69 (50–96)</b>	<b>&lt;0,001</b>
GPT (U/L) #	<b>38 (21–64)</b>	<b>90 (56–165)</b>	<b>0,002</b>
GGT (U/L) #	<b>97 (44–208)</b>	<b>298 (141–499)</b>	<b>0,001</b>
ALP (U/L) #	<b>420 (246–595)</b>	<b>898 (637–1532)</b>	<b>&lt;0,001</b>
Mayo kockázati pont #	<b>-0,859 (-1,447–0,131)</b>	<b>-0,072 (-0,6–0,658)</b>	<b>0,010</b>

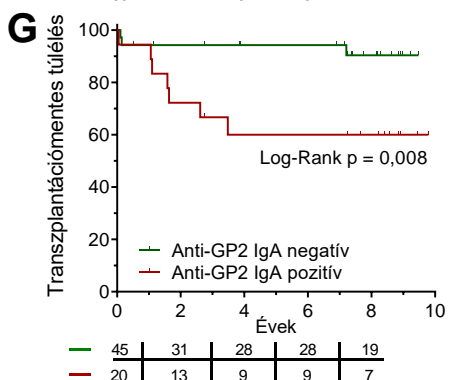
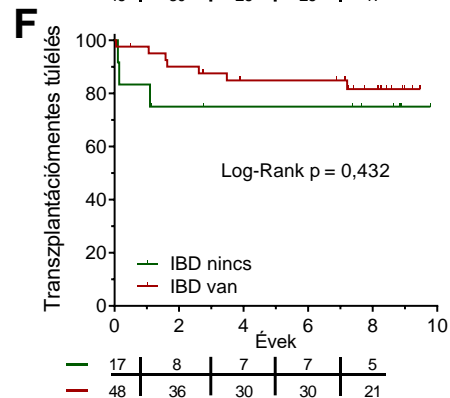
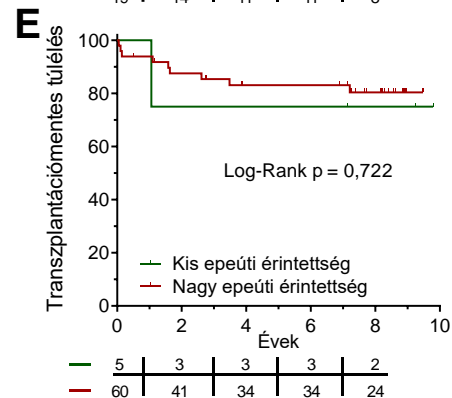
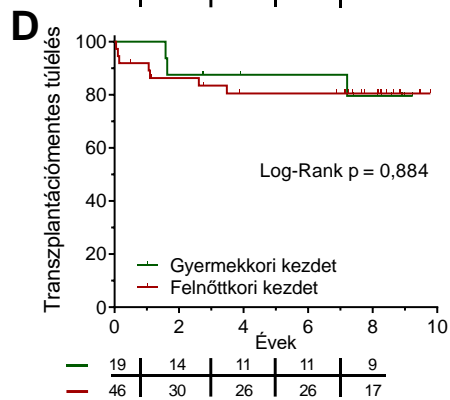
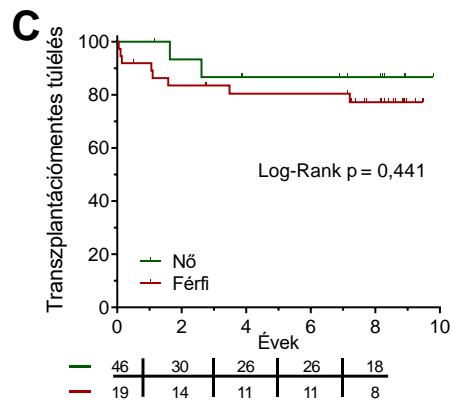
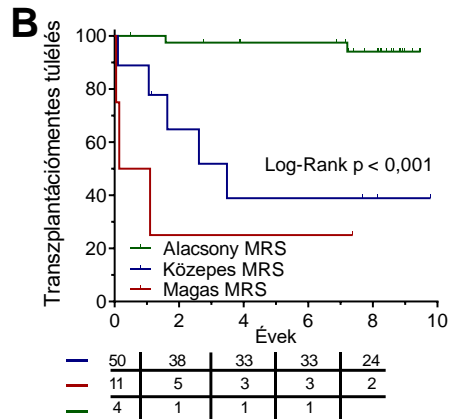
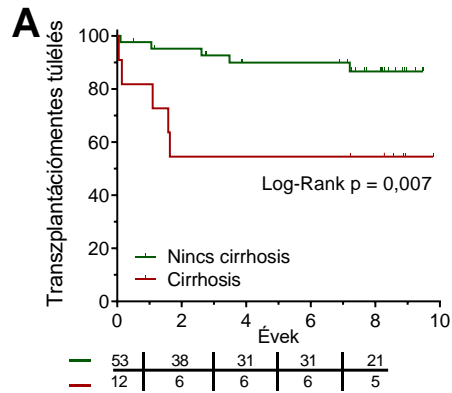
IBD: gyulladós bél betegség; ALP: alkalis foszfatáz; GPT: glutamát-piruvát transzamináz; GOT: glutamát-oxalacetát transzamináz;  $\gamma$ GT:  $\gamma$ -glutamil-transzferáz; GP2: glikoprotein 2.  
A változókat \* n (%) vagy # medián (interkvartilis tartomány) formában összegeztük.

### 5.3.3. Az anti-GP2 IgA jelenléte PSC-ben, a betegség súlyosabb lefolyásának kockázatával társul

Hét beteg esett át ortotóp májtranszplantáción (OLTx) a követési időszak alatt. Az indikációt kivétel nélkül a végstádiumú májbetegség kifejlődése adta. Májbetegséghez kötődő szövődmények miatt 6 pácienszt veszítettünk el. Ebből három haláleset már az OLTx után történt, tehát összesen 10 betegben következett be az összetett végpont (OLTx és/vagy májbetegséggel összefüggő halálozás). Egy beteg halálához akut miokardiális infarktusz vezetett, így ez az eset az esemény bekövetkeztekor cenzorálva lett. Kolonkarcinómát két betegben, míg epeúti malignitást egy betegben diagnosztizáltunk. A bevont betegek közül 9-nek volt legalább egyszer kolangitisze.

Elemeztük a különböző klinikai paraméterek és az anti-GP2 IgA összefüggését a kedvezőtlen betegség kimenetelekkel. Kaplan-Meier analízisben az emelkedett MRS és a cirrózis jelenléte szignifikáns kapcsolatot mutatott [Log-Rank  $p < 0,001$  és  $p = 0,007$ ] a betegség gyorsabb progressziójával, azonban nem találtunk ilyen összefüggést a betegek neme [Log-Rank  $p = 0,441$ ], a kialakuláskori életkor [Log-Rank  $p = 0,884$ ], a betegség lokalizációja [Log-Rank  $p = 0,722$ ] és az IBD társulása [Log-Rank  $p = 0,432$ ] szerint csoportosítva pácienseinket (**14. ábra** és **13. Táblázat**). Az anti-GP2 IgA antitest pozitivitás [Log-Rank  $p = 0,008$ ] előrejelezte az összetett végpont kialakulását (**14. ábra**).

Hasonlóképpen, az univariációs Cox regressziós analízis az anti-GP2 IgA-pozitivitás szerepét tárta fel a kedvezőtlen betegségkimenetel előrejelzésében [HR: 5,15 (95%CI: 1,33-19,97),  $p = 0,018$ ; (**13. Táblázat**)], mely multivariációs Cox analízisben független predikciós tényező maradt a MRS-re való korrigálás után [HR: 4,69 (95%CI: 1,05-21,04);  $p = 0,043$ ]. Hasonló tendenciát detektáltunk, amikor a MRS helyett a cirrózis jelenlétére korrigáltunk [HR: 3,74 (95%CI: 0,9-15,55);  $p = 0,07$ ]. Szubpopulációs analízisben az anti-GP2 IgA pozitivitás összefüggést mutatott a kedvezőtlen kimenetelekkel a PSC felnőttkori kialakulása [Log-Rank  $p = 0,034$ ], valamint IBD társulása esetén [Log-Rank  $p < 0,001$ ]. Azonban nem találtunk hasonló összefüggést társuló IBD hiányában [Log-Rank  $p = 0,666$ ], sem a gyermekkorban kezdődő PSC [Log-Rank  $p = 0,098$ ] alcsoportban.



#### 14. ábra A betegségfolyást befolyásoló tényezők primer szklerotizáló kolangitiszben

A magasabb Mayo kockázati pontszám (MRS), a cirrhosis, valamint a glikoprotein 2 (GP2) ellenes IgA autoantitest jelenléte szignifikáns összefüggést mutatott a rövidebb transzplantációmentes túléléssel, de a nem, a betegség kezdetekori életkor, a betegség lokalizációja és a társuló IBD jelenléte nem. Az MRS határértékei a következők voltak: alacsony rizikó:  $\leq 0$ , közepes rizikó:  $>0$  és  $\leq 2$ , magas rizikó:  $>2$ . Az életkorhoz kapcsolódó határértéket a betegség kezdetén 18 év-nél húztuk meg, a gyermekkori és a felnőttkori kezdetű PSC elkülönítésre.

### 13. Táblázat

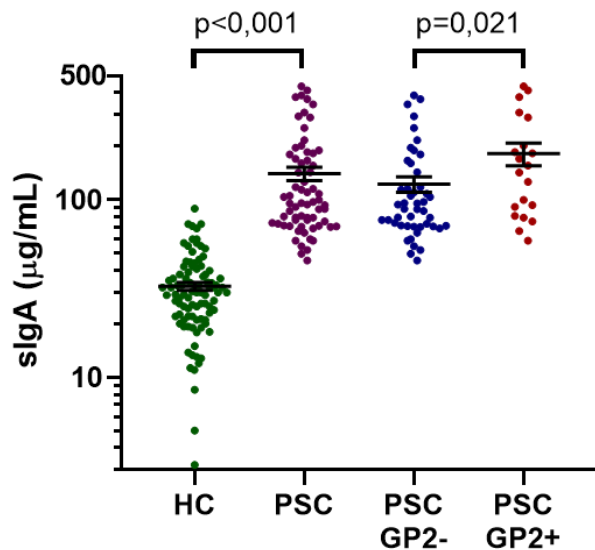
Egyváltozós Cox regressziós analízis a PSC-s betegek transzplantációmentes túlélésének előrejelzésére

Egyváltozós Cox regresszió			
	HR	95% CI	p
Nem (női)	0,55	0,12 - 2,59	0,448
Életkor a betegség kezdetekor (év [felnőtt])	1,11	0,29 - 4,28	0,884
Cirrózis jelenléte	4,7	1,36 - 16,29	<b>0,015</b>
IBD jelenléte	0,59	0,15 - 2,27	0,437
Betegség lokalizáció (nagy epeút)	0,69	0,09 - 5,44	0,723
Mayo kockázati pontszám	5,52	2,61 - 11,65	<b>&lt;0,001</b>
Anti-GP2 IgA	5,15	1,33 - 19,97	<b>0,018</b>

HR: kockázati hányados; CI: konfidencia intervallum

#### 5.3.4. Az anti-GP2 IgA antitest jelenléte összefüggést mutat a szekretoros IgA emelkedett koncentrációjával

Miután a PSC-s betegekben az anti-GP2 antitest csak IgA formában volt kimutatható, ennek lehetséges eredetét próbáltuk meghatározni. Ehhez első lépésben megmértük a szérum totál slgA szintjét egy házi fejlesztésű ELISA segítségével. A PSC-s betegekben jelentősen magasabb totál slgA-szinteket mértünk az egészséges kontrollokhoz képest [medián (IQR): 96 (73-180) vs. 30 (21-42) µg/mL;  $p < 0,001$ ]. Továbbá az anti-GP2 IgA pozitívitás esetén további slgA-szint emelkedést detektáltunk az anti-GP2 IgA-ra negatív esetekhez képest [medián (IQR): 149 (86-246) vs. 89 (71-118) µg/mL,  $p = 0,021$ ] (15. ábra).

