

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés

**VASCULARIS, IMMUNOLÓGIAI ÉS GENETIKAI TÉNYEZŐK
LEHETSÉGES PATOGENETIKAI SZEREPE NÉHÁNY
GASZTROENTEROLÓGIAI KÓRKÉPBEN**

DR. PAPP MÁRIA

Témavezetők:

Prof. Dr. Udvardy Miklós
Egyetemi tanár

Dr. Altorjay István
Habilitált egyetemi docens

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BELGYÓGYÁSZATI INTÉZET
GASZTROENTEROLÓGIAI TANSZÉK**

**DEBRECEN
2008**

Tartalomjegyzék

1.	Összefoglalás	3
2.	Summary	5
3.	Rövidítések jegyzéke	7
4.	Bevezetés.....	10
5.	Irodalmi áttekintés	16
6.1	Haptoglobín polimorfizmus	16
6.2	Szerológiai és genetikai vizsgálatok gyulladásos bélbetegségekben.....	22
6.	Anyagok és módszerek.....	26
7.1	Haptoglobín fenotípus/genotípus analízis	26
7.2	Antimikrobiális- és autoantitest vizsgálatok.....	28
7.2.1	Antimikrobiális antitest vizsgálatok	28
7.2.2	Autoantitest vizsgálatok	28
7.3	Genetikai vizsgáló eljárások.....	32
7.4	Etikai engedélyek	33
7.5	Anyagi források.....	33
7.6	Betegek kiválasztása	33
7.6.1	Haptoglobín polimorfizmus vizsgálathoz.....	33
7.6.2	Szerológiai vizsgálatokhoz	35
8.	Eredmények.....	36
8.1	Haptoglobín polimorfizmus vizsgálata.....	36
8.1.1	Haptoglobín polimorfizmus: új genetikai kockázati tényező a coeliakia kialakulásában és klinikai megjelenési formáiban.....	36
8.1.2	Haptoglobín polimorfizmus kapcsolata a Crohn-betegség viselkedésével és extraintesztinális manifesztációival	42
8.1.3	Megbeszélés	45
8.2	Szerológia vizsgálatok gyulladásos bélbetegségekben.....	49
8.2.1	A mikrobiális antigének elleni szerológiai válasz Crohn-betegségben összefügg a vékonybél érintettséggel, a nem-gyulladásos típusú betegség lefolyással és a NOD2/CARD15 genotípussal, de nem korrelál a gyógyszeres kezelésre adott válasszal és műtétek gyakoriságával	49
8.2.2	Megbeszélés	58
8.2.3	Etanol- és formalin-fixált neutrofil granulocita szubsztrátok együttes alkalmazásának vizsgálata az atípusos P-ANCA kimutatására IBD-ben: specificitás és reprodukálhatóság	62
8.2.4	Megbeszélés	70
7.	Főbb új tudományos eredmények.....	74
8.	Köszönetnyilvánítás.....	76
9.	Saját publikációk jegyzéke	79
10.	Felhasznált irodalom	88

1. Összefoglalás

A coeliakia és a gyulladásos bélbetegségek (IBD) változatos klinikai megjelenését befolyásoló faktorok jelentős része ismeretlen. A haptoglobin (Hp) molekula három fő fenotípusa különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns tulajdonsággal rendelkezik, és ezek kapcsolatot mutatnak egyes gyulladásos betegségek kórlefolyásával. A Hp α -lánc 1-1 genotípusa kis molekulású dimerek, a 2-1 genotípusa különböző hosszúságú lineáris polimerek, a 2-2 genotípusa ciklikus polimerek képződését eredményezi. Munkánk során vizsgáltuk a Hp polimorfizmus megoszlását, valamint annak lehetséges kapcsolatát a betegség klinikai megjelenésével nagyszámú coeliakiás és IBD betegben. A Hp fenotípusokat nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) és immunblottal határoztuk meg, mely egyértelműen azonosítja a betegek genotípusát is. Az eredményeket az egészséges magyar népeiséget reprezentáló kontrollokhoz viszonyítottuk. Coeliakiás betegekben a Hp2-1 típus előfordulása szignifikánsan gyakoribb, míg a Hp2-2 típusé ritkább volt az egészséges populációban találtakhoz képest. A Hp2-2 fenotípusú személyeknél azonban a súlyos, malabszorpcióval jelentkező klinikai betegség kockázata magasabb volt, a silent betegségé viszont jóval alacsonyabb. Dermatitis herpetiformisban a Hp fenotípusok megoszlása nem tért el a coeliakiás csoporttól. A Hp fenotípusok megoszlása IBD-ben nem különbözött az egészséges populációban észlelttől. Ugyanakkor Crohn-betegekben a Hp2-1 fenotípus esetén a gyulladásos (nem stenotizáló, nem penetráló) betegségforma előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt a másik két Hp fenotípushoz viszonyítva, míg a stenotizáló forma előfordulása ritkább. Továbbá az extraintesztinális manifesztációk közül primer szklerotizáló cholangitisben a Hp1-1 fenotípus egyáltalán nem fordult elő. A Hp szerepét a molekula immunreakciókban betöltött moduláló hatásai és eltérő térszerkezete magyarázhatják.

A mikrobiális- és autoantigének elleni szerológiai válasz, mint a *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) és *Escherichia coli* külső membrán porin C elleni antitestek (anti-OmpC) vagy a perinukleáris antineutrofil citoplazmatikus antitestek (P-ANCA) segítséget jelenthetnek az IBD differenciál diagnosztikájában és újabb adatok szerint összefüggést mutathatnak a betegség fenotípusával. Munkánk során nagyszámú IBD betegben és egészséges kontroll egyénekben vizsgáltuk a fenti antitestek előfordulási gyakoriságát és azok lehetséges kapcsolatát a betegség klinikai megjelenésével, lefolyásával, az

extraintesztinális tünetekkel és a veleszületett („innate”) immunitásban szerepet játszó receptorok mutációival és polimorfizmusával. Vizsgáltuk továbbá az antitestek szerepét a kezelés hatékonyságának előrejelzésében. Értékeljük az etanol-fixált neutrofil granulocytá preparátumokkal párhuzamosan használt formalin-fixált szubsztrátok alkalmazhatóságát az IBD asszociált atípusos P-ANCA mintázat azonosításában. A módszer sorozatok (*inter-assay*) és vizsgálók közötti (*inter-observer*) variabilitását az egyes mintáknak négy különböző kereskedelmi forgalomban elérhető assay felhasználásával, két különböző laboratóriumban történő tesztelésével határoztuk meg. Az ASCA és az anti-Omp meghatározás szérumból történt enzimvel kapcsolt immunoszorbens assay-val (ELISA), az ANCA meghatározás pedig indirekt immunfluoreszcens (IIF) vizsgálattal. A nucleotid oligomerisatio domain/caspase recruitment domain (NOD2/CARD15) mutációkat és a toll-like receptor (TLR)-4 D299G variánsokat polimeráz láncreakció/restríktio frágmenek hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálat segítségével határoztuk meg. A szerológia markerek hasznosnak bizonyultak a Crohn-betegség és a colitis ulcerosa differenciál diagnosztikájában. Az ASCA és az anti-Omp antitestek jelenléte Crohn-betegség, míg az atípusos P-ANCA pozitivitás colitis ulcerosa fokozott kockázatával járt. Az etanol-fixált neutrofil granulocyták mellett alkalmazott formalin-fixált preparátumok azonban IBD-ben nem segítettek a P-ANCA és az atípusos P-ANCA elkülönítésében. A különféle P-ANCA mintázatok együttes értékelése a Crohn-betegség és a colitis ulcerosa differenciál diagnosztikájában a specificitás és szenzitivitás növekedését eredményezte. Továbbá csökkentette a különféle kereskedelmi forgalomban elérhető tesztek *inter-assay* és az *inter-observer* variabilitását. Crohn-betegségben az ASCA és az anti-Omp pozitivitás a vékonybél érintettség és a nem-gyulladásos betegségforma szempontjából a logisztikus regresszió analízisben is független rizikófaktornak bizonyultak, míg a műtéti kockázat, a szteroid és infliximab kezelésre adott válaszkészség tekintetében nem. A szerológiai válasz vonatkozásában nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív összefüggés is kimutatható volt. A nem-gyulladásos típusú vékonybél Crohn-betegség és az antimikrobiális antitest pozitivitások száma, illetőleg az antitest titerek között szintén pozitív korrelációt találtunk (szerológiai-dózis hatás). Az ASCA és az anti-Omp antitestek jelenléte kapcsolatot mutatott a NOD2/CARD15 genotípussal. Az antimikrobiális antitestek előfordulási gyakorisága szignifikánsan nőtt a NOD2/CARD15 mutációk számának növekedésével, mely gén-dózishatásra utal és alátámasztja a mikrobákkal szembeni megváltozott érzékelés szerepét a Crohn-betegség patogenezisében.

2. Summary

Clinical presentations of the celiac disease and inflammatory bowel diseases (IBD) are highly variable but little is known about those factors determining disease phenotype. Since differences in the antioxidant, scavenging and immunomodulatory properties were found among three major haptoglobin (Hp) phenotypes, Hp polymorphism was reported to be associated with the risk and clinical course of inflammatory diseases. The *1-1* genotype of Hp α -chain results in production of low molecular weight dimers, while the *2-1* and *2-2* genotype are associated with variable length of linear polymers and cyclic polymers, respectively. The aim of our study was to investigate the distribution of Hp polymorphisms in large cohort celiac patients and in patients with IBD, and also their possible association with the clinical presentation of these diseases. Hp phenotypes were determined by sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting of the sera, which clearly identifies the genotype of the patients. The Hp results were compared to a group of healthy individuals representing the normal Hungarian population. In celiac patients, the frequency of Hp2-1 phenotypes was significantly higher compared to the control population. The occurrence of Hp2-2 phenotype was lower; however patients having this phenotype were at an increased risk of severe malabsorption as a clinical presentation of the disease but reduced risk of silent disease. Patients with dermatitis herpetiformis showed similar Hp phenotype distribution to those in the whole celiac patients group. The Hp phenotype distribution showed no difference in IBD group as compared to control population. In Crohn's disease, patients with Hp 2-1 type carried a higher probability for inflammatory (non-stricturing, non-penetrating) form compared to the other two phenotypes, while the stricturing form developed less frequently. Regarding extraintestinal manifestations of the disease, we found no Hp1-1 expression in patients with primary sclerosing cholangitis. The role of Hp molecules may be contributed to their distinct immunomodulatory properties and structural characteristics.

Sero-reactivity to microbial components like *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) and outer membrane porin protein C of *Escherichia coli* (anti-OmpC) or autoantibodies directed against perinuclear components of neutrophils (P-ANCA) are reported to be associated with disease phenotype and may be of diagnostic importance in IBD. The aim of our study was to investigate the prevalence of serological markers in a large cohort of IBD patients and healthy controls. We also assessed the possible interaction with the clinical presentation, response to treatment and extraintestinal manifestations.

Additionally, we studied the relationship between serological response and genetic factors. We analyzed the feasibility of using the combination of ethanol-fixed and formaldehyde-fixed neutrophil substrates in the identification of IBD associated atypical P-ANCA. We also examined the *inter-assay* variability of this method by comparing four different commercially available assays, and the *inter-observer* precision based on the results of two distinct laboratories. Sera were assayed for ASCA and anti-Omp by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and ANCA by indirect immunofluorescence (IIF) method. The nucleotide-binding oligomerization domain/ caspase recruitment domain (NOD2/CARD15) and the toll-like-receptor (TLR)-4 variants were tested by polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Serological markers were useful in the differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. ASCA and anti-Omp positivity were associated with increased risk for Crohn's disease. In addition, atypical P-ANCA was associated with increased risk for ulcerative colitis. The combined application of ethanol-fixed and formaldehyde-fixed substrates did not facilitate the differentiation between P-ANCA and atypical P-ANCA, and the results were not consistent when using substrates from different sources. Combining all P-ANCAs (typical and atypical) together ensures the highest sensitivity and specificity in differentiating ulcerative colitis from Crohn's disease. In a logistic regression analysis, ASCA and anti-Omp were independently associated with ileal and non-inflammatory disease, but not with a risk for surgery or response to steroids or infliximab. In addition to qualitative correlations, quantitative correlations with serological response were also present. The number of antibodies produced against microbial antigens and their titers in Crohn's disease showed a positive correlation with the small bowel involvement and the severity of the disease course (serology dosage effect). Moreover, reactivity to microbial components was associated with NOD2/CARD15 genotype. Positive correlation was found between the number of mutations and the prevalence of antimicrobial antibodies (gene dosage effect), further supporting the role of altered microbial sensing in the pathogenesis of Crohn's disease.

3. Rövidítések jegyzéke

ANA: antinukleáris antitest

Anti-CBiR1: flagellin ellenes antitest

Anti-I2: anti-*Pseudomonas fluorescens* antitest

Anti-OmpC/ Anti-Omp: anti-outer membrane porin protein C antibody of *Escherichia coli* (anti-*Escherichia coli* külső membrán porin C antitest)

ASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest

ANCA: anti-neutrophil cytoplasmic antibody (antineutrofil citoplazmatikus antitest)

BPI: natural antibiotic bactericidal permeability increasing protein (természetes antibiotikus baktericid permeabilitást fokozó protein)

C-ANCA: citoplazmatikus ANCA

CDAI: Crohn Betegség Aktivitási Index

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

CI: konfidencia intervallum

CO: szén-monoxid

DHPLC: denaturing high performance liquid chromatography (nagyteljesítményű denaturáló folyadékkromatográfia)

DNS: dezoxi-ribonukleinsav

DNAse: dezoxi-ribonukleáz

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (enzimmel kapcsolt immunoszorbens assay)

EMA: endomysium elleni antitest

gASCA: glikán anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest

Hb: hemoglobin

HbSR: haptoglobin-hemoglobin scavenger receptor

HLA: humán leukocita antigén

HMG: high mobility group non-histone chromosomal protein

Hp: haptoglobin

HO-1: hemoxigenáz-1

IBD: inflammatory bowel diseases (gyulladásos bélbetegségek)

IL: interleukin

Ig: immunglobulin

IIF: indirekt immunfluoreszcencia

INF: interferon

IQR: interquartile range (interkvartilis tartomány)

LDL: low-density lipoprotein

LPI: labile plasma iron (labilis plazma vas)

LRR: leucine-rich repeat (leucingazdag ismétlődés)

LPS: lipopoliszacharid

MBL: mannan-binding lectin (mannóz-kötő lektin)

MPO: mieloperoxidáz

MHC: major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)

NO: nitrogén-oxid

NOS: NO szintáz

NOD2/CARD15: nucleotid oligomerisation domain/caspase recruitment domain

NPV: negatív prediktív érték

NS: nem szignifikáns

OR: odds ratio (esélyhányados)

P-ANCA: perinukleáris ANCA

PCR-RFLP: polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism (polimeráz láncreakció-restrikciós fragmens hossz polimorfizmus vizsgálat)

PGN: peptidoglikán

PPV: pozitív prediktív érték

PR3: proteináz-3

PSC: primer szklerotizáló cholangitis

PRR: pattern recognition receptor (mintázatfelismerő receptor)

SD: standard deviáció

SDS-PAGE: sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electroforesis (nátrium-dodecyl-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)

SNP: single nucleotide polymorphism (egy pontos nukleotid polimorfizmus)

Anti-TG: transzglutamináz elleni antitest

TLR: toll-like receptor

TNF- α : tumor nekrosis faktor-alfa

4. Bevezetés

A coeliakia különféle szervrendszereket érintő krónikus gyulladásos megbetegedés, autoimmun komponensekkel. A betegség genetikailag fogékony egyénekben a kalászos gabonafélékkel fogyasztott glutén-típusú fehérjék gliadin komponensének hatására alakul ki, és bármely életkorban manifesztálódhat. Amennyiben nem jut glutén a szervezetbe, a kórfolyamat önmagától leáll, a betegség klinikai tünetei megszűnnek. A gluténintolerancia azonban életreszóló¹. A diagnózis a vékonybélben kialakuló boholykárosodás és a transzglutamináz (TG) elleni immunreakció együttes kimutatásán alapul. A betegség manifesztálódásához a fő hisztokompatibilitási génekben (MHC II) a humán leukocita antigén (HLA)-DQ2 vagy DQ8 heterodimer jelenléte mindenképpen szükséges, hordozásuk azonban önmagában nem elegendő. Coeliakiában a női túlsúly már régóta ismert. A nem HLA-asszociált gének feltételezett szerepe a betegségre való fogékonyság kialakulásában legalább 50%-os, de a szóhajóvő különböző gének által jelentett kockázat egyenként jóval alacsonyabb, mint a HLA géneké és a közölt adatok helyenként ellentmondásosak².

A coeliakiához vezető korai patológiás történések magukba foglalják az innate immunrendszer aktivációját is, mely elsősorban az epiheliumban zajlik. Bizonyos gluten peptidek (p31-p43) fokozzák az aktivált dendritikus sejtek interleukin (IL)-15 szekrécióját, ami végső soron az intraepitheliális lymphocyták aktivációjához vezet (NKG2D receptorokat expresszálnak). Ezek a sejtek citotoxikus lymphocytává alakulnak át és az enterocyták további károsodásához vezetnek (az NKG2D ligandja az enterocyták felszínén lévő MIC-A). Ez megelőzheti a lamina propriában a szöveti transzglutamináz által deamidált gluten peptidek és a HLA-DQ2 és DQ8 molekulák kapcsolódásával aktivált adaptív CD4+ T sejt válasz kialakulását, mely a coeliakia patogenezisének egyik kulcslépése, aholis az interferon-gamma (IFN- γ) alapvető fontosságú (T-helper [Th] 1 dominanciájú folyamat)³.

Klinikai megjelenését tekintve a coeliakia rendkívül változatos kórkép, a befolyásoló faktorok jelentős része azonban ismeretlen⁴. Az újabb epidemiológiai vizsgálatok eredménye alapján a betegség jóval gyakoribb, mint azt korábban gondoltuk: az európai és észak-amerikai lakosság mintegy 1%-át érinti, azonban a felismert esetek száma ennél jóval kevesebb^{5,6}. A szerológiai módszerek széleskörű elterjedésének, valamint a betegség

egyre tudatosabb keresésének eredményeképpen jelentős csökkenés figyelhető meg a tünetek kezdete és a diagnózis felállítása között eltelt időtartamban. Továbbá a betegség felismerésekor a kevésbé súlyos tünetek dominálnak; egyre kevésbé találkozhatunk a klasszikus klinikai képpel, a malabszorpcióval³.

A gyulladássos bélbetegségek (IBD) a gasztrointesztinális traktust érintő krónikus megbetegedések. Két fő formájuk a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség, melyek diagnózisa a klinikai kép, az endoszkópos és radiológiai lelet, valamint a szövettani vizsgálat együttes eredménye alapján általában egyértelműen felállítható, ugyanakkor a betegség etológiája máig ismeretlen, multifaktoriálisnak tekinthető⁷. Mai elképzelésünk szerint az IBD genetikailag fogékony egyénben bizonyos környezeti (pl. enterális, mikrobiális) antigének és a mucosalis immunrendszer sajátos kölcsönhatása révén alakul ki. Egyre nyilvánvalóbbnak tűnik, hogy mind környezeti, mind genetikai tényezők fontosak nemcsak a betegségre való hajlam kialakításában, hanem a betegség viselkedésének, terápiás befolyásolhatóságának meghatározásában. Az újabb kutatási eredmények szerint az IL-23 az egyik kulcsfontosságú citokin a Th1/Th17 válasz szabályozásában. Az eddig az IL-12-nek tulajdonított funkciók jelentős része az IL-23-hoz kötött, különösen a mucosalis barrier funkcióban és immunválaszban kiemelkedő a szerepe. Az IL-23 hatása a T-sejtes válasz mellett az innate immunválasz aktiválásán keresztül is érvényre jut⁸.

A Crohn-betegség klinikai megjelenésében és lokalizációjában, valamint az extraintesztinális tünetek kialakulásában kifejezett heterogenitás tapasztalható, továbbá a betegség viselkedése és a kezelésre adott válasz úgy Crohn-betegségben, mint colitis ulcerosában egyaránt igen eltérő lehet. A sokszínű genetikai háttér részben magyarázhatja a kórkép változatos klinikai megjelenését, ugyanakkor számos részlet vár még tisztázásra.

Az IBD komoly egészségügyi problémát jelent, mert többnyire késő serdülőkorban, illetőleg fiatal felnőttkorban kezdődik, az érintett egyént egész életén végigkíséri, befolyásolja tanulását, munkáját, családi életét, életminőségét⁹. Európában a betegségben szenvedők számát mintegy 2,2 millióra teszik¹⁰. A betegség epidemiológiájában az elmúlt két évtizedben jelentős változás észlelhető: előfordulásuk az eddig alacsony incidenciájú területeken, mint például Kelet-Európában, köztük hazánkban is emelkedik¹¹, továbbá a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség korábbi 4-5:1-es aránya is közeledik egymáshoz.

A haptoglobin (Hp) molekula jelentős antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező akut fázis fehérje, melynek fő feladata, hogy intravascularisan a vörösvértestekből kikerülő, a sejtek számára toxikus szabad hemoglobint (Hb) megkösse, és azt a keringésből

eltávolítsa. A Hp ugyanakkor az extravascularis szövetekben és testfolyadékokban is aktív: direkt angiogenetikus, anti-inflammatorikus és immunmoduláns hatású¹². Átjut az érfalon és bizonyos hatásokra különböző szövetekben is expresszálódik. A Hp a neutrofil granulocytákban is megtalálható, a gyulladás helyén lokálisan felszabadulva képes a szövetkárosodás csökkentésére^{13,14}. A Hp receptorai a monocyta-makrofág rendszer sejtjein expresszálódó CD163¹⁵ és a CD11b (CR3), mely a granulocytákon, természetes ölüsejteken és a lymphocyták egy kis csoportjának felszínén található. A Hp a CD4+ és CD8+ T lymphocyták többségéhez is kötődik¹⁶, közvetlenül képes gátolni azok proliferációját és módosítja a Th1/ Th2 egyensúlyt¹⁷. A Hp polimorfizmus következtében létrejövő három, eltérő szerkezetű és tulajdonságú Hp molekula (HpI-1, 2-1, 2-2) számos gyulladásos és autoimmun kórkép lefolyását módosíthatják¹⁸.

Gyulladásos bélbetegségekben különféle autoantigének, valamint mikrobiális alkotórészek ellen képződnek antitestek. Leggyakrabban a *Saccharomyces cerevisiae* elleni antitesteket (ASCA) és az atípusos perinukleáris antineutrofil citoplazmatikus antitestet (P-ANCA) vizsgálták, de egyre több adat áll rendelkezésre az újabban felfedezett, különféle mikrobiális antigének ellen termelődő antitestekről is. Ilyenek pl. a külső membrán porin C ellenes antitest (anti-OmpC), *Pseudomonas fluorescens* ellenes antitest (anti-I2), valamint a különféle glikán ellenes antitestek. A CBir1 (flagellin) az első olyan bakteriális antigén, mely állatmodellben colitist indukál, és IBD betegekben is kóros immunválasz mutatható ki vele szemben¹⁹. A különféle mikrobiális- és autoantigének ellen termelődő antitestek pontos mechanizmusa és jelentősége azonban nem tisztázott. Alapvető kérdésnek tűnik, hogy az antitesteknek van-e szerepük az IBD immunpatogenezisében vagy megjelenésük csupán a gyulladt, áteresztő bélnyálkahártya következményének tartható.

Az IBD1 régióban található nucleotid oligomerisatio domain/caspase recruitment domain (NOD2/CARD15) gén mutációinak és a Crohn-betegség kapcsolatának felfedezése²⁰, melyet számos, köztük magyar beteganyagon is sikerült igazolni²¹, hívta fel a figyelmet arra, hogy a betegség patogenezisében kulcsfontosságú szerepet játszik az innate immunitás szabályozásának megváltozása. A gén terméke egy citoszolikus mintázatfelismerő receptor (pattern recognition receptor), mely a Gram-negatív és -pozitív baktériumokból származó bakteriális termékek, mint a lipopoliszacharidok (LPS) és peptidoglikánok (PGN) intracelluláris felismerésért felelős²². A receptorok egy másik fontos családja, amely az innate immunrendszer részeként a bakteriális termékek érzékelésében vesz részt, a sejtfelszíni toll-like receptorok (TLR). Ezek közül a TLR4 szükséges a LPS felismeréséhez²³. A genetikai és a szerológia markerek közötti lehetséges

összefüggést az is alátámasztja, hogy a NOD2/CARD15 variáns allélok fokozott bélpermeabilitást okoznak²⁴, a szerológiai markerek szintje pedig a bélpermeabilitás fokozódásával emelkedik²⁵. Ugyanakkor Crohn-betegségben az ASCA és a NOD2/CARD15 közötti kapcsolatot vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak, melyek legalábbis részben tükrözik a betegpopulációk között észlelt klinikai és genetikai különbséget¹⁹.

Célkitűzések

A haptoglobin (Hp) molekula α -láncát kódoló gén két allélja – Hp1 és Hp2 – következtében létrejövő három különböző fenotípusú Hp molekula térszerkezete eltérő és különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns tulajdonságokkal rendelkeznek, melynek révén kapcsolatot mutatnak egyes gyulladásos betegségek prevalenciájával és lefolyásával.

- A coeliakia gyakori, genetikailag meghatározott, klinikai megjelenését tekintve rendkívül változatos kórkép, mely számos szervrendszert érinthet, a befolyásoló faktorok jelentős része azonban ismeretlen. Az irodalomban a Hp polimorfizmus és a coeliakia kapcsolatát vizsgáló nagy esetszámú tanulmány nem ismert. Munkánkban ezért célul tűztük ki, hogy nagyszámú, egymással rokonságban nem álló, a tünetek teljes spektrumát reprezentáló coeliakiás betegcsoportban megvizsgáljuk a Hp fenotípusok megoszlását, valamint azok lehetséges kapcsolatát a betegség klinikai megjelenésével. Vizsgáltuk továbbá coeliakiában a nagy rizikójú HLA-DQ genotípusok prevalenciáját a három különböző Hp fenotípusú csoportban.
- A Crohn-betegség növekvő incidenciájával párhuzamosan a betegség klinikai megjelenésében, lefolyásában, valamint az extraintesztinális tünetek kialakulásában kifejezett heterogenitás észlelhető, amit elsősorban a változatos genetikai háttér magyarázhat. Az irodalomban a Hp polimorfizmus és a Crohn-betegség kapcsolatát vizsgáló, nagy esetszámú tanulmány nem ismert. Választ kerestünk ezért arra a kérdésre, hogy a Hp polimorfizmus kapcsolatba hozható-e a Crohn-betegség kialakulásával, annak extraintesztinális manifesztációival, a betegség klinikai megjelenési formáival és a kezelésre adott válasszal. Vizsgáltuk továbbá a Hp kapcsolatát más genetikai tényezőkkel is, mint pl. a NOD2/CARD15 mutációkkal illetőleg a TLR4 D299G polimorfizmussal.

Gyulladásos bélbetegségekben különféle mikrobiális- és autoantigének ellen képződhetnek antitestek, melyek jól használhatóak a betegség differenciál diagnosztikájában, ugyanakkor az antitestképződés pontos mechanizmusa és jelentősége egyelőre nem tisztázott. Újabb

vizsgálatok adatai szerint a szerológiai markerek jelenléte esetén a betegség agresszívebb lefolyású. Az antitestek prevalenciáját tekintve azonban jelentős földrajzi eltérésekről számoltak be. Felmerül továbbá a szerológiai és a genetikai markerek közötti lehetséges összefüggés, azonban a tanulmányok eredményei ellentmondásosak.

- Kelet Európából a szerológiai markerek vonatkozásában csak szórványosan állnak adatok rendelkezésre, ezért tartottuk fontosnak, hogy nagyszámú magyar IBD betegen vizsgáljuk az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitestek (ASCA), a külső membrán porin elleni antitest (anti-Omp) és az atípusos perinukleáris antineutrofil citoplazmatikus antitest (P-ANCA) előfordulását és azok esetleges összefüggését a betegség klinikai megjelenési formáival, a kezelésre adott válasszal és az extraintesztinális szövődményekkel. Vizsgáltuk továbbá a szerológiai válasz és a genetikai faktorok (NOD2/CARD15 és TLR4) kapcsolatát.

- Eltérően a különböző szisztémás kísér vasculitisekben jelenlévő klasszikus ANCA-tól, az IBD-hez társuló ANCA mintázatok azonosítására és interpretálására, nincs egyértelmű, nemzetközileg elfogadott ajánlás. Így célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az irodalomban javasolt, de eddig széles körben még nem vizsgált módszer és kritériumrendszer kivitelezhetőségét és reprodukálhatóságát rutin laboratóriumi körülmények között elérhető tesztek és eszközök segítségével. Az *inter-assay* és *inter-observer* vizsgálatok során négy különböző, kereskedelmi forgalomban elérhető, etanol-és formalin-fixált neutrofil szubsztrátot egyaránt tartalmazó, indirekt immunfluoreszcens teszt eredményeit hasonlítottuk össze két földrajzilag különböző laboratóriumban. A fluoreszcens mintázatok mellett továbbá vizsgáltuk az antinukleáris antitest (ANA) jelenlétét és a mieloperoxidáz (MPO), proteináz-3 (PR3), elasztáz, laktoferrin, katepsin G, lizozim illetőleg baktericid permeabilitást fokozó protein (BPI) antigének elleni antitest szinteket.

