Egyetemi Doktori (PhD) értekezés tézisei

A veleszületett és a szerzett immunitás humorális komponenseinek vizsgálata krónikus gyulladással járó gasztroenterológiai kórképekben

Dr. Földi Ildikó

Témavezető: Dr. Papp Mária

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

A VELESZÜLETETT ÉS A SZERZETT IMMUNITÁS HUMORÁLIS KOMPONENSEINEK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS GYULLADÁSSAL JÁRÓ GASZTROENTEROLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Földi Ildikó, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Papp Mária, PhD

A doktori szigorlati bizottság:
elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora
Dr. Tarr Tünde, PhD

A doktori szigorlat időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK Gyermekgyógyászati Intézet Könyvtára
2017. június 19. 11:00

Az értekezés bírálói:
Dr. Gasztonyi Beáta, PhD
Dr. Nagy Béla, PhD

A bírálóbizottság:
elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora
Dr. Gasztonyi Beáta, PhD
Dr. Nagy Béla, PhD
Dr. Tarr Tünde, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, A épület Tanterme,
2017. június 19. 13:00 óra

BEVEZETÉS

Az immunhomeosztázis fenntartását a veleszületett (innate) és a szerzett (adaptív) immunitás elemeinek szoros együttműködése teszi lehetővé. A veleszületett immunitás humorális (komplement rendszer, antimikrobiális peptidek, citokinek), és celluláris (fagociták, természetes ölő (NK) sejtek, dendritikus sejtek) komponensei képezik a szervezet első immunológiai védelmi vonalát a behatoló kórokozókkal szemben és kulcsszerepük van az adaptív immunválasz elindításában is. Az adaptív immunválasz humorális (citokinek, ellenanyagok) és celluláris elemei (T és B limfociták) ugyan bizonyos látenciaidő után aktiválódnak, de a két védekező rendszer nem egymástól függetlenül működik, hanem egymásra épülve és összefonódva biztosítják a gazdaszervezet védelmét. Az immunrendszer fokozott reaktivitása vagy csökkent működése számos gasztroenterológiai kórkép pathogenezisében kiemelt szerepet játszik. Klinikai kutatásunk során két olyan gasztroenterológiai betegcsoportot (coeliakiás betegek és májcirrhosisos betegek) választottunk ki, ahol a betegség patogenezisében és a betegséglefolyás során jelentkező szövődmények kialakulásában jelentős szerepet játszik a veleszületett immunrendszer működészavara. A két kórkép közös jellemzője, hogy a vékonybélfal gyulladása, strukturális és funkcionális károsodása következtében létrejövő fokozott permeabilitás és a megváltozott bélflóra együttesen krónikus bakteriális transzlokációhoz vezetnek. A különféle baktériumok jelenléte, illetve az ellenük kialakuló immunválasz befolyásolhatja a lokális vagy szisztémás gyulladás súlyosságát.

Coeliakia

A coeliakia (celiac disease: CD; gluténszenzitív enteropathia, lisztérzékenység, sprue) a glutén gliadin komponense által kiváltott, genetikailag fogékony egyénekben kialakuló, extraintesztinális manifesztációt is mutató T sejt mediálta autoimmun enteropathia.

A betegség megjelenése nagyon változó, keveset tudunk arról, milyen tényezők határozzák meg a tünetek típusait. A betegség klinikai manifesztációja lehet klasszikus, amikor jól észlelhetők a malabsorptio jelei és tünetei (hasmenés, fogyás, steatorrhoea, növekedési elmaradás) de jelentkezhet nem klasszikus (gasztrointesztinális tünetek és/vagy extraintesztinális manifesztációk) és aszimptomatikus formában is. Az elmúlt években világszerte egyre több nem klasszikus és aszimptomatikus beteget diagnosztizálnak .

Számos antitest képződése (pl: transzglutamináz ellenes antitest: TGA; endomysium ellenes antitest: EMA, gliadin ellenes antitest, deamidált gliadin peptid ellenes antitestek) jellemzi, habár ezek termelődésének hátterében álló mechanizmusok és a betegség pathogenezisében betöltött tényleges szerepük egyelőre nem teljesen ismert. A legelőször felismert gliadin ellenes antitesteket majd később leírt retikulin ellenes antitesteket alacsony szenzitivitásuk és specificitásuk miatt ma már nem használjuk a CD diagnosztikájában. A legtöbb ajánlás az anti-TG2 és EMA meghatározást javasolja. Újabban, bizonyos esetekben, a szintetikus deamidált gliadin peptidek elleni antitestek tűnnek valóban használható eszköznek a CD diagnosztizálásában.

A különféle baktériumok sejtfalának szénhidrát epitópjai ellen termelődő antitestek a szövődményes Crohn-betegség markerei. Az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest (ASCA) gyakoribb megjelenését coeliakiában is leírták. Ugyanakkor az IBD-ben észlelt egyéb antimikrobiális antitestek (ALCA, AMCA, ACCA, anti-OMP) előfordulásának gyakorisága ill. klinikai jelentősége coeliakiában azonban nem tisztázott.

Antimikrobiális antitestek

A glikánok glikozidkötéssel összekapcsolt, azonos monoszacharid egységekből felépülő oligoszacharidok. Jelen vannak a vörösvértestek, az immunsejtek és különféle mikroorganizmusok sejtfelszínén. A humorális és celluláris immunrendszer fontos molekulái, mivel szerepet játszanak a sejtek közötti kapcsolat létrejöttében, az innate immunválaszban és az ellenük termelődő antitestek ismerik fel a pathogének felszínén lévő szénhidrát komponensekből felépülő antigéneket. Ez magyarázza, hogy a glikán ellenes antitesteket a gyulladásos és autoimmun betegségek lehetséges biomarkereként tartják számon. A mannan ellenes antitestek közé tartozik a mannobioside [Man(α1,3) Man(α)] szénhidrát epitóp elleni IgG antitest vagy AMCA IgG is. További glikán-ellenes antitestek a laminaribioside [Glc(β1,3)Glc(β)], valamint a chitobioside [GlcNAc(β1,4)GlcNAc(β)] elleni antitest (ALCA IgG és ACCA IgA). Az IgA típusú anti-OmpC/anti-OMP antitest az *Escherichia coli* külső membránjában található porin C transzporterfehérje ellen termelődik.

A mannan ellenes antitestek közül a legtöbbet vizsgált antitest az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest (ASCA IgG és IgA vagy gASCA), mely a sütő- és sörélesztőben található *Saccharomyces cerevisiae* sejtfalában lévő oligomannóz struktúra ellen termelődik. Az ASCA és az egyéb mikrobiális antigének ellen termelődő antitestekről egyaránt elmondható, hogy kialakulásuk pontos mechanizmusa és jelentősége egyelőre nem tisztázott. Nem tudjuk, hogy az antitesteknek van-e szerepük a gyulladásos gasztroenterológiai betegségek [mint pl. gyulladásos

bélbetegségek (IBD) vagy coeliakia] immunpathogenesisében vagy megjelenésük csupán a gyulladt, áteresztő bélnyálkahártya következményének tartható. Továbbá az antimikrobiális antitestek megjelenése genetikai hajlamot mutathat, mert azon betegek, akiknek pozitív antitestjük van gyakran hordozzák a NOD2/CARD15 gén mutációit.
Antimikrobiális antitestképződést leírtak coeliakiában is. Az ASCA-k a legszélesebb körben vizsgált antitestek ebben a betegcsoportban de növekvő kísérletes adatok elérhetők az újonnan felismert antitestekről is, mint pl. anti-I2 vagy anti-OmpW (*Bacteroides caccae* TonB- linked outer membrane protein).