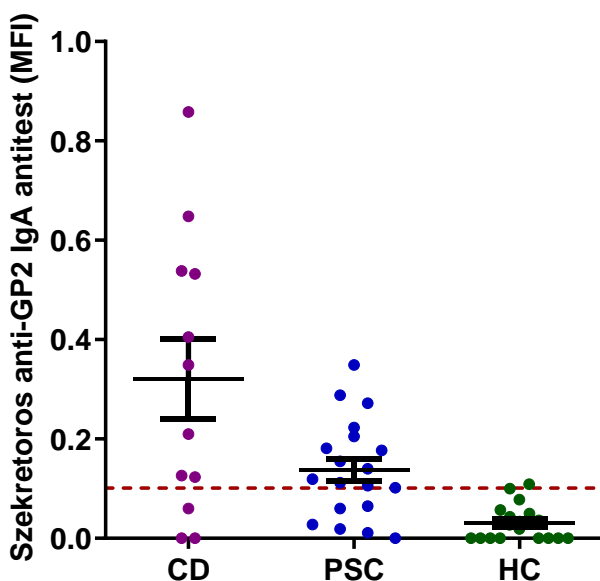


**15. ábra** A szekretoros IgA antitest koncentrációja emelkedett PSC-s betegekben, illetve tovább fokozott anti-GP2 IgA jelenléte esetén

HC: egészséges kontroll személyek  
 PSC: primer szklerotizáló kolangitisz  
 GP2-/+ : glikoprotein-2 ellenes IgA negatív/pozitív betegek

### 5.3.5. Az anti-GP2 IgA antitestek karakterizálása

Végül karakterizáltuk az anti-GP2 IgA antitesteket PSC-s és CD-ben szenvedő pácienseinkben egy áramlási-citometriás szubtipizáló esszé segítségével. PSC-ben a szekretoros komponens 68,4%-ban (13/19) volt jelen az anti-GP2 IgA antitestek felszínén hasonlóan a PSC nélküli CD-s betegekben (75%; 9/12) észleltekhez (**16. ábra**). Mind PSC-ben, mind CD-ben az IgA1 volt a domináns izotípus, viszont míg a CD-ben szenvedő betegekben az IgA2 arányának medián értéke mindössze 2,02% (IQR: 1,53-2,47%) volt, addig a PSC-s betegekben ez 6,75%-nak (IQR: 4,19-9,79%) adódott.



**16. ábra** A szekretoros komponens jelenléte az anti-GP2 IgA antitesteken

A pozitivitás határértékét (0,101) a negatív kontrollcsoport (egészséges egyének [HC]) medián fluoreszcencia intenzitásának (MFI) átlag + 2SD értéke alapján határoztuk meg.  
 CD: Crohn-betegség;  
 PSC: primer szklerotizáló kolangitisz

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. MIND A CSÖKKENT, MIND AZ EMELKEDETT SZÉRUMFERRITINSZINT JELEZHET KÓROS FOLYAMATOKAT EGYES CIRRÓZISOS JÁRÓBETEG CSOPORTOKBAN

A májcirrózisban szenvedő betegekben a vas fokozott felszívódása, és a gyakran társuló akut és krónikus vérzések következtében mind vastúlterhelés, mind vashiányos vérszegénység előfordul [59,64]. A szérumferritinszint egyaránt érzékeny a vasháztartás állapotára és a szervezetben zajló gyulladás jelenlétére [59,60], így szintje a cirrózisban zajló többféle patológiai folyamatról is információt hordozhat.

Ezért vizsgálataink során egy nagylétszámú cirrózisos járóbeteg csoportban megmértük a bevásárláskori szérumferritinszinteket, és 2 éves követési periódus alatt vizsgáltuk annak összefüggését a betegség-specifikus szövődmények kialakulásával és a halálozással. Ahogy arról előttünk már mások is beszámoltak [134], mi is szignifikánsan magasabbnak találtuk a molekula szérumkoncentrációját férfiakban és idősebb betegekben. Továbbá, szignifikánsan alacsonyabb szintet figyeltünk meg azoknál a betegeknél, akiknél korábban varixvérzés zajlott le, azonban az anémiához ezeknél a betegeknél nem társult a ferritinszint hasonló csökkenése.

A ferritinszint és a rutin laboratóriumi paraméterek korrelációs vizsgálatakor, azt találtuk, hogy a vércépzés és a vas homeosztázis markerei (hemoglobin, hematokrit, vörösvértestek átlagos corpuscularis hemoglobintartalma és átlagos corpuscularis térfogata) mind a kompenzált, mind a dekompenzált csoportokban, míg a gyulladás markerei (CRP, fehérvérsejtszám) és a betegség súlyosságát mérő pontszámok csak az utóbbi csoportban korreláltak a ferritinnel. Mindebből arra következtethetünk, hogy míg előrehaladott stádiumú cirrózisban a fokozódó gyulladás és a betegség súlyosság már számottevően befolyásolja a ferritin koncentrációját, addig a betegség korábbi szakaszaiban a ferritin szérumszintje főként a test vashomeosztázisának függvénye, hasonlóan az egészséges populációhoz. A ferritinszint és a gyulladásos paraméterek korrelációjának hiánya összhangban van azon korábbi megfigyelésekkel, miszerint a SIRS és a CARS túlnyomórészt a cirrózis dekompenzált stádiumában manifesztálódik és okozza az immundiszfunkció kialakulását [1].

Aalan-Johansen és Kaplan-Meier analízisek segítségével feltártuk, hogy az alacsony szérumszinttel rendelkező páciensek esetében magasabb a dekompenzált klinikai stádium kialakulásának gyakorisága a korábban kompenzált betegek körében, míg a magas ferritinszint a BF-ek gyakoribb kialakulásával mutatott összefüggést dekompenzált betegekben, valamint a halálozással minden betegcsoport esetén.

Bár az előzőleg megjelent tanulmányok csak a magas ferritinszintet tudták összefüggésbe hozni a kedvezőtlen betegség kimenetellel, azt fontos hangsúlyozni, hogy ezek a vizsgálatok AD miatt hospitalizált betegekben történtek [72–74]. Saját jelen megfigyelésünk, miszerint az alacsony szérumszint koncentráció a dekompenzált klinikai stádium kialakulásának fokozott kockázatával jár együtt korábban kompenzált cirrózisban szenvedő betegeknél, mindenképpen új és izgalmas megállapítás. A magyarázat mégsem egyszerű, és némi spekulációt igényel. A korrelációs analízisek során megfigyelt összefüggések alapján feltételezzük, hogy azon kompenzált betegekben, akiknek a ferritinszintje az alacsony tartományba esett, valószínűleg fel nem ismert krónikus, szubklinikai gasztrointesztinális vérzés vezethetett a vasraktárak kimerüléséhez és így az alacsony ferritinkoncentrációhoz. Cirrózisos betegeknél a vérzés ezen formája leginkább a klinikailag szignifikáns küszöböt elérő, megnövekedett portális nyomás következménye, ami az AD jól körülírt kockázati tényezője [59]. Amikor ellenőriztük az alacsony ferritinszinttel rendelkező és követés alatt dekompenzálódó betegek gasztroszkópiás leleteit, azt találtuk, hogy 8 betegből 7-nek nyelőcsővarixa és/vagy portális hipertenzív gasztropátiája volt a beválasztáskor. Ez a megfigyelés bizonyítékkal szolgál a megnövekedett portális nyomás jelenlétére ezekben a betegekben. Ezenkívül az anémia is független előrejelzője volt az első AD-s események kialakulásának, ami szintén támogatja a vérvesztés szerepére vonatkozó elképzeléseket ezekben a folyamatokban. Ezt a hipotézist azonban szükséges lesz a jövőben specifikus módszerekkel, például széklet-vér vizsgálattal ellenőrizni. Mindazonáltal a ferritinmérés potenciálisan már ezen eredmények alapján is egy fontos kiegészítő szűrő módszerré válhat mind a cirrózisos betegek korai klinikai stádiumának felmérésében, mind a későbbi terápia tervezésében.

Elsőre viszont talán ellentmondásosnak tűnhet, hogy a mortalitás inkább a magasabb ferritinszinttel mutatott összefüggést a kompenzált populációban is. Azonban amint arról már volt szó, a magas ferritinszint vagy a szervezet vastúlterhelését jelzi, amely a sejtekre nézve károsító hatású, vagy a BT, esetleg egy szubklinikus, kezdődő fertőzés által okozott fokozott gyulladási válasz eredménye [52]. Ez utóbbi kettő nyílt fertőzéseket provokálhat, míg maga a gyulladás és a vas által okozott toxikus hatás kiválthatja a HCC [135–137] és a társbetegségek [138–141] progresszióját, ami végső soron az összhalálozás növekedéséhez vezet. És valóban, amint azt a 9. ábra mutatja, szinte minden magas ferritinszinttel rendelkező beteg, aki a követés során dekompenzálódott, elhunyt, míg néhányan AD epizód nélkül is meghaltak. Ezzel szemben, amint azt a 6. ábra mutatja, dekompenzáció kialakulása nélkül egyetlen alacsony ferritinszintű beteg sem halt meg a követés alatt. Továbbá a dekompenzálódó alacsony ferritinszinttel rendelkező betegek körülbelül 40%-a szintén életben maradt. Ennek a különbségnek a magyarázata nem tisztázott, de az alacsony ferritinszint által jelzett, nem-gyulladási mechanizmusú dekompenzációs események valószínűleg kevésbé súlyosak/jobban kezelhetőek.

A háttérben húzódó folyamatok teljes feltárása azonban egy komplex látásmód alkalmazását fogja megkövetelni a jövőbeni tanulmányoktól, tekintettel arra, hogy a ferritin egy multifunkcionális molekula, amely elméletileg akár közvetlen szerepet is játszhat a különféle klinikai események előidézésében. Beszámoltak arról, hogy a két alegység eltérő funkcióval bír: a H-ferritin ferroxidáz aktivitással rendelkezik, míg az L-ferritin savas oldalláncai elősegítik a ferroxidáz megújulását, és elengedhetetlenek a ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) vasnak a ferritin magjába történő nukleációjához [52]. Kiemelendő, hogy a H-ferritin citoszolikus vasmegkötő aktivitása megakadályozza a glükóz-6-foszfát vas általi oxidatív gátlását, fenntartva ezzel a máj glükóztermelését a glükoneogenezisen keresztül, ami végeredményben a szervezet szépszis iránti toleranciájának növekedéséhez vezet [60]. Egy másik tanulmány eredményei szerint, az L-ferritin magas szintje gátolja a tumornekrózis faktor- $\alpha$  és az interleukin-1 LPS hatására történő termelését makrofágokban [142]. Ezzel szemben egy vérképzéssel foglalkozó közlemény, humán H-ferritin injekciója után, mieloszuppresszív hatásról és interleukin-10 indukcióról számolt

be egerekben, amely a molekula ferroxidáz aktivitásától függött. Ennek megfelelően, az L-ferritin, amely nem rendelkezik ferroxidáz aktivitással, nem mutatott ilyen hatást [143].

Fontos megjegyezni, hogy mivel a rutin laboratóriumi módszerek kizárólag az L-ferritin koncentrációt mérik, nincs információnk a H-ferritin arányáról vagy a szérumferritin vastelítettségének mértékéről, amik segíthetnék a háttérfolyamatok megértését. Ezek egyértelműen a jelen tanulmány korlátai, és jövőben további vizsgálatokat tesznek szükségessé.

Végül, a dekompenzált betegekben mindkét vizsgált kimenetellel (BF és halálozás) a magas ferritinszint mutatott összefüggést. Mégis, pont ebben az alcsoportban a magas ferritinszint elvesztette statisztikai szignifikanciáját a mortalitás kockázatának tényezőit vizsgáló többváltozós Cox regressziós modellben (vagyis az esemény bekövetkezésének esélyéről a modellben szereplő többi tényező mellett nem volt képes többlet információval szolgálni). Ezt a megfigyelést a ferritinszint, valamint a gyulladási markerek és a betegség súlyosságát mérő pontszámok között észlelt korrelációk magyarázhatják ezeknél a betegeknél, melyhez hasonló összefüggéseket nem láttunk a kompenzált betegcsoportban.