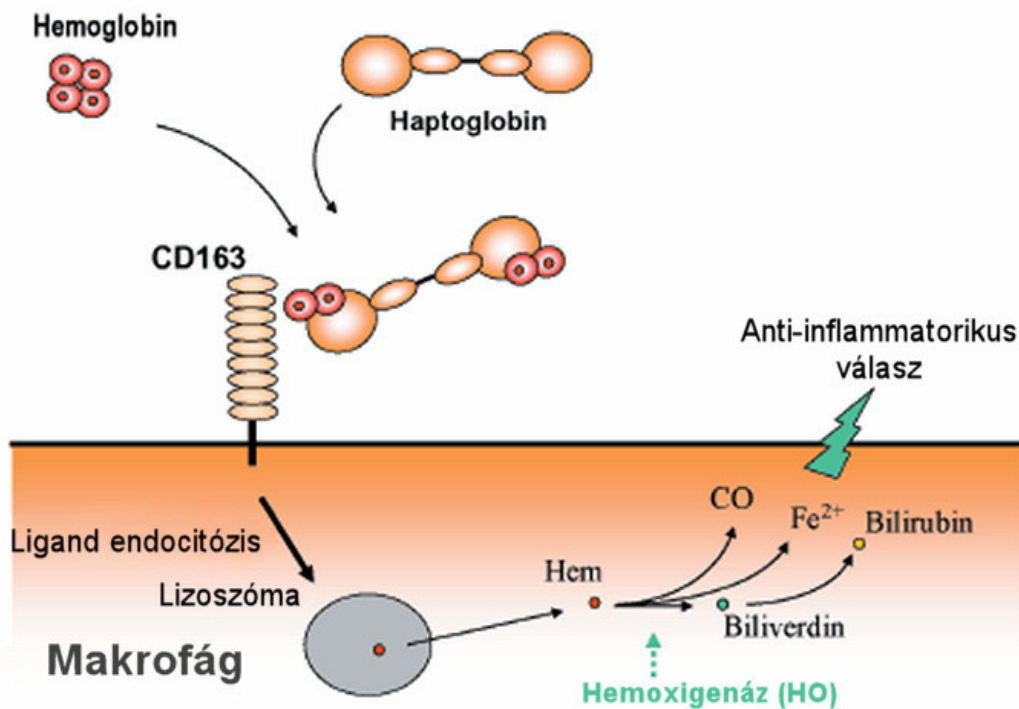
5. Irodalmi áttekintés

6.1 Haptoglobin polimorfizmus

Az intravasculáris hemolízis során a vörösvérsejtek destrukciójának következtében szabaddá váló hemoglobin (Hb) és hem érendothel károsító hatása jól ismert. A vasculáris homeosztázis fenntartásában kulcsfontosságú nitrogén-oxid (NO) mennyisége az oxihemoglobinnal történő, prompt és irreverzibilis reakcióba lépése miatt jelentősen lecsökken (NO scavenging), melyet a fokozott NO szintáz (NOS) aktivitás sem tud ellensúlyozni, ugyanis a vörösvértestekből kiszabaduló argináz az enzim szubsztrátját, az L-arginint, ornitinné alakítja. Az NO hiány a guanilát cikláz csökkent működését és így a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) mennyiségének csökkenését eredményezi. A cGMP hiánya a simaizom tónus szabályozásának zavarához, lokális vasoconstrictióhoz, trombocita aktivációhoz, valamint aggregációhoz vezet. A szabaddá váló hem a protoporfirin gyűrűbe zárt ferro vas(II) miatt is veszélyt jelent: a Fenton-reakció során keletkező hidroxil gyökök direkt módon károsíthatják az érfalat, valamint jelentős szerepet játszanak a low-density lipoprotein (LDL) oxidációban is^{26,27}. Az extravasculárisan szabaddá váló Hb, pl. szöveti gyulladás vagy érsérülés során, hasonló módon oxidatív stresszt, NO hiányt eredményez, mely makrofág aktivációhoz és következményes proinflammatorikus citokin felszabaduláshoz vezet.

A vörösvértestekből kiszabaduló és oxidálódó Hb-nak (methemoglobin) a vérzés helyén Hp-nal történő stabilizálása és a CD163/hemoxigenáz-1 (HO-1)/biliverdin reduktáz rendszer működése azonban képes ellensúlyozni a methemoglobin NO scavenger, vasoconstrictív, proliferatív, inflammatorikus és pro-oxidáns tulajdonságát^{28,29}. A Hp-Hb komplex képződése során megjelenő új epitóp a makrofágok és kisebb mértékben a monocyták felszínén is jelenlévő CD163 receptorhoz (haptoglobin-hemoglobin scavenger receptor, HbSR) kötődik. A kötődés Ca^{2+} -dependens és nagy affinitású¹⁵; a komplex endocytosisát követően annak lebomlását eredményezi a lizoszómákban. A HO-1 enzim hatására a hem molekula szénmonoxiddá (CO), biliverdinné és ferro vas(II)sá alakul. A CO vazodilatátor, antiproliferatív, anti-inflammatorikus és antioxidáns tulajdonságú. A biliverdin és az azt bilirubinná alakító biliverdin reduktáz szintén antioxidáns hatású. A felszabaduló ferritin pedig azonnal megkötí a ferro vas(II)-t³⁰ (**1. ábra**)

1. ábra A hemoglobin haptoglobinhoz való kötődése és a komplexnek a makrofágok CD163 scavenger receptorán keresztül történő metabolizmusa.



A Hp-Hb komplex elsősorban a májban (90%), kisebb részt a keringésben lévő monocytákban (10%) metabolizálódik, extravascularisan azonban az egyetlen lehetőség a makrofágokon keresztül történő clearance³¹. A Hp-Hb komplexnek a CD163 receptorához való kötődése és metabolizmusa egyben a veleszületett („innate”) immunrendszerrel való fontos, szorosan szabályozott kapcsolódási pontot is jelenti, ugyanis a monocyta/macrofág sejtek aktivációját eredményezi: fokozódik az anti-inflammatorikus tulajdonságú IL-10 termelése³². A gyulladás során az IL-6, IL-10 és a glükokortikoidok hatására nemcsak a keringésben lévő monocytákon, hanem az érintett szövetek makrofágjain is fokozódik a CD163 receptor expressziója. Ugyanakkor a klasszikus macrofág-aktivációban szerepet játszó citokinek (INF- γ , tumornekrózis faktor-alfa [TNF- α]) illetőleg a LPS csökkentik a CD163 receptor expresszióját. Az alternatív úton aktivált, CD163+ makrofágok egy rendkívül heterogén csoportot jelentenek, melyek a különböző stimulusokra sokrétű, ugyanakkor testreszabott módon képesek válaszolni. Kulcsszerepük van mind az akut,

mind pedig a krónikus gyulladásos folyamatok mérséklésében, a tolerancia indukcióban és a szöveti regenerációban¹⁶.

A **Hp molekula** egy $\alpha 2\beta 2$ szialoglikoprotein, szintézise elsősorban a hepatocytákban zajlik, melyet az akut fázis reakció során felszabaduló proinflammatorikus citokinek indukálnak, elsősorban az IL-6 és glükokortikoidok (együtt szabályozódás a CD163-val és HO-1-vel)³³. A molekula ugyanakkor nemcsak a keringésben, hanem az extravascularis szövetekben és a testfolyadékokban is jelen van. Egyrészt átjut az érfalon, másrészt LPS hatására adipocytákban, alveoláris sejtekben és epidermális sejtekben is megjelenik. Beszámoltak továbbá a Hp jelentős fokú ektópiás megjelenéséről adenomatosus vastagbélpolypokban és daganatszövetben³⁴, valamint tartósan fennálló áramlásváltozások következtében a nyírófeszültség és NO hatására az artériák falában is³⁵. A Hp a neutrofil granulocytákban is megtalálható. Nagyobbrészt a myeloid érés során a myelocyta/metamyelocyta fázisban *de novo* szintetizálódik és a specifikus granulumokban tárolódik ill. kis mértékben a plazmából az exogén Hp endocytosisa is lehetséges. A Hp így a gyulladás helyén lokálisan is felszabadul, és képes csökkenteni a szövetkárosodást^{13,14}. A Hp a szövetekben valódi chaperone aktivitást fejt ki azáltal, hogy megakadályozza a különféle fehérjék hősokk és az oxidatív stressz indukálta misfoldingját - fehérjék nem megfelelő feltekeredése, gombolyodása, hibás fehérje térszerkezetek kialakulása – és precipitációját, melyek toxikus hatásai jól ismertek³⁶.

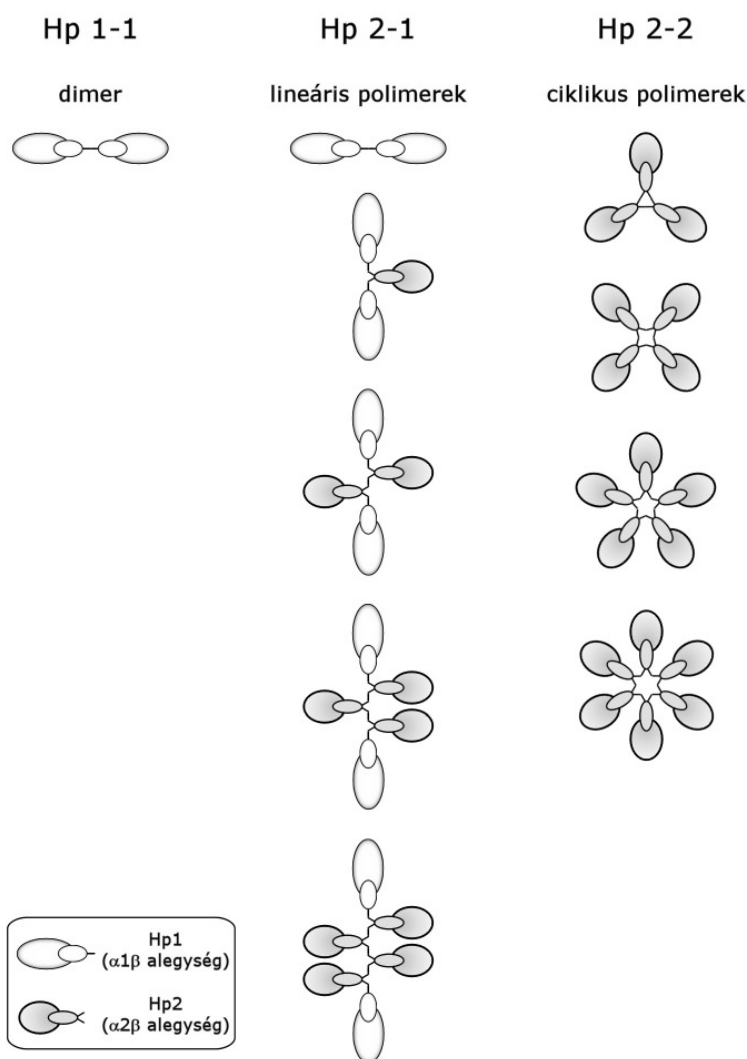
A **Hp molekula polimorfizmusát** az α -láncot kódoló gén két kodomináns allélja – Hp1 és Hp2 – határozza meg, mely a 16q22 kromoszómán helyezkedik el. Következésképp a molekula genetikai polimorfizmusa három fő fenotípusban nyilvánul meg (**Hp1-1**, **Hp2-1 and Hp2-2**). A Hp gén locus a Hp1 allél által kódolt 5 vagy a Hp2 allél által kódolt 7 exonból áll. A Hp2 a Hp1 allélből keletkezett az exon 3 és az exon 4 intragénikus duplikációja révén, feltéhetőleg egy nem-homológ dezoxi-ribonukleinsav (DNS) crossing-over folyamat során. A Hp monomerek összekapcsolódásához szükséges kritikus diszulfid kötőhelyek az exon 3-ban és az exon 4-ben találhatóak. A Hp1 monomerek monovalensek és dimerek keletkeznek belőlük. A Hp2 monomerek azonban bivalensek, tekintve, hogy az exon 3-t és az exon 4-t duplikátumban tartalmazzák és így két másik Hp monomer megkötésére képesek. Ennek következtében a Hp1 génre homozigóta egyének esetén létrejövő **Hp1-1** molekula, két $\alpha 1\beta$ alegységből álló dimer (86kDa). A Hp2 génre homozigóta egyénekben nagy molsúlyú ciklikus polimerek alakulnak ki. Az így képződő **Hp2-2** molekula valójában ezen változó számú $\alpha 2\beta$ alegységből álló ciklikus polimerek

keveréke (170-900kDa). A Hp génre heterozigóta egyénekben szintetizálódó **Hp2-1** molekula szerkezete teljesen eltér a homozigóta egyénekben képződő molekulákétól. Szintén egy polimer keverék, azonban ezt a molekulát két $\alpha 1\beta$ alegysége között különböző számú $\alpha 2\beta$ alegységből kialakuló lineáris polimerek alkotják (86-300kDa) (**2. ábra**).

A Hp fenotípusok szérumból gél elektroforézissel biztonsággal meghatározhatóak, és egyértelműen azonosítják az egyén genotípusát is. *Koch és mtsai* DNS mintákból PCR vizsgálat segítségével meghatározott genotípusokat összevetve a szérummintákból gél elektroforézissel történt fenotípus analízis eredményekkel teljes egyezést találtak³⁷.

2. ábra Az egyes haptogloblin (Hp) fenotípusok eltérő szerkezeti és alegység szerveződési jellemzői.

A Hp molekula szerkezeti felépítésében kulcsfontosságú kovalens kötések diszulfid hidak révén valósulnak meg, melyek kötőhelyei a molekula α -láncában találhatók. A Hp1 monomer ($\alpha 1\beta$) monovalens, így csak egyetlen másik Hp monomerrel tud összekapcsolódni. A Hp2 monomer ($\alpha 2\beta$) azonban bivalens, így két másik Hp monomerhez képes kötődni. Ennek köszönhetően a három Hp genotípus esetén egymástól eltérő szerkezetű Hp molekulák termelődnek. Hp1-1 kis molekulasúlyú haptogloblin dimerek (86kDa), a 2-1 genotípus különböző hosszúságú lineáris polimerek (86-300kDa), míg a 2-2 genotípus ciklikus polimerek (170-900kDa) képződését eredményezi. Elméletileg elképzelhető, gyakorlatilag azonban a Hp2-1 fenotípusú egyénekben az $\alpha 2\beta$ alegységek nem képeznek ciklikus polimereket a túlsúlyban lévő $\alpha 1\beta$ alegységek miatt.



Nagyszámú *in vitro* és *in vivo* adat támasztja alá, hogy a Hp molekula 3 fő fenotípusa között nemcsak szerkezeti, hanem jelentős funkcionális különbségek is kimutathatóak: különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns tulajdonsággal rendelkeznek, és ezek kapcsolatot mutatnak egyes gyulladásos betegségek – fertőzések, atherosclerosis, autoimmun betegségek – lefolyásával¹². A Hp1-1 és 2-2 molekula a különféle funkcionális vizsgálatokban általában ellentétesen viselkedett. A Hp2-1 működését ugyanakkor gyakran intermediérnek tartják, noha a molekula aktivitását csak ritkán vizsgálták és csak nagyon kevésbé ismert annak valódi viselkedése, esetleges különbözősége a másik két fenotípushoz képest. A Hp2-1 molekula szerkezetét figyelembe véve sem tekinthető a másik két fenotípus intermediérjének, mely szintén arra enged következtetni, hogy ugyanez érvényes a molekula működésére is.

A Hp egyik legtöbbet vizsgált tulajdonsága az antioxidáns kapacitása. A Hp Hb-kötő képessége és kapacitása^{38,39} az egyes fenotípusok esetén különböző, az antioxidáns aktivitásban észlelhető eltéréseket mégis elsősorban a Hp-Hb komplexben lévő vasnak a környezete számára való eltérő hozzáférhetőségével magyarázzák. A Hp molekulák közül Hp2-2 rendelkezik a legkisebb antioxidáns kapacitással, mind a keringésben, mind az extravascularis szövetekben. Egyrészt a Hp2-2-Hb komplexben lévő vas a leginkább elérhető a környezet számára, melynek következtében fokozott kelátképződési hajlam és kifejezettebb redoxaktivitás jellemezi a Hp1-1-Hb komplexben lévő vashoz képest. Ez az ún. labilis plazma vas (LPI) felelős a Hp2-2-Hb komplex esetén kimutatható fokozott szabadgyök képződésért. A Hb oxidálódása vagy glikozilálódása esetén azt is megfigyelték, hogy az LPI mennyisége nő, illetőleg az antioxidáns kapacitásban észlelhető fenotípus-függő különbség is jelentősen fokozódik^{40,41}. Továbbá a Hp-Hb komplex kiürülése a Hp2-2 fenotípus esetén jóval lassúbb és kevésbé hatékony a Hp1-1-hez képest⁴². Az extravascularis szövetekben és a különféle testfolyadékokban is a Hp2-2 antioxidáns kapacitását a nagy molekulatömege még tovább csökkenti azáltal, hogy korlátozza az érfalon való átjutásban⁴³.

Számos klinikai tanulmány igazolta a Hp polimorfizmus független prognosztikai szerepét a diabéteszes érszövődmények kialakulásában. A Hp2-2 fenotípusú diabéteszes betegekben gyakrabban alakul ki nephropathia, retinopathia és különféle cardiovascularis szövődmények, mint Hp2-1 és Hp1-1 fenotípusú egyéneknél^{44,45}, melyet a molekula csökkent antioxidáns kapacitása mellett egyre inkább annak fokozott immunreaktivitásával is összefüggésbe hoznak⁴⁶.

Újabb adatok a Hp molekulának az innate és az adaptív immunrendszer szabályozásában betöltött sokrétű szerepére utalnak. A vizsgálatok jelentős részében azonban vagy csak a molekuláról általánosságban írták le az adott hatást vagy a vizsgálat során csak egy adott fenotípusú Hp molekulát használtak és ezért kevés direkt adat áll rendelkezésünkre a különböző fenotípusú Hp molekulák pontos viselkedését illetően az egyes immunológiai folyamatokban. Továbbá az autoimmun betegségekkel foglalkozó néhány közlemény kis betegszámú vizsgálatokon alapul és az eredmények gyakran ellentmondásosak^{47,48}.

6.2 Szerológiai és gentikai vizsgálatok gyulladásos bélbetegségekben

Gyulladásos bélbetegségekben egyre több adat áll rendelkezésre a különféle autoantigének, valamint mikrobiális alkotórészek ellen termelődő antitestek lehetséges patogenetikai szerepéről. Jelentőségük a diagnosztikában, a prognózis felállításában, a betegség követésében, a kezelési stratégia kialakításában illetőleg hatékonyságának ellenőrzésében változó. Szubklinikus markerként való alkalmazhatóságuk is nyitott kérdés.

Az **anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA)** egy heterogén autoantitest család. Közös jellemzőjük, hogy az antitestek a neutrofilek (vagy olykor egyéb myeloid sejtek) primer granulumaiban található enzimek vagy egyéb citoplazmatikus fehérjék ellen irányulnak. Legkevesebb hét azonosított ANCA antigén van már, és több olyan, amit még nem sikerült pontosan azonosítani. Ilyen enzim többek között a mieloperoxidáz (MPO), proteináz-3 (PR3), elasztáz, laktoferrin, katepszin G, lizozim, természetes antibiotikus baktericid permeabilitást fokozó protein (BPI).

Az IBD-hez gyakran társuló ANCA több vonatkozásban is eltér a különböző szisztémás kísér vasculitisek diagnosztikájában és követésében használt klasszikus ANCA-tól⁴⁹, ugyanakkor megtévesztő módon az irodalomban gyakran szintén perinukleáris [P]-ANCA elnevezéssel illetik. A vasculitis asszociált típusos P-ANCA antigénjével szemben ezen atípusos P-ANCA antigénje – esetleg akár több is – nem ismert pontosan; feltehetően azonban nem citoplazmatikus, hanem nukleáris lokalizációjú és a neutrofil granulocyták maghártyájának belső részében található (50 kDa myeloid-specifikus fehérje)^{50,51}. A különféle, hiszton- (H1) és nem-hiszton kromoszomális fehérjék (HMG1 és HMG2) azonban szintén az antigén jelöltek közé tarthatnak^{52,53,54}. Az antigén pontos ismeretének

hiányában, az IBD asszociált P-ANCA mérésére alkalmas szenzitív és specifikus szolid-fázisú tesztet nem tudtak kifejleszteni, és így továbbra is az etanol-fixált granulocita preparátumokon indirekt immunfluoreszcens (IIF) módszerrel történő vizsgálat az egyetlen, széles körben elterjedt módszer az antitestek detektálásban. Az IIF módszerrel etanol-fixált neutrofil preparátumokon kapott perinukleáris mintázatok fluoreszcens megjelenése is eltérő a kétféle P-ANCA esetén, az egymástól való elkülönítésük azonban nem egyszerű; a megítélése egyaránt függ a használt szubsztráttól, a fluoreszcencia intenzitásától és a vizsgáló tapasztalatától. Fontos megjegyezni azonban azt is, hogy a nemzetközi konszenzus leirat⁵⁵ mindenféle perinukleáris fluoreszcenciát P-ANCA-ként említi. A típusos P-ANCA további jellegzetessége az atípusos P-ANCA-val szemben, hogy sajátosan anti-MPO pozitív. A P-ANCA MPO-specifitását megerősítő vizsgálatok: a formalin-fixált neutrofil preparátumok és az antigén-specifikus szolid-fázisú immunoassay. A fentiekből adódóan a neutrofil granulocytákon észlelt perinukleáris fluoreszcencia önmagában nem jelenti szükségszerűen vasculitis fennállását. Az IBD asszociált ANCA kimutatására egy ELISA és egy DNase-I-kezelt granulocita készítményeken végzett IIF vizsgálatot kombináló módszerről is említést tesznek az irodalomban⁵⁶. A metodika kifejlesztőin kívül, akik az IBD szerológiai vizsgálatok egyik úttörő munkacsoportjának tekinthetők, az eljárást nem igen használják és a konszenzus leirat sem említi.

Az atípusos P-ANCA jelenléte elsősorban colitis ulcerosás betegekre jellemző: a betegek 50-80%-ban található meg, míg az észak-amerikai és a nyugat-európai Crohn-beteg populációban csak 10%-ban fordul elő^{57,58}, de gyakori előfordulásáról számoltak be autoimmun hepatitisben⁵⁹ és primer szklerotizáló cholangitisben (PSC)⁶⁰ is. Crohn-betegekben ezzel szemben inkább a különféle **mikrobiális antigének ellen termelődő antitestek**, mint pl. az anti-*Saccharomyces cerevisiae* elleni antitestek (ASCA) jellegzetesek⁶¹, amelyek a betegek mintegy 50-70%-ában vannak jelen, míg colitis ulcerosás betegekben (10-15%) és egészséges egyéneknél (0-5%) csak ritkán mutathatók ki^{57,62,63}. A két antitest önmagában történő meghatározása mérsékelt szenzitivitásuk és specifitásuk miatt kevés jelentőséggel bír az IBD jelenlegi diagnosztikus algoritmusában.

Korábbi közlemények szerint az atípusos P-ANCA és az ASCA vizsgálatok kombinációja, azonban segíthet a Crohn-betegség és a colitis ulcerosa differenciál diagnosztikájában^{57,64} amennyiben a hagyományos vizsgálati módszerekkel a diagnózis nem egyértelmű. Az ASCA⁺/atípusos P-ANCA⁻ mintázat elsősorban Crohn-betegségre, míg az ASCA⁻/atípusos P-ANCA⁺ colitis ulcerosára jellegzetes. Ezen antitestek magas specifitásuk (85%-97%) révén jól használhatóak a klinikai gyakorlatban (az IBD

differenciál diagnosztikájában), ugyanakkor alacsony szenzitivitásuk (50-70%), főleg ha csak az egyik markert vizsgáljuk, nem teszi lehetővé szűrővizsgálatként való felhasználásukat. Egyes betegekben az antitestek jelenléte már évekkel az IBD klinikai diagnózisát megelőzően észlelhető⁶⁵. Továbbá a szerológia markerek jelenléte esetén a betegség agresszívebb lefolyású^{66,67}, gyakoribb a sebészeti beavatkozás szükségessége^{68,69}, ugyanakkor az antitestek prevalenciáját tekintve jelentős földrajzi eltérésekről számoltak be. A P-ANCA és az ASCA szenzitivitása kínai és japán betegekben sokkal alacsonyabb volt^{70,71}, míg a P-ANCA pozitivitást gyakoribbnak találták mexikói-amerikai colitis ulcerosás betegekben⁷². A szerológiai markerekkel kapcsolatosan Kelet Európából csak szórványosan állnak adatok rendelkezésre.

Az újonnan felfedezett ellenanyagok közül az *Eschericia coli* külső membránjában található porin C transzporterfehérje ellen termelődő antitestek (anti-OmpC) szeroprevalenciája Crohn-betegségben 24-56%, míg colitis ulcerosában 10% körüli^{67,69,73}. Anti-OmpC jelenléte esetén gyakoribb a penetráló és a stenotizáló betegség forma előfordulása. Továbbá az antitest pozitivitása esetén progresszív betegséglefolyással és a sebészeti beavatkozások szükségességének gyakoribb előfordulásával kell számolni^{67,74}. A további anti-mikrobiális antitestek – mint pl. az anti-I2 és az anti-CBir1 –, valamint a különféle szénhidrát epitópok elleni (anti-glikán) antitestek kimutatásának klinikai jelentősége abban összegezhető, hogy megteremtik annak a lehetőségét, hogy a betegeket a kvalitatív és kvantitatív szerológiai válasz alapján különféle alcsoportokba sorolhassuk. Az elmúlt években jelentős előrelépés történt a szerológiai markerek és az IBD klinikai megjelenése közötti összefüggés jobb megértésében, miszerint a kialakuló szerológiai válasz kumulatív jelenléte és nagysága markere lehet a szövődményes, agresszívebb lefolyású vékonybél Crohn-betegségnek és előrejelezheti a sebészi beavatkozás szükségességét. Fontos kérdésnek tűnik, hogy a diagnózis felállításának időpontjában a szerológiai markerek paneljét alkalmazva megbízhatóan kiválaszthatók-e azon betegek, akiknél súlyosabb kórlefolyásra lehet számítani, és így a hosszú távú prognózis javítása érdekében intenzívebb követést és korai agresszív kezelést igényelnek. További prospektív klinikai tanulmányok szükségesek a szerológiai vizsgálatok valódi klinikai jelentőségének meghatározására^{75,76}.

A szerológia tesztekkel kapcsolatosan fontos megemlíteni azonban, hogy az igazán markáns különbségek csak a betegek kisebb részében jelentkeznek. A Crohn-betegek mintegy egynegyede pozitív egyidőben több antitestre is, ill. rendelkezik kifejezetten magas antitest titerekkel. Hasonló a szeronegatív, vagy csak egy antigénnel szemben és

alacsony antitestválasszal reagáló betegek aránya is. A Crohn-betegek körülbelül felének azonban a szerológiai vizsgálatok alapján köztes fenotípusa lesz. Az újabb markerek felfedezésére irányuló törekvések célja pontosan az, hogy az IBD szerodiagnosztikus paneljének bővítésével ezekben, az ún. „szürke zónába” eső betegekben is azonosítani lehessen a progresszió és terápiás szempontból azonos csoportot jelentő egyéneket⁷⁷. A szenzitivitás várható növekedése, azonban magával vonhatja azt a figyelmen kívül nem hagyható aspektust, miszerint tovább csökkenhet a specificitás. Fontos kérdésnek tűnik az is, hogyan lehet a már jelenleg is rendelkezésre álló széles antitestpanelt klinikailag hatékonyan, ugyanakkor költségkímélő módon felhasználni¹⁹.

A különféle mikrobiális antigének ellen termelődő antitestek kialakulásának háttere esetleges patogenetikai szerepe egyelőre nem ismert pontosan. Egyre több irodalmi adat támasztja alá azt az elképzelést, miszerint az antitestképződés a bélbaktériumokkal szembeni immuntolerancia elvesztése miatt kialakult adaptív immunválasz következménye lehet. A szerológiai válaszban észlelhető különbségek részben tükrözhetik a betegcsoportra jellegzetes genetikai heterogenitást. Több irodalmi adat is megerősíti, hogy az antimikrobiális antitestek kialakulásában szerepe lehet a leucin gazdag ismétlődést (LRR) tartalmazó mintázatfelismerő receptorok (PRR)^{78,79,80} – mint például a NOD2/CARD15, a NOD1/CARD4 vagy TLR –és a mannóz-kötő lectin (MBL) genetikai eltéréseinek is⁸¹. Az irodalomban azonban ellentétes véleménnyel is találkozhatunk^{67,82,83}. Az innate immunitásban szerepet játszó receptorok mutációi/polimorfizmusai és az antimikrobiális antitestképződés közötti feltételezett összefüggést tovább erősíti, hogy ún. gén-dózishatás is megfigyelhető volt, azaz az antitestek prevalenciája szignifikánsan nőtt a mutációk számának növekedésével; másrészt, az antitestképződést gyakoribbnak találták a betegek egészséges elsőfokú rokonaiban a kontroll háttér populációhoz képest⁸⁴.