Májcirrhosis

A májsejteket károsító különböző tényezők (leggyakrabban alkoholfogyasztás, vírusinfekció, nem-alkoholos steatohepatitis vagy autoimmun folyamat) hatására a májban jellegzetes szövettani elváltozások (necroinflammatio, fibrogenezis) alakulnak ki. Ezen folyamatok progressziója eredményeképp általában évek, évtizedek alatt kialakul a definitív májcirrhosis (májzsugor). Májcirrhosisos betegekben a klinikai állapotrosszabbodás gyakori okai különböző fertőzések, melyeknek alapvető szerepük van számos szövődmény kialakulásában, beleértve a varixvérzést, hepatikus encephalopathiát, veseelégtelenséget, és véralvadási zavarokat. Bakteriális fertőzés kialakulása a mortalitást négyszeresére növeli. A fertőzés kialakulását követő 1 hónapon belül a betegek 30%-a, 1 éven belül további 30%-uk hal meg. A bakteriális infekciók megelőzése kiemelkedően fontos, amihez szükséges azon betegek korai észlelése, akiknél nagy a veszély ilyen epizódok kialakulására. Hosszú idő óta csak néhány klinikai előrejelző faktor ismert, mint a Child-Pugh stádium szerint előrehaladott betegség, gasztrointesztinális vérzés jelenléte. A májcirrhosisos betegek különösen fogékonyak a bakteriális fertőzések kialakulására, a májcirrhosis az egyik leggyakoribb szerzett immundeficiencia. Ennek hátterében azok az öröklött és szerzett immunitást is érintő mechanizmusok állnak, amiket összefoglaló néven a szakirodalomban a cirrhosishoz kapcsolt immundeficiencia (CAID) szindrómának neveznek.
Májcirrhosisos betegekben a bélnyálkahártya barrier számos okból károsodik, melynek következtében pathológiás bakteriális transzlokáció jön létre, az immunogén bakteriális termékek mennyisége emelkedik a keringésben. Ezek egyrészt fokozzák azokat a proinflammatorikus folyamatokat, amelyek a májszövet károsodásához vezetnek, másrészt a baktériumok felismerésben szerepet játszó szolubilis és celluláris receptorok elégtelen működése a fertőzésekre való fogékonyság fokozódásához vezethet.

Komplement rendszer-lektin útvonal

A komplement rendszer a veleszületett immunitás fontos eleme. A komplement rendszer három féle úton aktiválódhat, a klasszikus, az alternatív és a lektin útvonalon. A lektin útvonalat a mannóz –kötő lektin (MBL) vagy a fikolinok és a pathogének felszínén lévő szénhidrátok közötti kötődés aktiválja.

A lektin útvonal molekulái döntően a májban termelődnek és kulcsszerepük van a gazdaszervezet természetes védelmében a kórokozókkal szemben. Mannóz-kötő lektin, a fikolinok (FCN) és a kollektinek szolubilis mintázatfelismerő molekulaként (sPRM) viselkednek, míg a mannóz-kötő lektin asszociált szerin proteázok (MASP) a pathogének eliminálásának effektor molekulái. Humán vizsgálatok során eddig három fikolint azonosítottak: L-fikolin (**FCN-2**), H-fikolin **(FCN-3)**, és M-fikolin **(FCN-1).** A lektin rendszer fő aktivátora a MASP-2, mely az MBL-lel, a H-és L-fikolinnal komplexet képezve kering a plazmában. A MASP-2 akkor aktiválódik, ha az MBL vagy a fikolinok kötődnek a pathogén asszociált molekuláris mintázathoz, ezt követően a MASP-2 tudja hasítani a C2 és C4-et, ezáltal létre jön a C3 konvertáz, C4bC2b.

A funkcionális fehérjék alacsony szintje növeli a különféle fertőzés kialakulásának kockázatát, elsősorban immunszupresszióval járó kórképek esetén. A májcirrhosishoz kapcsolódó bakteriális fertőzésben betöltött szerepük eddig kevéssé ismert.

CÉLKITŰZÉSEK

Coeliakiás betegcsoport

Feltételeztük, hogy az újonnan felismert, IBD asszociált antitestek (magában foglalva a glikán ellenes és anti-OMP antitesteket) fontosak coeliakiában és célul tűztük ki ezen antitestek előfordulási gyakoriságának meghatározását egy felnőtt magyar betegcsoportban, vizsgálva az összefüggést a klinikai megjelenéssel, a gluténmentes diétával és a NOD2/CARD15 mutációval.

Májcirrhosisos betegcsoport

Jelen vizsgálatban célul tűztük ki a lektin útvonal különböző molekuláinak szérumszint meghatározását stabil cirrhosisos járóbetegek nagy kohorsz vizsgálatában és kerestük a betegség specifikus jellemzőkkel való összefüggéseket. Ezen felül 5 éves utánkövetéses vizsgálatban célunk volt értékelni, hogy a lektin útvonal különböző molekuláinak szérum szintjei cirrhosisban a klinikailag szignifikáns bakteriális infekciók kialalulására nézve kockázati tényezőnek tekinthetők-e.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegcsoportok

Coeliakiás betegek

190 nem rokon, felnőtt, magyar, biopsziával igazolt coeliakiás beteget (férfi/nő: 71/119, átlagéletkor: 39,9 év, SD: 14,1) és ezen betegek 66 első fokú rokonát (testvérek, átlagéletkor: 37,7 év, SD:13,9) vizsgáltunk. A coeliakia diagnózisa súlyos boholyatrophiát és crypta hyperplasiát (Marsh III típusú lézió) mutató vékonybél biopszián és emelkedett szérum transzglutamináz (TGA) és endomysium (EMA) elleni antitestszinteken alapult.

A 190 betegből 82 beteg szérumát a diagnózis idejében gyűjtöttük (CD1 csoport) és ezek közül további 30 beteg szérumszintjét újraértékeltük ugyanezen antitestekre hosszantartó glutén mentes diéta után. A medián követési idő ezek között a mintagyűjtések között 28,5 hónap volt [interquartile range (IQR):18-52]. A fennmaradó 108 esetben a coeliakia diagnózisát korábban megállapították, ezen vizsgálat előtt a betegek szoros gluténmentes diétát tartottak. Ezt a 108 beteget további két külön csoportra osztottuk a jelenlegi TGA és EMA státusnak és a mintagyűjtés alatti diétás compliance-nek megfelelően. 33 betegnek továbbra is pozitív volt az EMA és TGA eredménye (CD2 csoport) a medián átlagos időtartam 3,5 hónap volt (IQR: 1-11). Megfelelő compliance-t jelentett a diagnózishoz képest csökkent antitest titer. A fennmaradó 75 betegnek negatív EMA és normál TGA titere volt (CD3 csoport), medián követési idő: 21 hónap (IQR: 6-85).

Részletes klinikai adatokat gyűjtöttünk a betegség diagnózisakor észlelt klinikai megjelenési formájáról amit az alábbiak szerint osztályoztunk: (1) súlyos, generalizált malabsorptio; (2) nem specifikus gastrointestinális tünetek, amik nem befolyásolták az általános állapotot; (3) vashiányos anaemia jelentős hasi panaszok nélkül; (4) dermatitis herpetiformis; (5) tünetmentes betegség (populációs szűrés); (6) egyéb (autoimmun betegségek, csökkent csontsűrűség, májbetegség, idegrendszeri betegség). A betegeket ezen prezentációs csoportokhoz rendeltük hozzá prospektív módon a diagnózis során klinikai és rutin laboratóriumi módszerek felhasználásával.