Elmondható tehát, hogy mind az alacsony, mind a magas ferritinkoncentráció – bár különböző feltételezett mechanizmusok következtében – figyelmet érdemel cirrózisos betegekben. Mindkettő kóros folyamatokat jelezhet, amelyek szerepet játszanak a különböző kimenetek kialakulásában. Azon cirrózisos betegeknél, akiknek korábban nem volt akut vérzése, de alacsony a ferritinszintjük, a kezelő orvosnak érdemes megfontolnia az okkult vérzésforrás és a növekvő portális hipertenzió jeleinek keresését, míg minden magas ferritinszinttel rendelkező beteg fokozott halálozási kockázatnak van kitéve, így szorosabb nyomon követést vagy akár beavatkozást igényelhet. Ezek az új eredmények bár további vizsgálatokat igényelnek, fontosak, és támogathatják a ferritin rutinszerű használatának szükségességét a cirrózisban szenvedő betegek progressziójának követésére. Tekintettel arra, hogy a ferritin koncentráció mérés egy széleskörben elérhető és költséghatékony módszer, ideális eszköz lehetne a mindennapi klinikai gyakorlatban.

## 6.2. A SZÉRUM sTREM-1 SZINT MÉRÉSE SEGÍTHETI A CIRRÓZISHOZ TÁRSULÓ BF-EK DIAGNOSZTIKÁJÁT ÉS A RÖVIDTÁVÚ HALÁLOZÁS ELŐREJELZÉSÉT

A cirrózisban szenvedő betegek, a társuló immunhiányos állapot miatt, fokozottan fogékonyak a BF-ekre, amelyek gyakran súlyos betegség-specifikus szövődmények kialakulásához és a halálozás jelentős emelkedéséhez vezetnek [144,145]. A megbízható laboratóriumi markerek elengedhetetlenek a BF-ek korai diagnosztizálásához, és ezáltal lehetővé teszik a megfelelő beavatkozás(ok) időben történő elvégzését. A CRP a legszélesebb körben alkalmazott gyulladásos marker a mindennapi klinikai gyakorlatban, azonban a cirrózisban szenvedő betegeknél diagnosztikai értéke korlátozott [8]. Ezért új biomarkerek azonosítása szükséges ahhoz, hogy ebben a betegcsoportban is időben felismerhessük a fertőzések és az akut gyulladásos reakciók jelenlétét.

Legjobb tudomásunk szerint az általunk végzett klinikai vizsgálat az első, amely a sTREM-1 alkalmasságát és megbízhatóságát tanulmányozza a cirrózishoz kapcsolódó BF-ek diagnosztizálásában és prognózisának előrejelzésében.

Kutatásunk során először megvizsgáltuk az összefüggést a sTREM-1 koncentráció és a cirrózisos pácienseink betegség-specifikus jellemzői között. Megállapítottuk, hogy a teljes kohorszban a sTREM-1 koncentráció fokozatosan növekszik a betegség súlyosságával (Child-Pugh stádium) párhuzamosan. Azonban, amikor AD jelenléte szerint osztottuk fel betegeinket azt találtuk, hogy AD hiányában a sTREM-1 szintje nem magasabb szignifikánsan a krónikusan dekompenzált betegeknél a kompenzáltakhoz képest. Továbbá, a BF nélküli AD esetek csak a kompenzált klinikai stádiumhoz vagy a Child-Pugh A súlyosságú járóbeteg-csoportokhoz képest mutattak emelkedett sTREM-1 szintet. Ezzel ellentétben, a BF-ben szenvedő AD betegek sTREM-1 szérumkoncentrációja kiugróan magas volt. Hasonlóképpen, az ambuláns és AD-s esemény alkalmával begyűjtött mintapárok csak abban az esetben mutattak szignifikánsan eltérő sTREM-1 szintet, ha az AD-kor BF is jelen volt. Jelentős korrelációt észleltünk azonban a sTREM-1 koncentráció és a betegség súlyosságát mérő pontrendszerek között, különösen az AD csoportban, ahol a sTREM-1 értékek és a CLIF-AD pontszám összefüggése volt a legszembetűnőbb. Ezen eredményeket úgy összegezzük, hogy a sTREM-1 szint erősen függ a cirrózisban szenvedő betegeknél kialakuló fertőzések jelenlététől, míg a betegség stádiuma csak kisebb mértékben

befolyásolja azt. Továbbá egyértelmű összefüggés van a sTREM-1 koncentráció és a fertőzés súlyossága között, mivel a szeptikus betegekben még magasabb értékeket mértünk. Ezt támasztja alá a sTREM-1 szint szoros korrelációja a fehérvérsejtek és a neutrofilek számával, valamint a CRP-vel, melyek köztudottan jelentős emelkedést mutatnak BF-ben.

Ezután megvizsgáltuk a sTREM-1 diagnosztikus teljesítményét a cirrózishoz társuló BF-ek vonatkozásában, összehasonlítva a CRP-vel. A sTREM-1 és a CRP egyaránt a nem specifikus gyulladáshoz tartozó markerek közé sorolhatóak, celluláris eredetük azonban eltérő. A CRP a májban szintetizálódik, ezért a molekula felszabadulásának mértéke elméletben a májműködés függvénye. Egy korábbi tanulmány ki is mutatta, hogy minél súlyosabb a májműködés zavara, annál alacsonyabb a bakterémiára adott CRP-válasz [42]. Hasonlóképpen saját munkacsoportunk is beszámolt arról, hogy előrehaladott cirrózisban, illetve aszcitesz jelenlétében a CRP megbízhatósága csökken a BF-ek diagnosztizálásában. Míg alacsony stádiumú májbetegségben a CRP 10 mg/L-nél magasabb szintje már jelezte a BF jelenlétét, addig előrehaladott májbeteggekben ez a határérték >30 mg/L volt [41], ami nagyságrendileg megfelel a jelen tanulmányban bemutatott eredményeinknek (>9,1 és >36,2 mg/L). Ezzel szemben a sTREM-1-et főként neutrofilek, monociták és makrofágok termelik, bár beszámoltak arról is, hogy a molekula expressziója indukálható az endotélsejtekben is [146]. Ez alapján feltételeztük, hogy a sTREM-1 alkalmasabb marker lehet a cirrózishoz társuló BF-ek szűrésére. Ezen hipotézisünk tesztelésére ROC analízist végeztünk, összevetve a BF-ben szenvedő AD-s betegeket a járóbetegekkel, illetve a fertőzésmentes AD-s esetekkel. A várakozásoknak megfelelően a CRP teljesítménye jelentősen csökkent a második esetben, viszont a sTREM-1 diszkriminatív képessége is mindkét szituációban a CRP-éhez hasonlóan mutatkozott. Fontos azonban, hogy a CRP diagnosztikus pontosságának abszolút csökkenése meghaladta a sTREM-1 esetében megfigyelt értéket, ami alátámasztja a molekulák sejtes eredetének hatására vonatkozó hipotézisünknek.

Bár már számos biomarker tesztelésre került, eddig egyetlen molekula teljesítménye sem tudta meghaladni a CRP klinikai hatékonyságát a cirrózisos betegek BF-einek kimutatásában. Talán csak a PCT és a presepsin jelenthet kivételt, de ezek is kizárólag a rendkívül súlyos fertőzésekben bizonyultak megbízhatóbbnak [41,51,147]. A

laboratóriumi medicina egy új irányvonala az egyedi markerek kombinálása olyan összetett pontrendszerekké, amelyek hatékonysága egyértelműen meghaladja a különálló paramétereket [148–150]. Az eljárás során az egyes analitok egyedi vagy multiplex esszékkal történő mérését a tesztek modern matematikai módszerek segítségével történő egyesítése követi, mely egy összetett paramétert eredményez. Ilyen matematikai algoritmus például a logisztikus regresszió, a fő komponens- vagy a „random forest” analízis [148–151]. Ebben a tanulmányban ezt a megközelítést követve, logisztikus regressziós modell segítségével komplex pontrendszert hoztunk létre a CRP, a sTREM-1, valamint egy klinikai paraméter (aszцитesz jelenléte) kombinálásával. Az aszцитesz megjelenése a májműködés dekompenzációját jelző klinikai mérőföldkő, így ezen információ beépítése képes lehet a görbe korrekciójára ott, ahol a vizsgált markerek várhatóan alulteljesítenének. Ezenkívül az aszцитesz a cirrózisos betegek BF-ének jól ismert kockázati tényezője is [152]. Az új pontrendszer – melynek alapját a sTREM-1 természetes logaritmus képezi, figyelembe véve, a CRP szintjét, annak legjobb diszkriminációs határértékéhez képest, valamint a mérsékelt/súlyos aszцитesz jelenlétét – lényegesen pontosabb diagnosztikai eszköznek bizonyult, az egyedi paraméterekhez viszonyítva. Eredményeink tehát alátámasztják azt a koncepciót, miszerint az egyedi tesztek egyetlen paraméterbe való összevonása szolgálhat megoldásul bizonyos klinikai helyzetek speciális igényeire.

Az egyedi tesztek kombinálásának másik lehetséges megközelítése, hogy egyszerűen pontot adunk, ha bármelyik marker meghaladja a megállapított küszöbértéket, majd ezeket összegezzük. Az eljárás előnye, hogy rendkívül könnyen használható a klinikai gyakorlatban. Ez a módszer nyilvánvalóan nem eredményez folyamatos skálát, így nem tudjuk ROC analízissel összehasonlítani annak AUCROC-ját az eredeti markerekkel, azonban a módszerhez társuló összesített pontosság, szenzitivitás, specificitás, +PÉ és -PÉ, valamint a +LR és -LR megadhatóak. A teljesség kedvéért meghatároztuk ennek a pontozási módszernek is a paramétereit, összehasonlítva az egyedi markerekkel és az ADI pontrendszerrel. Bár a két származtatott pontrendszer teljesítménye összemérhető volt egymással, az ADI valamivel jobban teljesít a BF-sel rendelkező betegek azonosításában (szenzitivitás: 76,8% vs. 71,4%). Azonban a „legalább egy pozitív marker” módszer egyszerűsége és az a tény,

hogy nem tartalmazza a némileg szubjektív „aszцитesz jelenléte” paramétert, a klinikai gyakorlatban ellensúlyozhatja ezt a különbséget. Az összetett pontrendszereknél egy másik figyelembe veendő szempont a diagnosztikai költségek növekedése, de ezt az új paraméter által biztosított klinikai előny fényében kell értékelni.

Végül megvizsgáltuk, hogy a sTREM-1 képes-e információval szolgálni a cirrózishoz kapcsolódó fertőzések kimenetelével kapcsolatban. A BF-ben szenvedő betegeknél az emelkedett sTREM-1 szint szignifikáns összefüggést mutatott a magasabb 90 napos mortalitással mind a Kaplan-Meier, mind az egyváltozós Cox regressziós elemzések során. Többváltozós modellben a magas sTREM-1 koncentráció az ACLF fokozat mellett a BF-es betegek 90 napos mortalitásának független kockázati tényezője maradt. Kiemelendő, hogy az ln(sTREM-1), kohorszunkban, a MELD és a CLIF-AD pontrendszereknél is jobb prediktív teljesítményt mutatott. Korábbi tanulmányok, a prokalcitonint és az sCD163-at is a rövidtávú mortalitás rizikófaktorának találták BF-ben szenvedő cirrózisos betegeknél, míg a preszepszin szint nem nyújtott kellően megbízható információt a várható halálózásról [41,50,51]. A HR értékek és még inkább a Kaplan-Meier-elemzések alapján azonban úgy tűnik, hogy a sTREM-1 rendelkezik a legerősebb prediktív értékkel ezen markerek közül: ha a BF-ben szenvedő betegek szérum sTREM-1 koncentrációja felvételkor 660 pg/mL alatt volt, 80%-uk a kritikus 90 nap elteltével is még életben volt, míg, ha a sTREM-1 meghaladta ezt a határértéket, ez az arány mindössze 25% volt. Ezek az értékek az sCD163 esetében körülbelül 85% és 50% voltak, 7000 ng/mL határérték alkalmazásakor [50].