6. Anyagok és módszerek

7.1 Haptoglobin fenotípus/genotípus analízis

A Hp fenotípusok szérumból gélelektroforézissel biztonsággal meghatározhatóak, és egyértelműen azonosítják az egyén genotípusát is²⁵. A különböző betegcsoportok és kontroll egyének esetén a Hp fenotípus meghatározás szérumból – a Yang és mtsai⁸⁵ által korábban ismertetett módszert laboratóriumunkban módosítva⁸⁶ – történt röviden az alábbiak szerint: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid 5-10%-os lineáris gradiens gél elektroforézist (SDS-PAGE) követően polivinilidén-difluorid (PVDF) immobilion-P transfer membránra (Millipore, Bedford, MA) elektrotranszferrel átvittük (blottoltuk) a fehérjét. A detektálást Hp ellenes antitest (1:1000) (Polyclonal Rabbit Anti-Human Haptoglobin [Dako, Glostrup, Denmark]) és peroxidáz jelzett második antitest (1:2000) (Goat Anti-Rabbit-HRP, Dako), valamint diaminobenzidin [DAB] oldatok felhasználásával végeztük. A genotípusokat minden vizsgálat során 1-1 és 2-2 típusú gyári Hp standardok (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) felhasználásával állapítottuk meg.

A Hp polimer-expresszió stabilitásának, valamint a fenotipizálási módszer reprodukálhatóságának ellenőrzésére 27 coeliakiás beteg esetén két vagy több különböző időpontban levett szérummintákból nyert eredményeket hasonlítottuk össze. A mintavételek között eltelt medián időintervallum 12,8 év [tartomány 0,2-14,8 év] volt. Az egyes betegektől származó mintasorozatokban megegyező eredményeket kaptunk, melyek minden esetben azonos genotípust jeleztek.

A különböző Hp fenotípusok elektroforetikus mobilitásuk és sávmintázatuk alapján könnyen elkülöníthetők (**3. ábra**).

Statisztikai analízis

A Hp polimorfizmus vizsgálatok esetén a normalitás vizsgálatot Shapiro Wilk's W test segítségével végeztük. A különböző beteg és kontroll csoportok, valamint az adott betegség esetén az alcsoportok adatainak összehasonlítására T-próbát különböző varianciájú csoportokra, Fischer-exact-tesztet, illetőleg χ^2 -próbát alkalmaztunk helyenként Yates-korrektúrával, esélyhányadost (odds ratiót [OR]) határoztunk meg 95% konfidencia intervallummal (95% CI). A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat

SPSS13.0 programmal (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), statisztikusok segítségével (Dr. Vargha Péter és Dr. Dinya Elek) értékeltük.

3. ábra Különböző haptogloblin (Hp) fenotípusok elektroforetikus képe.

A Hp *1-1* fenotípus esetén egyetlen, kis molekulatömegű, gyorsan vándorló sáv látható (A). A Hp *2-2*-t számos, nagy molekulatömegű, lassan vándorló sáv jellemzi (B). A Hp *2-1* fenotípusban pedig mind a Hp *1-1*-nek megfelelő sáv, mind pedig számos lassabban vándorló sáv is megfigyelhető (C).



7.2 Antimikrobiális- és autoantitest vizsgálatok

7.2.1 Antimikrobiális antitest vizsgálatok

Az ASCA IgG és IgA, valamint anti-Omp IgA antitest meghatározásokat szérumból végeztük enzimvel kapcsolt immunoszorbens assay-vel (ELISA) (QUANTA Lite, INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Mind az ASCA IgG és IgA, mind pedig az anti-Omp IgA antitest meghatározások a gyártó előírásai szerint történtek. Egy adott típusú vizsgálat esetén minden minta tesztelésére kétszer került sor, ugyanazon a lemezen. Az eredményeket önkényes egységben a gyártó által megadott egyenlet segítségével fejeztük ki, pozitív cut-off értéknek ≥ 25 egységet tekintettük.

7.2.2 Autoantitest vizsgálatok

Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) meghatározása

Az ANCA jelenlétét szérumból indirekt immunfluoreszcens (IIF) módszerrel vizsgáltuk. A szérumból tesztelését etanol- és a formalin-fixált humán perifériás neutrofil granulocyták preparátumokon párhuzamosan végeztük, a *Terjung és mtsai*⁸⁷ által javasolt módon.

Az összehasonlító ANCA vizsgálatokhoz négy különféle ANCA assay-t használtunk (Nova Lite ANCA, INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA; ImmuGlo, IMMCO Diagnostics, Inc., Buffalo, NY; Granulocyte Mosaic Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany és ANCA Test System Immunoconcepts N.A. Ltd., Sacramento, CA). A meghatározások minden esetben ugyanazon mintából származó aliquotokból történtek. A szérumból az etanol- és a formalin fixált neutrofil szubsztrát lemezek esetén is a gyártók előírásai szerint 1:40 (INOVA), 1:20 (IMMCO és Immunoconcepts) és 1:10 (Euroimmun) hígításokban vittük fel. A mintázatok leolvasása IIF mikroszkóppal (Regionális Immunológiai Laborban: Eurostar Plus microscope, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika, Lübeck, Germany; INOVA Diagnostics-ban: Nikon Eclipse E200 Labphot-2 indirect immunofluorescence microscope, San Diego, CA) 400-szoros nagyítás mellett történt. Az *inter-assay variabilitás vizsgálat* során a fent említett négy immunfluoreszcens ANCA assay-ben kapott mintázatok egy vizsgáló

értékelt. Az **inter-observer variabilitás vizsgálat** során ezzel szemben csak egy assay-t használtuk (Nova Lite ANCA), a vizsgálatok azonban egyidejűleg földrajzilag különböző laboratóriumokban (Regionális Immunológiai Laboratórium, Debreceni Egyetem OEC, Debrecen és INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA) történtek.

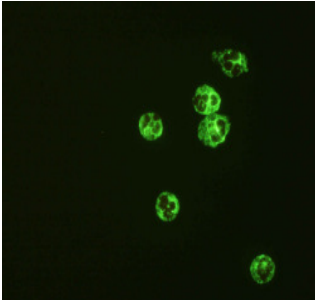
Az immunfluoreszcens eredmények értékelése az ANCA mintázatoknak az etanol- és formalin fixált szubsztárokon történő együttes viselkedése alapján történt az alábbiak szerint: 1) **Citoplazmatikus (C-ANCA) mintázat**nak tartottuk, ha az etanol- és formalin-fixálás esetén durva, granuláris citoplazma fluoreszcencia volt látható, mely a maglebenyek között hangsúlyozottabban jelentkezett. 2) **Típusos perinukleáris (P)-ANCA** mintázat esetén etanol-fixált preparátumokon a maglebenyeket körülvevő perinukleáris citoplazmában finom gyűrűszerű fluoreszcencia jelentkezett, intranukleáris terjedést mutatva, míg a formalin fixált sejteken diffúz citoplazmatikus fluoreszcencia alakul ki. 3) **Atípusos P-ANCA**-nak akkor tekintettük a mintázatot, ha az etanol-fixált preparátumokon a sejtmag perifériás részén széles, inhomogén, gyűrűszerű festődés volt látható, mely nukleáris terjedést nem mutatott vagy kombinált mintázatot találtunk, melynek során az előbb említett perinukleáris fluoreszcenciával együtt diffúz, a maglebenyek között nem mutatkozó, citoplazmatikus festődés is jelen volt. Az etanol-fixált preparátumokon látható festődési mintázat a formalinos preparátumokon vagy teljesen eltűnt, vagy gyenge perinukleáris festődés formájában megmarad. Az ANCA Konszenzus Nyilatkozat⁴⁴ által említett negyedik féle ANCA mintázat (**atípusos C-ANCA**) a vizsgált beteganyagban nem fordult elő. A **4. ábra** a különféle ANCA mintázatok immunfluoreszcens megjelenését mutatja be.

Az **ANCA antigén-specifitási vizsgálatokat** kereskedelmi forgalomban elérhető kiték segítségével (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) végeztük. Az MPO, PR3, laktoferrin, BPI, katepsin G, elasztáz és lizozim elleni IgG típusú antitestek jelenlétének kimutatása ELISA-val történt. Az egyes antitestek jelenlétét külön-külön, a gyártó által megadottak szerint határoztuk meg. Az anti-laktoferrin, anti-BPI, anti-katepsin G, anti-elasztáz és az anti-lizozim antitestek esetén az eredményeket pozitív vagy negatív formában adtuk meg, míg az anti-MPO és anti-PR3 antitestek esetén a kvalitatív eredmények mellett, azokat abszolút értékekben is megadtuk. Az eredményeket önkényes egységben a gyártó által megadott egyenlet segítségével fejeztük ki, pozitív cut-off értéknek ≥ 5 egységet tekintettük.

4. ábra Neutrofil granulocyta ellenes antitestek (ANCA) mikroszkópos immunfluoreszcens mintázata etanol- és formalin-fixált normál perifériás neutrophil granulocyta preparátumokon.

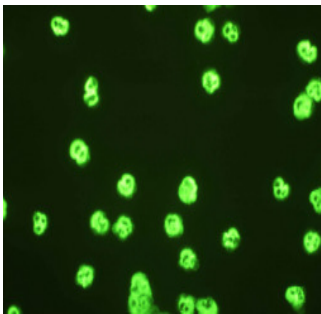
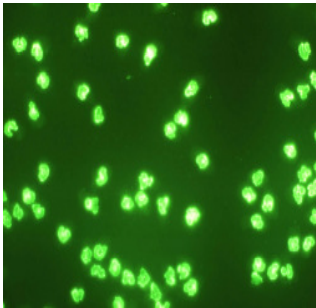
A: Citoplazmatikus (C)-ANCA mintázat (etanol-és formalin fixálás során egyaránt): durva, granuláris citoplazma fluoreszcencia, mely a maglebenyek között hangsúlyozottabban jelentkezik. **B:** A sematikus ábra a típusos és atípusos perinuclearis (P)-ANCA target antigénjeinek (●) szubcelluláris eloszlását és az immunfluoreszcens mintázatokat mutatja különféle fixálások mellett. **Típusos P-ANCA** mintázat etanol-fixált preparátumokon a maglebenyeket körülvevő perinukleáris citoplazmában finom gyűrűszerű fluoreszcenciaként jelentkezik és intranukleáris terjedést mutat. A formalin fixálás keresztkötések létrehozása révén megakadályozza a pozitív töltésű granuláris fehérjéknek a negatív töltésű maghártyához történő vándorlását. Így az etanol-fixált neutrophil preparátumokon típusos P-ANCA esetén észlelhető, valójában műterméknek tekinthető perinukleáris mintázat helyett az antigén valódi elhelyezkedésének megfelelően diffúz citoplazmatikus fluoreszcencia alakul ki. **Atípusos P-ANCA esetén**, etanol-fixált preparátumokon a sejtmag perifériás részén széles, inhomogén, gyűrűszerű festődés látható, mely intranukleáris terjedést nem mutat. Az antigén feltehetőleg a neutrophil granulociták maghártyájában található. Az atípusos P-ANCA által felismert nukleáris antigén elhelyezkedését a formalin-fixálás nem befolyásolja. Az etanol-fixált preparátumokon látható festődési mintázata a formalinos preparátumokon vagy gyenge perinukleáris festődés formájában megmarad, vagy pedig teljesen eltűnik.

A



B

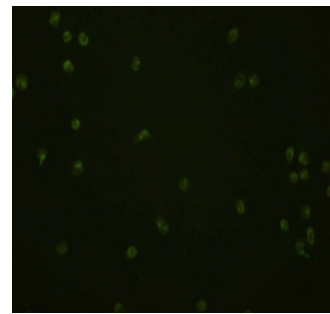
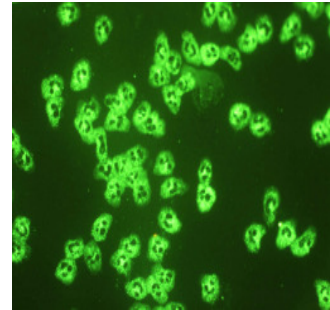
Etanol fixálás: P-ANCA



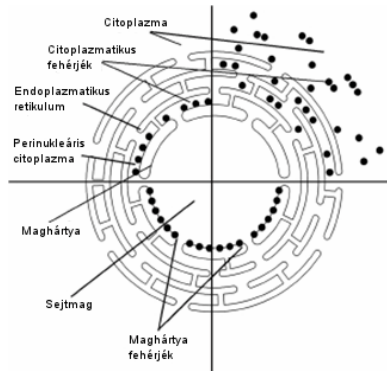
Etanol fixálás: atípusos P-ANCA



Formalin fixálás: P-ANCA



Formalin fixálás: atípusos P-ANCA



Anti-nukleáris antitest (ANA) meghatározás

Az anti-nukleáris antitest meghatározásokat HEp-2 sejteken (ANA-Hep-2) 1:40 arányban hígított szérummintákból, IIF módszerrel (ImmuGlo, IMMCO Diagnostics, Inc., Buffalo, NY) végeztük. Az eredményeket IIF mikroszkópban 400-szoros nagyítás mellett értékeltük.

Coeliakia specifikus autoantitestek meghatározása (endomysium [EMA] és transzglutamináz [anti-TG] elleni antitest)

Az IgA és IgG osztályú EMA vizsgálatok humán köldökszínór szubsztráton IIF módszerrel a korábban már ismertettek szerint történtek⁸⁸. Az anti-TG antitest meghatározást ELISA-val végeztük, *Escherichia coli*-ban termeltetett humán rekombináns antigén felhasználásával^{89,90}.

7.3 Genetikai vizsgáló eljárások

A genetikai vizsgálatokat a betegeknél már korábban elvégezték. Teljes vérből történő DNS szeparálást követően a **TLR4 D299G** polimorfizmust PCR-RFLP segítségével határozták meg. A **NOD2/CARD15** esetén a lehetséges mutációkat (single nucleotide polymorphism [SNP] 8, SNP12, és SNP13) denaturáló nagyteljesítő-képességű folyadék chromatographia (DHPLC) segítségével vizsgálták és direkt szekvenálással bizonyították²¹. A **HLA DQ allélok** meghatározása szekvenciaspecifikus primerek felhasználásával, PCR segítségével történt⁹¹.

Statisztikai analízis

A szerológiai vizsgálatok esetén a normalitás vizsgálatot Shapiro Wilk's W test segítségével végeztük. Az IBD betegek és a kontrollok, valamint az egyes IBD alcsoportok adatainak összehasonlítására T-próbát különböző varianciájú csoportokra, Fischer-exact-tesztet, illetőleg χ^2 -próbát alkalmaztunk helyenként Yates-korrekcióval, OR-t határoztunk meg 95% CI-val. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az atípusos P-ANCA, ASCA és a két antitest kombinációjának esetén is szenzitivitást, specificitást, pozitív

prediktív értéket (PPV) és negatív prediktív értéket (NPV) számoltunk, hogy meghatározzuk az adott antitestek és azok kombinációjának prediktív értékét a colitis ulcerosa, Crohn-betegség, izolált colon lokalizációjú Crohn-betegség és a kontroll csoport elkülönítésében. Amennyiben szükséges volt, meghatároztuk a prevalenciát, és használtuk a számításokban. A genetikai és klinikai adatok összehasonlítására logisztikus regressziót alkalmaztunk, az eredményeket OR és 95% CI formájában fejeztük ki. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

7.4 Etikai engedélyek

A vizsgálatokat minden esetben a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum és a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyével végeztük (81/2003; DEOEC RKEB/IKEB: 2595/2007, 2006/2007, 2601/2007). A betegek és a kontroll személyek a vizsgálatokról részletes szóbeli és írásbeli tájékoztatást kaptak és aláírták a beleegyező nyilatkozatot.

7.5 Anyagi források

A tanulmányok Mecenatúra (11/2005), OTKA (T43003, K61868), ETT (347/2006, 041/2006) pályázatok, EU Marie Curie Mobility Grant MRTN-CT-2006-036032 (TRACKS), Richter Gedeon a Gasztroenterológiai Kutatásért Pályázat (2007), a Debreceni Régió Gasztroenterológusainak Közhasznú Egyesülete, valamint az INOVA Diagnostics támogatásával történtek.

7.6 Betegek kiválasztása

7.6.1 Haptoglobin polimorfizmus vizsgálathoz

I. tanulmány: A vizsgálatban 712 egymással rokonságban nem álló **coeliakiás beteg** vett részt (357 gyerek és 355 felnőtt, medián életkor: 17 év [tartomány: 2-85], medián életkor a diagnózisakor: 7 év [tartomány: 1-85], férfi/nő arány: 233/479).

A coeliakia diagnózisát a vékonybélbiopsiás mintában észlelt crypta hyperplasiával járó súlyos boholyatrófia (Marsh III típusú lézió)⁹² és az emelkedett anti-TG elleni antitest

szint és /vagy EMA jelenléte alapján állítottuk fel⁹³. Azokat a betegeket, akiknél nem állt rendelkezésre szerológiai vizsgálati eredmény, csak akkor vontuk be a vizsgálatba, ha a diagnózist a klasszikus glutén terheléses teszt⁹⁴ és a HLA-DQ2 vagy DQ8 haplotípusok jelenléte is megerősítette. A dermatitis herpetiformist akkor tekintettük bizonyítottnak, ha a bőr direkt immunfluoreszcens vizsgálata a bőr papilláiban IgA depozitumokat mutatott⁹⁵.

A klinikai adatokat a kezelőorvosok által kitöltött részletes kérdőív alapján nyertük. Az adatok a következők voltak: nem, aktuális életkor, életkor a diagnózis felállításakor és a betegség klinikai megjelenési formája az alábbi kategóriák szerint: (i) súlyos generalizált malabszorpció (a következő öt tünet közül legalább négynek a megléte: hasmenés, puffadás, súlygyarapodás elmaradása vagy fogyás, hypoproteinemia) vagy fejlődésbeni visszamaradás; (ii) nem specifikus gasztrointesztinális tünetek, melyek az általános állapotot, vagy szomatikus fejlődést nem befolyásolják (hasmenés, székrekedés, puffadás, visszatérő hasi fájdalom, vagy hányás, reflux oesophagitis); (iii) vashiányos anémia különösebb gasztrointesztinális panaszok nélkül; (iv) dermatitis herpetiformis; (v) silent forma (populációsűrűs); (vi) egyéb (autoimmun betegségek, csontok csökkent ásványi anyag tartalma, májbetegség, neurológiai kórképek). A betegeket a diagnózis felállításakor a klinikum, a laboreredmények [-2SD (standard deviáció) életkornak megfelelő] és a növekedési görbék [-2SD életkornak megfelelő] alapján prospektív módon soroltuk be a fenti csoportokba.

II. tanulmány: A vizsgálatban 511 egymással rokonságban nem álló **IBD beteget** (Crohn-beteg: 468, életkor: 36,5±12,7 év, férfi/nő arány: 233/235, betegségstartam: 8,2±6,7 év és colitis ulcerosus: 43, életkor: 38,7±15,7 év, férfi/nő arány: 22/21, betegségstartam: 9,6±10,6 év) vizsgáltunk. A Crohn-betegek klinikai adatait a **4. táblázat** tartalmazza.

Az IBD diagnózisának felállítása a Lennard-Jones által leírt (klinikai, endoszkópos, radiológiai és kórszövettani) kritériumok alapján történt⁸. A betegek adatainak rögzítését a gondozó gastroenterológus szakorvos végezte előre elkészített kérdőív kitöltésével, mely tartalmazta a beteg nemét, az aktuális és a betegség felismeréskori életkort, az extraintesztinális tünetek jelentkezését (arthritis: perifériás, axiális; szemészeti szövődmények: conjunctivitis, uveitis, iridocyclitis; bőrelváltozások: erythema nodosum, pyoderma gangrenosum; májszövődmények: PSC; a relapszusok gyakoriságát (gyakori relapszus: >1/év), a gyógyszeres kezelés hatékonyságát (szteroid és/vagy immunszuppresszív szerek alkalmazásának szükségessége, szteroid-rezisztencia az ECCO [European Crohn's and Colitis Organisation] Konszenzus Report alapján⁹⁶, vagy az

infiximab kezelésre adott rövid-távú válasz), a sebészeti beavatkozás szükségességét (reszekciós műtétek), a családi IBD előfordulást, a dohányzási szokásokat. Továbbá a perianális szövődmény jelentkezését is rögzítettük. A betegség klinikai osztályozását (betegség felismeréskori életkor, a betegség lokalizációja, viselkedése) a bécsi klasszifikáció szerint végeztük⁹⁷ (≤ 40 év [A1], >40 év [A2]; terminális ileum [L1], colon [L2], ileocolicus [L3], felső tápcsatornai [L4] érintettség; gyulladásos [nem stenotizáló, nem penetráló] [B1], stenotizáló [B2] vagy penetráló [B3] betegségforma). Colitis ulcerosa esetén a betegség kiterjedését a követési idő alatt észlelt legnagyobb kiterjedés alapján határoztuk meg. A betegség lefolyását krónikus kontinuosnak tekintettük, ha a relapsusok száma évente >1 volt.

A tanulmányba történő bevonás feltétele volt, hogy a végleges diagnózis felállításától legalább egy év elteljen, a beteg folyamatos ellenőrzés alatt álljon és két évnél ne legyen régebbi a tápcsatorna endoszkópos és szövettani vizsgálata.

A kontroll csoport 384 egészség egyénből állt (medián életkor: 38 év [tartomány: 17-69], férfi/nő arány: 192/192). A kontroll egyének esetén részletes belgyógyászati fizikális vizsgálat, vérnyomásmérés és rutin laboratóriumi vizsgálatok történtek az esetleges rejtett betegségek kizárására.

7.6.2 Szerológiai vizsgálatokhoz

A vizsgálatban 653, egymással rokonságban nem álló **IBD beteget** (Crohn-beteg: 558, férfi/nő arány: 263/295, életkor: $36,3 \pm 12,6$ év, betegségstartam: $8,1 \pm 10,7$ év és colitis ulcerosás: 95, férfi/nő arány: 44/51, életkor: $39,7 \pm 14,5$ év betegségstartam: $8,9 \pm 9,8$ év) és 100 korban- és nemben egyező egészséges kontroll egyént vizsgáltunk (férfi/nő arány: 47/53, életkor: $36,6 \pm 9,1$ év). Az IBD diagnózisának felállítása a fentiekben ismertetett módon történt (7.6.2.1). A Crohn-betegek klinikai adatait a **6. táblázat** tartalmazza. Az összehasonlító ANCA vizsgálatokhoz 108 Crohn-beteg és 96 colitis ulcerosás beteg szérumát használtuk fel.

8. Eredmények

8.1 Haptoglobin polimorfizmus vizsgálata

8.1.1 Haptoglobin polimorfizmus: új genetikai kockázati tényező a coeliakia kialakulásában és klinikai megjelenési formáiban

A Hp molekula három fő fenotípusa különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns tulajdonsággal rendelkezik, és ezek kapcsolatot mutatnak különféle gyulladásos betegségek és autoimmun kórképek kórlefolásával. Coeliakiában egy egész sor gyulladásos folyamat zajlik, noha ezen eseményeknek a primer és szekunder szerepe mindmáig vitatott. Ezért tartottuk fontosnak azon hipotézis vizsgálatát, hogy a Hp polimorfizmus szerepet játszik-e a coeliakia patogenezisében és a betegség klinikai megjelenésében. A Hp polimorfizmus és a coeliakia kapcsolatával eddig mindössze egyetlen rövid közlés foglalkozott az 1970-es évek elejéről, mely szerint a Hp1-1 fenotípus előfordulása gyakoribb coeliakiával társult dermatitis herpetiformisban, a rendelkezésre álló adatok azonban hiányosak⁹⁸.

Nagyszámú, a tünetek teljes spektrumát reprezentáló coeliakiás betegek bevonásával vizsgáltuk a Hp polimorfizmus megoszlását és annak esetleges kapcsolatát a betegség klinikai megjelenési formájával. A 712 betegből 234 (32,9%) esetben a diagnózis felállítása súlyos generalizált malabszorpció vagy fejlődésbeni visszamaradás, 162 (22,8%) esetben általános leromlást nem okozó gasztrointesztinális tünetek, 67 (9,4%) esetben vashiányos anémia, 111 (15,6%) esetben dermatitis herpetiformis, 87 (12,1%) esetben pedig egyéb tünetek miatt történt. Ötvenegy betegben (7,2%) a betegség silent formájára szűrés kapcsán derült fény.

A coeliakiás betegekben a Hp2-1 típus előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt (56,9%), mint az egészséges populációban (46,1%, OR: 1,54, 95%CI: 1,20-1,98; $p=0,0006$). A Hp fenotípus megoszlásokat és Hp¹ allél frekvencia értékeket az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat Haptoglobín (Hp) fenotípusok és a Hp allélok gyakorisága coeliakiában és egészséges egyéneknél.

			Összevetés az egészséges kontroll csoporttal N=384		
			Hp (%)	OR (95% CI)	P
Coeliakia N=712	Hp1-1	71 (10,0%)	44 (11,5%)	0,86 (0,57-1,30)	0,44
	Hp2-1	405 (56,9%)	177 (46,1%)	1,54 (1,20-1,98)	0,0006
	Hp2-2	236 (33,1%)	163 (42,4%)	0,67 (0,52-0,87)	0,0023
	Hp1 allél frekvencia	0,3841	0,3451	1,18 (0,98-1,42)	0,3265

OR: Odds ratio

χ^2 - vagy Fisher's exact teszttel

Az egészséges kontroll populáció Hp fenotípus megoszlása megegyezett a korábbi, 25439 magyar egyént magába foglaló populációs szintű felmérés adataival⁹⁹ és a nem, valamint az életkor nem befolyásolta. A Hp1 és Hp2 allélok a kontroll csoportban megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

A coeliakiás betegek– akiknél a HLA eredmények rendelkezésre álltak (n=228) – mindegyike, legalább egy DQ2 vagy DQ8 allélt hordozott; a magas rizikóval járó DQ genotípusok előfordulási aránya (DQB1*0201/*0201 [DR3;DQ2/DR3;DQ2] vagy DQB1*0201/*0202 [DR3;DQ2/DR7;DQ2]) a három különböző Hp típus esetén azonos volt (Hp1-1: 40,0%, Hp2-1: 40,7%, Hp2-2: 38,8%), mely azt mutatja, hogy a HLA-asszociált hajlamosító tényezők előfordulása nem volt gyakoribb a Hp2-1-es coeliakiás csoportban. A kontroll csoport esetén HLA-DQ vizsgálatokat nem végeztünk.

A betegség klinikai megjelenési formáinak eltérő megoszlását észleltük a három különböző Hp genotípusú csoportban (**5. ábra** és **2. táblázat**). A Hp2-2-t hordozó személyeknél a súlyos, malabszorpcióval vagy fejlődésbeni visszamaradással jelentkező klinikai betegség kockázata magasabb volt (OR: 2,21 95%CI: 1,60-3,07), míg a nem-

specifikus vagy enyhe gasztrointesztinális tünetekkel járó forma (OR: 0,38, 95%CI: 0,25-0,58) vagy a silent betegség jóval ritkábban fordultak elő (OR: 0,35 95%CI: 0,16-0,76) a másik kétféle Hp fenotípust hordozó csoporthoz képest. Az összes Hp2-2 típusú coeliakiás beteg közül a betegség klinikai megjelenése 44,9%-ban volt malabszorpció vagy fejlődésbeni visszamaradás; ez szignifikánsabb gyakoribb volt, mint a teljes coeliakiás csoportban (32,9%, $p=0,0008$) vagy a másik két Hp fenotípusú csoportban (26,9%, $p<0,0001$). Hasonlóképpen, az összes malabszorpcióval vagy fejlődésbeni visszamaradással diagnosztizált coeliakiás beteg 45,3%-a volt Hp2-2 fenotípusú, annak ellenére, hogy a Hp2-2 fenotípus előfordulása coeliakiában alacsonyabb volt, mint az egészségesek között ($p=0,0023$).

A nem-specifikus vagy enyhe gasztrointesztinális tünetekkel jelentkező betegekben és a szűréssel felfedezett esetekben erős Hp2-1 túlsúly volt észlelhető (69,1% és 72,5%) a teljes coeliakiás csoporthoz képest, míg a Hp2-2 előfordulása ritkább volt.

A dermatitis herpetiformis előfordulás gyakoribb volt a Hp1-1 csoportban (22,5%) a másik két Hp csoporthoz (14,8%; $p=0,118$) és a teljes coeliakiás csoporthoz (15,6%; $p=0,131$) hasonlítva, a különbségek azonban nem bizonyultak szignifikánsnak. A dermatitis herpetiformis betegek mindössze 14,4%-a volt Hp1-1 típusú, míg a nagytöbbségük szintén a Hp2-1 csoportba tartozott.

A vashiányos anémia és az egyéb klinikai megjelenési formák előfordulási aránya a három különböző Hp fenotípusú csoportban azonos volt, továbbá megoszlásuk a teljes coeliakiás csoporttól sem tért el.

A **3. táblázat** az egyes Hp fenotípusok esetén a coeliakia különböző klinikai megjelenési formáinak esélyét foglalja össze.