A kontroll csoport 100 egészséges, etnikailag egyező véradó egyénből állt (férfi/nő: 47/53, átlagéletkor: 36,6 év, SD: 9,1) Egy második- nem coeliakiás, de egyéb gastrointestinalis betegségben szenvedő- kontroll csoportot is összeállítottunk. Ez 48 irritábilis bél szindrómában vagy gyulladás nélküli diverticulosisban szenvedő betegből állt (férfi/nő arány: 22/26, átlagéletkor: 40,4 ± 16,1 év). További összehasonlításokat végeztünk a korábban publikált Crohn-beteg csoporttal, akikben ugyanezen antitesteket korábban vizsgáltuk.

Májcirrhosisos betegek

Jelen tanulmányba bevont betegek munkacsoportunk azon 404 fős betegcsoportjának részét képezik, akiket 2006. május 1. és 2010. december 31. között járóbeteg szakrendelésen rendszeres vagy rendkívüli követéses vizit alkalmával valamint akut dekompenzációs (AD) epizód miatt osztályon vizsgáltunk. A vizsgálathoz 378 beteg szérummintája volt elérhető (266 járóbetegé és 117 AD epizód miatt hospitalizált betegé). További szerológiai értékelés során a stabil járóbetegeket vontuk be a vizsgálatba, míg az AD-s betegeket kizártuk. Akut dekompenzációnak definiáltuk a megszokott kritériumok szerint az alábbi események közül egy vagy több kombinációját: nagy mennyiségű ascites kifejlődése (II/III stádium), akut hepatikus encephalopathia akut gasztrointesztinális vérzés és/vagy szisztémás bakteriális infekció jelenléte. Refrakter asciteses betegek sem kerültek bevonásra.

A klinikai adatokat tartalmazó orvosi dokumentációt retrospektív módon elemeztük a követéses tanulmány előtti időszakra vonatkozóan. Beválasztáskor a betegség súlyosságának megállapítása májspecifikus pontrendszerek (Child-Plug és MELD) segítségével történt, valamint meghatároztuk a klinikai stádiumot is (kompenzált/dekompenzált).

Olyan betegeket vontunk be a követéses vizsgálatba, ahol a kezelő gasztroenterológus regisztrálta a kórházi felvételt igazoló AD időpontját és típusát. A követési időszak 5 évig vagy halálozásig/követésből kiesésig tartott. 85 beteg (32%) halt meg a követés alatt, a halálozásig eltelt medián idő 656 (IQR: 277-971) nap volt. A 181 életben maradt beteg medián követési ideje 1107 (IQR: 411-1825) napig tartott.

Klinikailag jelentős bakteriális infekció (spontán bakteriális peritonitisz, húgyúti fertőzés, tüdőgyulladás valamint egyéb bőr és lágyrész, epeúti, szájüregi és emésztőszervi fertőzések, osteomyelitis, endocarditis, továbbá pozitív haemokultúra esetén elhelyezkedés-specifikus fertőzés nélküli ismeretlen eredetű bakteriális infekció,) megjelenésének definíciója gondosan elvégzett klinikai és labor és képalkotóvizsgálatokon alapult

Az egészséges kontroll csoport 160 egészséges kor és nem szerint illesztett egyénből állt (férfi/nő: 72/88, életkor: 51,5±16,9 év) akiket véletlenszerűen választottak ki Debrecenben. A kontroll egyéneknek nem volt semmiféle gasztrointesztinális vagy májbetegsége.

MÓDSZEREK

Antimikrobiális antitestek meghatározása

A vizsgálatokhoz perifériás vérből nyert szérummintákat használtunk, melyeket a felhasználásig -80ºC-on tároltunk. Az antimikrobiális antitestek jelenlétének meghatározása

ELISA módszerrel történt, melyhez kereskedelmi forgalomban kapható kiteket használtunk a gyártó útmutatása szerint: gASCA IgG, AMCA IgG, ALCA IgG, ACCA IgA (IBDX®, Glycominds Ltd., Lod, Israel) és anti-OMP IgA(QUANTA Lite OMP PLUS ELISA, INOVA Diagnostics, San Diego, CA). Az eredményeket tapasztalati egységekben fejeztük ki, amit a minta és a kalibrátor optikai denzitásából (OD) számoltunk ki. A küszöb (cut-off) érték gASCA IgG esetén 50U/ml, AMCA IgG esetén 100U/ml, ALCA IgG esetén 60U/ml és ACCA IgA esetén 90U/ml, ati-OMP esetén 25 U/ml volt. Ezen értékek alatt mért mintákat negatívnak tekintettük. Az eredményeket mind abszolút értékben, mind pedig a pozitivitás gyakoriságában megadtuk.

NOD2/CARD15 mutációk detektálása

134 CD beteg és 100 egészséges egyén volt alkalmas a NOD2/CARD15 mutáció analízisre. Major NOD2/CARD15 mutációkat (SNP8 , 12 és 13) denaturáló nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (dHPLC, Wave DNA Fragment Analysis System, Transgenomic Limited, UK) határoztuk meg. A dHPLC profilban észlelt szekvencia-variáció szekvenálása mindkét szálon elvégzésre került a módosulás igazolásának céljából. A szekvenálási reakciókat az ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1,1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével végeztük el, míg a minták szekvenálásához az ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) eszközt alkalmaztuk.

Lektin rendszer vizsgálata

A betegektől származó szérummintákat -70°C–on fagyasztva tároltuk a vizsgálatokig. A MASP-2 szérumszintjét ELISA módszerrel határoztuk meg, a gyártó utasításainak megfelelően. (Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands). A mintákat ugyanazon a lemezen duplikátumokként mértük, és az átlagértékeket használtuk fel. A futtatások között a variációs koefficiens (CV) 8% volt. A detektálás határa 1,6 ng/mL volt. Irodalmi adatok alapján a <100ng/ml MASP-2 szintet tekintettük MASP-2 deficiensnek.

A Fikolin-L(FCN-2) és Fikolin-H (FCN-3) koncentrációk meghatározására szendvics ELISA módszereket állítottunk be.

A lapos aljú, nagy kötőkapacitású mikrotiter lemezeket karbonát/bikarbonát pufferben (pH=9,6) hígított, 0,75 µg/ml koncentrációjú monoklonális egér anti-humán Fikolin-L (GN4 klón) és Fikolin-H (4H5 klón) antitestekkel (HyCult Biotechnology, Uden, Hollandia) fedtük, és 37°C-on inkubáltuk 6 órán keresztül. A beteg, illetve kontroll mintákat a Fikolin-L esetében 10-szeres, a Fikolin-H esetében 1000-szeres hígításban, duplikátumok formájában vittük fel. Standardként rekombináns human Fikolin-L-ből és Fikolin-H-ból (R&D Systems Inc.,

Minneapolis, MN, USA) készült hígítási sort használtunk. A felvitel után a lemezt egy éjszakán át inkubáltuk +4°C-on nedves kamrában. Háromszori mosást követően 0,15 μg/ml koncentrációjú biotinált poliklonális kecske anti-humán Fikolin-L és Fikolin-H antitesteket (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) vittünk a lemezekre, melyeket 0,1%-os borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-pufferrel (pH 7,4) hígítottunk, és 2,5 órán keresztül inkubáltunk, nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Újabb mosás után 1000-szeres hígítású Avidin-Biotin- peroxidáz konjugátummal (Vectastain, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) inkubáltuk a lemezt 30 percen keresztül nedves kamrában. A szín előhívására tetrametil-benzidin-dihidroklorid (TMB;Sigma–Aldrich, Schnelldorf, Németország) oldatot használtunk, és a reakciót 2M H_2SO_4 oldattal terminálták. Az optikai denzitási értékek leolvasását 450 nm-en végeztük Labsystem Multiscan MS készülékkel (Thermo Scientific, Budapest, Magyarország) a leállítás után azonnal. Az eredmények kiszámítását a Genesis program segítségével végeztük négy pontos logisztikus görbeillesztés felhasználásával.