Fontos hangsúlyozni, hogy a sTREM-1 értékek összefüggést mutattak a szervkárosodás (AKI) és -elégtelenség (ACLF) jelenlétével is, amelyek a cirrózisos betegeknél a BF gyakori szövődményei [4,153]. Tekintettel arra, hogy a sTREM-1 egy 15 kDa-os molekula [85,86], a vesekárosodás közvetlenül is hozzájárulhat a marker szintjének emelkedéséhez, mivel csökken a sTREM-1 vesén keresztül történő kiválasztása. Ezért az AKI-ban szenvedő betegeknél, a BF sTREM-1-re alapozott diagnózisa nagyobb körültekintést igényelhet. Az AKI azonban elsősorban az álpozitívak arányát lenne képes megnövelni, túlbecsülve a BF-sel rendelkező betegek számát, ami klinikailag egy elfogadhatóbb scenárió, mint az ellenkezője. Érdekes módon, ezt a hatást nem figyeltük meg saját kohorszunkban, mivel BF nélkül nem volt szignifikáns különbség

a cirrózisos betegek sTREM-1 koncentrációjában AKI hiánya vagy jelenléte esetén (bár az utóbbi csoportba csak 5 egyén tartozott). Ezen túlmenően a cirrózisos betegeknél az AKI kialakulásának oka leggyakrabban maga a BF, ezért elképzelhető, hogy a vesefunkció károsodása amúgy sem emelné meg szignifikánsan a BF szempontjából álpozitív esetek számát. Hasonlóképpen, mivel a vesekárosodás maga is a halálozás egyik jól ismert kockázati tényezője, úgy gondoljuk, hogy az AKI jelenléte nem teszi a magas sTREM-1 szintet alkalmatlanná a 90 napos mortalitás előrejelzésére sem. Ezt támasztja alá az is, hogy a magas sTREM-1 koncentráció képes volt a 90 napos mortalitás előrejelzésére az ACLF-től függetlenül, amelyben a veseelégtelenséget találták a halálozás szempontjából a legfontosabb tényezőnek [4,153]. Ezen kérdésekre azonban csak egy, a sTREM-1-et specifikusan AKI-ban szenvedő cirrózisos betegek körében vizsgáló tanulmány tudna pontos választ adni.

A sTREM-1 diagnosztikus határértékei széles skálát ölelnek fel a különböző tanulmányokban [154]. Jelen vizsgálatunk során, a BF-ek diagnosztizálásához cirrózisos betegekben 429, valamint 642 pg/mL volt a molekula legjobb diszkriminatív értéke. Bár a legtöbb publikációban a meghatározott küszöbértékek alacsonyabbak voltak ennél, ennek hátterében számos tényező állhat. Fontos hangsúlyozni, hogy tanulmányunkban ambuláns cirrózisban szenvedő betegek szolgáltak kontrollként, és nem egészséges egyének. Mivel a sTREM-1 koncentráció a májbetegség súlyosságával párhuzamosan növekszik, ez a diszkriminatív küszöböt magasabb értékek felé tolhatja. Ezenkívül a szérumsTREM-1 mérése gondos mintakezelést igényel, mivel egyes beszámolók szerint a molekula érzékeny lehet az ismételt fagyasztás-olvasztás ciklusokra [155]. Ezért mi ezt a markert, a minták első alkalommal felolvasztott alikvotjaiból mértük, hogy elkerüljük annak esetleges lebomlását. Végül, a kereskedelmi forgalomban kapható különböző tesztek használata is eltérő sTREM-1 koncentrációt eredményezhet a vizsgált mintákban.

A jelen vizsgálat egyik korlátja vitathatatlanul az, hogy a szérumsTREM-1 koncentrációját csak a bevételekor mértük, és így a betegség lefolyás során nem tudtuk a molekula szintjének dinamikus változását értékelni. Eredményeink általános alkalmazhatóságának igazolására validációs tanulmányokra lesz szükség. Ezek miatt a sTREM-1 koncentráció további klinikai vizsgálata indokolt, ideértve az időbeni változások

értékelését és azok lehetséges összefüggésének vizsgálatát a fertőzés során bekövetkező különböző kimenetekkel.

Jelen tanulmány alapján azonban, a sTREM-1 ígéretes biomarkernek tűnik a cirrózisban szenvedő betegek BF-einek diagnosztizálásában. Megállapítottuk, hogy ezen klinikai körülmények között, a sTREM-1 megbízhatósága a CRP-éhez hasonló. Ezeknek a markereknek az ascites jelenlétét is figyelembe vevő kombinációja azonban lényegesen pontosabb eszközt biztosít a BF-ek diagnózisára cirrózisban. Továbbá azt is bebizonyítottuk, hogy ezeknél a betegeknél a magas sTREM-1 szint a fertőzéssel összefüggő rövid távú halálozás független előrejelzője.

### 6.3. AZ ANTI-GP2 IgA AUTOANTITESTEK A PROGRESSZÍV BETEGSÉG LEFOLYÁS SPECIFIKUS PROGNOZTIKAI MARKEREI PSC-BEN, ÉS BIZONYÍTÉKKÉNT SZOLGÁLNAK A BÉL-MÁJ INTERAKCIÓK JELENTŐSÉGÉRE

A GP2-specifikus autoantitestek megjelenése a GP2 molekulával szembeni tolerancia megszűnését jelzi. A fehérje kulcsfontosságú szerepet tölt be a bélnyálkahártya immunválaszának kialakításában a FimH-pozitív baktériumokkal szemben [105].

Munkacsoportunk előzetesen már megfigyelte a PSC gyakori előfordulását az anti-GP2-pozitív CD-s betegekben [132], valamint mások mellett [156] beszámoltunk arról is, hogy az anti-GP2 antitestek összefüggést mutatnak a progresszív betegség lefolyás különböző aspektusaival CD-ben szenvedő páciensekben. Érdekes módon, a munkacsoportunk által végzett nagyetszámú prospektív tanulmányban csak az IgA izotípusú antitestek álltak kapcsolatban a szövődmények kialakulásával, az IgG izotípusúak nem [132]. Ezért egy prospektíven követett PSC-s betegcsoportban is célul tűztük ki az anti-GP2 antitestek jelenlétének és klinikai fontosságának vizsgálatát különös tekintettel a különböző immunglobulin izotípusokra.

Egy német kutatócsoporttal egyidőben [157,158] demonstráltuk az IgA típusú anti-GP2 antitestek fokozott képződést PSC-ben. Mindketten ugyanazt a sejt alapú IIF tesztet alkalmaztuk azonos határértékkel. Ahogy korábban már bemutatásra került, az IIF teszt PSC-s betegekben alkalmasabb módszer az anti-GP2 IgA detektálására, mint az ELISA [132], ugyanis ez a típusú IIF teszt érzékeli egy speciális IgA jelenlétét is, mely a HEK239

sejtek felszínén a glycosylphosphatidylinositol-hoz horgonyzott GP2-t ismeri fel [108]. Az említett struktúra egy speciális GP2 epitóp kialakulásához vezet, ami valószínűleg nincsen jelen az ELISA lemez felszínén immobilizált GP2 molekulákon.

Összevetve a saját eredményeinket a Jendrek és munkatársai által publikáltakkal [159], néhány különbséget is fellelhetünk. Az általunk vizsgált PSC-s beteg populációnkban az anti-GP2 IgA alacsonyabb előfordulási arányt mutatott (30,8% vs. 48,7%), mely nagy valószínűséggel a vizsgált betegcsoportok összetételében lévő különbségekkel magyarázható. Először is, a Jendrek féle populációba bevont betegek, az MRS átlagok alapján, súlyosabb állapotúak voltak. Másodszor, a CCA előfordulása náluk 12,3% volt, míg a mi betegeink közül senkinek sem volt CCA-ja a bevéasztáskor. Harmadszor, az ő tanulmányukban az anti-GP2 IgA antitestek a májbetegek közül nem csak a PSC-s páciensekben voltak jelen, hanem a nagy epeutakat érintő kórképekben is, függetlenül azok malignus vagy benignus jellegétől, ahogy az a beteg-kontroll csoportjuk adatai alapján látszik. Végül, tanulmányunkban mi egy kiterjedt, különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedő kohorszt használtunk beteg-kontrollként ellentétben Jendrek és kollégái munkájával. Sem a kis epeutakat érintő betegségben (PBC) szenvedő páciensekben, sem az alkoholos májcirrózisos betegekben nem detektáltunk emelkedett anti-GP2 antitest előfordulást. Ezen utóbbi eredmény különösen érdekes mivel cirrózisban - a PSC-hez nagyon hasonlóan - a különböző specifikus antitestek, mint az ASCA vagy az ANCA, gyakoribb előfordulását tapasztaltuk, (38,5% és 52,2%), elsősorban az IgA izotípusból [114,160].

A bevéasztáskor jelenlévő anti-GP2 IgA pozitivitás összefüggést mutatott a súlyosabb betegség forma kialakulásával és a gyorsabb betegségprogresszióval, a betegség súlyosságát jelző faktorokra való korrigálás után is. Tanulmányunkban, a máj-specifikus halálozás, illetve az OLTx azonos végkimenetelt jelentett, mivel mindkettő a progresszív fibrózis eredményeként kialakuló végstádiumú májbetegség kifejlődésére utalt. Jendrek és munkatársai által publikált közleményben az IgA izotípusú anti-GP2 pozitivitás szintén a betegek egy rosszabb prognózisú csoportját azonosította. Megjegyzendő azonban, hogy az ő esetükben a magasabb halálozási arány a CCA jelenlétével volt összefüggésben, nem pedig a végstádiumú májbetegség kialakulásával. A mi kohorszunkban csupán egy páciensben (1,5%) fejlődött ki CCA a betegek követése

során, így az anti-GP2 IgA szerepének felmérése az epeúti rák kialakulásában nem volt lehetséges. Ez a CCA arány alacsonyabb, mint a más tanulmányokban közölt 8,0-13,2%, [161,162] de nagyságrendileg megegyezik az Izraelből (2,1%) és Hollandiából (3,6%) hasonló követési idő után, nemrégiben publikált adatokkal [101,163]. Az a korábbi megfigyelés, miszerint az anti-GP2 IgA gyakori sztenotizáló betegségben is szenvedő CD páciensek esetén [132,156,164], klinikai bizonyítékként támogathatja az anti-GP2 IgA és a fibrózis kapcsolatára vonatkozó elképzeléseket PSC-ben. Ezt az elgondolást egy további közlemény eredményei is megerősítik, melyben a GP2 fehérje 1-es és 4-es izoformája elleni IgA autoantitestek jelenlétét PSC-ben a társuló cirrózis és a súlyosabb betegség fenotípus rizikótényezőjeként azonosították [165]. Továbbá, egy nemrégiben elfogadott tanulmány szerint [166], az 1-es izoformára specifikus antitestek a rövidebb transzplantációmentes túlélés, míg a 4-es izoformát felismerő antitestek a CCA kialakulásának független rizikótényezői voltak két egymástól független betegpopulációban. Mindezek már elégséges bizonyítékul szolgálnak az anti-GP2 IgA antitestek klinikai gyakorlatba való integrációjának hasznosságáról, ami egy hosszú ideje fennálló és megoldatlan klinikai problémára kínál első alkalommal megoldást [167].

A klinikai alkalmazhatóságon kívül, a kórkép kialakulásában szerepet játszó patológias folyamatokkal kapcsolatos kérdésekre is válaszokat kerestünk. Hogy megvizsgáljuk a lehetséges kapcsolatot a nyálkahártya-immunitás és a PSC súlyos formájának kialakulása között, meghatároztuk a betegek szérumban mérhető össz-sIgA szinteket. Munkánk egy fontos új felismerése, hogy PSC-ben háromszor magasabb a totál sIgA mennyisége, mint az egészséges kontrollokban. Ez az eredmény az sIgA antitestek fokozott retrográd transzportjára utal PSC-ben, a bél mukózális felszíne irányából a keringés felé. Ezen felül még kétszeres sIgA-szint emelkedést találtunk az anti-GP2 IgA-pozitív esetekben. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a fokozott retrográd transzport szerepet játszhat a betegség kialakulásában, valamint az IgA izotípusú anti-GP2 antitest megjelenésével összefüggő súlyosabb lefolyásban.