Nem volt összefüggés a Hp fenotípusok és a diagnóziskori életkor között. Továbbá a férfi/női arány is megegyezett a három különböző Hp csoportban (**2. táblázat**).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a Hp2-1 fenotípus szignifikánsan gyakoribb volt a magyar coeliakiás betegek körében a kontroll populációval összehasonlítva. A Hp2-2 jelenléte azonban súlyosabb betegségfolyásra hajlamosított. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a Hp polimorfizmus vagy egyéb társult polimorfizmusok szerepet játszanak a betegségre való fogékonyság kialakulásában, továbbá módosító tényezőként szerepelhetnek a betegség lefolyásában.

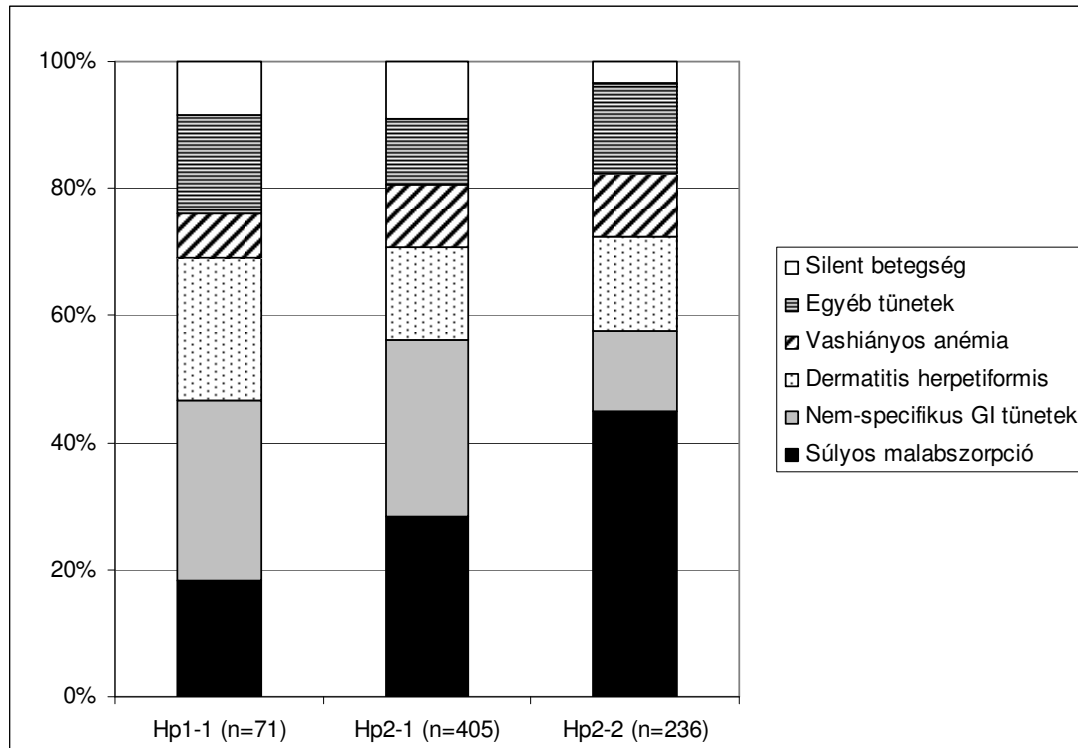
2.táblázat A hatoglobin (Hp) fenotípusok megoszlása a coeliakia eltérő klinikai megjelenési formáiban.

	Hp1-1 n=71 (10%)	Hp2-1 n=405 (56,9%)	Hp2-2 n=236 (33,1%)	Total n=712 (100%)
Férfi/nő	22/49	126/279	85/151	233/479
Átlagéletkor a diagnosis felállításakor (évek)	10,79±10,04	8,24±7,86	8,61±8,98	8,61±8,52
Hp típusok megoszlása a klinikai megjelenési formák szerint				
Súlyos malabszorpció/ fejlődésbeni visszamaradás, n	13 (5,6%)^{&}	115 (49,1%)^{&}	106 (45,3%)^{&}	234 (100%)
Nem-specifikus gasztrointesztinális tünetek, n	20 (12,4%)^{&}	112 (69,1%)^{&}	30 (18,5%)^{&}	162 (100%)
Vashiányos anémia, n	5 (7,5%)	39 (58,2%)	23 (34,3%)	67 (100%)
Dermatitis herpetiformis, n	16 (14,4%)	60 (54,1%)	35 (31,5%)	111 (100%)
Egyéb, n	11 (12,6%)	42 (48,3%)	34 (39,1%)	87 (100%)
Silent forma (populációsűrés) , n	6 (11,8%)[#]	37 (72,5%)[#]	8 (15,7%)[#]	51 (100%)

[&] p< 0,0001, [#] p= 0,005
 χ^2 - vagy Fisher's exact tesztel

5. ábra A coeliakia klinikai megjelenési formái a különböző haptoglobín (Hp) fenotípusok esetén.

GI= gasztrointesztinális



3. táblázat A különböző klinikai megjelenési formák esélye az egyes haptogloblin (Hp) fenotípus esetén coeliakiás betegekben.

Klinikai tünetek	Hp1-1 vs. nem Hp1-1			Hp2-1 vs. nem Hp2-1			Hp2-2 vs. nem Hp2-2		
	OR	95%CI	p	OR	95%CI	p	OR	95%CI	p
Súlyos malabszorpció/ fejlődésbeni visszamaradás	0,43	0,23-0,79	0,005	0,63	0,46-0,86	0,0035	2,21	1,60-3,07	< 0,0001
Nem-specifikus gasztrointesztinális tünetek	1,38	0,80-2,39	N.S.	1,97	1,35-2,65	0,0004	0,38	0,25-0,58	< 0,0001
Vashiányos anémia	0,71	0,27-1,82	N.S.	1,06	0,64-1,77	N.S.	1,06	0,62-1,8	N.S.
Dermatitis herpetiformis	1,67	0,92-3,04	N.S.	0,873	0,58-1,31	N.S.	0,92	0,59-1,42	N.S.
Egyéb	1,36	0,69-2,71	N.S.	0,67	0,43-1,06	N.S.	1,34	0,85-2,13	N.S.
Silent forma (populációsűrés)	1,22	0,50-2,98	N.S.	2,104	1,12- 3,97	0,0192	0,35	0,16-0,76	0,005

NS= nem szignifikáns

8.1.2 Haptoglobin polimorfizmus kapcsolata a Crohn-betegség viselkedésével és extraintesztinális manifesztációival

A Crohn-betegség patofiziológiájában egyre inkább előtérbe kerül az az újszerű szemlélet, miszerint a döntő fontosságú első lépés az innate immunitásban észlelhető defektus lenne, és ennek következményeként alakulna ki az adaptív immunitás zavara. A Hp-nak mind az innate mind pedig az adaptív immunrendszer szabályozásában betöltött komplex, esetenként fenotípusfüggő szerepe, valamint a granulomatosus fertőzések lefolyására kifejtett hatása alapján felmerülhet az IBD patogenezisével vagy annak kórlefolásával való kapcsolata is. Ugyanakkor a Hp polimorfizmus megoszlásáról IBD betegek vonatkozásában csak kevés adat ismert. Mindössze egy, a Th1/Th2 orientáció genetikai hátterét vizsgáló tanulmány részeként került sor 28 Crohn-betegben a Hp fenotípus-megoszlás meghatározására¹⁰⁰.

Multicentrikus tanulmányunkban magyar IBD betegekben, elsősorban Crohn-betegekben vizsgáltuk a Hp polimorfizmus megoszlást és annak esetleges kapcsolatát a betegség klinikai megjelenésével, a kezelésre adott válasszal és az extraintesztinális manifesztációkkal. Vizsgáltuk továbbá a Hp kapcsolatát más genetikai tényezőkkel (NOD2/CARD15 mutációkkal illetőleg a TLR4 D299G polimorfizmussal) is.

Crohn-betegségben a Hp1 allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő a kontroll egyénekhez képest (0,395 vs. 0,345; OR: 1,24, 95% CI: 1,02-1,51, $p=0,03$) (**5. táblázat**), a Hp fenotípus megoszlás azonban nem különbözött a vizsgált IBD csoportokban a kontroll populációtól (**4. táblázat**). A Crohn-beteg csoportban egyetlen ahaptoglobinaemiás (Hp 0-0) esetet észleltünk.

A Hp polimorfizmus nem mutatott összefüggést Crohn-betegségben sem a betegség kezdete kori életkorral, sem a betegség fennállásának időtartamával, sem pedig a családi IBD gyakorisággal. Nem volt hatással a betegség lokalizációjára. A Hp fenotípusok és a perianális manifesztáció között sem volt összefüggés kimutatható.

A betegség viselkedése azonban kapcsolatban állt a Hp polimorfizmussal: a 2-1 fenotípus esetén a gyulladásos (nem stenotizáló, nem penetráló) forma [B1] előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt (44,9%) a másik két Hp fenotípushoz viszonyítva (1-1: 36,6%, 2-2: 34,3%) (OR_{B1Hp2-1} vs egyéb: 2,06, 95%CI: 1,29-3,28), míg a stenotizáló forma [B2] előfordulása ritkább (2-1: 20,3%, 1-1: 32,4%, 2-2: 32,5%; $p=0,04$). A penetráló [B3]

forma előfordulása mindhárom fenotípus esetén azonos volt (*I-I*: 29,6%, *2-I*: 34,8% *2-2*: 32,5%). A relapszusok gyakorisága nem különbözött a fenotípusok alapján.

Az extraintesztinális manifesztációk közül PSC vonatkozásában jelentős különbséget találtunk a különféle Hp fenotípusok esetén. A 18 PSC-s betegből egyetlen esetben sem fordult elő *I-I* Hp fenotípus. Ezen megfigyelésünket egy nagyobb számú PSC betegcsoportban is meg tudtuk erősíteni ($n=63$) ($HpI-I$: 0%, $Hp2-I$: 52,4%, $Hp2-2$: 47,6%, $OR_{HpI-I \text{ vs. egyéb}}$: 0,06, 95%CI: 0,003-0,99; $p=0,0012$).

Crohn-betegségben a Hp polimorfizmus nem mutatott kapcsolatot, a szteroid- és az azathioprin-kezelés sajátosságaival illetőleg a sebészeti beavatkozásokkal.

Nem volt összefüggés a Hp fenotípusok és a TLR4 D299G polimorfizmus között sem. A NOD2/CARD15 gén LRR régiójában lévő három fő mutáció közül az SNP 12 az *I-I* fenotípus esetén szignifikánsan gyakrabban fordult elő (14,3% [9/63]), mint a másik két fenotípus esetén (*2-I*: 3,6% [7/186], *2-2*: 6,1% [9/138]) ($p=0,025$), az SNP 8 és 13-al nem találtunk kapcsolatot.

Colitis ulcerosában fenotípus-genotípus kapcsolatot nem találtunk, igaz az esetszám kicsi volt (adatokat nem mutatjuk).

4. táblázat Crohn-betegek klinikai adatai a haptoglobín (Hp) fenotípusok szerint.

	Hp1-1 (n=71)	Hp2-1 (n=227)	Hp2-2 (n=169)	Összes (n=468)
Nem (férfi/nő)	37/34	110/117	86/83	233/235
Életkor (évek)	36,2±12,7	36,0±12,7	37,4±12,6	36,5±12,7
Életkor a betegség kezdetekor (évek)	28,3±11,8	27,7±12,1	29,2±11,2	28,2±11,7
Betegségtartam (évek)	8,6±6,1	8,3±7,1	8,1±6,5	8,3±6,7
Családi IBD előfordulás ¹	12 (16,9%)	23 (10,1%)	23 (13,6%)	58 (12,4%)
Lokalizáció ¹				
L1	16 (22,5%)	55 (24,2%)	42 (24,9%)	113 (24,1%)
L2	18 (25,4%)	53 (23,3%)	44 (26,0%)	116 (24,8%)
L3	35 (49,3%)	115 (50,7%)	80 (47,3%)	230 (49,1%)
L4	2 (2,8%)	4 (1,8%)	2 (1,2%)	8 (1,7%)
Viselkedés¹				
B1	26 (36,6%)	102	58 (34,3%)	186 (40,4%)*
B2	23 (32,4%)	(44,9%)	55 (32,5%)	125
B3	21 (29,6%)	46 (20,3%)	55 (32,5%)	(26,7%)**
		79 (34,8%)		155 (33,1%)
Perianális lézió ¹	21 (29,6%)	64 (28,2%)	46 (27,2%)	131 (28,0%)
Gyakori relapszus ¹	25 (35,2%)	96 (42,3%)	73 (52,5%)	194 (41,6%)
Extraintesztinális tünetek				
Arthritis ¹	21 (29,6%)	73 (32,1%)	56 (33,1%)	150 (32,1%)
Szem ¹	6 (8,5%)	22 (9,7%)	10 (5,9%)	38 (8,1%)
Erythema nodosum, pyoderma ¹	5 (7,0%)	19 (8,4%)	13 (7,7%)	37 (7,9%)
PSC¹	0 (0,0%)	7 (3,1%)	11 (6,5%)	18 (3,8%)*
Szteroid kezelés/ refrakter ¹	60 (84,5%)	187 (82,4%)	145 (85,8%)	393 (84,0%)
Azathioprin kezelés	10 (14,1%)	18 (7,9%)	14 (8,3%)	42 (9,0%)
Reszekciós műtétek ¹	47 (66,2%)	146 (64,3%)	111 (65,7%)	305 (65,2%)
Reszekciós műtétek ¹	25 (35,2%)	89 (39,2%)	72 (42,6%)	186 (39,7%)
Többszörös reszekció ¹	8 (11,3%)	21 (9,2%)	22 (13,0%)	51 (10,9%)
Dohányzás (n)				
nem	46	135	88	270
igen	20	75	61	156
korábban	5	17	19	41
NOD2 (n=404)				
carrier	21 (33,3%)	58 (30,1%)	44 (29,9%)	123 (30,4%)
non-carrier ¹	42 (66,7%)	135 (69,9%)	103 (70,1%)	281 (69,6%)
TLR4 D299 (n=404)				
carrier	7 (12,5%)	22 (11,4%)	11 (7,5%)	41 (10,1%)
non-carrier ¹	56 (87,5%)	171 (88,6%)	136 (92,5%)	363 (89,9%)

¹n (%)

Lokalizáció: L1: terminális ileum, L2: colon, L3: ileocolicus, L4: felső tápcsatornai érintettség

Viselkedés: B1: gyulladásos [nem stenotizáló, nem penetráló], B2: stenotizáló, B3: penetráló betegségforma

*** OR_{B1Hp2-1} vs egyéb: 2,06, 95% CI: 1,29-3,28; ** p_{B2Hp2-1} vs egyéb: 0,04; *** p= 0,039**

a kontrollhoz képest

5. táblázat Haptogloblin (Hp) fenotípusok és a Hp allélok gyakorisága Crohn-betegekben, colitis ulcerosásokban és egészséges egyénekben.

	Esetek	Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2	Hp1 allél
Crohn- betegség, n (%)	468 (100,0%)	71 (15,2%)	227 (48,5%)	169 (36,1%)	0,3951*
Colitis ulcerosa, n (%)	43 (100,0%)	4 (9,4%)	23 (53,5%)	16 (37,2%)	0,3140
Kontrollok, n (%)	384 (100,0%)	44 (11,5%)	177 (46,1%)	163 (42,4%)	0,3451*

* OR:1,24, 95% CI: 1,02-1,51, $p=0,03$ a kontrollhoz képest

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a Hp1 allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő magyar Crohn-betegekben, a Hp fenotípusok pedig a betegség viselkedésével és a PSC gyakoriságával mutattak összefüggést, ami a Hp polimorfizmus vagy egyéb társult polimorfizmusok betegségmódosító szerepére utalnak Crohn-betegségben.

8.1.3 Megbeszélés

Tanulmányunk az első az irodalomban, mely nagyszámú coeliakiás és Crohn-beteg csoportban vizsgálta a Hp genetikai polimorfizmusának szerepét egyrészt a betegségre való fogékonyságban, másrészt a klinikai fenotípus kialakításában. A Hp fenotípusok azonosítására egy könnyen kivitelezhető gélelektroforézis módszert használtunk, mivel általánosan elfogadott, hogy a Hp fenotípusok megegyeznek a mögöttes genotípusokkal³⁷. Coeliakiás betegekben a Hp2-1 fenotípus/genotípus előfordulását szignifikánsan gyakoribbnak találtuk az egészséges kontroll populációhoz képest. Egyetlen, ovarium carcinomás betegekkel foglalkozó klinikai tanulmányt leszámítva¹⁰¹, nem ismert olyan

adat, amely bármely betegség és a Hp2-1 kapcsolatára utalna. Ezzel szemben a Hp1-1 (asthma bronchiale, atopiás dermatitis⁷², krónikus hepatitis C vírusfertőzés¹⁰² és májcirrhosis¹⁰³) vagy a Hp2-2 (diabéteszes betegek vascularis szövődményei³⁴, esszenciális hipertónia¹⁰⁴, vagy előrehaladott és terápiarezisztens tuberculosis¹⁰⁵) számos betegséggel összefüggésbe hozható. Az autoimmun betegségekkel foglalkozó néhány közlemény kis betegszámú vizsgálatokon alapul és az eredmények gyakran ellentmondásosak^{47,48}.

Friss irodalmi adatok arra utalnak, hogy a Hp befolyásolhatja a Th1/Th2 egyensúlyt, mely egy olyan újabb részlet, ami segíthet a coeliakia komplex patogenezisének megértésében. A lamina propria CD4+ T-sejtjeinek gliadin peptidek hatására bekövetkező aktivációja HLA-DQ2 vagy DQ8 molekulák jelenlétében a coeliakia patogenezisének egyik kulcslépése, ahol az IFN- γ alapvető fontosságú (Th1 dominanciájú folyamat)¹⁰⁶. A Hp *in vitro* körülmények között serkenti a Th1 választ azáltal, hogy jelentősen csökkenti a Th2-típusú citokin kiáramlást, melyet Hp^{-/-} egerekben *in vivo* adatok is alátámasztanak. A kísérleteket 1-1 és 2-1 fenotípusú Hp molekulák keverékével végezték, és nem volt jelen 2-2 molekula¹⁷.

A Hp polimorfizmust nagyszámú IBD betegben vizsgálva, a Hp1 allél prevalenciáját szignifikánsan gyakoribbnak találtuk Crohn-betegekben, a Hp fenotípus megoszlás azonban nem különbözött az egészséges kontroll populációban észlelt megoszlástól, ugyanakkor a betegség bécsi klasszifikáció⁹⁷ szerinti gyulladásos formájában [nem stenotizáló, nem penetráló; B1] a Hp2-1 fenotípus előfordulása szignifikánsan magasabb volt, a stenotizáló [B2] formához képest. Saját megfigyelésünk eltér attól az egyetlen irodalmi adattól, mely szerint Crohn-betegségben Hp1-1 fenotípusú egyént nem találtak. Bottini és mtsai tanulmányukban azonban mindössze 28 Crohn-beteget vizsgáltak¹⁰⁰. Érdekes módon a myosin IX gén coeliakiára hajlamosító allél variánsai Crohn-betegekben szintén kimutathatóak voltak¹⁰⁷, feltehetően azoknak a gyulladásos folyamatokat elősegítő tulajdonságaik miatt. A Hp1-1 önmagában inkább Th2-asszociált betegségekre hajlamosíthat, és *in vitro* körülmények között a Hp2-2-höz képest nagyobb mértékben fokozza az anti-inflammatorikus IL-6 és IL-10 termelődését¹⁰⁸.

A coeliakia és a Hp1 és Hp2 allélokra heterozigóta állapot közötti kapcsolat meglehetősen szokatlan és további magyarázatra szorul, miért is hajlamosít jobban a betegség kialakulására a Hp1 és Hp2 homozigóta formákhoz képest. Ehhez fontos lehet az a tény, hogy a Hp2-1 genotípusú egyénekben termelődő lineáris polimerek molekuláris

szerkezete jelentősen különbözik mind a Hp2-2, mind pedig a Hp1-1 gentotípus esetén keletkező Hp molekulákétól és feltehetőleg működését tekintve is eltér azoktól.

In vitro és *in vivo* eredmények egyaránt alátámasztják az eltérő Hp fenotípusok különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns tulajdonságait. Sajnálatos módon a Hp működését vizsgáló tanulmányok többsége csak a Hp1-1 és Hp2-2 fenotípusú molekulák jellegzetességeit hasonlította össze, és alig néhány foglalkozott tisztított Hp2-1 molekulával¹⁷. Éppen ezért csak kevés információ áll rendelkezésre a Hp2-1 molekula valódi viselkedéséről és annak feltételezett intermedier hatása egyáltalán nem megalapozott. A Hp2-1 mind az 1-1, mind pedig a 2-2 molekula bizonyos szerkezeti jellegzetességeit hordozza. Egyrészt megtalálhatók benne a Hp2-2-re jellemző nagy molekulatömegű polimerek, ugyanakkor a molekula két végén egy-egy $\alpha\beta$ alegységet hordoz. A szerkezeti jellegzetességeknek megfelelően elképzelhető hogy a Hp2-1 bizonyos funkciók tekintetében inkább a Hp1-1, míg másokban a Hp2-2-vel mutat hasonlóságot.

A coeliakia klinikai megjelenése rendkívül változatos, a betegség egyaránt jelentkezhet gyermek- és felnőttkorban, és különféle szervrendszereket érinthet. A coeliakia kórlefolyására jellemző, hogy kezdetben a beteg teljesen tünet- és panaszmentes lehet és a betegsége jellegzetes klinikai kép csak később fejlődik ki¹⁰⁹. Továbbá a klinikai képet kezdetben domináló tünetek is változhatnak a betegség lefolyása során, ami tovább nehezíti a betegség megjelenési formáiért felelős tényezők azonosítását. Éppen ezért vizsgálatunkban csak néhány, egymástól jól elkülöníthető kategóriát állítottunk fel a betegség megjelenéskor észlelt tünetek alapján, melyekbe a betegeket a diagnózis felállításakor prospektív módon soroltuk be.

A tanulmányunkban szereplő betegcsoport elég nagy volt ahhoz, hogy ne csak a kifejezett malabszorpciós tünetekkel jelentkező, hanem a tünetmentesen kiszűrt, vagy enyhe tünetekkel bíró betegek is kellőképpen reprezentálva legyenek, amiben szerepet játszott a résztvevő klinikai központok széleskörű diagnosztikus aktivitása. Coeliakiás kohorszunkban a kontroll populációhoz képest a Hp2-2 fenotípus előfordulása szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,0023$), de ezen fenotípusú személyeknél a súlyos, malabszorpcióval jelentkező vagy fejlődésbeni visszamaradással járó betegségforma kockázata magasabb volt. Korábban ezek a súlyos tünetek számítottak a coeliakia klasszikus megjelenési formájának, manapság azonban csak a jéghegy csúcsát képviselik¹¹⁰. Ugyanakkor a Hp2-2 fenotípus esetén nem észleltük a betegség koraiabb megjelenését, ezt azonban magyarázhatja az is, hogy az utóbbi években nagyszámú, enyhe panaszokkal bíró kisgyermeknél állítottuk fel a coeliakia diagnózisát. A Hp2-2 a nem-

specifikus és enyhe gasztrointesztinális tünetekkel jelentkező betegek vagy tünetmentes egyének között ritkán fordult elő, míg a Hp2-1 előfordulása még magasabb volt (69,1 és 72,5%), mint a coeliakiás csoportban összességében (56,9%).

A tünetmentes esetek legalább hétszer gyakoribbak a tünetekkel jelentkező formánál¹¹⁰, ami szintén alátámasztja a Hp2-1 és a coeliakia közötti primer kapcsolatot. A Hp2-2 betegségmódosító hatása összefügghet a molekulának az oxidatív szövetkárosodás elleni védekezés¹¹¹ és a gyulladásos folyamatok down-regulációjában mutatott csekély hatékonyságával. A klinikumban ez a hatás a Hp2-2 és a diabéteszes érszövődmények közötti szoros összefüggésben nyilvánul meg¹¹². A Hp2-2-Hb komplexek kevésbé hatékonyan és lassabban eliminálódnak a CD163 receptoron keresztül, mint a Hp1-1-t tartalmazók. Továbbá a Hp2-2 a CD163 expressziójának szignifikáns csökkenésével is együttjár¹¹³. Az extravascularis terekben a CD163 receptor jelenti a Hp-Hb komplexek clearance-ének egyetlen útját, ezért a Hp2-2 fenotípusú egyének esetében a reaktív oxigén gyökök felszaporodhatnak.

Újabb irodalmi eredmények arra utalnak, hogy a makrofágok CD163 receptorai nemcsak a Hp-Hb komplex scavenger receptoraként szolgálnak, hanem az IL-10, HO-1, és bilirubin szintézis elősegítése révén immunmoduláló hatással rendelkeznek és elsősorban az anti-inflammatorikus folyamatokban játszanak jelentős szerepet¹³. Kimutatták továbbá, hogy ha a Hp2-2-Hb komplex kötődik a CD163 receptorhoz, a Hp1-1-hez képest szignifikánsan kisebb mennyiségű anti-inflammatorikus IL-10 szabadul fel³⁵. Az IL-10-nek immunreguláló hatása van a gliadin dependens T sejt aktivációban, gátolja az antigén prezentációt, és fokozza a hiporeszponzív gliadin specifikus T-sejtek képződését¹¹⁴. A Hp2-2 esetében ezen felül a szervezet immunreaktivitása is kifejezettebb, melynek okai lehetnek a prosztaglandin szintézisre kifejtett gátló hatás^{115,116}, valamint, hogy a perifériás vérben nagyobb számban jelennek meg B- és CD4+ T lymphocyták¹⁶.

Nagyszámú dermatitis herpetiformis beteganyagunkban nem sikerült igazolni Marks és mtsai⁹⁸ azon, 1971-ből származó megfigyelését, miszerint ebben a betegségben a Hp1-1 fenotípus előfordulása gyakoribb, mint coeliakiában. Az ő beteganyaguk azonban kisszámú volt és a szerzők nem közöltek pontos adatokat sem a betegek számáról, sem pedig a Hp fenotípusok gyakoriságáról. Jelen vizsgálatban szereplő 111 dermatitis herpetiformis beteg mindössze 14%-ában fordult elő Hp1-1 fenotípus, mely megfelelt az átlagpopulációban észleltnek.

A PSC és a Hp polimorfizmus kapcsolatát eddig nem vizsgálták, illetőleg az irodalomban nem ismert olyan betegcsoport, ahol a Hp1-1 fenotípus teljes hiányáról

számoltak volna be. A PSC kialakulása során immungenetikailag fogékony egyénben a béltraktus krónikus gyulladása során transzlokálódó baktériumok az epeúrendszerben antigénként jelenhetnek meg, a memória T-sejtek pedig nemcsak a colon, hanem az epeutak endothel sejtjeihez is kötődnek. A memória T-sejtek biliáris traktusba történő homingja vezethet a PSC kialakulásához. Újabb adatok az epeúrendszer oxidatív károsodásában felvetik a mononucleáris sejtek jelentőségét is¹¹⁷. Primer szklerotizáló cholangitisben a sinusoidális és a perisinusoidális térben makrofágok szaporodnak fel. Az aktivált makrofágoknak és az általuk termelt citokineknek szerepük lehet a gyulladás fenntartásában, a fibrosis, majd a cirrhosis kialakulásában¹¹⁸. A Hp fenotípusok és a PSC kapcsolatának egyik lehetséges magyarázata a CD163+ makrofágok eltérő viselkedése a különböző Hp molekulákkal való kölcsönhatás során^{32,46,108}. Másrészt a PSC immungenetikai modelljéhez illeszkedhet az a megfigyelés, hogy a szervezetnek a különféle bakteriális fertőzésekre adott válasza, annak hatékonysága az egyes Hp fenotípusok esetén jelentősen eltér^{102,105, 119}.

A kapott eredményeink megerősítésére azonban további, földrajzilag eltérő régióban végzett populációs vizsgálatok szükségesek. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására is, hogy a különböző Hp molekulák milyen szerepet játszanak a különféle gyulladásos folyamatokban, és mi lehet azok pontos patogenetikai kapcsolata az általunk vizsgált betegségsoportokban.

8.2 Szerológia vizsgálatok gyulladásos bélbetegségekben

8.2.1 A mikrobiális antigének elleni szerológiai válasz Crohn-betegségben összefügg a vékonybél érintettséggel, a nem-gyulladásos típusú betegség lefolyással és a NOD2/CARD15 genotípussal, de nem korrelál a gyógyszeres kezelésre adott válasszal és műtétek gyakoriságával

Mai elképzelésünk szerint IBD-ben a bélnyálkahártya krónikus gyulladása és az ehhez társuló különféle szisztémás tünetegyüttesek az endogén belfórával szemben kialakuló túlméretezett immunválasz következményei. A bélnyálkahártya immun és/vagy barrier funkciójának genetikai zavara esetén a patológiás folyamatot bizonyos környezeti hatások indítják el. Állatkísérletes adatok alapján az egyén és a bélbaktériumok közötti kölcsönhatás különösen fontos lehet. A pontos mechanizmust azonban, melynek során a bélnyálkahártya áteresztővé válik a bakteriális környezettel szemben, egyelőre nem

ismerjük. Egy adott genetikai defektus megléte esetén a kommenzális baktériumflóra nem minden tagja képes patológiás immunválasz kiváltására, valamint a kialakuló immunválasz mértéke is eltérő lehet, ennek megfelelően a betegség klinikai megjelenése is^{120,121}. A luminalis antigénekkal szembeni immuntolerancia elvesztése IBD-ben ismert⁶⁴, ugyanakkor a szerológiai markerek diagnosztikus és patogenetikai jelentősége még számos részletét tekintve tisztázásra vár. Továbbá az antitestek prevalenciáját tekintve jelentős földrajzi eltérésekről számoltak be. A szerológiai markerekkel kapcsolatosan Kelet-Európából pedig csak szórványosan állnak adatok rendelkezésre.