Duplikált minták esetén amennyiben a koefficiens variáció (CV)>20%, ismételt mérés történt. Futtatások között a CV 17% FCN-2 és 14%volt FCN-3-ra nézve. A detektálás határának a legalacsonyabb standard koncentrációkat tekintettük. Mivel a fikolin deficienciának nincs definíciója jelen vizsgálatban FCN-2 (<427ng/ml) és FCN-3 (<4857ng/ml) alacsony szintek meghatározása önkényesen a betegek szérum szint 25%-ának megfelelően történt.

Statisztikai elemzés

A folyamatos változók eloszlását Shapiro-Wilk W-teszt segítségével vizsgáltuk. Az adatok bemutatása eloszlás szerint medián (25-75 percentilis tartomány), átlag ± szórás illetve esetszám (%) formában történt.

A coeliakiás betegek és a kontrollok, valamint az egyes coeliakia alcsoportok adatainak összehasonlítására T-próbát különböző varianciájú csoportokra, illetőleg $\chi 2$-próbát alkalmaztunk helyenként Yates-korrekcióval, valamint valószínűségi változó (LR) meghatározást is végeztünk. Szenzitivitást, specificitást, pozitív (LR+) és negatív valószínűségi változót (LR-) számoltunk 95%-os konfidencia intervallummal (95%CI), hogy meghatározzuk a gASCA IgG, AMCA IgG, ALCA IgG, ACCA IgA és anti-OMP antitestek és azok kombinációjának prediktív értékét a coeliakiás betegek és a kontrollok elkülönítésére. Spearman féle korrelációs analízist alkalmaztunk annak eldöntésére, hogy van-e összefüggés a coeliakia specifikus antitestek és az antimikrobiális antitestek szintje között. Különböző becsült varianciával rendelkező független változókon végzett kétmintás t próbát, illetve varianciaanalízist és post-hoc Scheffé-próbát alkalmaztunk a glikán ellenes antitest titerek és a

diagnózis klinikai tünetei közötti összefüggés elemzésére. A $p<0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Kategorikus változókat hasonlítottunk össze a Fisher exact teszttel vagy χ^2 teszttel Yates korrekcóval. Folyamatos változók összehasonlítására Mann-Whitney U tesztet vagy >2 csoport esetén a Kruskal Wallis H-tesztet használtuk Dunn post-hoc teszttel. A párminták összehasonlítását Wilcoxon féle rang teszttel végeztük. A folyamatos változók közötti összefüggés megállapításához Spearman korrelációt használtunk.

A kategorikus klinikai változók vagy a lektin útvonal molekuláinak szérum szintjei és a követési idő alatti kedvezőtlen betegségkimenetelek közötti összefüggéseket Kaplan-Meier analízissel és univariációs Cox regressziós analízissel vizsgáltuk. A különböző alcsoportok szignifikanciáját log-rank teszttel értékeltük. A független rizikófaktorok azonosításához multivariációs analízist végeztünk backward eliminációval és valószínűségi arány teszttel (LRT). Az összefüggéseket kockázati hányadokként [hazard ratio-HR] 95% konfidencia intervallummal [CI] adtuk meg. A statisztikai elemzésekhez az SPSS Statistics 22,0 [SPSS, Chicago, IL] az adatok ábrázolásához a GraphPad Prism 6 [San Diego, CA] programokat használtuk. A különbséget statisztikailag szignifikánsnak akkor tekintettük, ha a kétszempontos p érték<0,05 volt.

EREDMÉNYEK

Antimikrobiális antitestek vizsgálata coeliakiában

A gASCA, AMCA, és ACCA ellenanyagok gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a coeliakia diagnózisának felállításakor, mint az egészséges és a gastrointestinalis kontrollokban. Az ALCA IgG és anti-OMP esetén azonban a kontroll csoportokhoz hasonló eredményeket kaptunk. Mivel az antitestek előfordulási gyakoriságának tekintetében nem találtunk különbséget az egészséges és a gasztrointesztinális kontrollok között, ezért a későbbi összehasonlításokhoz csak az egészséges kontroll személyek adatait használtuk. A javasolt cut-off értékeket alapul véve kiszámítottuk a különböző markerekre vonatkozó specificitást és szenzitivitást. A coeliakiás betegek 65,9%-a volt pozitív legalább egy vizsgált ellenanyagra a diagnózis időpontjában. Az ALCA-t kivéve az összes glikánellenes és anti-OMP antitest kezeletlen coeliakiára specifikusnak mutatkozott. A szenzitivitás összességében azonban alacsony maradt (gASCA: 39%, AMCA: 35,4%, ACCA: 37,8%). Mind a gASCA, mind az AMCA, mind pedig az ACCA jelenléte a coeliakia előfordulásának mérsékelten fokozott

kockázatával járt a kontroll csoporthoz képest. Bármely glikán ellenes antitest pozitivitás is a coeliakia előfordulásának fokozott kockázatával járt.

A coeliakia diagnózisakor észlelt tünetekre vonatkozó részletes klinikai adatok a CD1 csoportban 82 betegből 78-ban voltak elérhetők. A 78 betegből 32-nél (41%) jelentkezett súlyos malabsorptio, 34-nél (43,6%) nem specifikus enyhébb gasztrointesztinális tünetek, 9-nél (11,5%) vashiányos anaemia, és 3-nál (3,9%) egyéb tünetek. A glikán ellenes antitestek titere a prezentáló tüneteknek megfelelően változott. Súlyos malabsorptios betegeknél sokkal gyakrabban észleltünk többszörös antitest pozitivitást (*P*=0,019) míg a nem specifikus gastrointestinális tünetek vagy vashiányos anaemia esetén gyakoribb volt a szeroreaktivitás hiánya, vagy a csupán egy glikán komponens ellenében mutatott reaktivitás. Azon coeliakiás betegek között akikben többszörös antitest pozitivitást észleltünk, az esetek 65,4%-ában a diagnóziskor a vezető tünet a malabsorptio volt, mely érték szignifikánsan magasabb, mint egyéb szerotípusú CD csoportban. (0 = 26,9%, vagy 1 = 34,8%, *P* = 0,019)

Szignifikáns korrelációt találtunk a glikán ellenes antitestek és a TGA szintje között (pgASCA < 0,001, R = 0,39; pAMCA = 0,01, R = 0,28; pALCA = 0,006, R = 0,23; pACCA < 0,0001, R =0,53; p antiOMP = 0,001, R = 0,25 Spearman féle korrelációs analízist alkalmazva). Ehhez hasonlóan pozitív összefüggés mutatkozott az EMA IgA és gASCA (p < 0,001), AMCA (p < 0,001), ACCA (p< 0,0001), vagy bármely glikán (p < 0,0001) antitest között, anti-OMP esetén azonban nem.

Azon 30 fős betegcsoportban, akiket vizsgáltunk a diagnóziskor, illetve a hosszútávú gluténmentes diéta során (CD1 alcsoport) a glikán ellenes antitestek pozitivitása a szigorú hosszas GMD mellett (gASCA 12, AMCA 9 és ACCA 11 betegben) teljesen eltűnt. Minden egyes ellenanyag koncentrációja is szignifikánsan csökkent a gluténmentes diéta után. (p<0,001 minden esetben). Az anti-OMP ellenanyag a 14 betegből egy esetben pozitív maradt az EMA és TGA negatívvá válása ellenére, de a titer ebben a betegben is jelentősen csökkent a 135 hónapos gluténmentes diéta alatt.