Az áramlási citometriás analízis során a PSC-s betegek 68,4%-ában volt kimutatható az SC jelenléte az anti-GP2 antitesteken, ugyanakkor az IgA2 izotípusú anti-GP2 aránya nem növekedett az egészséges populációban még normálisnak tekintett 10% felé. Ennek oka lehet, a GP2 antigén protein természete, ugyanis egy korábbi tanulmány

szerint a fehérjeantigének sokkal gyengébb induktorai az IgA2 termelésnek a poliszacharidoknál [168]. Az SC ilyen nagy arányú előfordulása viszont erősen arra utal, hogy a bélbe való szekréció után az anti-GP2 antitestek felvételre kerülnek a mukózális epitheliumon keresztül. Azonban az sIgA molekulák jellemzően antigénjükhöz kötött állapotban vannak jelen a béllumenben, ezért visszavételük során az anti-GP2 autoantitestek GP2-vel borított FimH-pozitív baktériumokat juttathatnak be a nyálkahártyába [169]. Ez a folyamat hozzájárulhat a bélmukóza mikrobiális túltelítődéséhez, és fenntartja az antigének indukálta immunválaszt. A bélnyálkahártya gyulladása a biliáris rendszerre is kiterjedhet a gyulladt bélben aktiválódott memória T-limfociták közvetítésével, melyek az aberránsan expresszált adhéziós molekuláik segítségével az epeutakba is bevándorolhatnak [170]. Érdekes módon, a FimH-t nemrégiben a TLR-4 ligandjaként azonosították [171]. A hosszantartó TLR-4 aktiváció, a transzformáló növekedésifaktor- $\beta$  közvetítésével fokozhatja a fibrotikus folyamatokat [172], a FimH által indukált I-es típusú interferon termelés, pedig összefüggésben áll az autoimmun reakciók felerősödésével [173]. Elképzelhető, hogy ez a folyamat áll a bélben bekövetkező GP2 elleni tolerancia elvesztése és a májban kialakuló fibrózis fokozódása, valamint a betegségprogresszió kapcsolatának hátterében. A GP2 és a FimH molekula interakciója és szerepe, azonban még mindenképpen további kutatásokat igényel a PSC patogenezisében, különös tekintettel arra, hogy ez a mechanizmus terápiás szempontból is rendkívüli jelentőséggel bírhat. Már fejlesztés alatt áll a rekombináns FimH adhéziós fehérjeje elleni vakcina a visszatérő húgyúti infekciók kezelésére [174], ugyanis a GP2 és a húgyutakban található uromodulin (Tamm-Horsfall protein) szerkezete és funkciója nagyon hasonlít egymáshoz [174]. Ráadásul a mannóz-vezérelt FimH antagonisták is ígéretes jelöltnek tűnnek az UTI és Crohn-betegség terápiájában [175–177].

Összefoglalásként, az IgA izotípusú anti-GP2 antitest előfordulása korrelál a PSC lefolyásának súlyosságával, azonban nem mutat hasonló kapcsolatot más krónikus májbetegségekben, mint például a kis epeúti érintettségű kolesztatikus májbetegség. Ezért a jelen prospektív tanulmány eredményei arra utalnak, hogy az anti-GP2 IgA egy hasznos szerológiai eszköz lehet a PSC-s betegek állapot-súlyosságának felmérésében. Ezenkívül az IgA típusú anti-GP2 antitest jelenléte PSC-ben, további bizonyítékként szolgál a bél-máj interakciók fontosságára a betegség lefolyásában.

Kutatásunk során tehát modern laboratóriumi és statisztikai megközelítéseket alkalmazva a krónikus májbetegségek menedzselése szempontjából 3 ígéretes markert azonosítottunk, illetve karakterizáltunk, miközben a háttérfolyamatok egyes mechanizmusait is feltártuk. Ezen markerek diagnosztikus, valamint rövid és hosszútávú prognosztikai potenciállal bírnak, és bár további kutatást igényelnek, a jövőben segíthetik a klinikusok terápia választását, hogy ezen betegek az elérhető legmegfelelőbb kezelésben részesülhessenek.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

**Háttér:** A krónikus májbetegségben szenvedő betegekben az immun reguláció különböző zavarai figyelhetők meg. Ezek fokozott bakteriális transzlokációhoz, a bakteriális fertőzésekkel (BF) szembeni fokozott esendőséghez, valamint autoimmun folyamatok kialakulásához vezethetnek. Mindezek gyorsítják a betegség progresszióját, specifikus komplikációk kialakulását és a halálozás növekedését eredményezhetik. Ezeknek a folyamatoknak az időben történő felismeréséhez, illetve előrejelzéséhez, olyan diagnosztikus és prognosztikus eszközökre – biomarkerekre – van szükség, melyek hozzájárulnak a betegség által elént állított diagnosztikus és terápiás problémák megoldásához.

**Módszerek:** Kutatásunk során immuno-esszék segítségével, 3 betegcsoportban, 3 molekula szérumszintjét határoztuk meg: ferritin – 244 cirrózisos járóbeteg; sTREM-1 – 269 cirrózisos beteg (172 ambuláns, 97 akutan dekompenzált (AD) beteg – 56 BF-sel); anti-GP2 autoantitest – 65 PSC-s beteg, valamint kontrollok. Követéses vizsgálatok során meghatároztuk a markerek diagnosztikus, valamint rövid és hosszútávú előrejelző értékét a BF, valamint a különböző kedvezőtlen kimenetek tekintetében.

**Eredmények:** Multivariáns modelljeinkben: (1) 2 éves követés alatt az alacsonyabb (<40 µg/L) ferritinkoncentrációt, a dekompenzált klinikai stádium kialakulását előrejelző független kockázati tényezőnek találtuk korábban kompenzált cirrózisban szenvedő betegekénél (sHR: 3,762; p=0,002); (2) míg a dekompenzált cirrózisos járóbeteg BF-einek kialakulása (sHR: 2,335, p=0,013) és a teljes populáció mortalitása (HR: 2,143; p=0,013) a magasabb (>310 µg/L) keringő ferritinszinttel mutatott összefüggést; (3) a magas sTREM-1 szint (>660 pg/mL) a 90 napos halálozás független előrejelzőjének bizonyult BF-ben szenvedő AD-s betegekben (HR: 2,941; p=0,048). A sTREM-1 hatékonysága az AD-s betegek BF-ének azonosításában (AUROC: 0,804; p<0,0001) hasonló volt a CRP-éhez. E két molekula, és az aszcitesz jelenlétének kombinációja egy összetett pontszámmá, szignifikánsan növelte diszkriminatív képességüket (AUROC: 0,878, p<0,0001). (4) Az anti-GP2 IgA jelenléte a Mayo kockázati pontszámra való korrigálás után is, a 10 éves követés során, a PSC-s betegek rövidebb transzplantációmentes túlélésének független predikciós tényezője maradt (HR: 4,69; p=0,043).

**Következtetés:** Mind három vizsgált marker értékes információt szolgáltat a májbetegség állapotáról/lefolyásáról, mely segítheti a döntéshozatalt a mindennapi klinikai munkában, illetve hozzájárul a háttérben húzódó patológiai mechanizmusok megértéséhez.

## 8. SUMMARY

**Background:** Various disorders of immune regulation are observed in patients with chronic liver diseases. These can lead to increased bacterial translocation, susceptibility to bacterial infections (BI), and development of autoimmune processes. These changes can accelerate disease progression, lead to specific complications, and increased mortality. In order to recognize and predict these events in time, such diagnostic and prognostic tools - biomarkers - are needed that can help us overcoming the diagnostic and therapeutic problems set by the diseases.

**Methods:** In our study, serum concentrations of 3 molecules were determined by immunoassays in 3 patient groups: ferritin – 244 outpatients with cirrhosis; sTREM-1 – 269 cirrhotic patients (172 outpatients, 97 acutely decompensated (AD) patients – 56 with BI); anti-GP2 autoantibody – 65 patients with PSC and controls. In follow-up studies, we determined the diagnostic as well as short- and long-term prognostic values of these markers for BI and various adverse outcomes.

**Results:** In our multivariate models: (1) lower ( $<40$   $\mu\text{g/L}$ ) ferritin concentration was found to be an independent risk factor of decompensated clinical stage development in patients with previously compensated cirrhosis (sHR: 3.762,  $p=0.002$ ); (2) while higher ( $>310$   $\mu\text{g/L}$ ) circulating ferritin levels were associated with the development of BIs in decompensated cirrhotic outpatients (sHR: 2.335,  $p=0.013$ ) and mortality in the entire population (HR: 2.143,  $p=0.013$ ) within a 2-year follow-up period; (3) high sTREM-1 levels ( $>660$   $\text{pg/mL}$ ) proved to be an independent predictor of 90-day mortality in AD patients with BI [HR: 2.941,  $p=0.048$ ]. The efficacy of sTREM-1 in identifying BI in AD patients (AUROC: 0.804,  $p<0.0001$ ) was similar to CRP. The combination of these two molecules and the presence of ascites into a composite score significantly increased their discriminative power (AUROC: 0.878,  $p<0.0001$ ). (4) The presence of anti-GP2 IgA was an independent predictor of shorter transplant-free survival in patients with PSC even after correction for Mayo risk score at 10-year follow-up (HR: 4.69,  $p=0.043$ ).

**Conclusion:** All three markers examined here provide valuable information about the state/course of liver disease, which can help decision-making in everyday clinical work and contribute to the understanding of the underlying pathological mechanisms.

## 9. TÁRGYSZAVAK

Cirrózis,  
Primer szklerotizáló kolangitisz (PSC),  
Immun diszfunkció,  
Akut dekompenzáció,  
Bakteriális fertőzés,  
Halálozás,  
Biomarker,  
szolúbilis, myeloid sejteken expresszált  
trigger receptor-1 (sTREM-1),  
Ferritin,  
Glikoprotein 2 (GP2),  
Immunglobulin A (IgA),  
Kombinált pontrendszer

Cirrhosis,  
Primer sclerosing cholangitis (PSC),  
Immune dysfunction,  
Acute decompensation,  
Bacterial infection,  
Mortality,  
Biomarker,  
soluble Triggering Receptor Expressed  
on Myeloid Cells-1 (sTREM-1),  
Ferritin,  
Glycoprotein 2 (GP2),  
Immunglobulin A (IgA),  
Composite score

## 10. HIVATKOZÁSOK

- [1] Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *Journal of Hepatology* 2014;61:1385–1396.
- [2] Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* 2014;20:2564–2577.
- [3] Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, et al. Bacterial infections in cirrhosis: A position statement based on the EASL Special Conference 2013. *Journal of Hepatology* 2014;60:1310-1324.
- [4] Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013;144:1426–1437.
- [5] Fernández J, Acevedo J, Wiest R, Gustot T, Amoros A, Deulofeu C, et al. Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: Prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut* 2017;67:1870–1880.
- [6] Mücke MM, Rummyantseva T, Mücke VT, Schwarzkopf K, Joshi S, Kempf VAJ, et al. Bacterial infection-triggered acute-on-chronic liver failure is associated with increased mortality. *Liver International* 2018;38:645–653.
- [7] Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, et al. Sepsis in cirrhosis: Report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut*; 2005;54:718-725.
- [8] Pieri G, Agarwal B, Burroughs AK. C-reactive protein and bacterial infection in cirrhosis. *Annals of Gastroenterology* 2014;27:113–120.
- [9] Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systemic inflammatory response syndrome in cirrhotic patients: Relationship with their in-hospital outcome. *Journal of Hepatology* 2009;51:475–482.
- [10] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644–55.
- [11] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340:448-454.
- [12] Eksteen B. The Gut-Liver Axis in Primary Sclerosing Cholangitis. *Clinics in Liver Disease* 2016;20:1–14.

- [13] O'Hara SP, Karlsen TH, Larusso NF. Cholangiocytes and the environment in primary sclerosing cholangitis: Where is the link? *Gut* 2017;66:1873–1877.
- [14] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology* 2019;70:151–171.
- [15] Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology* 2013;58:593–608.
- [16] Zatoński WA, Sulkowska U, Mańczuk M, Rehm J, Boffetta P, Lowenfels AB, et al. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. *European Addiction Research* 2010;16:193–201.
- [17] Központi Statisztikai Hivatal. Halálozások a gyakoribb halálokok szerint (1990–) [Internet] at <[http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_wnh001.html](http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html)>
- [18] WHO | Global Status Report on Alcohol and Health 2014. WHO 2016.
- [19] Mackenbach JP, Kulhánová I, Bopp M, Borrell C, Deboosere P, Kovács K, et al. Inequalities in Alcohol-Related Mortality in 17 European Countries: A Retrospective Analysis of Mortality Registers. *PLoS Medicine* 2015;12: e1001909.
- [20] Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus J v., Webber L, et al. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *Journal of Hepatology* 2018;69:718–735.
- [21] Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis - Fact or fantasy? *Hepatology* 2006;43(Suppl 1):S82-8.
- [22] Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, Varaut A, Varsat B, Ngo Y, et al. Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterology* 2010;10:40.
- [23] D'Amico G, Morabito A, D'Amico M, Pasta L, Malizia G, Rebora P, et al. Clinical states of cirrhosis and competing risks. *Journal of Hepatology* 2018;68:563–576.
- [24] Shi Y, Yang Y, Hu Y, Wu W, Yang Q, Zheng M, et al. Acute-on-Chronic Liver Failure Precipitated by Hepatic Injury is Distinct From That Precipitated By Extrahepatic Insults. *Hepatology* 2015;62:232–42.
- [25] Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246–1256, 1256.e1-5.