Jelen tanulmány célja az volt, hogy nagyszámú IBD betegben vizsgáljuk a különféle szerológiai markerek (ASCA, anti-Omp és atípusos P-ANCA) előfordulását és azok esetleges összefüggését a betegség klinikai megjelenési formájával, a kezelésre adott válasszal és az extraintesztinális szövödményekkel. Vizsgáltuk továbbá a szerológiai válasz és a genetikai faktorok (NOD2/CARD15 mutációk és TLR4 D299G polimorfizmus) kapcsolatát.

Szerológiai markerek előfordulási gyakorisága és klinikai haszna IBD-ben

Az anti-Omp, ASCA és atípusos P-ANCA előfordulási gyakoriságát a **7. táblázat** mutatja. Crohn-betegségben a medián ASCA IgA, IgG és anti-Omp titerek rendre a következők voltak: 17,9 U/ml (interkvartilis tartomány [IQR]: 9,8 és 58), 25,1 U/ml (9,5 és 53,7) és 16,0 U/ml (10,3 és 26,6). Az ASCA és az anti-Omp antitestek jelenléte Crohn-betegség ($OR_{ASCA}=7,65$, 95%CI: 4,37-13,4; $OR_{Omp}=1,81$, 95%CI: 1,08-3,05, χ^2 -teszt Yates korrekcióval), míg az atípusos P-ANCA pozitivitás colitis ulcerosa fokozott kockázatával járt ($OR_{P-ANCA}=10,91$, 95%CI: 4,34-27,41) a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az atípusos P-ANCA és az ASCA pozitivitás gyakorisága colitis ulcerosa és Crohn-betegség esetén is szignifikánsan eltért egymástól. A Crohn-betegek 20,8% -a az ASCA IgA, ASCA IgG és anti-Omp antitestek mindegyikére pozitív volt, ezzel szemben a colitis ulcerosás betegekben (3,2%), valamint a kontroll egyéneknél (1%) a hármas antitest pozitivitás ritka volt ($p<0.0001$ mindkét esetben) (**6. ábra**).

6. táblázat Az ASCA és az anti-OMP összefüggése a Crohn-betegség fenotípusával.

	Összes (n=558)	ASCA pozitív (n=331)	ASCA negatív (n=227)	Anti-Omp pozitív (n=174)	Anti-Omp negatív (n=384)
Nem (F/N)	263/295	165/166	98/129	80/94	183/201
Életkor (év)	36,3 ± 12,6	33,3 ± 11,4*	40,9 ± 12,8*	35,8 ± 12,7	36,7 ± 12,6
Életkor a betegség kezdetekor (év)	28,3 ± 11,3	25,6 ± 9,9*	32,4 ± 12,2*	26,7 ± 11,5**	29,1 ± 11,3**
Betegségtartam (év)	8,7 ± 7,6	7,7 ± 6,3	8,4 ± 7,2	9,1 ± 6,7**	7,5 ± 6,6**
Családi IBD előfordulás ^a	69 (12,3%)	43 (12,9%)	26 (11,5%)	19 (10,9%)	50 (13,0%)
Lokalizáció (n)					
L1	127	77*	50*	31	96
L2	140	59	81	43	97
L3	286	190	96	97	189
L4	5	5	0	3	2
Viselkedés (n)					
B1	222	109*	113*	41*	181*
B2	149	95	54	58	91
B3	187	127	60	75	112
Perianalis lézió ^a	163(29,2%)	113 (34,1%)***	50 (22,0%)***	60 (34,5%)	103 (26,8%)
Gyakori relapsus ^a	223 (39,9%)	140 (42,3%)	83 (36,6%)	74 (42,5%)	148 (38,5%)
Arthritis ^a	165 (29,6%)	94 (28,4%)	71 (31,3%)	61 (35,1%)	104 (27,1%)
Szemészeti tünet ^a	39 (7,0%)	24 (7,3%)	15 (6,6%)	20 (11,5%)**	19 (4,9%)**
Szteroid kezelés/refrakter ^a	457 (81,9%) / 54 (11,8%)	280 (84,8%)/ 36 (12,9%)	177 (78,0%) / 18 (10,2%)	150 (86,2%) / 19 (12,7%)	307 (79,9%) / 35 (11,4%)
Azathioprinkezelés ^a	363 (65,1%)	224 (67,7%)	139 (61,3%)	126 (72,4%)**	237 (61,7%)**
Reszekciós műtét ^a	228 (40,9%)	152 (45,9%)***	76 (33,5%)***	95 (54,6%)*	133 (34,6%)*
Infliximab kezelésre adott válasz:					
-remisszió	23	18	5	8	15
-parciális	28	13	5	8	10
-nincs hatás	15	10	5	6	9
Dohányzás (n)					
nem	332	201	131	110	222
igen	183	106	77	54	129
korábban	43	24	19	10	33
NOD2 (n=457) carrier	138	101*	37*	53***	85***
Non-carrier	319	162	101	79	240
TLR4 (n=457) carrier	44	24	20	12	32
Non-carrier	413	239	174	120	293

¹n (%)

Lokalizáció: L1: terminális ileum, L2: colon, L3: ileocolicus, L4: felső tápcsatornai érintettség

Viselkedés: B1: gyulladásos [nem stenotizáló, nem penetráló], B2: stenotizáló, B3: penetráló betegségforma

* $p<0,0001$; ** $p=0,02$; *** $p=0,002$ ASCA-pozitív és negatív vagy anti-Omp pozitív és negatív betegek között χ^2 -tesztet vagy χ^2 -tesztet Yates korrekcióval alkalmazva

7. táblázat Szerológiai markerek Crohn-betegségben, colitis ulcerosában, valamint egészséges kontroll egyénekből.

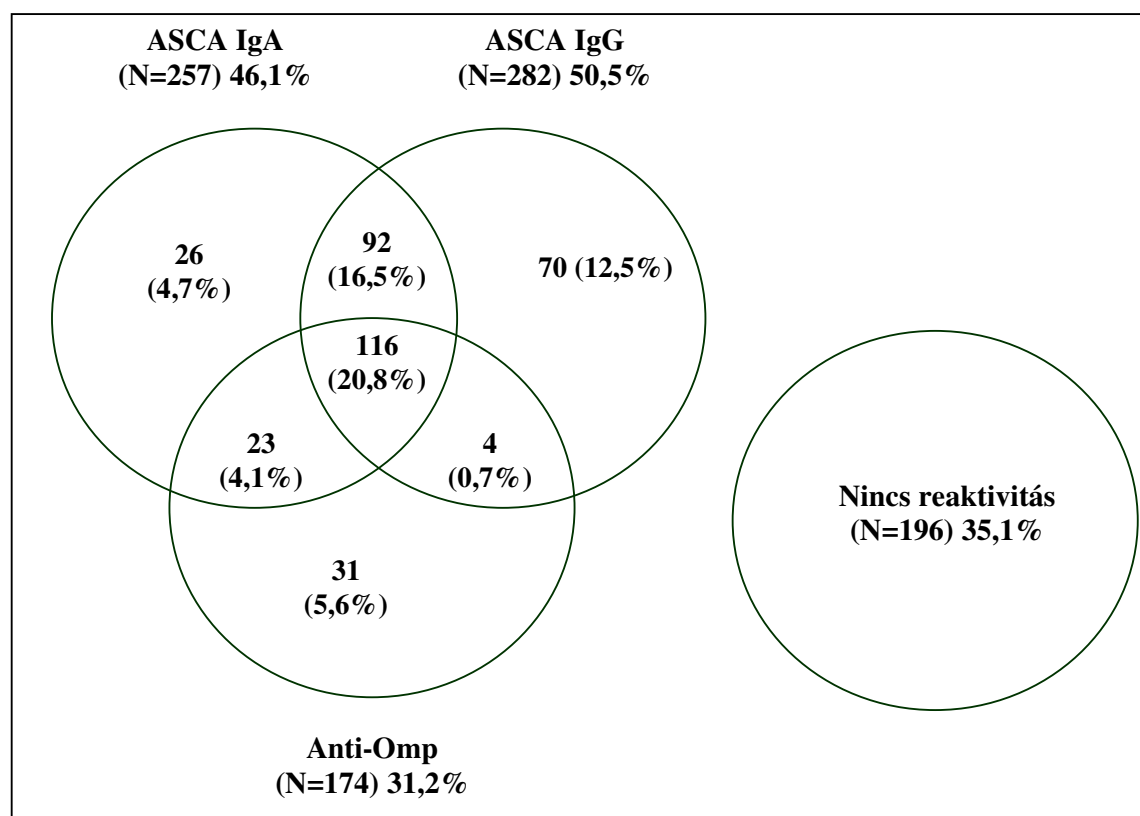
	P-ANCA	ASCA IgA és/vagy IgG	Anti-Omp
Crohn-betegség (n=558)	77 (13,8%)*,&	331(59,3%)**,&	174 (31,2%)*
Colitis ulcerosa (n=95)	39 (41,1%)*,&	13 (13,7%)*	23 (24,2%)
Kontroll (n=100)	6 (6%)*, #	16 (16%)*	20 (20%)*

Crohn-betegség vs. kontroll: * $p=0,036$; ** $p<0,0001$; *** $p=0,024$

Colitis ulcerosa vs. kontroll: # $p<0,0001$

Crohn-betegség vs. colitis ulcerosa: & $p<0,0001$, χ^2 -teszt alkalmazása Yates korrekcióval

6. ábra Az anti-mikrobiális antitestek megoszlása Crohn-betegségben.



A szerológiai markerek kombinációja (mint pl. P-ANCA+/ASCA-, P-ANCA-/ASCA+ vagy ASCA IgA és IgG együttes pozitivitás) elfogadható specificitást és pozitív prediktív értéket mutatott a kontroll csoport, a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség elkülönítésében. A szerológiai markerek kombinációja még a colon lokalizációjú Crohn-betegséget (L2) és colitis ulcerosát is elfogadható módon tudta elkülöníteni (8. táblázat). A szerológiai markerek kombinációjának szenzitivitása ugyanakkor alacsonynak bizonyult. (Az anti-Omp eredményeket nem mutatjuk).

8. táblázat Szerológiai markerek prediktív értéke Crohn-betegségben és colitis ulcerosában.

	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	PPV (%)	NPV (%)
P-ANCA Colitis ulcerosa vs. Kontroll	41	94	87	61
P-ANCA Colitis ulcerosa vs. Crohn-betegség	41	86	75	59
P-ANCA Colitis ulcerosa vs. Crohn-betegség colon (L2)	41	66	54	53
ASCA IgA és/vagy IgG Crohn-betegség vs. Kontroll	59	84	79	67
ASCA mind IgA&IgG Crohn-betegség vs. Kontroll	37	99	97	61
ASCA IgA és/vagy IgG Crohn-betegség vs. Colitis ulcerosa	59	86	81	68
ASCA mind IgA&IgG Crohn-betegség vs. Colitis ulcerosa	37	95	87	60
ASCA IgA és/vagy IgG Crohn-betegség colon (L2) vs. Colitis ulcerosa	44	86	76	61
ASCA mind IgA&IgG Crohn-betegség colon (L2) vs. Colitis ulcerosa	25	95	83	56
P-ANCA+ASCA- Colitis ulcerosa vs. Kontroll	36	95	88	60
P-ANCA+ASCA- Colitis ulcerosa vs. Crohn-betegség	36	93	84	59
P-ANCA+ASCA- Colitis ulcerosa vs. Crohn-betegség colon (L2)	36	91	80	59
P-ANCA-ASCA+ Crohn-betegség vs. Kontroll	52	85	78	64
P-ANCA-ASCA+ Crohn-betegség vs. Colitis ulcerosa	52	92	86	66
P-ANCA-ASCA+ Crohn-betegség colon (L2) vs. Colitis ulcerosa	38	92	82	60

PPV: pozitív prediktív érték; NPV: negatív prediktív érték; ASCA+: ASCA IgA és/vagy IgG pozitív

Szerológiai markerek kapcsolata az IBD fenotípusával és a műtéti kockázattal

Crohn-betegségben univariációs analízist végezve (χ^2 -teszt vagy χ^2 -teszt Yates korrekcióval) összefüggést tudunk kimutatni az anti-Omp pozitivitás, a betegség korábbi életkorban történő manifesztációja ($p=0,025$), a hosszabb betegségfennállás ($p=0,01$), a nem-gyulladásos ($p<0,0001$, OR: 2,89, 95%CI: 1,93-4,33) / penetráló betegségforma ($p=0,001$, OR: 1,84, 95%CI: 1,27-2,67), a szemtünetek előfordulása ($p=0,019$, OR: 2,23, 95%CI: 1,16-4,30), az azathioprin használat ($p=0,016$, OR: 1,62, 95%CI: 1,10-2,41) és a sebészeti beavatkozás szükségessége ($p<0,0001$, OR: 2,26, 95%CI: 1,58-3,27) között. Az ASCA pozitivitás a betegség korábbi életkorban történő manifesztációja ($p<0,0001$), a vékonybél érintettség ($p<0,0001$, OR: 2,51, 95%CI: 1,70-3,71), a nem-gyulladásos ($p<0,0001$, OR: 2,02, 95%CI: 1,43-2,86) / penetráló betegségforma ($p=0,004$, OR: 1,73, 95% CI: 1,20-2,51), a perianalis érintettség ($p=0,002$, OR: 1,83, 95%CI: 1,25-2,70) és a sebészeti beavatkozás szükségessége ($p=0,004$, OR: 1,69, 95%CI: 1,19-2,40) szempontjából bizonyult rizikófaktornak (**6. táblázat**).

A szerológiai markerek és a betegség viselkedése (**9. táblázat**), a szemtünetek, valamint a sebészeti beavatkozás szükségessége közötti összefüggést logisztikus regressziós analízisben is vizsgáltuk. Az anti-Omp és az ASCA független rizikófaktornak bizonyultak a nem-gyulladásos betegségforma szempontjából, míg az anti-Omp ($B=0,38$, $p=0,04$, OR: 1,47, 95%CI: 1,01-2,13) és a női nem ($B=1,11$, $p=0,005$, OR: 3,05, 95%CI: 1,41-6,62) a szemtünetek kialakulásával mutatott összefüggést ugyanabban a modellben, mely a nem-gyulladásos betegségformát, mint független változót is tartalmazta. Ezzel szemben a sebészeti beavatkozás szükségességének előrejelzésében a hosszabb betegségfennállás, a vékonybél érintettség és nem-gyulladásos betegségforma bizonyultak független kockázati tényezőknek, míg a P-ANCA, ASCA vagy anti-Omp statusz nem (adatokat nem mutatjuk).

Colitis ulcerosás betegekben nem találtunk fenotípus-szerotípus összefüggést (adatokat nem mutatjuk).

9. táblázat Logisztikus regresszió: A szerológiai adatok és a nem-gyulladásos típusú betegség lefolyás közötti összefüggés Crohn-betegségben

Tényező	koefficiens	P érték	OR	95 % CI
Női nem	0,19	0,30	1,21	0,83-1,73
Hosszabb betegség tartam (≤ 10 év vs. > 10 év)	0,86	$< 0,0001$	2,37	1,53-3,65
Crohn-betegség lokalizációja	-0,15	0,89	0,99	0,79-1,22
P-ANCA	-0,10	0,11	0,90	0,79-1,03
ASCA	0,29	0,003	1,33	1,10-1,61
Anti-Omp	0,42	$< 0,0001$	1,52	1,22-1,89
Aktuális dohányzás	0,13	0,25	1,13	0,91-1,41

A koefficiens az OR naturalis logjának felel meg; p érték: szignifikancia szint; OR: odds ratio; 95%CI: 95% konfidencia intervallum.

Szerológiai markerek kapcsolata a NOD2/CARD15 genotípusokkal

Az ASCA ($p < 0,0001$, OR: 2,64, 95%CI: 1,71-4,10) és az anti-Omp ($p = 0,005$, OR: 1,89, 95%CI: 1,24-2,90, χ^2 -teszt Yates korrekcióval) antitestek jelenléte univariációs analízisben összefüggést mutatott a NOD2/CARD15 genotípussal. Szerológiai gén-dózis hatást is ki tudtunk mutatni, azaz antimikrobiális antitestek előfordulási gyakorisága szignifikánsan nőtt a NOD2/CARD15 mutációk számának növekedésével. Az ASCA pozitivitás 50,6%, 70,7% és 80% volt a 0, 1 vagy 2 variáns NOD2/CARD15 alléllal ($p < 0,0001$) rendelkező betegekben, míg az anti-Omp antitestek 24,5%, 37,4% és 42,5%-ban ($p = 0,007$) voltak jelen. A NOD2/CARD15 és ASCA ($B = 0,406$, $p = 0,001$, OR: 1,50, 95%CI: 1,18-1,90) közötti összefüggés az antitest pozitivitást, a nemet, a betegség tartamot, a vékonybél érintettséget vagy csak a vékonybél betegséget, a nem-gyulladásos betegségformát és a dohányzást, mint független változókat tartalmazó logisztikus regressziós modellben is szignifikáns maradt, míg a NOD2/CARD15 és anti-Omp közötti összefüggés nem.

Szerológiai válasz nagyságának a betegség fenotípusával való összefüggése

A „szerológiai dózishatás” vizsgálatot a Mow⁷⁴ és Arnot⁶⁷ által korábban már leírt módon elvégezve pozitív összefüggést tudtunk kimutatni az antitest-válaszok száma

(ASCA és/vagy anti-Omp) és a vékonybél érintettség, a nem-gyulladásos betegségforma, valamint a sebészeti beavatkozás szükségessége között, míg az izolált colon érintettség és az antitest pozitivitások száma között fordított összefüggést találtunk (**10. táblázat**). Logisztikus regressziós modellben – mely magában foglalta a betegségstartamot, a nemet, a vékonybél érintettséget, a nem-gyulladásos betegség viselkedést és az aktuális dohányzást, mint független változókat – az antitest-válaszok száma független rizikófaktornak bizonyult a hosszabb betegségstartam ($p < 0,0001$, OR 3,01, 95%CI: 1,91-4,72), a nem gyulladásos betegség viselkedés ($p < 0,0001$, OR: 3,15, 95%CI: 2,46-4,03) és a vékonybél érintettség ($p = 0,001$, OR: 2,38, 95%CI: 1,44-3,93) tekintetében, a sebészeti beavatkozás szükségességének ($p = 0,076$) előrejelzésében azonban nem.

Az antimikrobiális antitest termelődés nagyságának és a betegség fenotípusának kapcsolata

Az ASCA IgA, IgG és anti-Omp antitest szintek közötti különbségeket medián értékekben és kvartilisekben is megadtuk (**11. táblázat**). A logisztikus regressziós analízisben a fent említett változókat figyelembe véve az ASCA IgA, IgG és anti-Omp kvartilis antitest szintek független kockázati tényezőknek bizonyultak a nem-gyulladásos betegség formát (ASCA IgA: $p < 0,0001$, OR: 1,39, 95%CI: 1,18-1,62; ASCA IgG: $p = 0,03$, OR: 1,28, 95%CI: 1,09-1,15; anti-Omp: $p < 0,0001$, OR: 1,44, 95%CI: 1,23-1,70) és a sebészeti beavatkozás szükségességét (ASCA IgA: $p = 0,004$, OR: 1,27, 95%CI: 1,08-1,49; ASCA IgG: $p = 0,003$, OR: 1,30, 95%CI: 1,10-1,53; anti-Omp: $p < 0,0001$, OR: 1,34, 95%CI: 1,14-1,58) illetően.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a szerológiai markerek saját beteganyagunkban is hasznosnak bizonyultak a Crohn-betegség és colitis ulcerosa differenciál diagnosztikájában. A mikrobiális antigének elleni szerológiai válasz Crohn-betegségben összefüggést mutatott a vékonybél érintettséggel, a nem-gyulladásos típusú betegség lefolyásával és a NOD2/CARD15 genotípussal, de nem korrelált sem a gyógyszeres kezelésre adott válasszal, sem pedig a műtétek gyakoriságával. A szerológiai markerek és a NOD2/CARD15 genotípus kapcsolata alátámasztja a megváltozott mikrobiális érzékelés jelentőségét a Crohn-betegség patogenezisében.

10. táblázat Crohn-betegekben az antimikrobiális antigének ellen termelődő antitest válaszok számának a betegség fenotípusával való összefüggése.

Klinikai fenotípus	Szerológiai marker pozitivitás			OR (0 vs. 2)	95% CI (0 vs. 2)
	0	1	2		
Ilealis érintettség	128 (65,3%)	175 (79,9%)	112 (78,3%)	1,92	1,17-3,15
Izolált colon érintettség	68 (34,7%)	42 (19,2%)	30 (21,0%)	0,50	0,30-0,82
Nem-gyulladásos típusú betegség	96 (48,9%)	125 (57,1%)	115 (80,4%)	4,28	2,60-7,05
Reszekciós műtétek	64 (32,7%)	81 (37,0%)	83 (58,1%)	2,85	1,82-4,46

A Crohn-betegség klinikai fenotípusának összefüggését mutatja az ASCA és anti-Omp antitestek jelenlétével.

Az eredmények függetlenek a P-ANCA, NOD2/CARD15 vagy TLR4 statusztól.

OR: odds ratio, 95%CI: 95% konfidencia intervallum, χ^2 -tesztet alkalmazva Yates korrekcióval.

11.táblázat A betegség jellegzetességei az egyes immunválasz kvartilisekben.

Klinikai fenotípus	ASCA IgA					ASCA IgG				
	Q1	Q2	Q3	Q4	p	Q1	Q2	Q3	Q4	p
Vékonybél érintettség	64,7%	73,7%	77,5%	81,0%	0,014	54,7%	72,9%	84,5%	85,1%	<0,0001
Izolált colon érintettség	35,3%	26,2%	22,0%	17,7%	0,001	43,2%	27,1%	15,5%	14,6%	<0,0001
Nem-gyulladásos betegségforma	49,6%	52,5%	66,9%	71,1%	<0,0001	49,7%	57,9%	66,9%	66,5%	0,009
Reszekciós műtétek	34,5%	33,8%	41,6%	52,8%	0,004	32,4%	36,4%	44,4%	50,4%	0,01

Klinikai fenotípus	Anti-Omp				
	Q1	Q2	Q3	Q4	p
Vékonybél érintettség	71,5%	74,5%	77,0%	74,4%	N.S.
Izolált colon érintettség	28,5%	24,1%	23,0%	25,0%	N.S.
Nem-gyulladásos betegségforma	50,8%	51,8%	58,3%	77,6%	<0.0001
Reszekciós műtétek	33,8%	35,0%	33,9%	58,6%	<0.0001

Megjegyzés. *Oszlopok:* Q1–Q4 megfelel az egyes szerológiai markerek alapján kvartilisekre lebontott betegcsoportoknak. A szerológiai válaszkészség a quartilis 1-be tartozó betegek esetén volt a legalacsonyabb, míg a quartilis 4 esetén a legmagasabb. *Sorok:* a számok az egyes fenotípusokba tartozó betegek százalékos arányát jelzik.

8.2.2 Megbeszélés

Munkánk során a kelet-európai régióból elsőként számoltunk be a szerológiai és a genetikai markerek közötti komplex összefüggésről nagyszámú IBD beteganyagot vizsgálva. Kimutattuk, hogy a bakteriális komponensekkel szemben kialakuló szerológiai válasz Crohn-betegségben szoros kapcsolatban áll a klinikai képpel és az innate immunitásban szerepet játszó NOD2/CARD15 gén mutációival. A szerológiai markerek jelenléte független rizikófaktornak bizonyult a betegség korai megjelenésére, a vékonybél érintettségére, a nem-gyulladásos betegségformára és a NOD2/CARD15 genotípusra nézve. Érdekes módon az anti-Omp antitestek jelenléte és a szemészeti manifesztációk között is összefüggés volt kimutatható.

Az ASCA és az anti-Omp pozitivitás előfordulási gyakorisága megfelelt a korábbi észak-amerikai és nyugat-európai kaukázusi betegeket vizsgáló tanulmányok eredményeinek^{57,64 67,69,122} és jelentősen különbözött az ázsiai populációtól (Crohn-betegségben az ASCA IgA aránya 10%-os volt)^{70,71}. Crohn-betegségben az ASCA IgA és IgG pozitivitás arányát 46,1% és 50,5%-nak találtuk, míg a betegek 35,1%-a nem mutatott reaktivitást sem az ASCA-val, sem pedig az Omp-vel szemben. Ezzel szemben a magyar betegek között az atípusos P-ANCA pozitivitás kisebb gyakoriságú volt, nagyjából megfelelt a kínai populációban tapasztalható aránynak. Meg kell jegyezni azonban, hogy az atípusos P-ANCA detektálhatóságához munkánk során az etanol-fixált neutrofil preparátumok mellett formalin-fixáltakat is használtunk (míg a korábbi IBD tanulmányok jelentős részében csak etanol-fixált neutrofil preparátumokat használtak). Az eltérő eredményeket a metodikai különbségek legalábbis részben magyarázhatják.

A szerológiai markerek specificitása, szenzitivitása és PPV értékei is összevethetőek voltak a korábbi vizsgálatokban találtakkal, ami alátámasztja azt a tényt, hogy a különféle markerek külön-külön nem használhatóak az IBD diagnosztikájában. A magas PPV érték mindazonáltal lehetővé teszi, hogy válogatott esetekben kiegészítő diagnosztikus paraméterként mégis szóba jöjjenek.

A Crohn-betegség és a colitis ulcerosa differenciál diagnosztikájában az izolált colon érintettséggel járó Crohn-betegség és a colitis ulcerosa differenciálása jelenthet nehézséget, mivel a vékonybél érintettség csak Crohn-betegségben fordul elő. Ezért célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a szerológiai markerek milyen prediktív értékkel bírnak az izolált

colon lokalizációjú Crohn-betegség és a colitis ulcerosa elkülönítésében. 146 Crohn-betegünk esetén volt izolált colon érintettség. Az ASCA IgA és IgG kettős pozitivitás (PPV Crohn-betegségre: 83%), P-ANCA-/ASCA+ mintázat (PPV Crohn-betegségre: 82%) és P-ANCA+/ASCA- (PPV colitis ulcerosára: 80%) elfogadható PPV értékekkel társult, noha a szenzitivitás itt is alacsony volt. Egy korábbi vizsgálatban 92%-os PPV értéket közöltek P-ANCA+/ASCA- esetén izolált colon lokalizációjú Crohn-betegség és colitis ulcerosa elkülöníthetőségét tekintve, de csoportonként mindössze 50 beteget vizsgáltak, az ANCA mintázatokat pedig csak etanol-fixált granulocytá preparátumokon vizsgálták⁷¹. Az anti-Omp antitestnek a szerológiai panelhez való hozzáadása nemhogy javította volna az eredményeket, hanem még alacsonyabb szenzitivitás és specificitás értékeket eredményezett (adatokat nem mutatjuk).

Egy korábbi, 156 Crohn-beteget vizsgáló tanulmányban a P-ANCA jelenléte és a colitis-szerű kép között multivariációs analízisben összefüggést tudtak kimutatni⁵⁶. Saját munkánkban a P-ANCA pozitív és negatív Crohn-betegek klinikai megjelenési formájában nem találtunk különbséget. Hasonlóképpen a szerológiai profil colitis ulcerosában sem mutatott összefüggést a klinikai képpel.

Vizsgáltuk továbbá a szerológiai markerek és a betegség megjelenési formája közötti összefüggést. Korábbi klinikai vizsgálatokhoz hasonlóan^{67,68,69,74} mi is azt találtuk, hogy Crohn-betegségben az ASCA és az anti-Omp jelenléte esetén a betegség fiatalabb életkorban jelentkezik, súlyosabb lefolyású, gyakoribb a vékonybél érintettség, a nem-gyulladásos betegségforma és gyakrabban válik szükségessé sebészeti beavatkozás (univariációs analízist alkalmazva). *Arnott és mtsai*⁶⁷ tanulmányukban az ASCA és az anti-Omp jelenléte esetén progresszív betegségelfolyásról számoltak be.

A korábbi tanulmányoknak^{56,67,71,74} mindenképpen bizonyos szintű hátrányát jelenti, hogy azok egy részében a szerológiai markereknek a betegség időtartamával való összefüggését vagy nem vizsgálták, vagy ha vizsgálták is és összefüggést tudtak kimutatni a szerológiai markerek jelenléte és a betegség időtartama között (ahogyan ezt az anti-Omp esetén mi is tapasztaltuk), az adatok elemzésekor akkor sem korrigálták a betegség fenotípusa közötti összefüggést a betegség fennállásának időtartamára.