Coeliakiában a NOD2/CARD15 mutáció jelenléte (19/134, 14,2%) nem különbözött a kontroll csoporttól (16/100, 16%). Nem találtunk továbbá semmilyen összefüggést a prezentációs tünetek, a glikán ellenes antitest pozitivitás és a NOD2/CARD15 variánsok között

Lektin útvonal molekuláinak vizsgálata májcirrhosisos betegekben

A FCN-2 és FCN-3 szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a cirrhosisos betegekben a kontroll csoporthoz képest (FCN-2: 505[426–596] vs 769 [629–1145] p<0,001 és FCN-3:

7301[4857–10601] vs 10797 [9017–13867] p<0,001). MASP-2 szint is szignifikánsan alacsonyabb volt (MASP-2: 212[126–359] vs 412 [285–586]) valamint a MASP-2 deficiencia (<100 ng/ml) is gyakrabban fordult elő cirrhosisos betegekben (19,5% vs 2% p<0,001).
Cirrhosisban a lektin útvonal mindhárom molekulájának a szintje fokozatosan csökkent a betegség súlyosságának Child-Pugh stádiumok szerinti előrehaladásával. Továbbá a MASP-2 szintekkel ellentétben mindkét típusú fikolin szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az asciteses betegekben.
A fikolin szintek bizonyos fokig összefüggtek a betegség etiológiájával. Mindkét típusú fikolin szint szignifikánsan alacsonyabb volt alkoholos cirrhosisban a nem alkoholos eredethez képest, de csak Child A stádium esetén (FCN-2: 505 [440 – 562] vs. 548 [489 – 679] ng/ml, p=0,001 és FCN-3: 7509 [5508 – 10897] vs. 10596 [7065 – 15379] ng/ml, p<0,001,), vagy azokban, akiknek nem volt ascitesük.. MASP-2 esetén nem találtunk hasonló összefüggést.
Szignifikáns összefüggést észleltünk a lektin útvonal molekulái és a máj orientált pontrendszerek (Child-Pugh és MELD), valamint a portális hiprtenzió laboratóriumi paraméterei, ill. a csökkent máj és vesefunkció között.

Stabil járóbetegek alcsoportjában (n=65) vizsgáltuk a szérum lektinszintek szekvenciális változásait. Először 33 beteg szérummintáit vizsgáltunk későbbi járóbeteg kontroll alkalmával is. (A két mintavétel között eltelt idő 655 [IQR: 246-1090] nap volt). Egyik vizsgált molekula szérumszintjében sem találtunk szignifikáns változást (FCN-2: 504 [458-600] vs. 479 [423-543], p=0,092; FCN-3: 9449 [5934-13070] vs. 8814 [5999-11006], p=0,837; MASP-2: 221 [129-369] vs. 208 [119-324], p=0,313). Ezen időszak alatt a Child-Pugh stádiumok között sem észleltünk szignifikáns változást (p=1,000 Wilcoxon rank tesztet alkalmazva).
Egy másik, 32 betegből álló alcsoportban AD epizód idején is elvégeztük a lektinszint méréseket. Egyik molekula szintjében sem találtunk szignifikáns eltérést (FCN-2 164 [107-284] vs. 178 [102-314], p=0,772; FCN-3: 6455 [3877-9204] vs. 5978 [3723-8751], p=0,400; MASP-2: 183 [106-329] vs. 167 [78-276], p=0,140). A két mintavétel között eltelt medián idő 555 nap [133–955] volt.

A lektin útvonalat alkotó molekulák szérumszintjének jelentősége a klinikailag jelentős bakteriális infekciók kialakulásában

A vizsgálatba bevont betegek közül 95 (35,7%) betegben alakult ki klinikailag jelentős bakteriális infekció (CSI) legalább egy alkalommal a követési idő alatt. Az első infekció kialakulásáig eltelt medián idő 626 [169-799] nap volt. A leggyakrabban diagnosztizált infekció a húgyúti infekció volt, ami 33,7%-ot tett ki, ezt a spontán bakteriális peritonitisz (24,2%) és

pneumónia (12,6%) követte. Az estek 5,3%-a multifokális eredetű volt. Egyéb bakteriális infekciók között észleltünk még orbáncot (4,2%), cholangitist (2,1%), bacteriaemiát (2,1%), akut bronchitist (3,2%) és az infekció helyét nem tudtuk meghatározni 12 esetben (12,6%). A lektin útvonal molekuláinak szérumszintjeiről elmondható, hogy a normál molekula szinthez képest az alacsony FCN-2 és FCN-3 szintek összefüggtek a klinikailag jelentős bakteriális infekciók növekvő kumulatív incidenciájával (FCN-2 esetében 62,6% vs. 46,7% HR: 1,55, 95%CI: 1,00-2,39, p=0,047 és FCN-3 esetén 59,3% vs. 48,2% HR: 1,61, 95%CI: 1,05-2,47, p=0,029)

A szérum fikolin profil,-amely esetén mindkét fikolin molekula szintjét egyidejűleg figyelembe vettük- lépcsőzetesen növekvő kumulatív incidenciát mutatott a klinikailag jelentős bakteriális infekció kialakulására nézve az alacsony fikolin szintek számának növekedésével: 45,7% volt mindkét fikolin normál szintje esetén, 57,2% ha két fikolin közül az egyiknek volt alacsony a szintje és 63,8% volt azokban, akiknél mindkét fikolin szint alacsonyabbnak bizonyult (HR: 2,00, 95%CI: 1,15-3,47, p=0,016). Nem találtunk hasonló összefüggést sem az individuális**,** sem a fikolinokkal kombinált MASP-2 deficiencia esetén.

A klinikailag jelentős bakteriális fertőzések kialakulásával összefüggő klinikai faktorok univariációs Cox regressziós analízise során az alkoholos betegségetiológia (HR: 1,68, 95%CI: 1,07-2,66, p=0,024), előrehaladott betegségstádium (Child-Pugh stage B/C [HR: 2,42, 95%CI: 1,61-3,64,p<0,001] vagy az ascites jelenléte [HR: 2,31, 95%CI: 1,54-3,46,p<0,001]) és korábbi CSI epizód (HR: 2,64, 95%CI: 1,76-3,96, p<0,001) szignifikánsan összefüggtek a klinikailag jelentős bakteriális infekciók kialakulásának valószínűségével. Multivariációs Cox regressziós analízisben azonban, mely mind a lektin útvonal molekuláinak szérumszintjeit, mind pedig a klinikai változókat számításba vette, azt mutatta, hogy csak a klinikai faktorok, mint az előrehaladott betegségstádium és korábbi CSI epizód bizonyultak a klinikailag szignifikáns bakteriális infekciók kialakulására nézve független kockázati tényezőnek, azonban ez nem állt fenn sem az egyes fikolinok, sem pedig a fikolin profil esetén.

Vizsgáltuk a szérum fikolin profil és a MASP-2 deficiencia lehetséges hatását a fertőzéshez kapcsolódó halálozásra (n=95). Az első bakteriális infekció lezajlása alatt 19 beteg (20,0%) halt meg. Sem a beválasztáskor észlelt fikolin szérum profil sem a MASP-2 deficienca nem volt összefüggésben a halálozás rizikójával a Kaplan-Meier túlélési analízisben. Az egész vizsgált cirrhosisos betegcsoportban a májbetegséghez kapcsolódó halálozás 85 esetben következett be (32%). Kaplan-Meier túlélési analízis megmutatta, hogy jelentősen rosszabb a túlélés azon betegekben, akiknek a betegsége előrehaladott a Child-Pugh stádiumnak megfelelően (p<0,001), akiknek volt ascitese (p<0,001) vagy megelőző már zajlott CSI epizódja (p=0,035).