- [26] Vitalis Z, Papp M. Bacterial Infections in Cirrhosis. In: Blackwell RM, Tyson AP, editors. *Cirrhosis: Causes, Treatment Options and Potential Complications*, New York: Nova Science Publishers Inc.; 2013, p. 1–26.
- [27] Clària J, Arroyo V, Moreau R. The Acute-on-Chronic Liver Failure Syndrome, or When the Innate Immune System Goes Astray. *The Journal of Immunology* 2016;197:3755–3761.
- [28] Bernsmeier C, Triantafyllou E, Brenig R, Lebosse FJ, Singanayagam A, Patel VC, et al. CD14+ CD15- HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells impair antimicrobial responses in patients with acute-on-chronic liver failure. *Gut* 2018;67:1155–1167.
- [29] Moreau R. The Pathogenesis of ACLF: The Inflammatory Response and Immune Function. *Seminars in Liver Disease* 2016;36:133–140.
- [30] Homann C, Varming K, Høgåsen K, Mollnes TE, Graudal N, Thomsen AC, et al. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. *Gut* 1997;40:544–549.
- [31] Gao B, Jeong W il, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008;47:729–736.
- [32] Manifold IH, Triger DR, Underwood JCE. Kupffer-cell depletion in chronic liver disease: implications for hepatic carcinogenesis. *The Lancet* 1983;322:431–433.
- [33] Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial System Phagocytic Activity in Cirrhosis and Its Relation to Bacterial Infections and Prognosis. *Hepatology* 1984;4:53–58.
- [34] Francés R, Benlloch S, Zapater P, González JM, Lozano B, Muñoz C, et al. A Sequential Study of Serum Bacterial DNA in Patients with Advanced Cirrhosis and Ascites. *Hepatology* 2004;39:484–491.
- [35] Francés R, Muñoz C, Zapater P, Uceda F, Gascón I, Pascual S, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004;53:860–864.
- [36] Tornai T, Papp M. A bél működésének változása és annak jelentősége májcirrhosisban. *Magyar Belrov Arch* 2017;70:198–207.
- [37] Thulstrup AM, Sørensen HT, Schønheyder HC, Møller JK, Tage-Jensen U. Population-based study of the risk and short-term prognosis for bacteremia in patients with liver cirrhosis. *Clinical Infectious Diseases* 2000;31:1357–1361.

- [38] Kusaba N, Kumashiro R, Ogata H, Sata M, Tanikawa K. In Vitro Study of Neutrophil Apoptosis in Liver Cirrhosis. *Internal Medicine* 1998;37:11–17.
- [39] Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang KM, Vonderheide RH, et al. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-Positive B-cell population. *Hepatology* 2012;55:709–19.
- [40] Cirera I, Martin Bauer T, Miguel N, Vila J, Grande L, Taurá P, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2001;34:32–37.
- [41] Papp M, Vitalis Z, Altorjay I, Tornai I, Udvardy M, Harsfalvi J, et al. Acute phase proteins in the diagnosis and prediction of cirrhosis associated bacterial infections. *Liver International* 2012;32:603–611.
- [42] Park WB, Lee KD, Lee CS, Jang HC, Kim H bin, Lee HS, et al. Production of C-reactive protein in Escherichia coli-infected patients with liver dysfunction due to liver cirrhosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2005;51:227–230.
- [43] Angeli P, Tonon M, Pilutti C, Morando F, Piano S. Sepsis-induced acute kidney injury in patients with cirrhosis. *Hepatology International* 2016;10:115–123.
- [44] Westhuyzen J, Healy H. Review: Biology and relevance of C-reactive protein in cardiovascular and renal disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2000;30:133–143.
- [45] Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. 1993;91:1351–1357.
- [46] Lu XL, Xiao ZH, Yang MY, Zhu YM. Diagnostic value of serum procalcitonin in patients with chronic renal insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2013;28:122–129.
- [47] Lee WS, Kang DW, Back JH, Kim HL, Chung JH, Shin BC. Cutoff value of serum procalcitonin as a diagnostic biomarker of infection in end-stage renal disease patients. *Korean Journal of Internal Medicine* 2015;30:198–204.
- [48] El-sayed D, Grotts J, Golgert WA, Sugar AM. Sensitivity and specificity of procalcitonin in predicting bacterial infections in patients with renal impairment. *Open Forum Infectious Diseases* 2014;1:ofu068.

- [49] Caldini A, Chelazzi C, Terreni A, Biagioli T, Giannoni C, Villa G, et al. Is procalcitonin a reliable marker of sepsis in critically ill septic patients undergoing continuous veno-venous hemodiafiltration with “high cut-off” membranes (HCO-CVVHDF)? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2013;51:e261-3.
- [50] Tornai T, Vitalis Z, Sipeki N, Dinya T, Tornai D, Antal-Szalmas P, et al. Macrophage activation marker, soluble CD163, is an independent predictor of short-term mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection. *Liver International* 2016;36:1628-1638.
- [51] Papp M, Tornai T, Vitalis Z, Tornai I, Tornai D, Dinya T, et al. Presepsin teardown - Pitfalls of biomarkers in the diagnosis and prognosis of bacterial infection in cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* 2016;22:9172–9185.
- [52] Chiou B, Connor JR. Emerging and Dynamic Biomedical Uses of Ferritin. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 2018;11:124.
- [53] Leimberg MJ, Prus E, Konijn AM, Fibach E. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008;103:1211–8.
- [54] Kidane TZ, Sauble E, Linder MC. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2006;291:C445-455.
- [55] Santambrogio P, Cozzi A, Levi S, Arosio P. Human serum ferritin G-peptide is recognized by anti-L ferritin subunit antibodies and concanavalin-A. *British Journal of Haematology* 1987;65:235–237.
- [56] Adams PC, Chau LA. Uptake of ferritin by isolated rat hepatocytes. Effect of metabolic inhibitors and iron. *Clinical and Investigative Medicine Medecine Clinique et Experimentale* 1993;16:15–21.
- [57] Sakamoto S, Kawabata H, Masuda T, Uchiyama T, Mizumoto C, Ohmori K, et al. H-Ferritin Is Preferentially Incorporated by Human Erythroid Cells through Transferrin Receptor 1 in a Threshold-Dependent Manner. *PloS One* 2015;10:e0139915.
- [58] Torti S v, Torti FM. Human H-kininogen is a ferritin-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 1998;273:13630–13635.
- [59] Gkamprela E, Deutsch M, Pectasides D. Iron deficiency anemia in chronic liver disease: etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *Annals of Gastroenterology* 2017;30:405–413.

- [60] Weis S, Carlos AR, Moita MR, Singh S, Blankenhaus B, Cardoso S, et al. Metabolic Adaptation Establishes Disease Tolerance to Sepsis. *Cell* 2017;169:1263-1275.e14.
- [61] Guyader D, Thirouard A-S, Erdtmann L, Rakba N, Jacquelinet S, Danielou H, et al. Liver iron is a surrogate marker of severe fibrosis in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2007;46:587–595.
- [62] Adams PC. Iron overload in viral and alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology* 1998;28 Suppl 1:19–20.
- [63] Eng SC, Taylor SL, Reyes V, Raaka S, Berger J, Kowdley K v. Hepatic iron overload in alcoholic end-stage liver disease is associated with iron deposition in other organs in the absence of HFE-1 hemochromatosis. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 2005;25:513–517.
- [64] Cotler SJ, Bronner MP, Press RD, Carlson TH, Perkins JD, Emond MJ, et al. End-stage liver disease without hemochromatosis associated with elevated hepatic iron index. *Journal of Hepatology* 1998;29:257–262.
- [65] Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:7811–279.
- [66] Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *Journal of Hepatology* 2011;54:173–181.
- [67] Pietrangelo A. Mechanism of iron toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2002;509:19–43.
- [68] Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. *The American Journal of Gastroenterology* 2004;99:286–291.
- [69] Zanninelli G, Loréal O, Brissot P, Konijn AM, Slotki IN, Hider RC, et al. The labile iron pool of hepatocytes in chronic and acute iron overload and chelator-induced iron deprivation. *Journal of Hepatology* 2002;36:39–46.
- [70] Kamei A, Watanabe Y, Ishijima T, Uehara M, Arai S, Kato H, et al. Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiological Genomics* 2010;42:149–156.

- [71] Stein J, Connor S, Virgin G, Ong DEH, Pereyra L. Anemia and iron deficiency in gastrointestinal and liver conditions. *World Journal of Gastroenterology* 2016;22:7908–7925.
- [72] Maiwall R, Kumar S, Chaudhary AK, Maras J, Wani Z, Kumar C, et al. Serum ferritin predicts early mortality in patients with decompensated cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2014;61:43–50.
- [73] Oikonomou T, Goulis I, Soulaïdopoulos S, Karasmani A, Doum̄tsis P, Tsioni K, et al. High serum ferritin is associated with worse outcome of patients with decompensated cirrhosis. *Annals of Gastroenterology* 2017;30:217–224.
- [74] Maras JS, Maiwall R, Harsha HC, Das S, Hussain MS, Kumar C, et al. Dysregulated iron homeostasis is strongly associated with multiorgan failure and early mortality in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2015;61:1306–1320.
- [75] Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunology Letters* 2008;116:111–116.
- [76] Arts RJW, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 2013;93:209–215.
- [77] Bukong, T. N., Iracheta-Vellve, A., Saha, B., Ambade, A., Satishchandran, A., Gyongyosi, B., Lowe, P., Catalano, D., Kodys, K., & Szabo G. Inhibition of spleen tyrosine kinase activation ameliorates inflammation, cell death, and steatosis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2016;64:1057–1071.
- [78] Tornai D, Furi I, Shen ZT, Sigalov AB, Coban S, Szabo G. Inhibition of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 Ameliorates Inflammation and Macrophage and Neutrophil Activation in Alcoholic Liver Disease in Mice. *Hepatology Communications* 2019;3:99–115.
- [79] Kurniawan DW, Jajoriya AK, Dhawan G, Mishra D, Argemi J, Bataller R, et al. Therapeutic inhibition of spleen tyrosine kinase in inflammatory macrophages using PLGA nanoparticles for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Controlled Release* 2018;288:227–238.
- [80] Torres-Hernandez A, Wang W, Nikiforov Y, Tejada K, Torres L, Kalabin A, et al. Targeting SYK signaling in myeloid cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2019;38:4512–4526.

- [81] Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001;410:1103–1107.
- [82] Zysset D, Weber B, Rihs S, Brasseit J, Freigang S, Riether C, et al. TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nature Communications* 2016;7:1–16.
- [83] Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C. TREM-1–expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 2007;117:3097–3106.
- [84] Wu J, Li J, Salcedo R, Mivechi NF, Trinchieri G HA. The Pro-inflammatory Myeloid Cell Receptor TREM-1 Controls Kupffer Cell Activation and Development of Hepatocellular Carcinoma Juan. *Cancer Res* 2012;72:3977–3986.
- [85] Baruah S, Keck K, Vrenios M, Pope MR, Pearl M, Doerschug K K-T. Identification of a novel splice variant isoform of TREM-1 in human neutrophil granules. *J Immunol* 2015;195:5725–5731.
- [86] Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Rodríguez-Rojas A, del Fresno C, García F, Vallejo-Cremades MT, et al. Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. *The Journal of Immunology* 2007;179:4065–4073.
- [87] Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Béné MC, Bollaert PE, Lozniewski A, Mory F, et al. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *Journal of Experimental Medicine* 2004;200:1419–1426.
- [88] Tejera A, Santolaria F, Diez ML, Alemán-Valls MR, González-Reimers E, Martínez-Riera A, et al. Prognosis of community acquired pneumonia (CAP): Value of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and other mediators of the inflammatory response. *Cytokine* 2007;38:117–123.
- [89] Charles PE, Noel R, Massin F, Guy J, Bollaert PE, Quenot JP, et al. Significance of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 elevation in patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *BMC Infectious Diseases* 2016;16:559.
- [90] Eaton JE, Talwalkar JA, Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology* 2013;145:521–536.