További zavaró tényező, amit számos vizsgálatban szintén figyelmen kívül hagytak, pedig befolyásolja a betegség megjelenését, az a dohányzás. Crohn-betegségben a dohányzás gyakoribb relapszusokkal és posztoperatív betegségkiújulással társul. A dohányzás Crohn-betegségre gyakorolt káros hatásáért felelős alapvető mechanizmusok nem ismertek. A bél motilitás, a nyáktermelés, a permeabilitás és a keringés megváltozása

azonban egyaránt szerepet játszhat¹²³. Ezeken túl a dohányzás az antigén mediálta T-sejt proliferáció gátlásával gátolja az immunrendszer működését. Az IL-1b, IL-8 és TNF- α - melyek fontosak a patogénekkel szembeni védekezésben – termelődése dohányosokban szintén lecsökken a nem dohányzókkal összehasonlítva¹²⁴. Egy belga tanulmányban¹²⁵ 113 Crohn-beteg esetén a dohányzás és az ASCA pozitivitás között fordított összefüggést találtak, ami arra utalhat, hogy a dohányzás hatással lehet a bélbaktériumokkal szemben kialakuló immunválaszra. Saját vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a dohányzási szokások és a különböző mikrobiális antigénekkel szemben kialakuló szerológiai válasz között.

Mindezeket figyelembe véve nem meglepő, hogy vizsgálatunkban, bizonyos esetekben a fenotípus-szerotípus összefüggés (mint pl. azathioprin használat, ill. a sebészeti beavatkozás szükségessége) a multivariációs analízisben a betegség időtartamával és a dohányzással történő korrigálást követően nem maradt szignifikáns. Ez arra utal, hogy mind az azathioprin használat, mind pedig a sebészeti beavatkozás szükségessége elsősorban idő- és nem szerológiai profil függő változók.

Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a magasabb ASCA IgA és IgG titereket medián értékek és kvartilisek segítségével vizsgálva azok kifejezett összefüggést mutattak a vékonybél érintettséggel és a súlyosabb betegség lefolyással^{56,71,74}. *Mow*⁷⁴ és *Arnott*⁶⁵ prospektív módon vizsgálták, hogy van-e összefüggés a szerológiai válaszok száma és a betegség lefolyása vagy megjelenési formája között, azt feltételezve, hogy a betegség súlyossága összefügg a szerológiai dózishatással. Azaz, minél több antigénnel szemben alakul ki antitest válasz, annál nagyobb a valószínűsége a súlyosabb betegség lefolyásnak. Azt találták, hogy az ASCA, az anti-I2, és anti-OmpC antitesteket expresszáló betegek esetén nagyobb volt a fibrostenotizáló/ penetráló forma és a sebészeti reszekció előfordulása, mint a szeronegatív betegek esetén. Nem tisztázott egyelőre, hogy ez egy független asszociáció-e, mivel az antitest pozitivitást gyakoribbnak találták a hosszabb ideje fennálló betegség esetén és növekvő ASCA ($p=0,001$), anti-I2 ($p=0,005$), valamint anti-OmpC ($p=0,003$) szinteket észleltek a betegség időtartam kvartilis analízisnél.

Saját vizsgálatunk alátámasztotta, hogy a szerológiai válaszok száma összefüggésben áll a vékonybél érintettséggel és a nem-gyulladásos betegségformával a betegség időtartamára történő korrigálás után is, ugyanakkor nem bizonyult független prediktív faktornak a sebészi reszekció tekintetében (ugyanazon modellben). Ha azonban a szerológiai válasz nagysága alapján vizsgáltuk az összefüggést, az független prediktív

faktor volt a műtéti beavatkozás tekintetében. Az anti-Omp esetén ez az összefüggés azonban csak a legmagasabb antitest titerrel rendelkező betegekre (Q4) volt igaz.

A legtöbb tanulmányban nem találtak összefüggést az antitest termelődés és az extraintesztinális manifesztációk jelenléte között⁶⁷. Az anti-Omp és a szemészeti szövődmények közötti összefüggés Crohn-betegségben további vizsgálatokat igényel.

Crohn-betegségben az ASCA és a NOD2/CARD15 status összefüggése ellentmondásos^{67,74,126,127} ami arra utalhat, hogy a vizsgált betegcsoportok között jelentős klinikai és genetikai eltérések lehetnek. Az eddig vizsgált legnagyobb (n=1225) IBD kohorszban az ASCA (63,7%, vs. 49,4%) jelenléte összefüggést mutatott a NOD2/CARD15 variáns allélok előfordulásával⁸⁰. Szerológiai gén-dózis hatást is ki tudunk mutatni, azaz az antimikrobiális antitestek előfordulási gyakorisága szignifikánsan nőtt a NOD2/CARD15 mutációk számának növekedésével. Érdekes módon a TLR4 D299G variánsok colitis ulcerosás betegekben fordított összefüggést mutattak az anti-Omp-val (3,1% vs. 28,5%). Továbbá inverz gén dózishatás volt megfigyelhető colitis ulcerosában az anti-Omp jelenlétében. Ezekkel az eredményekkel összhangban, saját munkánkban is összefüggést találtunk az ASCA és a NOD2/CARD15 között, mely független volt a beteg nemétől, a betegség időtartamától, annak lokalizációjától, klinikai viselkedésétől és a beteg dohányzási szokásaitól is. Gén-dózis hatást mi is ki tudunk mutatni.

Vizsgáltuk továbbá a szerológiai markerek és a gyógyszeres kezelésre adott válasz összefüggését. Az már korábbról ismert, hogy az antitest titerek változatlanok maradnak 5-amino-szalicilsav, szteroid és infliximab kezelés során, legalábbis 4-12 hónapos utánkövetési időszak alatt^{73,128}. Egy osztrák munkacsoport tendencia-szerű összefüggést mutatott ki az ASCA pozitivitás és a szteroid kezelésre adott válasz között, míg hasonló kapcsolatot nem találtak, az azathioprin és az infliximab esetében. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a betegek szerológiai profilja nem jelzi előre sem a szteroid, sem pedig az azathioprin rezisztenciát. 56 Crohn-betegben (*lokalizáció*: vékonybél: 4, colon: 16 és ileocolicus: 35; *viselkedés*: gyulladásos forma: 17 és penetráló forma: 39 beteg) vizsgáltuk a szerológiai-marker pozitivitás és az infliximab kezelésre adott válasz közötti összefüggést. Eredményeink alapján elmondható, hogy nincs összefüggés egyik vizsgált szerológiai marker és az indukciós infliximab kezelésre (5 mg/ttskg dózis a 0., 2. és 6. héten; részleges válasz: Crohn Betegség Aktivitási Index [CAI] ≥ 70 pontos csökkenés és/vagy a fistulák számának $\geq 50\%$ csökkenése; remisszió: CDAI <150 vagy összes fisztula záródása) adott rövidtávú válaszkészség (8. héten vizsgálva) között sem.

8.2.3 Etanol- és formalin-fixált neutrofil granulocytá szubsztrátok együttes alkalmazásának vizsgálata az atípusos P-ANCA kimutatására IBD-ben: specificitás és reprodukálhatóság

A nemzetközi ANCA konszenzus megállapodás értelmében az IIF módszerrel, etanol-fixált neutrofil preparátumokon kapott mintázatok lehetnek: C-ANCA, C-ANCA (atípusos), P-ANCA és atípusos ANCA. Optimális esetben a típusos P-ANCA a sejtmagot körülvevő perinukleáris citoplazmában finom gyűrűszerű fluoreszcenciaként intranukleáris terjedést mutatva jelentkezik és sajátosan anti-MPO pozitív. A nem vasculitises állapotokban, így IBD-ben is a festődési mintázat a sejtmag perifériás részén gyakran inkább széles, inhomogén, gyűrűszerű és nem mutat intranukleáris terjedést⁵⁵. A kétféle P-ANCA mintázat egymástól való elkülönítése azonban nem egyszerű, és fontos megjegyezni, hogy a konszenzus leirat mindenféle perinukleáris fluoreszcenciát P-ANCA-ként említ, tekintve, hogy a perinukleáris mintázat pontos jellemzése és az intranukleáris terjedés megítélése egyaránt függ a használt szubsztráttól, a fluoreszcencia intenzitásától és a vizsgáló tapasztalatától. Ebből adódóan a neutrofil granulocytákon észlelt perinukleáris fluoreszcencia önmagában nem jelenti szükségszerűen vasculitis fennállását. A P-ANCA MPO-specificitását megerősítő vizsgálatok: a formalin-fixált neutrofil preparátumok és az antigén-specifikus szolid-fázisú immunoassay.

Az IBD szerológiával foglalkozó legtöbb tanulmány csak etanol-fixált granulocytá szubsztrátumot használt, amely azzal jár, hogy a valós eredmények torzulhatnak az MPO-ANCA, ANA és egyéb, nem IBD asszociált antitestek (anti-laminin, anti-Golgi, anti-aktin, stb.) jelenléte miatt¹²⁹. *Terjung és mtsai* nemrégiben írtak le egy reprodukálható és specifikus módszert, melyben etanol- és formalin-fixált humán neutrofil szubsztrátokat egyidejűleg használtak a típusos és az atípusos P-ANCA elkülönítésére. A keresztkötéseket létrehozó formalin-fixálás mellett a típusos P-ANCA diffúz citoplazmatikus fluoreszens festődést mutat. Ezzel szemben az atípusos P-ANCA finom 'perinukleáris' mintázat formájában jelentkezik, számos intranukleáris fluoreszcens góccal⁸⁷. Ez a mintázat azonban csak confocalis laser scanning elektronmikroszkóppal detektálható; alacsonyabb felbontású IIF mikroszkópot használva felismerése igen nehéz, ezért gyakran negatívnak véleményyzik^{130,131}. Munkánk során vizsgáltuk az etanol- és formalin-fixált granulocytá szubsztrátumok együttes alkalmazásának megbízhatóságát és hatékonyságát az atípusos P-ANCA kimutatásában rutin laboratóriumi körülmények között elérhető tesztek és eszközök

segítségével. A vizsgálati módszer kivitelezhetőségének és reprodukálhatóságának felmérésére egy *inter-assay* és *inter-observer* variabilitás vizsgálatot végeztünk, melynek során a szérum mintákat négy, kereskedelmi forgalomban elérhető fluoreszcens szubsztráton, két különböző laboratóriumban teszteltük. A fluoreszcens mintázatok etanol- és formalin-fixált lemezekon történő értékelése mellett, vizsgáltuk az anti-nukleáris antitestek (ANA) jelenlétét, valamint ELISA módszerrel az MPO, proteináz-3 (PR3), elasztáz, katepsin G, lizozim és (BPI) ellenes antitestek szintjét.

Inter-assay vizsgálat - fluoreszcens mintázatok

A vizsgálat IBD populációban az összes ANCA mintázat előfordulása az etanol- és formalin-fixált neutrofil szubsztrátok együttes alkalmazása mellett a négyféle IIF assay-vel vizsgálva 24,5% és 37,5% közötti volt: 39,6-53,1% colitis ulcerosásokban és 11,1-24,1% Crohn-betegekben. Az *inter-assay vizsgálatban* a különböző ANCA mintázatok előfordulási gyakoriságát **12. A és 12. B táblázatok** foglalják össze.

Mind colitis ulcerosában, mind pedig Crohn-betegségben egy assay kivételével az ANCA mintázatok döntően atípusos P-ANCA-nak adódtak (az összes ANCA 68,4-76,3% ill. 71,4-90,0%). Az IMMCO assayben az ANCA mintázatoknak csak viszonylag kis százaléka volt atípusos P-ANCA (colitis ulcerosában az összes ANCA 17,6%-a, Crohn-betegségben 38,5%-a), míg a típusos P-ANCA előfordulása jóval magasabb volt (az összes ANCA 72,5% és 46,2%-a). A C-ANCA mintázat előfordulása mind a négy assayben alacsony volt.

A négy különböző módszerrel kapott eredmények közötti egyezés az egyes ANCA mintázatokra vonatkozóan a következők szerint alakult: atípusos P-ANCA: 73,6-88,0%, P-ANCA: 77,4-93,3% és C-ANCA 93,3-98,1%. A súlyozott Kappa értékek (κ) azonban csak gyenge-közepes egyezésre utaltak ($\kappa = 0,14-0,34$ az atípusos P-ANCA-ra) (**13. táblázat**). A κ koefficiensek típusos P-ANCA és C-ANCA esetén azok alacsony előfordulási gyakorisága miatt nem kerültek meghatározásra. Az eredmények hasonlóak voltak, amikor a colitis ulcerosás és Crohn-betegeket külön csoportként vizsgáltuk (adatokat nem mutatjuk).

A **7. ábra** két colitis ulcerosás beteg (No.104 és No.95) szérumában észlelt ANCA mintázatokot mutatja a négy különféle assay használatával. Az egyik beteg esetén (No. 104) minden teszt atípusos P-ANCA mintázatot mutatott, míg a másik beteg esetén (No.

95) a különböző ANCA tesztek esetén eltérő eredményeket kaptunk: az INOVA és az Immunoconcepts tesztek esetén C-ANCA, míg az IMMCO és az Euroimmun tesztek esetén P-ANCA mintázatokat. A minta anti-PR3 IgG pozitív volt (17,8 U/mL).

A különböző assay-vel kapott eredmények további vizsgálata és összehasonlítása az alábbi, általunk meghatározott kritériumrendszer szerint történt. A fluoreszcens mintázatot akkor tekintettük atípusos P-ANCA-nak, ha a négyből 3 assay-vel azonos eredményt kaptunk. Ezt mindössze 16 esetben (az összes beteg 7,8%-a) találtuk így, ami a különféle assay-ek eredményei között tapasztalható jelentős eltéréseket tükrözi. Amennyiben a típusos és atípusos P-ANCA mintázatokat összevontuk (a Konszenzus Ajánlásnak megfelelően⁴⁴, 41 betegnél kaptunk egyezést (az összes eset 20,1%-a). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a típusos- és az atípusos P-ANCA mintázat elkülönítésében a formalin-fixált lemezek használata nem hatékony és az eredmények javulnak, ha a típusos és az atípusos P-ANCA mintázatokat nem választjuk külön egymástól. A fenti 41 esetből az INOVA, az IMMCO és az Euroimmun assay-k közel azonos arányban bizonyultak pozitívnak (92,7, 90,2% és 82,9%), míg az Immunoconcepts assay alábecsülte a P-ANCA pozitív minták arányát (58,5%). Ezért a további értékelésből az Immunoconcepts kittel kapott eredményeket kihagytuk, és új kritériumrendszert állítottunk fel a másik három assay adatai alapján. Eszerint akkor fogadtuk el az eredményeket egyezőnek, amennyiben 3 assay-ből 2 azonos mintázatot mutatott. Atípusos P-ANCA vonatkozásában ez 28 (az összes beteg 13,7%-a), míg az összes P-ANCA mintázatra nézve 57 esetet (az összes beteg 27,9%-a) jelentett, 41 colitis ulcerosás (42,7%) és 16 Crohn-beteget (14,8%) ($p < 0,0001$ a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség között). Az össz-ANCA pozitivitás (25,5-34,8% a három fenti assay használatával, beleértve néhány C-ANCA mintázatot is) tekintetében elmondható, hogy a különféle P-ANCA mintázatokat együtt értékelve az esetek döntő többségében egyezést tudtunk kimutatni. A három különböző assay hasonló arányban talált azonos mintázatot (89,5, 87,7% és 71,9%).

12. táblázat *Inter-assay* vizsgálat eredményei a négy ANCA tesztnek megfelelően.

A. Különböző ANCA mintázatok megoszlása colitis ulcerosás betegekben (n = 96)

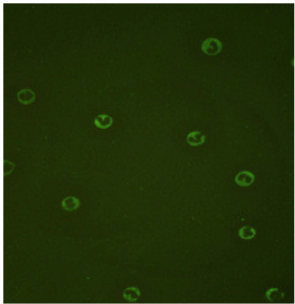
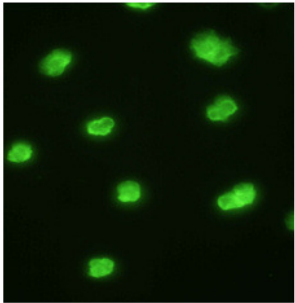
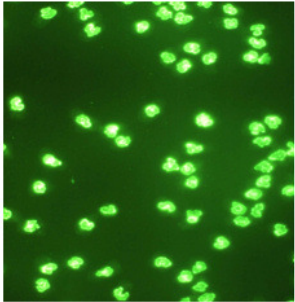
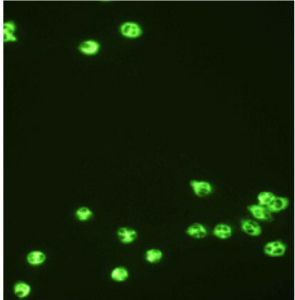
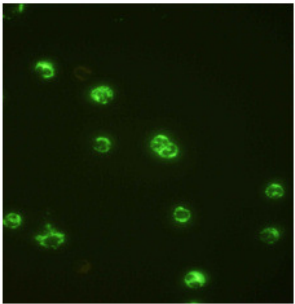
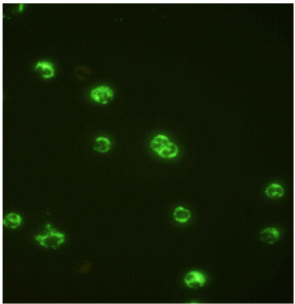
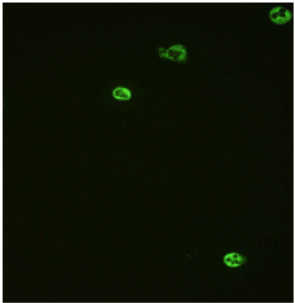
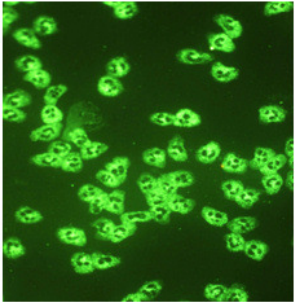
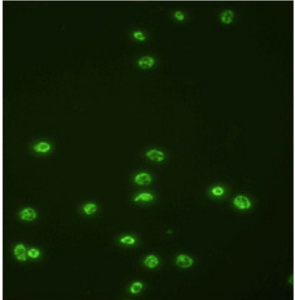
	INOVA	IMMCO	Euroimmun	Immuno-concepts
Összes ANCA	51 (53.1%)	51 (53.1%)	38 (39.6%)	38 (39.6%)
Atípusos P-ANCA	38 (39.6%)	9 (9.4%)	26 (27.1%)	29 (30.2%)
P-ANCA	9 (9.4%)	37 (38.5%)	12 (12.5%)	5 (5.2%)
C-ANCA	4 (4.2%)	5 (5.2%)	0 (0.0%)	4 (4.2%)

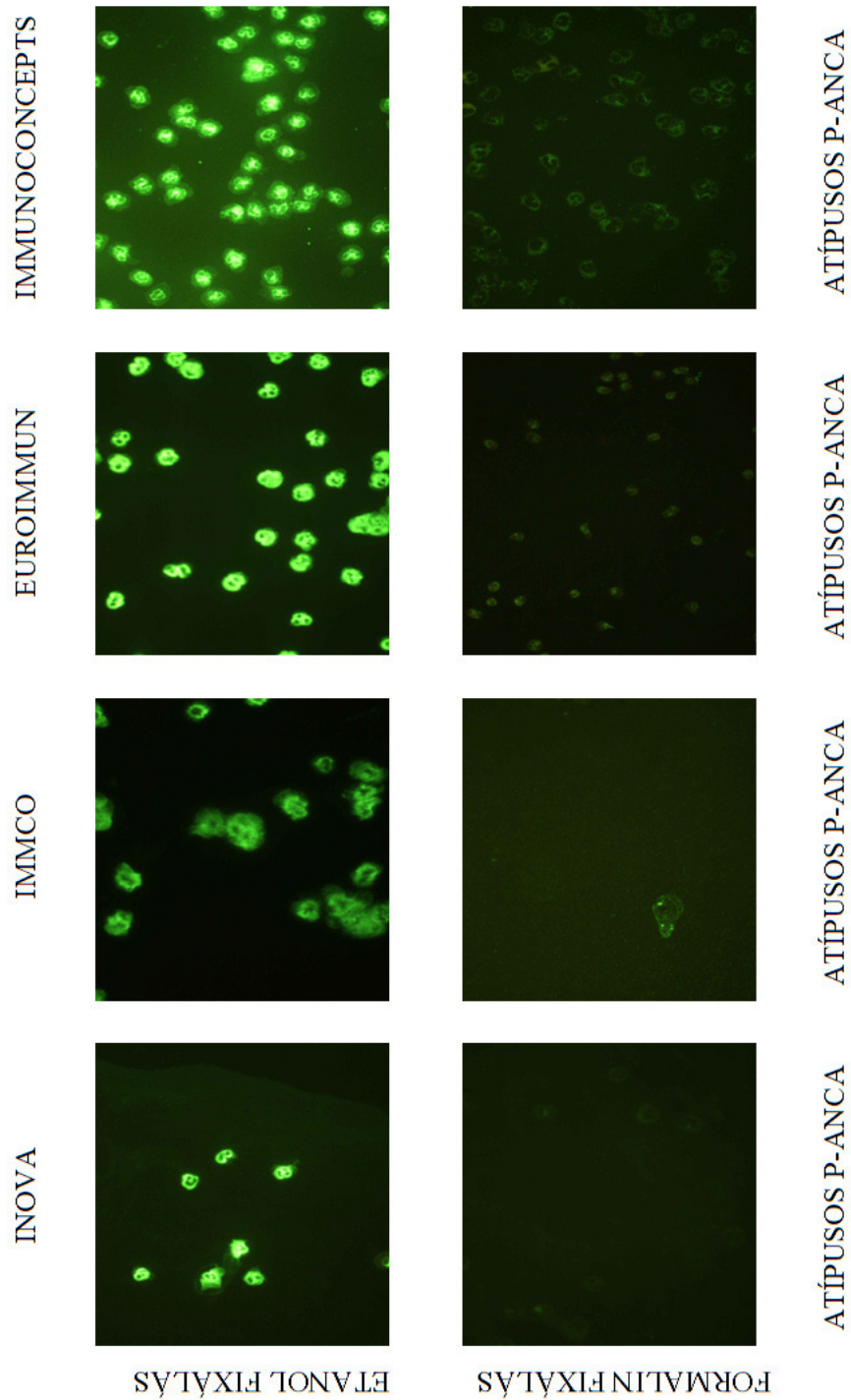
B. Különböző ANCA mintázatok megoszlása Crohn-betegekben (n = 108)

	INOVA	IMMCO	Euroimmun	Immuno-concepts
Összes ANCA	20 (18.5%)	26 (24.1%)	14 (13.0%)	12 (11.1%)
Atípusos P-ANCA	18 (16.7%)	10 (9.3%)	10 (9.3%)	10 (9.3%)
P-ANCA	2 (1.9%)	12 (11.1%)	4 (3.7%)	1 (0.9%)
C-ANCA	0 (0.0%)	4 (3.7%)	0 (0.0%)	1 (0.9%)

13. táblázat Egyezés a négy különböző immunfluoreszcens ANCA teszt között az atípusos P-ANCA esetén a súlyozott kappa (κ) értékek alapján.

	INOVA	IMMCO	Euroimmun	Immunoconcepts
INOVA	1			
IMMCO	0.15	1		
Euroimmun	0.34	0.03	1	
Immunoconcepts	0.34	0.14	0.27	1

ETANOL FIXAŁAS	INOVA	IMMCO	EUROIMMUN	IMMUNOCONCEPTS	
					C-ANCA
					C-ANCA



7. ábra Colitis ulcerosás beteg (No.104 és No.95) szérumában észlelt ANCA mintázatok négy különféle assay használatával.

Antigén specificitás

Vizsgáltuk a neutrofil granulocyták különféle citoplazmatikus alkotórészeivel, például az MPO, PR3, laktoferrin, BPI, katepsin G, elasztáz és a lizozimmel reagáló IgG antitestek jelenlétét. Az MPO és PR3 elleni antitesteknek mind a szintjük, mind pedig a gyakoriságuk alacsony volt. Az anti-PR3 antitest azonban gyakrabban volt jelen, mint az anti-MPO. Mind az anti-PR3, mind az anti-MPO colitis ulcerosában gyakoribb volt Crohn-betegséggel összehasonlítva (4,2% vs. 0,9%; n.s. és 16,7% vs. 3,7%; $p=0,002$). Továbbá (csak a pozitív eseteket vizsgálva) az anti-PR3 szintje is magasabb volt colitis ulcerosában, mint Crohn-betegségben (25,9 [IQR 15,8-38,1] vs. 9,6 [IQR 7,9-13,4]) NS). Egy colitis ulcerosás betegben anti-MPO és anti-PR3 antitestet egyaránt találtunk, míg 2 Crohn-betegben és 4 colitis ulcerosás betegnek a fenti antitestek valamelyikén túl laktoferrin és/vagy BPI elleni antitestje is volt. A 24 betegből, akikben anti-MPO és/vagy anti-PR3 antitestek változó mértékben voltak jelen, 21 (87,5%) mutatott valamilyen fokú immunfluoreszcenciát IMMCO lemezeken, míg 13-13 (54,2%) INOVA, Euroimmun és Immunoconcepts szubsztrátokon. Ha figyelmen kívül hagytuk azokat a mintákat, amelyek a cut-off értéknél kétszer kevesebb antitestet tartalmaztak, csupán 13 beteg esetében találtunk jelentős mennyiségű anti-MPO és anti-PR3 antitesteket (az összes beteg 6,4%-a), és ezek közül 8-10 esetben volt IIF pozitív a különböző assay-kel vizsgálva (**14. táblázat**). Egyik csoportban sem találtunk katepsin G és elasztáz elleni antitesteket, és betegcsoportonként csupán 1 betegnek volt lizozim ellenes antitestje (**14. táblázat**). Az anti-laktoferrin és anti-BPI antitestek előfordulási gyakorisága 10,4% vs. 4,6% és 10,4% vs. 7,4% volt colitis ulcerosában és Crohn-betegségben (NS) (**14. táblázat**). Egy Crohn-betegben és 3 colitis ulcerosás betegben mindkét antitest kimutatható volt, míg az anti-MPO és anti-PR3 6 betegben fordult elő együtt. A 31 betegből (az összes beteg 15,2%-a), akikben lizozim, laktoferrin és/vagy BPI elleni antitestek voltak jelen, 27-nél (87,1%) kaptunk pozitív IIF eredményeket az IMMCO lemezeken, és 20 (64,5%), 13 (41,9%) és 11 (35,5%) esetben INOVA, Euroimmun és Immunoconcepts szubsztrátokon. Az immunfluoreszcens mintázatok megoszlása változó volt az egyes módszereknél, P-ANCA, atípusos P-ANCA és C-ANCA egyaránt előfordult (**15. táblázat**).

Az ELISA-val kapott eredményeket szintén elemeztük a klinikai fenotípus vonatkozásában. Nem találtunk szignifikáns különbséget a fenti antitestekkel rendelkező

vagy nem rendelkező betegek között a nemet, életkort, diagnóziskori életkort és a betegség lokalizációját vagy viselkedését vizsgálva.

Az ANA pozitivitást HEp-2 szubsztráton, IIF módszerrel vizsgálva a colitis ulcerosás betegek 17,7%-ban, míg a Crohn-betegek 6,5%-ban figyeltünk meg.

14. táblázat Különféle neutrofil granulocyta alkotórészek ellen kialakuló autoantitestek előfordulási gyakorisága IBD betegekben.

	MPO	PR3	Laktoferrin	BPI	Katepsin G	Elasztáz	Lizozim
Colitis ulcerosa (n=96)	4 (4.2%)	16 (16.7%)	10 (10.4%)	10 (10.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.9%)
Crohn-betegség (n=108)	1 (0.9%)	4 (3.7%)	5 (4.6%)	8 (7.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.9%)

MPO: mieloperoxidáz; PR-3: proteináz-3; BPI: baktericid permeabilitást fokozó protein

15. táblázat A különféle ANCA assay-kel kapott immunfluoreszcens mintázatok megoszlása anti-laktoferrin, anti-BPI és anti-lizozim antitest pozitív IBD betegekben (n=31)

	Atípusos P-ANCA	Típusos P-ANCA	C-ANCA	Negatív
IMMCO	7	14	6	4
INOVA	16	4	0	11
Euroimmun	9	4	0	18
Immunoconcepts	9	1	1	20

4 betegnek volt egyaránt laktoferrin- és BPI-ellenes, valamint 6 betegnek mieloperoxidáz (MPO) és proteináz-3 (PR-3) elleni antitestje

Inter-observer vizsgálat

Az *inter-observer* vizsgálatban ugyanazt a tesztet (Nova Lite ANCA, INOVA) használtuk két független laboratóriumban, az eredményeket pedig két különböző, tapasztalt vizsgáló értékelte. Colitis ulcerosában az ANCA mintázatok előfordulása gyakoribb volt a San Diego-i laboratóriumban, mint a debreceniben (64,6% vs. 53,1%), ami jórészt a gyakoribb atípusos P-ANCA mintázatnak volt tulajdonítható (57,3% vs. 39,6%). Ezzel

párhuzamosan a P-ANCA (5,2% vs. 9,4%) és C-ANCA (2,1% vs. 4,2%) valamivel ritkábban fordult elő. Crohn-betegekben a két vizsgáló gyakorlatilag azonos előfordulási gyakoriságot talált a különböző ANCA mintázatok esetében: 17,6% vs. 16,7% az atípusos P-ANCA-nál, 2,8% vs. 1,9% a P-ANCA-nál és 0,9% vs. 0,0% a C-ANCA-nál (összesen 21,3% vs. 18,5%). A teljes beteganyagot tekintve az atípusos P-ANCA esetében az egyezés mértéke 75,5%, volt, ami 0,44-es κ értéknek, vagyis közepes vizsgálók közötti konkordanciának felelt meg. A P-ANCA és C-ANCA esetében a κ koefficiens nem került kiszámításra a nagyon alacsony előfordulási arány miatt.