MASP-2 deficiencia (p =0,387) vagy szérum fikolin profil (p =0,093) nem függött össze a teljes túléléssel.

MEGBESZÉLÉS

Antimikrobiális antitestek vizsgálata coeliakiában

Munkánk az első az irodalomban, mely relatíve nagy coeliakiás beteganyagban komplexen vizsgálta az összefüggéseket az új szerológiai marker panelek, a betegség klinikai tünetei és a NOD2/CARD15 státusz között. Az antimikrobiális antitestképződés folyamatának vizsgálata coeliakiás betegekben az antitestképződés megismerésének újabb eleme lehet.

Vizsgálatunkban bemutattuk, hogy a glikán ellenes antitestek (gASCA, ACCA, és AMCA) összefüggnek a coeliakiával a diagnózis felállításakor. Azonban az ALCA és az anti-OMP előfordulási gyakorisága nem különbözött a kontroll csoport eredményeitől. A gASCA pozitivitás aránya (39%) coeliakiás betegekben diagnóziskor összevethető volt korábbi coeliakiás betegcsoportban vizsgált eredményekkel.

A coeliakiás betegek adatait saját IBD-s beteganyagunkéval összehasonlítva az ASCA IgG prevalenciájában a két betegcsoport között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Az ASCA IgG gyakrabban fordult elő IBD-ben (50,5%), mint coeliakiában (35,7%), a különbség azonban nem bizonyult szignifikánsnak (p=0,091). Jelen vizsgálatban az ALCA kivételével a glikán ellenes antitestek előfordulása és a medián titerük coeliakiában a diagnózis felállításakor hasonló volt a korábban Crohn-betegség esetén leírtakhoz (coeliakia gASCA: 33,1 U/mL, AMCA 79,3 U/mL, ALCA 21,5 U/mL, ACCA 68,4 U/mL *vs* Crohn-betegség gASCA: 48,3 U/mL, AMCA 55,5 U/mL, ALCA 25,4 U/mL, ACCA 46,2 U/mL). Rádásul a pozitivitás aránya bármely antitest esetén összehasonlítható ezen betegcsoportokban (coeliakia *vs* Crohn betegség 65,9% *vs* 59,4%, p = NS). Továbbá a szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív érték coeliakiában összevethető volt a Crohn-betegségben megfigyeltekkel. Gasztrointesztinális tünetekkel rendelkező betegek esetén ASCA, AMCA vagy ACCA jelenléte nem csak fennálló Crohn-betegségre utalhat, hanem összefügghet kezeletlen coeliakiával is. Ugyanakkor eredményeink alapján az ALCA és az anti-OMP specifikus, de kevésbé szenzitív markernek bizonyult Crohn-betegségben.

Jelen adatok azt támasztják alá, hogy mind coeliakiában, mind Crohn-betegekben elsődleges defektus van a bél permeabilitásban, amely a rokonok alcsoportjaiban is észlelhető. Coeliakiában az antitestek megjelenése a glutén által provokált gyulladás és következményes

szövetkárosodás miatt kialakuló megnövekedett intestinalis permeabilitásnak tulajdonítható, míg a glutén étrendből történő eliminálása jelentősen csökkenti vagy normalizálja a fokozott intestinális permeabilitást. Feltételezhetően ezek a gliadin által indukált folyamatok (bél barrier károsodás) az okai az antimikrobiális antitest képződésének a betegségben. Ezt támasztja alá, hogy ezen vizsgálatban a glikán ellenes markerek és a TGA vagy EMA között összefüggést tudtunk kimutatni, továbbá az, hogy az antitest státusz alapvetően megváltozott a gluténmentes diéta bevezetését követően. A gASCA és egyéb glikánellenes antitestek teljesen eltűntek a vizsgált coeliakiás betegekben a szigorú, hosszú távú gluténmentes diéta után.

Jelen vizsgálatban megállapítottuk, hogy az antitestek eltűnésének kinetikája változóan érzékeny a gluténmentes diéta hosszára. A glikán ellenes antitestek közül az AMCA és ACCA csökkent leggyorsabban, közvetlenül amint a TGA titer elkezdett csökkenni.

Vizsgáltuk a lehetséges összefüggést a szerológiai válasz és a betegség klinikai tünetei között. Azon betegek, akikben a glikánokkal szemben többszörös szeroreaktivitást észleltünk gyakrabban mutattak súlyos malabsorptios tüneteket, mint azok, akiknél egyáltalán nem észleltünk egyik glikánnal szemben sem reaktivitást (63% *vs* 22%, $P = 0,019$), és körülbelül a malabsorptios esetek 53%-át tették ki. Az összes alcsoport közül a TGA titer azok esetében érte el a legmagasabb értéket (115,9 U/mL *vs* egyéb: 60,9 U/mL, $P = 0,016$), akiknél malabsorptio jelentkezett, mely szintén arra utal, hogy a fokozott intestinális permeabilitás az antitest képződés valószínűsíthető komponense. Jól ismert, hogy az intestinális károsodás malabsorpciós esetekben a legkifejezettebb és a TGA a szöveti sérülés jó markere. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a különböző klinikai prezentációs csoportokban az esetek száma alacsony volt, ezért további vizsgálatok szükségesek nagyobb coeliakiás betegcsoportban az eredmények megerősítésére.

Legutóbbi adatok felvetik annak a lehetőségét, hogy az antimikrobiális antitestek jelenléte, legalábbis részben genetikai hajlamhoz kapcsolható. Coeliakiasokban mi nem figyeltünk meg semmilyen összefüggést a glikán ellenes antitestek és a NOD2/CARD15 variáns jelenléte között. Coeliakiában az antimikrobiális antitest képződésben örökletes vonás nem valószínű, mivel nem találtuk magasabbnak az ASCA (9,1% *vs* 14%) és az anti-OMP(12,1% *vs* 20%) prevalenciát ezen vizsgálatban a 66 első fokú, nem érintett rokon (testvér) esetében.

A szerológiai válasz jelenléte feltehetőleg a bél mikroflóra elemeinek tartós jelenléte miatt kialakuló reakció, mely a megnövekedett bakteriális transzlokáció következtében alakul ki. A vékonybélből származó fokozott bakteriális transzlokáció jelentőségét az antimikrobiális antitestképződésben továbbá alátámasztja az a tény is, hogy Crohn-betegekben a szerológiai

válasz jelenléte főképp a komplikált (strikturáló vagy penetráló) vékonybél érintettségben jellemző és ritkábban észlelt izolált colon betegség vagy colitis ulcerosás betegek esetében. Ugyanakkor a gyógyult bélfal véd a mikrobák, illetve azok komponenseinek inváziójától és ez az antimikrobiális antitest képződés megszűnéséhez vezet. Coeliakiában ez a folyamat igazolható annak megfigyelésével, hogy az antitestképződés csak átmeneti jelenség. A gliadin expozíció megszűnése és az ezt követő nyálkahártya gyógyulás eredményeképp az antitestek teljesen eltűnnek.

Adataink ezenfelül szükségessé tesznek kiegészítő alapkutatásokat, hogy feltárják a kommenzális bélbaktériumokra adott immunválasz pontos mechanizmusait, csakúgy mint a bakteriális transzlokáció lehetséges klinikai jelentőségét a betegség vagy a szövődmények kialakulásában, ami már kellően megalapozott egyéb kórállapotokban, mint pl. májcirrhosis, akut pancreatitis vagy szepszis.