- [91] Trivedi PJ, Adams DH. Mucosal immunity in liver autoimmunity: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* 2013;46:97–111.
- [92] Liu JZ, Hov JR, Folseraas T, Ellinghaus E, Rushbrook SM, Doncheva NT, et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nature Genetics* 2013;45:670–675.
- [93] Müller T, Alberts R, de Vries EMG, Goode EC, Jiang X, Sampaziotis F, et al. Genetic association analysis identifies variants associated with disease progression in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2018;67:1517–1524.
- [94] Dutta AK, Khimji AK, Kresge C, Bugde A, Dougherty M, Esser V, et al. Identification and functional characterization of TMEM16A, a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel activated by extracellular nucleotides, in biliary epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:766–776.
- [95] Reich M, Deutschmann K, Sommerfeld A, Klindt C, Kluge S, Kubitz R, et al. TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro. *Gut* 2016;65:487–501.
- [96] Maroni L, van de Graaf SFJ, Hohenester SD, Oude Elferink RPJ, Beuers U. Fucosyltransferase 2: A Genetic Risk Factor for Primary Sclerosing Cholangitis and Crohn's Disease—A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 2015;48:182–191.
- [97] Pinzani M, Luong TV. Pathogenesis of biliary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 2018;1864:1279–1283.
- [98] Lindor KD, Kowdley K v, Harrison EM. ACG Clinical Guideline: Primary Sclerosing Cholangitis. *American Journal of Gastroenterology* 2015;110:646–659.
- [99] Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, Vesterhus M. Primary sclerosing cholangitis – a comprehensive review. *Journal of Hepatology* 2017;67:1298–1323.
- [100] Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. *The Lancet* 2018;391:2547–2559.
- [101] Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ, Rauws EA, Spanier BWM, Poen AC, et al. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2013;58:2045–2055.
- [102] Ohno H, Hase K. Glycoprotein 2 (GP2) grabbing the fimH<sup>+</sup> bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes* 2010;1:407–410.

- [103] Schierack P, Rödiger S, Kolenda R, Hiemann R, Berger E, Grzymajło K, et al. Species-specific and pathotype-specific binding of bacteria to zymogen granule membrane glycoprotein 2 (GP2). *Gut* 2015;64:517–519.
- [104] Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS, Hase K, et al. Comprehensive Gene Expression Profiling of Peyer’s Patch M Cells, Villous M-Like Cells, and Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 2008;180:7840–7846.
- [105] Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH + bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 2009;462:226–230.
- [106] Yu S, Lowe AW. The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds *Escherichia coli* type 1 Fimbriae. *BMC Gastroenterology* 2009;9:58.
- [107] Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, Reinhold D, Büttner T, Jungblut PR, et al. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn’s disease. *Gut* 2009;58:1620–1628.
- [108] Komorowski L, Teegen B, Probst C, Aulinger-Stöcker K, Sina C, Fellermann K, et al. Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn’s disease are directed against two antigens: The glycoproteins CUZD1 and GP2. *Journal of Crohn’s and Colitis* 2013;7:780–790.
- [109] Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stöcker K, et al. Autoimmunity to pancreatic juice in crohn’s disease results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1987;22:41–52.
- [110] Papp M, Lakatos PL. Serological studies in inflammatory bowel disease: How important are they? *Current Opinion in Gastroenterology* 2014;30:359–364.
- [111] Lakatos PL, Aitorjay I, Szamosi T, Palatka K, Vitalis Z, Tumpek J, et al. Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behavior, perianal disease, and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Inflammatory Bowel Diseases* 2009;15:365–374.
- [112] Husby S, Murray JA. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 2014;11:655–663.

- [113] Forcione DG, Rosen MJ, Kisiel JB, Sands BE. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut* 2004;53:1117–1122.
- [114] Papp M, Sipeki N, Vitalis Z, Tornai T, Altorjay I, Tornai I, et al. High prevalence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is associated with increased risk of bacterial infection in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2013;59:457–466.
- [115] Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Reviews Immunology* 2012;12:821–832.
- [116] Brandtzaeg P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2010;26:554–563.
- [117] Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology* 2011;4:603–611.
- [118] Woof JM, Ken MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology* 2006;208:270–282.
- [119] Carey E, Carey WD. Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete? *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2010;77:519–527.
- [120] Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *British Journal of Surgery* 1973;60:646–649.
- [121] Kamath PS, Kim WR. The Model for End-stage Liver Disease (MELD). *Hepatology* 2007;45:797–805.
- [122] Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, et al. The management of ascites in cirrhosis: Report on the consensus conference of The International Ascites Club. *Hepatology* 2003;38:258–266.
- [123] Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT, et al. Hepatic encephalopathy - Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002;35:716–721.
- [124] Grace ND, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Burroughs AK, Pagliaro L, Makuch RW, et al. Portal hypertension and variceal bleeding: An AASLD single topic symposium. *Hepatology* 1998;28:868–880.

- [125] Cadranel JF, Denis J, Pauwels A, Barbare JC, Eugène C, Martino V di, et al. Prevalence and risk factors of bacteriuria in cirrhotic patients: A prospective case-control multicenter study in 244 patients. *Journal of Hepatology* 1999;31:464–468.
- [126] Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, et al. Bacterial infections in cirrhosis: Epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35:140–148.
- [127] Ginès P, Angeli P, Lenz K, Møller S, Moore K, Moreau R, et al. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2010;53:397–417.
- [128] Mohan P, Ramu B, Bhaskar E, Venkataraman J, Pazhanivel M, Bhavadharani R, et al. Prevalence and risk factors for bacterial skin infection and mortality in cirrhosis. *Annals of Hepatology* 2011;10:15–20.
- [129] Jalan R, Pavesi M, Saliba F, Amorós A, Fernandez J, Holland-Fischer P, et al. The CLIF Consortium Acute Decompensation score (CLIF-C ADs) for prognosis of hospitalised cirrhotic patients without acute-on-chronic liver failure. *Journal of Hepatology* 2015;62:831–840.
- [130] Martins EB, Chapman RW. Sclerosing cholangitis. *Current Opinion in Gastroenterology* 2001;17:458–462.
- [131] Kim WR, Therneau TM, Wiesner RH, Poterucha JJ, Benson JT, Malinchoc M, et al. A Revised Natural History Model for Primary Sclerosing Cholangitis. *Mayo Clinic Proceedings* 2000;75:688–694.
- [132] Papp M, Sipeki N, Tornai T, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, et al. Rediscovery of the anti-pancreatic antibodies and evaluation of their prognostic value in a prospective clinical cohort of Crohn's patients: The importance of specific target antigens [GP2 and CUZD1]. *Journal of Crohn's and Colitis* 2015;9:659–668.
- [133] Kaplan MM, Gershwin ME. Primary Biliary Cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 2005;353:1261–1273.
- [134] Foy BH, Li A, McClung JP, Ranganath R, Higgins JM. Data-driven physiologic thresholds for iron deficiency associated with hematologic decline. *American Journal of Hematology* 2020;95:302–309.
- [135] Yu L-X, Ling Y, Wang H-Y. Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression. *NPJ Precision Oncology* 2018;2:6.
- [136] Refolo MG, Messa C, Guerra V, Carr BI, D'Alessandro R. Inflammatory Mechanisms of HCC Development. *Cancers* 2020;12:641.

- [137] Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* 2014;3:31–40.
- [138] Christina G Katsiari, Dimitrios P Bogdanos LIS. Inflammation and cardiovascular disease. *World J Transl Med* 2019;8:1–8.
- [139] Mihai S, Codrici E, Popescu ID, Enciu A-M, Albuiescu L, Necula LG, et al. Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome. *Journal of Immunology Research* 2018;2018:2180373.
- [140] Kobayashi M, Suhara T, Baba Y, Kawasaki NK, Higa JK, Matsui T. Pathological Roles of Iron in Cardiovascular Disease. *Current Drug Targets* 2018;19:1068–1076.
- [141] van Swelm RPL, Wetzels JFM, Swinkels DW. The multifaceted role of iron in renal health and disease. *Nature Reviews Nephrology* 2020;16:77–98.
- [142] Fan Y, Zhang J, Cai L, Wang S, Liu C, Zhang Y, et al. The effect of anti-inflammatory properties of ferritin light chain on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in murine macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014;1843:2775–2783.
- [143] Broxmeyer HE, Cooper S, Levi S, Arosio P. Mutated recombinant human heavy-chain ferritins and myelosuppression in vitro and in vivo: a link between ferritin ferroxidase activity and biological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:770–774.
- [144] Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Seminars in Liver Disease* 2008;28:26–42.
- [145] Thalheimer U, Triantes CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005;54:556–563.
- [146] Jolly L, Carrasco K, Derive M, Lemarié J, Boufenzer A, Gibot S. Targeted endothelial gene deletion of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 protects mice during septic shock. *Cardiovascular Research* 2018;114:907–918.
- [147] Christ-Crain M, Müller B. Procalcitonin in bacterial infections - Hype, hope, more or less? *Swiss Medical Weekly* 2005;135:451–460.
- [148] Mrázová V, Mocák J, Varmusová E, Kavková D, Bednářová A. Use of multidimensional data analysis for prediction of lung malignity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009;50:210–215.
- [149] Farlow EC, Vercillo MS, Coon JS, Basu S, Kim AW, Faber LP, et al. A multi-analyte serum test for the detection of non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2010;103:1221–1228.

- [150] Eastman PS, Manning WC, Qureshi F, Haney D, Cavet G, Alexander C, et al. Characterization of a multiplex, 12-biomarker test for rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012;70:415–424.
- [151] Kappelmayer J, Antal-Szalmás P, Nagy B. Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders. *Clinica Chimica Acta* 2015;438:35–42.
- [152] Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2014;60:197–209.
- [153] Bajaj JS, O’Leary JG, Reddy KR, Wong F, Biggins SW, Patton H, et al. Survival in infection-related acute-on-chronic liver failure is defined by extrahepatic organ failures. *Hepatology* 2014;60:250–256.
- [154] Lemarié J, Gibot S. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1: Diagnosis or Prognosis? *Critical Care Clinics* 2020;36:41–54.
- [155] Kofoed K, Schneider UV, Scheel T, Andersen O, Eugen-Olsen J. Development and validation of a multiplex add-on assay for sepsis biomarkers using xMAP technology. *Clinical Chemistry* 2006;52:1284–1293.
- [156] Michaels MA, Jendrek ST, Korf T, Nitzsche T, Teegen B, Komorowski L, et al. Pancreatic Autoantibodies Against CUZD1 and GP2 Are Associated with Distinct Clinical Phenotypes of Crohn’s Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2015;21:2864–2872.
- [157] Jendrek ST, Gotthardt D, Nitzsche T, Korf T, Michaels MA, Weiss KH, et al. SAT-387 - Autoreactive Iga Antibodies against the Pancreatic Major Glycoprotein 2 are Associated with Primary Sclerosing Cholangitis and Related Biliary Tract Cancer. *Journal of Hepatology* 2016;64, p. S647.
- [158] Papp M, Tornai T, Kovacs G, Vitalis Z, Tornai I, Fechner K, et al. Target-specific anti-pancreatic antibodies are frequent in patients with primary sclerosing cholangitis and associated with poor disease outcome. *Falk Symposia 201 - Gut-Liver Interactions: From IBD to NASH*, 2016; p. 33.
- [159] Jendrek ST, Gotthardt D, Nitzsche T, Widmann L, Korf T, Michaels MA, et al. Anti-GP2 IgA autoantibodies are associated with poor survival and cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2017;66:137–144.
- [160] Papp M, Norman GL, Vitalis Z, Tornai I, Altorjay I, Foldi I, et al. Presence of anti-microbial antibodies in liver cirrhosis - A tell-tale sign of compromised immunity? *PLoS ONE* 2010;5:e12957.

- [161] Broomé U, Olsson R, Lööf L, Bodemar G, Hultcrantz R, Danielsson Å, et al. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996;38:610–615.
- [162] Farrant JM, Hayllar KM, Wilkinson ML, Karani J, Portmann BC, Westaby D, et al. Natural history and prognostic variables in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1991;100:1710–1717.
- [163] Yanai H, Matalon S, Rosenblatt A, Awadie H, Berdichevski T, Snir Y, et al. Prognosis of primary sclerosing cholangitis in Israel is independent of coexisting inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 2015;9:177–184.
- [164] Degenhardt F, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Kunst C, Roggenbuck D, et al. Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrostenosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2016;22:2648–2657.
- [165] Sowa M, Kolenda R, Baumgart DC, Pratschke J, Papp M, Tornai T, et al. Mucosal Autoimmunity to Cell-Bound GP2 Isoforms Is a Sensitive Marker in PSC and Associated With the Clinical Phenotype. *Frontiers in Immunology* 2018;9:1959.
- [166] Wunsch E, Norman GL, Milkiewicz M, Krawczyk M, Bentow C, Shums Z, et al. Anti-glycoprotein 2 (anti-GP2) IgA and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies to serine proteinase 3 (PR3-ANCA): antibodies to predict severe disease, poor survival and cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2021;53:302–313.
- [167] Tornai D, Papp M. Editorial: serologic antibodies in primary sclerosing cholangitis – a tell-tale sign of compromised gut-liver immunity? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2021;53:350–351.
- [168] Simell B, Kilpi T, Käyhty H. Subclass distribution of natural salivary IgA antibodies against pneumococcal capsular polysaccharide of type 14 and pneumococcal surface adhesin A (PsaA) in children. *Clinical and Experimental Immunology* 2006;143:543–549.
- [169] Duc M, Johansen FE, Corthésy B. Antigen binding to secretory immunoglobulin A results in decreased sensitivity to intestinal proteases and increased binding to cellular Fc receptors. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:953–960.
- [170] Pollheimer MJ, Halilbasic E, Fickert P, Trauner M. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 2011;25:727–739.