A típusos és atípusos P-ANCA mintázatok együtt értékelve, colitis ulcerosás és a Crohn-beteg csoportban a P-ANCA előfordulási gyakorisága 62,5% és 20,4% ($p < 0,0001$) volt a San Diego-i, illetve 49,0% és 18,6% ($p < 0,0001$) a debreceni laboratóriumban. Az egyezés 77,9% volt, a vonatkozó κ érték 0,53–nak adódott. A colitis ulcerosás betegek között a P-ANCA szenzitivitása 62,5% (95% CI: 52,0-72,0%), a specificitása 79,6% (95% CI: 70,6-86,5%) volt a San Diego-i, illetve 49,0% (95% CI: 38,7-59,3%) és 81,5% (95% CI: 72,6-88,1%) a debreceni laboratóriumban mérve. A két labor között nem volt szignifikáns különbség a szenzitivitás és a specificitás tekintetében.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az etanol- és formalin-fixált neutrofil szubsztrátok együttes alkalmazása nem segítette a típusos és az atípusos P-ANCA mintázatok elkülönítését és az eredmények ellentmondásosak voltak a különböző ANCA assay-k használata mellett. A kétféle P-ANCA mintázat együttes értékelése eredményezte a legmagasabb szenzitivitást és specificitást a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség elkülönítésében. A neutrofilek specifikus granulumfehérjéi ellen kialakuló immunválasz előfordulása alacsony volt és különféle IIF mintázatokkal társult; többszörös pozitívitas előfordult. Nem találtunk összefüggést a különféle antitestek jelenléte és a betegség klinikai megjelenési formái között.

8.2.4 Megbeszélés

A vasculitishez társuló ANCA-ra vonatkozó Konszenzus Nyilatkozattól⁵⁵ eltérően IBD-ben nincsenek pontos útmutatások az ANCA mintázatok IIF detektálására és értelmezésére¹³². Indirekt immunfluoreszcens módszert használva az etanol-fixált szubsztrátokon jelenleg is nehézséget jelent a típusos és atípusos P-ANCA mintázatok

elkülönítése. Az eddig rendelkezésre álló közlemények a formalin-fixált neutrofilek használatáról az IBD-hez társuló atípusos P-ANCA detektálásában kisszámúak és nem egyértelműek^{56,133,134}. Az ellentmondásos adatok magyarázata a formaldehid fixálási módszerek különbségei és a nem egységes immunfluoreszcens mikroszkópos nagyítás használata lehet. Az azonban leszűrhető, hogy a formaldehid fixált szubsztrát egyszerűen és hatékonyan alkalmazható az ANA és a típusos P-ANCA elkülönítésére, melyek gyakran együttesen fordulnak elő¹³⁵. *Terjung és mtsai*⁸⁷ nemrég megjelent közleménye szerint a formalin-fixált neutrofilek használata reprodukálható (92%), specifikus (97%) és szenzitív (98%) módszernek bizonyult a vasculitishez társuló típusos P-ANCA és az atípusos P-ANCA immunfluoreszcens mintázatok elkülönítésében. A kutatók IIF-et és laser scanning elektronmikroszkópot alkalmazva felállítottak továbbá egy mikroszkópos kritériumrendszert a típusos és atípusos P-ANCA-k elkülönítésére. Sajnos az atípusos P-ANCA szimultán reaktivitása formaldehid- és etanol-fixált neutrofileken, illetve a fenti mikroszkópos kritériumrendszernek a használati értéke IBD-ben egyelőre nincs kellően tisztázva. *Targan és mtsai*⁵⁶ kifejlesztettek egy olyan ANCA detektálási rendszert, amely az IIF során egy enzimatis (DNase I) emésztési lépéssel helyettesíti a formalin-fixált neutrofil lemezek alkalmazását, ezt a módszert mások azonban csak ritkán használják¹³³. Szintén ezen munkacsoport az „atípusos” kifejezés helyett gyakran a „DNase-érzékeny” (vagyis DNase-val kezelt neutrofileken nem detektálható) P-ANCA-t használja. A különböző ANCA assay-k és vizsgálóhelyek közötti gyenge egyezés jól dokumentált^{136,137}. A jelentős különbségek feltehetően az egyes gyártók kitjeinek helyenként eltérő paramétereivel (a háttér fluoreszcenciát befolyásoló sejtpreparálási és fixálási módszerek, valamint a használt pufferek és konjugátumok közötti különbségek) magyarázhatók. Az ellentmondásos eredmények további okai lehetnek a vizsgálat során használt nem egyforma mikroszkópok és a vizsgálók eltérő tapasztalati szintjei.

Jelen vizsgálatban nagyszámú IBD betegcsoportban próbáltunk különbséget tenni a C-ANCA, P-ANCA és az atípusos P-ANCA antitestek között a mintázatok előfordulása alapján, amihez etanol- és formalin-fixált lemezeket, illetve előre felállított IIF kritériumokat használtunk. A leggyakrabban észlelt ANCA mintázat colitis ulcerosában és Crohn-betegségben egyaránt az atípusos P-ANCA volt. Csakhogy a különböző, kereskedelmi forgalomban kapható ANCA assay-k eredményeit összevetve, a betegek szérumában az atípusos P-ANCA előfordulási gyakoriságában szignifikáns különbségek adódtak (colitis ulcerosa: 9,4-39,6%; Crohn-betegség: 9,3-16,7%). Az assay-ket párosával összehasonlítva, az egyes kombinációk esetében a kapott κ -értékek 0,14-0,34 közöttiek

voltak, ami szignifikánsan alacsony szintű egyezésre utal. Két korábbi vizsgálatban is ehhez hasonló eredményeket közöltek. *Joossens és mtsai*¹³⁷ 50 colitis ulcerosás beteg esetén vizsgálták az ANCA jelenlétét négy különböző, kereskedelmi forgalomban kapható szubsztrát (Bio-Rad, The Binding Site, Immunoconcepts és INOVA) segítségével. Az atípusos P-ANCA gyakorisága 16% és 62% közé esett mind etanol-, mind formalin-fixált humán neutrofil szubsztrátot használva, a kapott κ érték alacsony egyezést jelent. *Sandborn és mtsai*¹³⁶ tanulmányukban 162 IBD beteg esetén vizsgálták a P-ANCA kimutató érzékenységét, amely a résztvevő laboratóriumokban (Prometheus, Oxford, Würzburg, Mayo és Smith Kline Beecham) 0-63% volt. A tanulmányban az egyik assay a DNase emésztési módszert alkalmazta, míg a többiek csupán etanol-fixált lemezeket használtak.

Tanulmányunkban amennyiben a típusos és atípusos P-ANCA-val kapott eredményt együtt értékeltük (vagyis a formalin-fixált lemezeken tapasztalt különböző IIF mintázatokat figyelmen kívül hagytuk), az ANCA pozitív minták döntő többségében egyezést sikerült kimutatni. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a formalin-fixált lemezek használata bizonytalan adatokhoz vezethet, és ez lehet a felelős a különféle assay-k eredményei között tapasztalható ellentmondásokért. A kapott eredmények látszólag ellentmondanak a *Terjung és mtsai*⁸⁷ által közöltekkel, az a tanulmány azonban confocalis laser scanning elektronmikroszkópot használt a mintázatok értékelésére, amely sokkal érzékenyebb és nagyobb felbontású a rutinszerűen használt fluoreszcens mikroszkópoknál. Ebből következik, hogy az általuk kidolgozott mikroszkópos kritériumrendszer rutin laboratóriumi körülmények között nem alkalmazható.

Az *inter-observer* vizsgálatban magasabb szintű konkordanciát találtunk az atípusos P-ANCA vonatkozásában ($\kappa=0,44$), ami arra enged következtetni, hogy a különböző forrásból származó ANCA assay-k fluoreszcenciája közti eltérések nagyobb mértékben járulnak hozzá az eredmények sokszínűségéhez, mint a használt mikroszkóp típusa vagy a vizsgálók jártassága. A típusos és atípusos P-ANCA mintázatokat együtt értékelve az egyezés ezúttal is javult ($\kappa=0,53$), és a P-ANCA kimutató érzékenysége és specificitása tekintetében colitis ulcerosában nem volt szignifikáns különbség a két résztvevő vizsgálóhely eredményei között (62,5% vs. 49% és 79,6% vs. 81,5%). Ezek az értékek egybehangzóak az általunk korábban közölt megfigyeléssel a P-ANCA előfordulási gyakoriságát illetően IBD-ben¹³⁸.

Lizozim, laktoferrin vagy BPI elleni specifikus antitesteket a betegek 15,2%-ában találtunk, e tekintetben nem volt különbség a colitis ulcerosa és a Crohn-betegség csoport

között. Többszörös pozitívítás gyakran előfordult, ezen antitestek némelyike nem produkált pozitív fluoreszcenciás mintázatot, a többi P-ANCA, atípusos P-ANCA vagy C-ANCA-ként volt detektálható. Nem találtunk összefüggést az antitestek jellegzetességei és a fluoreszcenciás mintázatok között, és a mintázatok eloszlása nagyon változó volt a különböző módszerekkel mérve. Hasonlóképpen nem volt egyértelmű összefüggés a különféle antitestek jelenléte és az IBD típusa és megjelenési formája között sem. Az anti-MPO és anti-PR3 antitestek az összes beteg 11,8%-ában voltak jelen; a PR3 elleni antitest gyakoribb volt colitis ulcerosában, mint Crohn-betegségben (16,7% vs. 3,7%; $p=0,002$). Egy colitis ulcerosás betegben anti-MPO és anti-PR3 antitesteket egyaránt találtunk, míg 2 Crohn-betegben és 4 colitis ulcerosás betegnek a fenti antitesteken túl laktoferrin és/vagy BPI elleni antitestjei is voltak. Az antitest szintek általában alacsonyak voltak, és ha csak azokat a mintákat vettük figyelembe, amelyek a cut-off értéknél kétszer több antitestet tartalmaztak, csupán 13 beteg esetében találtunk jelentős mennyiségű anti-MPO és anti-PR3 antitesteket (az összes beteg 6,4%-a), és ezek közül csak 8-10 esetében detektáltunk egyértelmű fluoreszcenciát a különböző assay-ekkel. Az anti-MPO és anti-PR3 alacsony szintje, illetve a többi granuláris komponenssel szembeni egyidejű – gyakran többszörös – antitest pozitívítás arra utal, hogy ezeknek az antitesteknek a klinikai jelentősége és specificitása nem mérvadó.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a típusos és atípusos P-ANCA elkülönítése formalin-fixált lemezek segítségével nem kellően megbízható és reprodukálható módszer rutin laboratóriumi körülmények között, illetve fluoreszcens mikroszkóp használatával. A P-ANCA antitesteket (függetlenül attól, hogy etanol-fixált lemezekben típusos vagy atípusos mintázatot mutatnak) együtt kell értékelni. Különösen rutin laboratóriumi körülmények között, amikor az ANCA vizsgálatot nagyon különböző betegek (vasculitis, IBD, autoimmun rheumas betegségek, stb.) mintáiból kell elvégezni, a típusos és atípusos P-ANCA elkülönítése nem mindig lehetséges. Mivel a Konszenzus Nyilatkozat⁵⁵ szerint az IIF tesztet mindig anti-MPO és anti-PR3 ELISA-nak kell követnie, ez általában segít a vasculitishez társult, illetve az egyéb ANCA-k megkülönböztetésében. Az anti-MPO és anti-PR3 antitestek magas titere aktív, primer kisért vasculitisekre jellemző, de a fenti antitestek alacsony titerrel jelen lehetnek kezelt vasculitisben, IBD-ben és szisztémás reumás betegségekben is, ami azt jelenti, hogy a klinikai tünetek ismerete nélkül az ANCA vizsgálat (IIF+ELISA) eredményének értelmezése gyakorlatilag lehetetlen. A laktoferrin, BPI, kathepsin G, elasztáz és lizozim elleni antitestek meghatározása úgy tűnik, hogy nem szolgál használható információkkal.

7. Főbb új tudományos eredmények

1. Munkánkban nagyszámú coeliakiás betegcsoportban vizsgáltuk a Hp polimorfizmus szerepét a betegség kialakulásában és annak klinikai megjelenésében. Az irodalomban elsőként számoltunk be arról, hogy coeliakiás betegekben a Hp2-1 típus előfordulása szignifikánsan gyakoribb az egészséges kontroll populációhoz képest. A HLA-asszociált hajlamosító tényezők előfordulása azonban nem mutatott kapcsolatot a Hp genotípussal.

2. Összefüggést találtunk továbbá a Hp fenotípusok és a coeliakia klinikai megjelenési formái között. A Hp2-2 fenotípus bár coeliakiában ritkábban fordult elő, súlyosabb klinikai forma kialakulásához vezetett. Ezzel szemben a Hp2-1 fenotípus esetén elsősorban a betegség enyhébb tünetek formájában történő jelentkezését észleltük. A tünetmentesen, szűrés kapcsán felfedezésre került esetek jelentős része is ebbe a fenotípusba tartozott. A korábbi, kis esetszámú irodalmi adattól eltérően, a saját beteganyagunkban a Hp fenotípusok megoszlása dermatitis herpetiformis esetén nem tért el a coeliakiás csoportban észlelttől.

3. Az általunk vizsgált nagy esetszámú magyar Crohn-beteg populációban a Hp1 allél előfordulását szignifikánsan gyakoribbnak találtuk, a Hp fenotípus megoszlás azonban nem tért el a kontroll populációból észlelttől. Crohn-betegekben a polimorfizmus kapcsolatba volt hozható a betegség lefolyásával: a Hp2-1 fenotípus esetén gyakoribbnak találtuk a betegség enyhébb tünetekkel járó gyulladásos formáját és ritkábbnak a szövődmenyes, stenozizáló formát. Primer szklerotizáló cholangitisben a Hp1-1 fenotípus egyáltalán nem fordult elő.

4. Munkánk során a kelet-európai régióból elsőként számoltunk be a szerológiai és a genetikai markerek közötti komplex összefüggésekről nagyszámú IBD beteganyagban. Az ASCA, az anti-OMP és atípusos P-ANCA antitestek előfordulási gyakorisága összhangban volt a korábbi észak-amerikai és nyugat-európai kaukázusi betegeket vizsgáló tanulmányok eredményeivel. A szerológiai markerek specifitása, szenzitivitása és PPV értékei is a korábbi vizsgálatokkal összhangban amellet szólnak, hogy a különféle markerek külön-külön nem használhatóak az IBD diagnosztikájában. A magas PPV érték

mindazonáltal lehetővé teszi, hogy válogatott esetekben kiegészítő diagnosztikus vizsgálatként kerüljenek alkalmazásra.

5. Vizsgálatunkban a mikrobiális antigének elleni szerológiai válasz Crohn-betegségben összefüggést mutatott a betegség korai megjelenésével, a vékonybél érintettségével, és a nem-gyulladásos típusú betegség lefolyással, de nem korrelált sem a gyógyszeres kezelésre adott válasszal, sem pedig a műtétek gyakoriságával. Az eddigi irodalmi adatoktól eltérően saját beteganyagunkban az atípusos P-ANCA pozitív és negatív Crohn-betegek klinikai megjelenési formája nem különbözött egymástól. Hasonlóképpen colitis ulcerosus betegekben sem találtunk fenotípus-szerotípus összefüggést.

6. A szerológiai markerek és az innate immunitásban szerepet játszó receptorok mutációi közötti kapcsolatot vizsgáló néhány tanulmány eredményei ellentmondásosak. Munkánk során azt találtuk, hogy Crohn-betegségben a bakteriális komponensekkel szemben kialakuló szerológiai válaszok kapcsolatban állnak a NOD2/CARD15 genotípusokkal. Szerológiai gén-dózishatás is kimutatható volt és a szerológiai válasz mértéke korrelált a sebészi beavatkozások szükségességével. A szerológiai markerek és a NOD2/CARD15 genotípus kapcsolata alátámasztja a megváltozott mikrobiális érzékelés jelentőségét a Crohn-betegség pathogenesisében.

7. Eredményeink alapján elmondható, hogy a típusos és az atípusos P-ANCA elkülönítésére az irodalomban javasolt, formalin-fixált lemezeket is használó módszer és mikroszkópos kritériumrendszer nem kellően megbízható és reprodukálható eljárás rutin laboratóriumi körülmények között, illetve fluoreszcens mikroszkóp használatával. A P-ANCA antitesteket (függetlenül attól, hogy etanol-fixált lemezekon típusos vagy atípusos mintázatot mutatnak) együtt kell értékelni. Az anti-MPO és anti-PR3 antitestek alacsony titerrel jelen lehetnek IBD-ben is. Az ANCA vizsgálat (IIF+ELISA) eredményének értelmezése csak a klinikai tünetek ismeretének birtokában lehetséges. A laktoferrin, BPI, kathepsin G, elasztáz és lizozim elleni antitestek meghatározása úgy tűnik, nem szolgál használható információkkal IBD-ben.

8. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék hálás köszönetet mondani tanító mesteremnek **Dr. Udvardy Miklósnak** a Belgyógyászati Intézet igazgató egyetemi tanárának, akinek szeretetteljes támogatását a II. Belklinikára kerülésem első percétől érezhettem. Lankadatlan figyelme, állandó biztatása, barátsága munkám során végig elkísért. Benne egy rendkívül széles látókörű, nyitott és fantasztikusan kreatív kutatót ismerhettem meg. Mellette szerettem meg a klinikai kutatómunkát, tanultam meg annak fontosságát és vált a belgyógyász-gasztroenterológiai munkám elválaszthatatlan részévé. Vele érezhettem meg először azt a szellemi kihívást, amit a tudomány járatlan ösvényein való elindulás és az azon való töretlen előrehaladás jelent annak minden nehézségével és izgalmával. Őt mindig csodáltam, mert sugárzott belőle a betegek és a belgyógyászat iránti őszinte odaadása és tisztelete. Tőle tanultam meg a betegek szeretetét, és a gondos belgyógyászati látásmód alapjait is. Mégegyszer köszönöm Neki, hogy megtisztelt bizalmával, hogy tanítványává fogadott.

Hálával tartozom **Dr. Altorjay Istvánnak** a Gasztroenterológiai Tanszék vezető egyetemi docensének, akinek a példája végérvényesen megszilárdította bennem a gasztroenterológia iránti elkötelezettségemet. Köszönöm Neki, hogy láthattam mellette a belgyógyász-gasztroenterológusok munkás hétköznapijait. Kitartása, munkabírása, a betegek iránti őszinte odaadás mindig lenyűgözött. Köszönöm Neki, hogy mindig kiállt mellettem, hogy tanított és az endoszkópos csapatának tagjává fogadott.

Külön köszönöm **Dr. Hársfalvi Jolánnak** a Klinikai Kutató Központ egyetemi docensnőjének, aki harmadéves medikus korom óta figyelemmel kíséri pályámat. TDK hallgatóként Ő tanította meg nekem a laboratóriumi kutatómunka első lépéseit, és azóta is folyamatosan tanít. Neki köszönhetem, hogy gyakorló klinikusként olyan látásmódot és jártasságot szerezhettem a laboratóriumi kutatómunkában, amely kevés klinikusnak adatik meg, és ezt most is nagy kincsként őrzöm. Kritikája, segítő megjegyzései, állandó biztatása, és legfőbbképpen barátsága munkám során végig elkísért. Ő az most is, akit a nap bármelyik percében zavarhatok, bármilyen problémával megkereshetek, és akitől

bármikor segítséget kaphatók. Köszönöm, hogy munkáim minden szomorú és a boldog pillanatában jelen van.

Nagyon köszönöm **Dr. Korponay Ilma Ritának** a Gyermekklinika docensnőjének, hogy munkatársának fogadott és tanítványa lehettem. Tudását, fantasztikus kreativitását és hihetetlen munkabírást mindig csodáltam. Az Ő példája bizonyítja számomra, hogy hogyan lehet valaki egyszerre nagyon jó klinikus és eredményes kutató.

Őszintén köszönöm **Dr. Lakatos Péter László** kollégámnak és barátomnak, hogy segítségével egy nagyon aktív, lendületes munkacsoport tagjává válhattam. Mellette tapasztalhattam meg mennyi erő rejlik egy csapatban, ha az közös munkával közös célokért küzd. Munkatársként és barátként is magával ragadott racionalitása, dinamizmusa és örökös tenni akarása. Köszönöm Neki a sok-sok közös munkával eltöltött órát és mindazt, amire megtanított.

Nagyon köszönöm **Dr. Tumpek Juditnak**, a laboratóriumban együtt eltöltött sok-sok órát, melynek során oly sok szeretettel és türelemmel segített az immunológiai laboratóriumi módszerek elsajátításában. Köszönöm Neki barátságát és azt a szeretetteljes féltő támogatást, mellyel végigkísérte munkáimat.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Lakos Gabriellának**, hogy kritikus észrevételeikkel, tanácsaival nagy segítségemre volt a kéziratok elkészítésében.

Szeretném megköszönni **minden kollégámnak**, külön is kiemelve **Dr. Tornai Istvánt**, **Dr. Vitális Zsuzsannát** és **Dr. Palatka Károlyt**, hogy oly sok türelemmel tanítottak és segítettek mindennapi klinikai munkámat.

Őszintén köszönöm **Dr. Kacska Sándornak** és **Dr. Földi Ildikónak**, hogy bármikor számíthattam rájuk, ha a klinikai vagy a laboratóriumi munkák sokaságában segítőtársakra volt szükségem.

Köszönetet mondok **Fábián Marika**, **Bézi Andrea** és **Szöllősiné Ibolya** laboratóriumi asszisztensnőknek, akik segítő munkájukkal hozzájárultak a vizsgálatok elvégzéséhez.

És végül szeretnék köszönetet mondani családomnak.

Drága Tamás, köszönöm, hogy férjként mindig mellettem álltál, ha szükség volt rá meghallgattál. Köszönöm Neked szerelmedet, szeretetteljes támogatásodat és a miattam vállalt sok lemondást.

Drága Édesanyám, köszönöm, hogy kisgyermek korom óta arra neveltél, hogy az életben rám bízott feladatokat a tőlem telhető legjobban kell elvégeznem, akkor is, ha azok olykor nagyon nehezek és sok lemondással járnak. A Te rendíthetetlen hited és lelkerőd az, amiből a mai napig erőt merítve az elérhetetlennek hitt távlatok karnyújtásnyira kerülnek. Köszönöm, hogy kisfiaim, **Tomika** és **Gergőke** számára az én távollétemben most is megteremtetted azt a biztos, támogató, meleg családi háttérrel, mely egész gyermekkoromat végigkísérte.

Drága Édesapám, Testvérem, Mamika, Nagymama, Tibi Nagypapa, Anyuka és Apuka köszönöm Nektek, azt a sok szeretetet, gondoskodást, amit Tőletek kapok, hogy egy csodálatos családban élhetek, köszönöm a szomorú és a boldog pillanatokat. És legfőképpen köszönöm a szereteteket.

9. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó saját publikációk jegyzéke absztraktok nélkül

Közlemények

- I. **Papp M**, Lakatos PL; Hungarian IBD Study Group; Palatka K, Foldi I, Udvardy M, Harsfalvi J, Tornai I, Vitalis Zs, Dinya T, Kovacs A, Molnar T, Demeter P, Papp J, Lakatos L, Altorjay I: Haptoglobin polimorfizmus vizsgálata gyulladásos bélbetegségekben. Orvosi Hetilap, 2006, 147: 1745-50.
- II. **Papp M**, Lakatos PL; Hungarian IBD Study Group; Palatka K, Foldi I, Udvardy M, Harsfalvi J, Tornai I, Vitalis Zs, Dinya T, Kovacs A, Molnar T, Demeter P, Papp J, Lakatos L, Altorjay I: Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behaviour and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. Digestive Disease and Sciences. 2007; 52: 1279-84. IF 1,448
- III. **Papp M**, Foldi I, Nemes E, Udvardy, Harsfalvi J, Altorjay I, Mate I, Dinya T, Varvolgyi Cs, Barta Zs, Veres G, Lakatos PL, Tumpek J, Toth L, Szathmari E, Kapitany A, Gyetvai A, Korponay-Szabo IR: Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations. Közlésre elfogadva: Clinical Chemistry (2008. jan.15.) IF: 5,454
- IV. **Papp M**, Altorjay I, Lakatos PL: Szerológiai vizsgálatok jelentősége gyulladásos bélbetegségekben. Orvosi Hetilap 2007; 148: 887-896.
- V. **Papp M**, Norman GL, Altorjay I, Lakatos PL: The utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? World Journal of Gastroenterology. 2007; 13: 2028-36.

- VI. **Papp M**, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, Palatka K, Vitalis Zs, Foldi I, Lakos G, Tumpek J, Udvardy ML, Harsfalvi J, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Bene L, Molnar T, Tulassay Zs, Miheller P, Veres G, Papp J, the Hungarian IBD Study Group, Lakatos PL: Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, non-inflammatory disease behaviour and NOD2/CARD15 genotype, but not with response to medical therapy or risk for surgery. Inflammatory Bowel Diseases 2007; 13 : 984-92. IF 3,912

Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk jegyzéke absztraktok nélkül

Közlemények

- I. **Papp M**, Mezei G, Udvardy M, Altorjay I: Haematológiai és haemostasis paraméterek változása transjugularis intrahepaticus portosystemas shunt (TIPS) hatására. Orvosi Hetilap, 2003; 144: 1341-5.
- II. **Papp M**, Udvardy M, Vitális Zs, Tornai I, Altorjay I: Gastrooesophagealis varixvérzés – Újdonságok a patofiziológia terén. Orvosi Hetilap, 2006; 147: 309-314.
- III. Vitalis Zs, **Papp M**, Tornai I, Altorjay I: A nyelőcsővarix-vérzés megelőzése és kezelése. Orvosi Hetilap 2006; 147: 2455-63.
- IV. Lakatos PL, Fischer S, Claes K, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Demeter P, Tulassay Z, Palatka K, **Papp M**, Rutgeerts P, Szalay F, Papp J, Vermeire S, Lakatos L; Hungarian IBD Study Group. DLG5 R30Q is not associated with IBD in Hungarian IBD patients but predicts clinical response to steroids in Crohn's disease. Inflammatory Bowel Diseases 2006; 12: 362-8. IF 3,912
- V. **Papp M**, Farkas A, Udvardy M, Tornai I: Bakteriális fertőzések májcirrhosisban. Orvosi Hetilap 2007; 148: 387-395.

- VI. Fischer S, Lakatos LP; Hungarian IBD Study Group, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, **Papp M**, Szilvasi A, Tulassay Zs, Osztovits J, Papp J, Demeter P, Schwab R, Tordai A, Andrikovics H: The ATP-binding Cassette Transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility and disease phenotype in Hungarian patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2007; 42: 726-33. IF 1,869
- VII. Molnar T, Hofner P, Nagy F, Lakatos PL and the Hungarian IBD Study Group, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Altorjay I, **Papp M**, Palatka K, Demeter P, Tulassay Zs, Nyari T, Miheller P, Papp J, Mandi Y, Lonovics J: NOD1 gene E266K polymorphism is associated with disease susceptibility but not with disease phenotype or NOD2/CARD15 in Hungarian patients with Crohn's disease. *Dig Liver Dis.* 2007 Oct 25; [Epub ahead of print] IF 2,000

Az értekezéshez kapcsolódó nemzetközi folyóiratokban megjelent idézhető absztraktok

- I. **Papp M**, Palatka K, Foldi I, Udvardy M, Harsfalvi J, Tornai I, Kovacs A, Molnar T, Demeter P, Papp J, Lakatos L, Lakatos P, Altorjay I: Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behaviour and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. *Gut* 2006; 38 Suppl 2: A113 (MON-G-164).
- II. **Papp M**, Lakatos PL, Udvardy M, Foldi I, Harsfalvi J, Balogh I, Altorjay I, Dinya T, Habior A, Szalay F, Tornai I: Haptoglobin and myeloperoxidase promoter polymorphism in primary biliary cirrhosis. *Falk Symposia* 155 – 157, 2006 október (378).
- III. Veres G, **Papp M**, Lakatos PL, Arato A, Molnár K, Tornai I, Dezsőfi A, Szőnyi L. Haptoglobin polymorphism in primary sclerosing cholangitis. *J Ped Gastro Nutr* 2007; 44 Suppl: 226.