Májcirrhosisos betegek

Jelen tudásunk szerint vizsgálatunk a legnagyobb tanulmány, ami komplex összefüggéseket vizsgál a lektin útvonal molekuláinak szérumszintjei a betegség etiológiája és súlyossága között májcirrhosisos betegek nagy esetszámú csoportjában. Vizsgáltuk a lektin útvonal két mintázatfelismerő molekuláját (FCN-2 és FCN-3) és egy effektor molekuláját (MASP-2).

A lektin útvonal komponenseinek szérumszintje egészséges egyénekben is nagy egyének közötti variabilitást mutat. Jelen vizsgálatban median MASP-2 szint és a MASP-2 deficiencia jelenléte megegyezett a korábban közöltekkel, míg FCN-2 és FCN-3 szintek alacsonyabbak voltak. Az eltérés feltehetőleg a módszerek és a kutatáshoz felhasznált különféle anyagok sokfélesége miatt van. MASP-2 esetében kereskedelemben elérhető assay-t alkalmaztunk, ami a komplement/lektin tanulmányokban széles körben használt. A FCN-2 és FCN-3 szintek méréséhez azonban in-house kettős antitest sandwich ELISA-t használtunk.

Stabil cirrhosisos járóbetegek nagy csoportjában (n=266) azt találtuk hogy mindhárom molekula szérumszintjei szignifikánsan alacsonyabbak voltak az egészséges kontroll csoporthoz képest.

Annak oka, hogy a lektinek szérumszintjei a cirrhosisos betegekben miért csökkennek további magyarázatokat igényel. Egy lehetséges magyarázat lehet az, hogy cirrhosisban hepatocyták szintetikus kapacitása károsodott és feltehetőleg a vérkeringés a szervben gátolt, ami a molekulák csökkent termelődését vagy a perifériás vérbe való kijutását eredményezi. Ezt a feltételezést támasztja alá az eredményünk, hogy a FCN-2, FCN-3 és MASP-2 szintek

fokozatosan csökkentek a betegség súlyosságának megfelelően. Szignifikáns összefüggés volt a máj szintetikus funkciójának laboratóriumi jellemzői (szérum albumin szint és INR) és a különböző lektin szintek között, melyek a betegség súlyosságának megfelelő fokozatos csökkenést mutattak.

Jelen vizsgálatban a lektin szintek intra-individuálisan hosszú távon is stabilak voltak, és változatlanok maradtak az akut dekompenzáció (AD) korai fázisában is, ami lehetővé teszi, hogy szerológiai biomarkerekként használjuk őket hosszú távon is.

Tanulmányunkban végeztünk továbbá egy követéses vizsgálatot is, melyben vizsgáltuk, hogy fikolinok alacsony szintje vagy a MASP-2 deficencia kockáztai tényezőnek tekinthető-e a cirrhosisos betegekben a klinikailag jelentős infekciók kialakulás szempontjából.

FCN-2 és *MASP2* gén promoter és a kódoló régiói számos SNP-t foglalnak magukba, ami a fehérje koncentrációra hatással van, de relatíve kevés SNP-t azonosítottak az FCN-3 génen. Egyértelműen alátámasztott, hogy a genotípusnak nagyon kevés befolyása van az átlagos protein koncentrációra. A gén polimorfizmusoktól eltekintve ezen gének up/downregulációja és a szérum proteinek csökkenése/növekedése úgy tűnik összefüggésben van a különféle gyulladásos és fertőzéses betegségekkel. Továbbra is megállapításra vár, hogy a nem genetikai befolyás van-e annyira erős, mint a genotípus, vagy annál is erősebb. Ezen limitáló tényezők miatt elemeztük a lektin útvonal molekuláinak szérum szintjeit a genotipizálás helyett. Amennyiben szerológiai markert használunk hosszú távú előrejelzésre, akkor fontos, hogy ezen molekula szérumszintjeinek stabilnak kell lenniük legalább bizonyos időperiódus alatt és bizonyos körülmények között. Ennek megfelelően meghatároztuk a FCN-2, FCN-3 és MASP-2 szérum szintek stabilitását a betegek egy alcsoportjában. A mintavételek között eltelt medián idő összevethető volt az első klinikailag jelentős bakteriális infekció megjelenéséig eltelt idővel. Ezen molekulák egyikének szérumszintje sem mutatott szignifikáns változást az idő elteltével. Nem volt észlelhető szignifikáns változás a betegség súlyosságában sem ezen periódus alatt.

A mintázatfelismerő molekulák alacsony szintje a mikrobák elégtelen felismeréséhez és csökkent komplement aktivációhoz, opszonizációhoz, gyulladásos citokin szekrécióhoz vezet, ami az infekciókra való fokozott fogékonyságot eredményez. Ezért ésszerű feltételezni, hogy a lektin útvonal molekuláinak szérumszintjei összefügghetnek a cirrhosisos betegek bakteriális infekciós epizódjaival, azonban ezt eddig még nem vizsgálták. Az általunk vizsgált betegcsoportban a klinikailag szignifikáns bakteriális infekciók kumulatív valószínűsége szignifikánsan magasabb volt azon egyéneknél, akinél vagy a FCN-2 vagy a FCN-3 csökkent, ez tovább fokozódott, ha mindkét lektin esetén alacsony szinteket mértünk. Ez az összefüggés

nem volt független a betegség súlyosságától. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a csökkent fikolin szintek előrehaladott cirrhosisban a májsejtek szintetikus kapacitás-károsodásának következményei, és nincs olyan jelentős helyettes, ami ezt a funkciójukat pótolni tudja. Ezért a lektindeficienciák a cirrhosishoz kapcsolódó immundeficiencia fontos, szerzett alkotóelemeinek tekinthetők. Nem zárható azonban az ki, hogy egyéb, az alternatív útvonalat hasonlóképpen aktiváló, de más epitópokat felismerő szolubilis mintázatfelismerő molekulák (MBL, M-fikolin, kollektin 10 és 11) azért valamelyest képesek enyhíteni a FCN deficiencia immunológiai hatásait.

Prognosztikai szempontból az eredményeink nem hordoztak új információt, azonban pathológiai szempontból ezek az új felismerések figyelemre méltók. A szolubilis mintázatfelismerő molekulák (sPRMs) a nem antibiotikum alapú infekció profilaxis célpontjai lehetnek. Előrehaladott májcirrhosisban, amikor májfunkció javulása májtranszplantáció nélkül nem lehetséges, a cirrhosishoz társuló immundiszfunkciós szindróma komponenseinek korrekciója csökkenthetné a kialakuló, és döntően halálhoz vezető infekciók gyakoriságát. MBL deficiencia esetén az MBL szint helyreállítása javította a túlélést, biztonságosnak és hatékonynak bizonyult mind pre-klinikai, mind a korai fázis II. vizsgálatokban. Hasonló vizsgálatok végzése fikolin deficiencia esetén is jelentőséggel bírhat.

Jelen vizsgálatunkban a MASP-2 szintek nem függtek össze a klinikailag szignifikáns infekciók gyakoriságával. Kétségtelenül vizsgálatunk limitáló tényezője az, hogy nem végeztünk funkcionális analízist. Így nem zárhatjuk ki, hogy a MASP-2 aktivitás összefügghet a vizsgált klinikai kimenetekkel.

A lektin útvonal molekuláinak a betegek beválasztásakor vizsgált szérumszintje nem mutattak összefüggést az infekcióval összefüggő halálozással. Mivel a komplement rendszernek a betegségekre való fogékonyságban kettős szerepe van, feltételezhetjük, hogy inkább a gyulladásos folyamat során túlzott aktiváció következtében létrejövő szövetkárosodás tűnik ártalmasabbnak, mint a működés hiánya. Ebből következően további értékelések és tanulmányok elvégzése indokolt a jövőben a lektin útvonal vizsgálatára cirrhosisos betegekben.