- [171] Mossman KL, Mian MF, Lauzon NM, Gyles CL, Lichty B, Mackenzie R, et al. Cutting Edge: FimH Adhesin of Type 1 Fimbriae Is a Novel TLR4 Ligand. *The Journal of Immunology* 2008;181:6702–6706.
- [172] Seki E, de Minicis S, Österreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. *Nature Medicine* 2007;13:1324–1332.
- [173] Hall JC, Rosen A. Type I interferons: Crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology* 2010;6:40–49.
- [174] Roggenbuck D, Reinhold D, Werner L, Schierack P, Bogdanos DP, Conrad K. Glycoprotein 2 Antibodies in Crohn's Disease. *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 60, Academic Press Inc.; 2013, p. 187–208.
- [175] Mydock-Mcgrane LK, Cusumano ZT, Janetka JW. Mannose-derived FimH antagonists: A promising anti-virulence therapeutic strategy for urinary tract infections and Crohn's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2016;26:175–197.
- [176] Dreux N, Denizot J, Martinez-Medina M, Mellmann A, Billig M, Kisiela D, et al. Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathogens* 2013;9:e1003141.
- [177] Gouin SG. Repurposing *Escherichia coli* antiadhesives in Crohn's disease. *Future Medicinal Chemistry* 2016;8:1903–1906.



Nyilvántartási szám: DEENK/96/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tornai Dávid  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

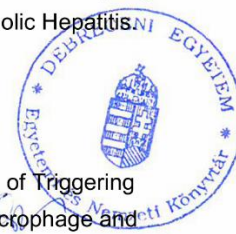
1. **Tornai, D.**, Antal-Szalmás, P., Tornai, T. I., Papp, M., Tornai, I., Sipeki, N., Janka, T., Balogh, B., Vitális, Z.: Abnormal ferritin levels predict development of poor outcomes in cirrhotic outpatients: a cohort study.  
*BMC Gastroenterol.* 21 (1), 1-13, 2021.  
IF: 2.489 (2019)
2. **Tornai, D.**, Vitális, Z., Jónás, A., Janka, T., Földi, I., Tornai, T. I., Sipeki, N., Csillag, A., Balogh, B., Sümegi, A., Földesi, R., Papp, M., Antal-Szalmás, P.: Increased sTREM-1 levels identify cirrhotic patients with bacterial infection and predict their 90-day mortality.  
*Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* "Accepted by Publisher", 2020.  
IF: 2.718 (2019)
3. Tornai, T. I., **Tornai, D.**, Sipeki, N., Tornai, I., Alsulaimani, R., Fechner, K., Roggenbuck, D., Norman, G. L., Veres, G., Pár, G., Pár, A., Szalay, F., Lakatos, P. L., Antal-Szalmás, P., Papp, M.: Loss of tolerance to gut immunity protein, glycoprotein 2 (GP2) is associated with progressive disease course in primary sclerosing cholangitis.  
*Sci. Rep.* 8 (1), 1-11, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18622-1>  
IF: 4.011





### További közlemények

4. **Tornai, D.**, Papp, M.: Editorial: serologic antibodies in primary sclerosing cholangitis - a tell-tale sign of compromised gut-liver immunity?  
*Aliment. Pharmacol. Ther.* 53 (2), 352-353, 2021.  
IF: 7.515 (2019)
5. Janka, T., Tornai, T. I., Borbély, B., **Tornai, D.**, Altorjay, I., Papp, M., Vítális, Z.: Deleterious effect of proton pump inhibitors on the disease course of cirrhosis.  
*Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 32 (2), 257-264, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0000000000001499>  
IF: 2.251 (2019)
6. **Tornai, D.**, Szabó, G.: Emerging medical therapies for severe alcoholic hepatitis.  
*Clin Mol Hepatol.* 26 (4), 686-696, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3350/cmh.2020.0145>  
IF: 3.987 (2019)
7. Lowe, P., Cho, Y., **Tornai, D.**, Coban, S., Catalano, D., Szabó, G.: Inhibition of the Inflammasome Signaling Cascade Reduces Alcohol Consumption in Female But Not Male Mice.  
*Alcohol. Clin. Exp. Res.* 44 (2), 567-578, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.14272>  
IF: 3.035 (2019)
8. Mezei, Z. A., **Tornai, D.**, Földesi, R., Madar, L., Sümegi, A., Papp, M., Antal-Szalmás, P.: A DNA pool of FLT3-ITD positive DNA samples can be used efficiently for analytical evaluation of NGS-based FLT3-ITD quantitation: testing several different ITD sequences and rates, simultaneously.  
*J. Biotechnol.* 303, 25-29, 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.06.305>  
IF: 3.503
9. Saha, B., **Tornai, D.**, Kodys, K., Adejumo, A., Lowe, P., McClain, C., Mitchell, M., McCullough, A., Dasarathy, S., Kroll, D. A., Barton, B., Radaeva, S., Szabó, G.: Biomarkers of Macrophage Activation and Immune Danger Signals Predict Clinical Outcomes in Alcoholic Hepatitis.  
*Hepatology.* 70 (4), 1134-1149, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.30617>  
IF: 14.679
10. **Tornai, D.**, Furi, I., Shen, Z. T., Sigalov, A. B., Coban, S., Szabó, G.: Inhibition of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 Ameliorates Inflammation and Macrophage and Neutrophil Activation in Alcoholic Liver Disease in Mice.  
*Hepatol Commun.* 3 (1), 99-115, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/hep4.1269>





11. Dinya, T., Tornai, T. I., Vitális, Z., Tornai, I., Balogh, B., **Tornai, D.**, Antal-Szalmás, P., Sümegi, A., Andrikovics, H., Bors, A., Tordai, A., Papp, M.: Functional polymorphisms of innate immunity receptors are not risk factors for the non-SBP type bacterial infections in cirrhosis. *Liver Int.* 38 (7), 1242-1252, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/liv.13664>  
IF: 5.542
12. Tornai, T. I., Havasiné Pályu, E., Vitális, Z., Tornai, I., **Tornai, D.**, Antal-Szalmás, P., Norman, G. L., Shums, Z., Veres, G., Dezsőfi, A., Pár, G., Pár, A., Orosz, P., Szalay, F., Lakatos, P. L., Papp, M.: Gut barrier failure biomarkers are associated with poor disease outcome in patients with primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol.* 23 (29), 5412-5421, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i29.5412>  
IF: 3.3
13. Földi, I., Tornai, T. I., **Tornai, D.**, Sipeki, N., Vitális, Z., Tornai, I., Dinya, T., Antal-Szalmás, P., Papp, M.: Lectin-complement pathway molecules are decreased in patients with cirrhosis and constitute the risk of bacterial infections. *Liver Int.* 37 (7), 1023-1031, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/liv.13368>  
IF: 4.5
14. Satishchandran, A., Ambade, A., Rao, S., Hsueh, Y. C., Iracheta-Vellve, A., **Tornai, D.**, Lowe, P., Gyöngyösi, B., Li, J., Catalano, D., Zhong, L., Kodys, K., Xie, J., Bala, S., Gao, G., Szabó, G.: MicroRNA 122, Regulated by GRLH2, Protects Livers of Mice and Patients From Ethanol-Induced Liver Disease. *Gastroenterology.* 154 (1), 238-252, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.022>  
IF: 20.773
15. Tornai, T. I., Vitális, Z., Sipeki, N., Dinya, T., **Tornai, D.**, Antal-Szalmás, P., Karányi, Z., Tornai, I., Papp, M.: Macrophage activation marker, soluble CD163 is an independent predictor of short-term mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection. *Liver Int.* 36 (11), 1628-1638, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/liv.13133>  
IF: 4.116
16. Papp, M., Tornai, T. I., Vitális, Z., Tornai, I., **Tornai, D.**, Dinya, T., Sümegi, A., Antal-Szalmás, P.: Presepsin teardown: pitfalls of biomarkers in the diagnosis and prognosis of bacterial infection in cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 22 (41), 1-14, 2016.  
IF: 3.365





17. Vitális, Z., Altorjay, I., Tornai, I., Palatka, K., Kacska, S., Havasiné Pályu, E., **Tornai, D.**, Udvardy, M., Hársfalvi, J., Dinya, T., Veres, G., Lakatos, P. L., Papp, M.: Phenotypic polymorphism of haptoglobin: a novel risk factor for the development of infection in liver cirrhosis. *Hum. Immunol.* 72 (4), 348-354, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2011.01.008>  
IF: 2.837

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 88,621**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
9,218**

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

Debrecen, 2021.03.11.



## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek Prof. Dr. Antal-Szalmás Péternek, aki vezette és támogatta munkámat a laboratóriumi eljárások és a tudományos gondolkodás elsajátításában.

Köszönöm Dr. Papp Máriának, aki még tudományos diákköri hallgatóként egyengette első lépéseimet a tudomány világában, és aki később is segített az eredményeim klinikai ismeretekkel való kontextusba helyezését.

Köszönöm édesanyámnak, Dr. Vitális Zsuzsannának, aki a kezdetektől segítette és támogatta tudományos munkámat.

Köszönöm unokatestvéremnek, Dr. Tornai Tamásnak, akinek segítségével a statisztikai gondolkodás és elemzés gyakorlati alapjait sajátítottam el.

Köszönöm Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak, hogy lehetőséget biztosított a DE Laboratóriumi Medicina Intézetében a PhD munkám elkészítésére.

Köszönöm Prof. Dr. Szabó Gyöngyinek, akinek irányítása alatt, amerikai munkám során önálló kutatóvá értem.

Köszönöm Vargáné Földesi Róza segítségét a kísérletes laboratóriumi munka végzésében.

Köszönöm a Gasztroenterológiai Tanszék dolgozóinak áldozatos munkáját a klinikai minták és adatok gyűjtésében, mely lehetővé tette ezen eredmények létrejöttét.

Köszönöm családomnak és barátaimnak türelmét, szeretetét, mellyel támogatták munkám sikerességét.

## **13. FÜGGELÉKEK I**

### NYILATKOZAT AZ ÉRTEKEZÉSBEN SZEREPLŐ SAJÁT ÉS TÁRSSZERZŐI EREDMÉNYEK MEGOSZLÁSÁRÓL

A ferritinnel kapcsolatos eredmények statisztikai analízise és a kézirat elkészítése a jelölt munkája.

A sTREM-1 szérum koncentrációjának meghatározását, a kapott eredmények statisztikai kiértékelését, valamint a publikáció megírását a jelölt végezte.

Az anti-GP2 IgA ELISA-val való mérését, valamint az antitestek áramlási citometriás módszerrel történő tipizálást (IgA1/IgA2/sIgA) a jelölt végezte, míg az antitestek indirekt immunfluoreszcenciás meghatározása és az eredmények statisztikai kiértékelése társszerzők munkája.

A jelölt ezenkívül részt vett mindhárom beteg kohorsz mintáinak, valamint klinikai és laboratóriumi adatainak gyűjtésében, illetve kódolásában a statisztikai számításokhoz.

### PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

A projektek megvalósításához szükséges anyagi forrást a következő pályázatok biztosították:

HORIZON 2020 MICROB-PREDICT, GINOP-2.3.2-15-2016-00048, valamint EFOP-3.6.1-16-2016-00022 és 3.6.2-16-2017-00006. Az EFOP projekteket az Európai Unió és az Európai Szociális Alap (European Social Found) közösen finanszírozta.

## 14. FÜGGELÉKEK II