- IV. **Papp M**, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, Palatka K, Vitalis Zs, Foldi I, Lakos G, Tumpek J, Udvardy ML, Harsfalvi J, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Bene L, Molnar T, Tulassay Zs, Miheller P, Veres G, Papp J, the Hungarian IBD Study Group, Lakatos PL: Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, non-inflammatory disease behaviour and NOD2/CARD15 genotype, but not with response to medical therapy or risk for surgery. JCC 2007; 1 Suppl 1: P-002 és Gut 2007; 39 Suppl 1: A141 (MON-G-268).
- V. Lakatos PL, Altorjay I, Dotan N, Tumpek J, Sipka S, Lakos G, Udvardy M, Palatka K, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Tulassay Zs, Miheller P, Norman GL, Shums Z, Szamosi T, Papp J, **Papp M**: Comparing conventional and gASCA tests for the diagnosis and determination of clinical phenotype in Crohn's disease. Gut 2007; 39 Suppl 1: A119 (MON-G-162).
- VI. **Papp M**, Tumpek J, Norman GL, Shums Z, Lakos G, Sipka S, Altorjay I, Lakatos PL: Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with inflammatory bowel diseases: interassay- and interobserver variability comparing four different commercially available assays. Gut 2007; 39 Suppl 1: A141 (MON-G-267).

Nemzetközi folyóiratokban megjelent idézhető absztraktok

- VII. Altorjay I, Palatka K, Mezei G, **Papp M**, Tornai I: Efficacy of mini-loop ligation in comparison to sclerotherapy in the treatment of esophageal varicosity. Gastrointestinal Endoscopy, 2002, 55: AB196-TI896
- VIII. Altorjay I, **Papp M**, Palatka K, Mezei G, Tornai I: Additional, continuous proton pump inhibitor treatment prolonged survival in cirrhotic patients following sclerotherapy because of variceal bleeding. Gut, 2002, 51:A175.

- IX. **Papp M** , Udvardy M, Varga Zs, Káplár M, Sipka S, Alexa M, Palatka K, Balogh I, Hársfalvi J, Altorjay I: Inflammation and aggressive proteolytic enzymes – Do they play a role in acute variceal bleeding? Gut 2004; 36 Suppl 1: A-259 (WED-G-137).
- X. Palatka K, **Papp M**, Udvardy M, Altorjay I: Assessment of routine laboratory and clinical data for activity of Crohn's disease in correlation with myeloperoxidase and matrix metalloproteinase activity. Gut 2004; 36 Suppl 1: A-219 (TUE-G-336).
- XI. Kaplar M, Csongradi E, Paragh Gy, **Papp M**, Foldi I, Veszpremi A, Nagy B, Kappelmayer J: Changes in the level of soluble and thrombocyte surface P-selectin and the number of thrombocyte derived microparticles in obesity and in diabetes mellitus. Diabetologia, 2006; 49 Suppl 1.
- XII. Fischer S, Lakatos LP, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, **Papp M**, Szilvasi A, Tulassay Zs, Osztoivits J, Papp J, Demeter P, Schwab R, Tordai A, Andrikovics H: The ATP-binding Cassette Transporter ABCG2 (BCRP) V12M and Q141K variants in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases. Gut 2006; 38 Suppl 2: A112 (MON-G-160).
- XIII. Lakatos PL, Fisher S, Claes K, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Demeter P, Palatka K, **Papp M**, Tulassay Zs, Rutgeerts P, Szalay F, Vermeire S, Papp J, Lakatos L: DLG5 R30Q is not associated with inflammatory bowel disease in Hungarian IBD patients, but predicts clinical response to steroids in Crohn's disease. Gut 2006; 38 Suppl 2: A112 (MON-G-161).

- XIV. Lakatos LP, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, **Papp M**, Szilvasi A, Tulassay Zs, Osztovits J, Papp J, Demeter P, Schwab R, Tordai A, Andrikovics H: The ATP-binding Cassette Transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility and disease phenotype in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases. JCC 2007; 1 Suppl 1: P-120
- XV. Udvardy ML, Szekeres-Csiki K, **Papp M**, Harsfalvi J: Quantitation of von Willebrand factor multimer distribution by densitometry. J Thromb Haemost 2007; 5 Suppl 2: P-W-198.
- XVI. Tornai I, **Papp M**, Udvardy ML, Harsfalvi J. VWF functions, ADAMTS-13 activity and antigen levels in patients with liver cirrhosis. J Thromb Haemost 2007; 5 Suppl 2: P-T-207.
- XVII. Gacsai N, **Papp M**, Harsfalvi J, Udvardy M: Haptoglobin polymorphism in patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood 2007; 21 Suppl 1: P-037.
- XVIII. **Papp M**, Foldi I, Tumpek J, Varvolgyi Cs, Barta Zs, Sipka S, Dotan N, Korponay-Szabo IR, Nemes E, Veres G, Altorjay I, Lakatos PL: Anti-glycan antibodies in celiac disease before and after gluten-free diet. Gut 2007; 39 Suppl 1: A109 (MON-G-111).
- XIX. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, **Papp M**, Szilvasi A, Szabo O, Tulassay Zs, Miheller P, Papp J, Demeter P, Tordai A, Andrikovics H: The 3'UTR NFKBIA variant is associated with extensive colitis in Hungarian patients. Gut 2007; 39 Suppl 1: A133 (MON-G-230).

- XX. Molnar T, Hofner P, Nagy F, Lakatos PL, Fisher S, Lakatos L, Kovacs A, Altorjay I, **Papp M**, Palatka K, Demeter P, Tulassay Zs, Miheller P, Papp J, Mandi Y, Lonovics J: NOD1 gene E266K polymorphism is associated with disease susceptibility but not with disease phenotype or NOD2/CARD15 in Hungarian patients with Crohn's disease. Gut 2007; 39 Suppl 1: A134 (MON-G-233).

Egyéb absztraktok

Papp M, Altorjay I, Káplár M, Udvardy M: A neutrophil granulocytá eredetű myeloperoxidase enzim szerepet játszhat-e a nyelőcsővarix rupturájában? Hematológia és Transzfúziológia 2005 (38) Suppl I: 63

Földi I, **Papp M**, Hársfalvi J, Káplár M, Udvardy M: Haptoglobin polimorfizmus szerepe a diabeteses angiopathia pathogenesisében. Hematológia és Transzfúziológia 2005 (38) Suppl I: 26

Előadások

A Magyar Gasztroenterológiai Társaság 47. Nagygyűlés Balatonaliga

2005. június 7-11.

Hemosztázis paraméterek jelentősége a nyelőcső varixvézések prognózisában

A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának

Tudományos ülése

Debrecen, 2005. szeptember 22-24.

Krónikus B-vírus hepatitis reaktivációja Non-Hodgkin-lymphomás betegen kemoterápia után

A Magyar Gasztroenterológiai Társaság Endoszkópos Szekciójának Vándorgyűlése
Pécs, 2005. október 7-8.

Rockall-score és a hemosztázis paraméterek jelentősége a nyelőcső varixvézések
kórjlatában

Dilemmák és megoldások gyulladásos bélbetegségben, 2005/II.

Budapest, 2005. november 19.

Crohn betegség infliximab kezelése során jelentkező pulmonális eltérések

Nagyerdei Belgyógyászati Tudományos Napok

Debrecen, 2005. december 5.

Az érfalra ható agresszív tényezők szerepe a varixvézés kialakulásában

Fiatal Gasztroenterológusok Munkacsoportjának I. Kongresszus

Harkány, 2006. március 31 – április 2.

Wilson-kór következtében kialakult akut fatális májelégtelenség fiatal nőbetegben

A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Tavaszi
Tudományos Ülése

Sátoraljaújhely, 2006. május 26.

Akut tápcsatornai vérzések ellátása vérző intenzív osztályunkon

Debreceni Belgyógyászati Napok szakvizsga-előkészítő és szakorvostovábbképző
tanfolyam

Debrecen, 2005. június 12-16.

Autoimmun cholestaticus májbetegségek

Magyar Gasztroenterológiai Társaság 47. Nagygyűlés

Szeged, 2005. június 7-11.

Haptoglobin polimorfizmus kapcsolata a Crohn-betegség viselkedésével és
extraintestinalis manifesztációival

4th Scientific Meeting of The Reserarch Training Network „Real-time thrombosis”

Párizs, 2006. szept. 13-17.

VWF functions, ADAMTS-13 activity and antigen in patients with liver cirrhosis

II. Debreceni Gasztro-Immun Konferencia

Debrecen, 2006. november 17-18.

Szerológiai vizsgálatok jelentősége a gyulladásos bélbetegségekb

10. Felhasznált irodalom

-
- ¹ Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. *Gut*. 2006;55: 1037-1046.
- ² Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology* 2005;128(4 Suppl 1): S74-8.
- ³ Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*. 2007;117: 41-9.
- ⁴ Dewar DH, Ciclitira PJ. Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005;128: S19-24.
- ⁵ Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Hopfl P, Knip M. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med*. 2003;348: 2517-24.
- ⁶ Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*. 2003;163: 286-92.
- ⁷ Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1989;170: 2-6.
- ⁸ Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn's disease. *Nature Med*. 2007;13:26-28.
- ⁹ Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, Lakatos PL. [Epidemiology of inflammatory bowel diseases in Veszprem county of Western Hungary between 1977 and 2001]. *Orv Hetil*. 2003;144: 1819-27.
- ¹⁰ Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences 2004;126: 1504-1517.
- ¹¹ Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol*. 2006;12: 6102-8.
- ¹² Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*. 1996; 42:1589-600.
- ¹³ Wagner L, Gessl A, Parzer SB, Base W, Waldhausl W, Pasternack MS. Haptoglobin phenotyping by newly developed monoclonal antibodies. Demonstration of haptoglobin uptake into peripheral blood neutrophils and monocytes. *J Immunol*. 1996;156: 1989-96.
- ¹⁴ Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, Rasmussen T, Udby L, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Moestrup SK, Porse BT, Borregaard N. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* 2006;108: 353-61.
- ¹⁵ Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409: 198-201.
- ¹⁶ Langlois M, Delanghe J, Philippe J, Ouyang J, Bernard D, De Buyzere M, Van Nooten G, Leroux-Roels G. Distribution of lymphocyte subsets in bone marrow and peripheral blood is associated with haptoglobin type. Binding of haptoglobin to the B-cell lectin CD22. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997;35: 199-205.
- ¹⁷ Arredouani M, Matthijs P, Van Hoeyveld E, Kasran A, Baumann H, Ceuppens JL, Stevens E. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 2003;108: 144-51.

-
- ¹⁸ Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol*. 2007;29: 92-110.
- ¹⁹ Papp M, Norman GL, Altorjay I, Lakatos PL. Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? *World J Gastroenterol*. 2007;13: 2028-36.
- ²⁰ Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping for susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379: 821-823.
- ²¹ Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P; Hungarian IBD Study Group. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol*. 2005;11: 1489-95.
- ²² Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003;278: 8869-72.
- ²³ da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, et al. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex: transfer from cd14 to tlr4 and md-2. *J Biol Chem*. 2001;276: 21129-21135.
- ²⁴ Buhner S, Buning C, Genschel J, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;55: 342-7.
- ²⁵ Harrer M, Reinisch W, Dejaco C, et al. Do high serum levels of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies result from a leakiness of the gut barrier in Crohn's disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15:1281-85.
- ²⁶ Russell PR, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. A novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653-1662.
- ²⁷ Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, Balla G. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49: 1030-43.
- ²⁸ Moestrup SK, Moller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med*. 2004;36: 347-54.
- ²⁹ Zuwala-Jagiello J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Pol*. 2006;53: 257-68.
- ³⁰ Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem*. 2002;234-235: 249-63.
- ³¹ Zvi B, Levy AP. Haptoglobin phenotypes, which one is better and when? *Clin Lab*. 2006;52: 29-35.
- ³² Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*. 2004;94: 119-26.
- ³³ Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab*. 2000;46: 547-52.
- ³⁴ Bresalier RS, Byrd JC, Tessler D, Lebel J, Koomen J, Hawke D, Half E, Liu KF, Mazurek N; Great Lakes-New England Clinical and Epidemiology Center of the Early Detection Research Network. A circulating ligand for galectin-3 is a haptoglobin-related glycoprotein elevated in individuals with colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127: 741-8.
- ³⁵ Smeets MB, Pasterkamp G, Lim SK, Velema E, van Middelaar B, de Kleijn DP. Nitric oxide synthesis is involved in arterial haptoglobin expression after sustained flow changes. *FEBS Lett*. 2002;529: 221-4.

-
- ³⁶ Yerbury JJ, Rybchyn MS, Easterbrook-Smith SB, Henriques C, Wilson MR. The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin. *Biochemistry* 2005;44: 10914-25.
- ³⁷ Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schomig A, Kastrati A. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem*. 2002;48: 1377-82.
- ³⁸ Okazaki T, Nagai T. Difference in hemoglobin-binding ability of polymers among haptoglobin phenotypes. *Clin Chem*. 1997;43: 2012-3.
- ³⁹ Javid J. The effect of haptoglobin polymer size on hemoglobin binding capacity. *Vox Sang*. 1965; 10: 320-5.
- ⁴⁰ Bamm VV, Tsemakhovich VA, Shaklai M, Shaklai N. Haptoglobin phenotypes differ in their ability to inhibit heme transfer from hemoglobin to LDL. *Biochemistry* 2004;43: 3899-906.
- ⁴¹ Asleh R, Guetta J, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy AP. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2005;96: 435-41.
- ⁴² Asleh R, Marsh S, Shilkrot M, Binah O, Guetta J, Lejbkiewicz F, Enav B, Shehadeh N, Kanter Y, Lache O, Cohen O, Levy NS, Levy P. Genetically determined heterogeneity in haemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Cir Res*. 2003;92: 1193-1200.
- ⁴³ Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafranek T, Levy NS, Ricklis RM, Levy AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 2001;98: 3693-8.
- ⁴⁴ Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, Howard BV; Strong Heart Study. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40: 1984-90.
- ⁴⁵ Asleh R, Levy AP. In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1: 19-28.
- ⁴⁶ Levy AP, Moreno PR. Intraplaque hemorrhage. *Curr Mol Med*. 2006;6: 479-88.
- ⁴⁷ Dahlqvist SR, Frohlander N. Haptoglobin groups and rheumatoid arthritis. *Hum Hered*. 1985;35: 207-11.
- ⁴⁸ Dahlqvist SR, Beckman G, Beckman L. Serum protein markers in systemic lupus erythematosus. *Hum Hered*. 1988;38: 44-7.
- ⁴⁹ Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, Wiik A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: a review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int*. 2000;57: 846-62.
- ⁵⁰ Terjung B, Spengler U, Sauerbruch T, Worman HJ. "Atypical p-ANCA" in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 2000;119: 310-22.
- ⁵¹ Billing P, Tahir S, Calfin B, Gagne G, Cobb L, Targan S, Vidrich A. Nuclear localization of the antigen detected by ulcerative colitis-associated perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Pathol*. 1995;147: 979-87.
- ⁵² Roozendaal C, Zhao MH, Horst G, Lockwood CM, Kleibeuker JH, Limburg PC, Nelis GF, Kallenberg CG. Catalase and alpha-enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*. 1998;112: 10-6.
- ⁵³ Roozendaal C, Horst G, Pogany K, van Milligen de Wit AW, Kleibeuker JH, Haagsma EB, Limburg PC, Kallenberg CG. Prevalence and clinical significance of anti-lactoferrin

autoantibodies in inflammatory bowel diseases and primary sclerosing cholangitis. *Adv Exp Med Biol.* 1998;443: 313-9.

⁵⁴ Sobajima J, Ozaki S, Osakada F, Uesugi H, Shirakawa H, Yoshida M, Nakao K. Novel autoantigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2. *Clin Exp Immunol.* 1997;107: 135-40.

⁵⁵ Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol.* 1999;111: 507-13.

⁵⁶ Vasilias EA, Kam LY, Karp LC, Gaiennie J, Yang H, Targan SR. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut* 2000; 47: 487-96.

⁵⁷ Peeters M, Joossens S, Vermeire S, et al. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 730-4.

⁵⁸ Satsangi J, Landers CJ, Welsh KI, et al. The presence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 1998;4: 18-26.

⁵⁹ Terjung B, Bogsch F, Klein R, Sohne J, Reichel C, Wasmuth JC, Beuers U, Sauerbruch T, Spengler U. Diagnostic accuracy of atypical p-ANCA in autoimmune hepatitis using ROC- and multivariate regression analysis. *Eur J Med Res.* 2004;9: 439-48.

⁶⁰ Terjung B, Worman HJ. Anti-neutrophil antibodies in primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2001;15: 629-42.

⁶¹ Bossuyt X: Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem.* 2006;52: 171-181.

⁶² Main J, McKenzie H, Yeaman GR, et al. Antibody to Saccharomyces cerevisiae (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988; 297: 1105-1106.

⁶³ Vermeire S, Jossens S, Peeters M, et al. Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibody) Assays in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2001;120: 827-33.

⁶⁴ Quinton JF, Sendid B, Reumaux D et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42: 788-91.

⁶⁵ Israeli E, Grotto I, Gilburd B, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut* 2005;54: 1232-6.

⁶⁶ Esters N, Vermeire S, Jossens S, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97: 1458-62.

⁶⁷ Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, Drummond HE, Smith BK, Targan SR, Satsangi J. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol.* 2004;99: 2376-84.

⁶⁸ Forcione DG, Rosen MJ, Kisiel JB, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut* 2004;53: 1117-22.

⁶⁹ Zholudev A, Zurakowski D, Young W, et al. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis:

diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol.* 2004;99: 2235-41.

⁷⁰ Hisabe T, Matsui T, Sakurai T, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in Japanese patients with inflammatory bowel disease: diagnostic accuracy and clinical value. *J Gastroenterol.* 2003;38: 121-6.

⁷¹ Lawrance IC, Murray K, Hall A, et al. A prospective comparative study of ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian IBD patients. *Am J Gastroenterol.* 2004;99: 2186-94.

⁷² Basu D, Lopez I, Kulkarni A, et al. Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2005;100: 2254-61.

⁷³ Landers CJ, Cohavy O, Misra R, et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002;123: 689-99.

⁷⁴ Mow WS, Vasilias EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126: 414-24.

⁷⁵ Devlin SM, Dubinsky MC. Determination of serologic and genetic markers aid in the determination of the clinical course and severity of patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14: 125-8.

⁷⁶ Walfish A, Sachar D. Phenotype classification in IBD: Is there an impact on therapy? *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13: 1573-5.

⁷⁷ Vermeire S, Rutgeerts P. Antibody responses in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2004;126: 601-4.

⁷⁸ Cruysen BV, Peeters H, Hoffman IE, Laukens D, Coucke P, Marichal D, Cuvelier C, Remaut E, Veys EM, Mielants H, De Vos M, De Keyser F. CARD15 polymorphisms are associated with anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in caucasian Crohn's disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2005;140: 354-9.

⁷⁹ Devlin SM, Yang H, Ippoliti A, Taylor KD, Landers CJ, Su X, Abreu MT, Papadakis KA, Vasilias EA, Melmed GY, Fleshner PR, Mei L, Rotter JI, Targan SR. NOD2 variants and antibody response to microbial antigens in Crohn's disease patients and their unaffected relatives. *Gastroenterology* 2007;132: 576-86.

⁸⁰ Henckaerts L, Pierik M, Joossens M, Ferrante M, Rutgeerts P, Vermeire S. Mutations in pattern recognition receptor genes modulate seroreactivity to microbial antigens in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56: 1536-42.

⁸¹ Seibold F, Boldt AB, Seibold-Schmid B, Schoepfer AM, Flogerzi B, Muller S, Kun JF. Association of deficiency for mannan-binding lectin with anti-mannan antibodies in Crohn's disease: a family study. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13: 1077-82.

⁸² Walker LJ, Aldhous MC, Drummond HE, Smith BR, Nimmo ER, Arnott ID, Satsangi J. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clin Exp Immunol.* 2004;135: 490-6.

⁸³ Joossens S, Pierik M, Rector A, Vermeire S, Ranst MV, Rutgeerts P, Bossuyt X. Mannan binding lectin (MBL) gene polymorphisms are not associated with anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) in patients with Crohn's disease. *Gut* 2006;55: 746.

⁸⁴ Mei L, Targan SR, Landers CJ, Dutridge D, Ippoliti A, Vasilias EA, Papadakis KA, Fleshner PR, Rotter JI, Yang H. Familial expression of anti-Escherichia coli outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130: 1078-85.

⁸⁵ Yang SE, Min WK, Park H, Chun S, Nah J, Kim JQ. Distribution of haptoglobin phenotypes in a Korean population, using the semi-automated PhastSystem. *Ann Clin Biochem.* 2000;37: 205-9.

- ⁸⁶ Papp M, Lakatos PL; Hungarian IBD Study Group, Palatka K, Foldi I, Udvardy M, Harsfalvi J, Tornai I, Vitalis Z, Dinya T, Kovacs A, Molnar 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.* 2007;52: 1279-84.
- ⁸⁷ Terjung B, Worman HJ, Herzog V, Sauerbruch T, Spengler U. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol.* 2001;126: 37-46.
- ⁸⁸ Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut* 1994;35: 776-778.
- ⁸⁹ Ambrus A, Banyai I, Weiss MS, Hilgenfeld R, Keresztessy Z, Muszbek L, Fesus L. Calcium binding of transglutaminases: a ⁴³Ca NMR study combined with surface polarity analysis. *J Biomol Struct Dyn.* 2001;19: 59-74.
- ⁹⁰ Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabo IR, Sarnesto A, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology.* 1998;115: 1322-8.
- ⁹¹ Kapitany A, Toth L, Tumpek J, Csipo I, Sipos E, Woolley N, et al. Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24: 1395-402.
- ⁹² Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology.* 1992;102: 330-54.
- ⁹³ Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, olletti RB, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg EJ, Horvath K, Murray JA, Pivor M, Seidman EG; North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;40: 1-19.
- ⁹⁴ Korponay-Szabo IR, Kovacs JB, Lorincz M, Goracz G, Szabados K, Balogh M. Prospective significance of antiendomysium antibody positivity in subsequently verified celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;25: 56-63.
- ⁹⁵ Collin P, Reunala T. Recognition and management of the cutaneous manifestations of celiac disease: a guide for dermatologists. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4: 13-20.
- ⁹⁶ Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Scholmerich J, Reinisch W; European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55: i1-15.
- ⁹⁷ Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis.* 2000;6: 8-15.
- ⁹⁸ Marks J, Roberts DF, Wyatt EH, et al. Some genetic aspects of coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut* 1971;12: 857.
- ⁹⁹ Tauszik T, Szabo L. Haptoglobin polymorphism in Hungary. *Gene Geogr.* 1992;6: 153-7.
- ¹⁰⁰ Bottini N, Gloria-Bottini F, Amante A, Saccucci P, Bottini E. Genetic polymorphism and TH1/TH2 orientation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;138: 328-33.
- ¹⁰¹ Dobryszczycka W, Warwas M. Haptoglobin types in ovarian tumors. *Neoplasma.* 1983;30: 169-72.
- ¹⁰² Louagie HK, Brouwer JT, Delanghe JR, De Buyzere ML, Leroux-Roels GG. Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1996;25: 10-4.

- ¹⁰³ Zhao H, Zhang G. Haptoglobin groups and cirrhosis of the liver. *Hum Hered.* 1993;43: 134-6.
- ¹⁰⁴ Delanghe JR, Duprez DA, De Buyzere ML, Bergez BM, Callens BY, Leroux-Roels GG, Clement DL. Haptoglobin polymorphism and complications in established essential arterial hypertension. *J Hypertens.* 1993;11: 861-7.
- ¹⁰⁵ Kasvosve I, Gomo ZA, Mvundura E, Moyo VM, Saungweme T, Khumalo H, Gordeuk VR, Boelaert JR, Delanghe JR, De Bacquer D, Gangaidzo IT. Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4: 771-5.
- ¹⁰⁶ Branski D, Fasano A, Troncone R. Latest developments in the pathogenesis and treatment of celiac disease. *J Pediatr.* 2006;149: 295-300.
- ¹⁰⁷ Amundsen SS, Vatn M, Wijmenga C, et al. Association analysis of MYO9B gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Norwegian cohort. *Tissue Antigens* 2006;68: 249-52.
- ¹⁰⁸ Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2007;191: 48-53.
- ¹⁰⁹ Rewers M. Epidemiology of celiac disease: What are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? *Gastroenterology* 2005;128: S47-S51.
- ¹¹⁰ Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994;343: 200-3.
- ¹¹¹ Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, et al. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 2001;98: 3693-8.
- ¹¹² Levy AP. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. *Acta Diabetol.* 2003; Suppl 2: S330-3.
- ¹¹³ Levy AP, Purushothaman KR, Levy NS, urushothaman M, Strauss M, Asleh R, Marsh S, Cohen O, Moestrup SK, Moller HJ, Zias EA, Benhayon D, Fuster V, Moreno PR. Downregulation of the hemoglobin scavenger receptor in individuals with diabetes and the Hp 2-2 genotype: implications for the response to intraplaque hemorrhage and plaque vulnerability. *Circ Res.* 2007;101: 106-10.
- ¹¹⁴ Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings MK, Stefanile R, De Giulio B, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Roncarolo MG, Troncone R. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut* 2005;54: 46-53.
- ¹¹⁵ Jue DM, Shim BS, Kang YS. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. *Mol Cell Biochem.* 1983;51: 141-7.
- ¹¹⁶ Saeed SA, Ahmad N, Ahmed S. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: its polymorphism and relation to hemoglobin binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353: 915-20.
- ¹¹⁷ Aoki CA, Bowlus CL, Gershwin ME. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Autoimmun Rev.* 2005;4: 137-43.
- ¹¹⁸ Cameron RG, Blendis LM, Neuman MG. Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis. *Clin Biochem.* 2001;34: 195-201.
- ¹¹⁹ Wasserzug O, Blum S, Klement E, Lejbkiewicz F, Miller-Lotan R, Levy AP. Haptoglobin 1-1 genotype and the risk of life-threatening *Streptococcus* infection: evolutionary implications. *J Infect.* 2007;54: 410.
- ¹²⁰ Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World J Gastroenterol.* 2006;12: 1829-41.

-
- ¹²¹ Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol.* 2007;42: 16-25.
- ¹²² Dubinsky MC, Ofman JJ, Urman M, Targan SR, Seidman EG. Clinical utility of serodiagnostic testing in suspected pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96: 758-65.
- ¹²³ Thomas GA, Rhodes J, Green JT, et al. Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J* 2000;76: 273-279.
- ¹²⁴ Soporì M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 372-377.
- ¹²⁵ Van Kemseke C, Belaiche J, Steeman C, et al. Negative association between smoking and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in Crohn's disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2003;66: 1-6.
- ¹²⁶ Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasilias EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JJ, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;123: 679-88.
- ¹²⁷ Dassopoulos T, Frangakis C, Cruz-Correa M, Talor MV, Burek CL, Datta L, Nouvet F, Bayless TM, Brant SR. Antibodies to saccharomyces cerevisiae in Crohn's disease: higher titers are associated with a greater frequency of mutant NOD2/CARD15 alleles and with a higher probability of complicated disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13: 143-51.
- ¹²⁸ Teml A, Kratzer V, Schneider B, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies: A Stable Marker for Crohn's Disease During Steroid and 5-Aminosalicylic Acid Treatment. *Am J Gastroenterol* 2003;98: 2226-31.
- ¹²⁹ Savige JA, Paspaliaris B, Silvestrini R, Davies D, Nikoloutsopoulos T, Sturgess A, Neil J, Pollock W, Dunster K, Hendle M. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol.* 1998;51: 568-75.
- ¹³⁰ Radice A, Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA. Contribution of immunofluorescence to the identification and characterization of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. The role of different fixatives. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18: 707-12.
- ¹³¹ Cambridge G, Rampton DS, Stevens TR, McCarthy DA, Kamm M, Leaker B. Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1992;33: 668-74.
- ¹³² Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC, McEvoy R, Pusey C, Pollock W, Trevisin M, Wiik A, Wong R; International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol.* 2003;120: 312-8.
- ¹³³ Klebl FH, Bataille F, Berteau CR, Herfarth H, Hofstadter F, Scholmerich J, Rogler G. Association of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies with Vienna classification subtypes of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2003; 9: 302-7.
- ¹³⁴ Chowdhury SM, Broomhead V, Spickett GP, Wilkinson R. Pitfalls of formalin fixation for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Clin Pathol.* 1999;52: 475-7.
- ¹³⁵ Lee SS, Lawton JW, Chak W. Distinction between antinuclear antibody and P-ANCA. *J Clin Pathol.* 1991;44: 962-3.
- ¹³⁶ Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Colombel JF, Fleming KA, Seibold F, Homburger HA, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJ, Kaul DK, Wallace J, Harmsen WS, Zinsmeister

AR, Targan SR. Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2001; 7: 192-201.

¹³⁷ Joossens S, Daperno M, Shums Z, Van Steen K, Goeken JA, Trapani C, Norman GL, Godefridis G, Claessens G, Pera A, Pierik M, Vermeire S, Rutgeerts P, Bossuyt X. Interassay and interobserver variability in the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with ulcerative colitis. *Clin Chem*. 2004; 50: 1422-5.

¹³⁸ Papp M, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, Palatka K, Vitalis Z, Foldi I, Lakos G, Tumpek J, Udvardy ML, Harsfalvi J, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Bene L, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Veres G, Papp J, Lakatos PL. 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*. 2007; 13: 984-992.