.

FŐBB ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Coeliakia

1. Coeliákiában a glikán ellenes antitestek előfordulása gyakori a diagnózis felállításakor, a kezelés megkezdése előtt.

2. Az antitestek prevalenciája és azok titer értékei nagyon hasonlóak a Crohn-betegségben észleltekéhez és kapcsolatot mutatnak a betegség klinikai megjelenésével, a NOD2/CARD15 mutáció jelenlétével azonban nem.

3. A legmagasabb glikán ellenes antitest prevalencia és titer értékek a legsúlyosabb klinikai formában jelentkező betegség, a malabszorpció esetén észlelhető.

4.Kellő hosszúságú és megfelelő gluténmentes diéta hatására az antitestek a szérumból teljesen eltűnnek.

5. A glikán ellenes antitestek előfordulása coeliakiás betegek egészséges elsőfokú hozzátartozóiban nem gyakoribb.

6. Eredményeink alapján az ASCA és egyéb glikán ellenes antitestek a coeliakia és a gluténmentes diéta compliance kiegészítő markereinek tekinthetők

Májcirrhosis

1. Elsőként számoltunk be nagyszámú májcirrhosisos beteganyagban a lektin komplement útvonal molekuláiról komplex módon. A szérum lektin szintek összefüggést mutatnak a májbetegség súlyosságával és a portális hipertenzió jelenlétével. A lektinszintek nem mutattak összefüggést a májcirrhosis etiológiájával.

2. Vizsgálatunkban a szérum lektin szintek intra-individuálisan hosszú távon is stabilak, és változatlanok maradtak a májcirrhosis akut dekompenzációjának korai fázisában, ami lehetővé teszi, hogy szerológia biomarkerekként használjuk őket hosszú távon is.

3. Eredményeink arra utalnak, hogy a csökkent fikolin szintek előrehaladott cirrhosisban a májsejtek szintetikus kapacitás-károsodásának következményei, és nincs olyan jelentős helyettes, ami ezt a funkciójukat pótolni tudja. Ezért az észlelt lektin deficiencia a cirrhosishoz társuló immundiszfunkciós szindróma új alkotóelemének tekinthető.

4. Prognosztikai szempontból az eredményeink nem hordoztak új információt a jelenleg elérhető klinikai prognosztikai faktorokhoz képest és nem alkalmasak a rizikóbecslés mátrix modelljébe való bevonásra, mert az infekciók prognosztikájában független kockázati tényezőként nem alkalmazhatók.

5. A lektinek nem antibiotikum típusú infekcióprofilaxis célmolekulái lehetnek a májcirrhosisos betegekben .

Nyilvántartási szám: DEENK/30/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Földi Ildikó
Neptun kód: C98QK7
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Földi, I.**, Tornai, T., 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. [Epub ahead of print], 2017.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1111/liv.13368
   IF: 4.47 (2015)

2. Papp, M.*, **Földi, I.***, Altorjay, I., Pályu, E., Udvardy, M., Tumpek, J., Sipka, S., Korponay-Szabó, I., Nemes, É., Veres, G., Dinya, T., Tordai, A., Andrikovics, H., Norman, G. L., Lakatos, P. L.: Anti-microbial antibodies in celiac disease: trick or treat?
   World J. Gastroenterol. 15 (31), 3891-3900, 2009.
   DOI: http://dx.doi.org/10.3748/wjg.1515.383891
   * Megosztott első szerzős közlemény.
   IF: 2.092

További közlemények

3. Papp, M., Norman, G. L., Vitális, Z., Tornai, I., Altorjay, I., **Földi, I.**, Udvardy, M., Shums, Z., Dinya, T., Orosz, P., Lombay, B., Pár, G., Pár, A., Veres, G., Csak, T., Osztovits, J., Szalay, F., Lakatos, P. L.: Presence of Anti-Microbial Antibodies in Liver Cirrhosis: a Tell-Tale Sign of Compromised Immunity?
PloS One. 5 (9), e12957-1-e12957-9, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012957
IF: 4.411

4. Molnár, K., Papp, M., Szőnyi, L., Lakatos, P. L., Tornai, I., **Földi, I.**, Arató, A., Dezsőfi, A., Veres, G.: Haptoglobin polimorfizmus vizsgálata gyermekkori és felnőttkori primer szklerotizáló cholangitisben.
Gyermekgyógyászat. 59 (5), 277-281, 2008.

5. Papp, M., **Földi, I.**, Nemes, É., Udvardy, M., Hársfalvi, J., Altorjay, I., Máté, I., Dinya, T., Várvölgyi, C., Barta, Z., Veres, G., Lakatos, P. L., Tumpek, J., Tóth, L., Szathmári, E., Kapitány, A., Gyetvai, Á., Korponay-Szabó, I.: Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations.
Clin. Chem. 54 (4), 697-704, 2008.
DOI: http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.098780
IF: 5.579

6. Papp, M., Nemes, É., **Földi, I.**, Udvardy, M., Hársfalvi, J., Altorjay, I., Máté, I., Dinya, T., Várvölgyi, C., Barta, Z., Veres, G., Lakatos, P. L., Tumpek, J., Tóth, L., Szathmári, E., Kapitány, A., Gyetvai, Á., Korponay-Szabó, I.: Haptoglobin-polimorfizmus: új genetikai kockázati tényező a coeliakia kialakulásában és klinikai megjelenési formáiban.
Gyermekgyógyászat. 59 (5), 264-270, 2008.

7. Papp, M., Altorjay, I., Dotan, N., Palatka, K., **Földi, I.**, Tumpek, J., Sipka, S., Udvardy, M., Dinya, T., Lakatos, L., Kovács, Á., Molnár, T., Tulassay, Z., Miheller, P., Norman, G. L., Szamosi, T., Papp, J., The Hungarian IBD Study Group, Lakatos, P. L.: New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort.
Am. J. Gastroenterol. 103, 665-681, 2008.
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01652.x
IF: 6.444

KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA
EGYETEMI ÉS NEMZETI

8. Papp, M., Lakatos, P. L., Palatka, K., **Földi, I.**, Udvardy, M., Hársfalvi, J., Tornai, I., Vitális, Z., Dinya, T., Kovács, Á., Molnár, T., Demeter, P., Papp, J., Lakatos, L., Altorjay, I.: Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behavior, and extraintestinal manifestations in Hungarian patients.
Dig. Dis. Sci. 52 (5), 1279-1284, 2007.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s10620-006-9615-1
IF: 1.319

9. Papp, M., Altorjay, I., Norman, G. L., Shums, Z., Palatka, K., Vitális, Z., **Földi, I.**, Lakos, G., Tumpek, J., Udvardy, M. L., Hársfalvi, J., Fischer, S., Lakatos, L., Kovács, Á., Bene, L., Molnár, T., Tulassay, Z., Miheller, P., Veres, G., Papp, J., Lakatos, P. L.: Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients.
Inflamm. Bowel Dis. 13 (8), 984-992, 2007.
DOI: http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20146
IF: 4.705

10. Papp, M., Lakatos, P. L., Palatka, K., **Földi, I.**, Udvardy, M., Hársfalvi, J., Tornai, I., Vitális, Z., Dinya, T., Kovács, Á., Molnár, T., Demeter, P., Papp, J., Lakatos, L., Altorjay, I.: Haptoglobin polimorfizmus vizsgálata gyulladásos bélbetegségekben.
Orv. Hetil. 147 (36), 1745-1750, 2006.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,02
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,562

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

Debrecen, 2017.02.17.