

„A felfedezés lényege: látni azt, amit már mindenki látott, de olyat gondolni, amit senki más nem gondolt róla.” (Szent-Györgyi Albert)

A veleszületett immunitás egyes fehérjéi ellen kialakuló autoantitestek szerepe krónikus gyulladással járó gasztroenterológiai kórképek patogenezisében és jelentőségük a kórlefolyás előrejelzésében

■ Sipeki Nóra dr.

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Intézet, Gasztroenterológiai Tanszék, Debrecen
Correspondence: sipeki.nora@med.unideb.hu

A klinikai gyakorlat szempontjából nagy jelentőséggel bírnak azok a biomarkerek, amelyek segítséget nyújtanak a különféle gasztroenterológiai betegségek kimenetelének előrejelzésében. Az utóbbi években az érdeklődés középpontjába került olyan klinikai és laboratóriumi (szerológia és genetikai) tényezők felkutatása, amelyek segítséget nyújthatnak a klinikusok számára azon betegek kiszűrésében, akik fokozott kockázattal rendelkeznek az adott betegség progressziójára nézve. Lehetővé téve az egyénre szabott követési stratégia, valamint kezelési terv kialakítását. Klinikai kutatásunk során két olyan gasztroenterológiai betegcsoportot (májcirrózis, gyulladásos bélbetegségek [IBD]) választottunk ki, ahol a betegség patogenezisében és a kórlefolyás során a szövődmények kialakulásában jelentős szerepet játszik a veleszületett immunrendszer működészavara. A két kórkép további közös jellemzője, hogy a vékonybélgyulladás következtében létrejövő strukturális és funkcionális károsodás, a bélnyálkahártya csökkent védekezőképessége és a megváltozott bélflóra együttesen krónikus bakteriális transzlokációhoz (BT) vezetnek. A különféle luminális baktériumok és/vagy bakteriális termékek kontrollálatlan felvétele tovább súlyosbítja a már zajló lokális és szisztémás proinflammatorikus folyamatokat elősegítve ezáltal a betegség súlyosbodását és a szövődmények kialakulását.

Role of antibodies produced against innate immunity proteins in the pathogenesis of gastroenterological diseases associated with chronic (bowel) inflammation and their significance in the prediction of disease course

Biomarkers which can assist to define and predict disease outcome in different gastroenterological diseases has of importance. In recent years, much emphasis has been placed on the determination of important predictive factors. Identification of new markers (serologic and genetic), which can help clinicians in the identification of patients at risk for disease progression around the time of diagnosis, will hopefully allow choosing the most appropriate management in terms of therapy, intensity of follow-up and frequency of various investigations. Two heterogenous gastroenterological disease groups (liver cirrhosis, inflammatory bowel disease [IBD]) were chosen for further evaluation, in which the disruption of innate immune system plays a pivotal role in the pathogenesis of the disease and also in the development of disease specific complications throughout the disease course. Common feature of these two diseases is that the structural and functional disruption of gut barrier integrity due to chronic small bowel inflammation, the disturbance of mucosal immunity and the alteration of gut luminal flora altogether lead to chronic enhanced bacterial translocation (BT). BT, or in other words, sustained uptake of bacteria and/or bacterial products from the gut into the circulation leads to a more profound activation of local and systemic pro-inflammatory processes and as a consequence, contribute to the acute or chronic worsening of the disease, as well as the development of disease specific complications.

Bevezető

A veleszületett immunrendszer a különböző patogénekkel és testidegen anyagokkal szembeni védekezés meghatározó első vonala. A kialakuló immunválasz nem szelektív és immunmemória kialakulásával sem jár, ugyanakkor az adaptív immunrendszer aktiválódásáig ez a rendszer jelent védelmet a szervezet számára. A veleszületett immunrendszer működése kulcsfontosságú az adaptív immunválasz beindításában is. A legfontosabb humorális komponensek (komplementrendszer, antimikrobiális peptidek és különböző citokinek) és a celluláris elemek (fagociták, természetes ölő [NK], valamint dendritikus sejtek) a patogén jelenlététől függetlenül funkcióképes állapotban vannak és nagyon rövid idő alatt képesek aktiválódni. A mikrobák felismerése az ún. „mintázatfelismerő receptor (PRR)”-okon keresztül történik, amelyek az adott mikrobából származó jellegzetes kémiai szerkezetű molekulákat az ún. „kórokozó-asszociált molekuláris mintázat (PAMP)”-okat ismerik fel. A PAMP-ok korai felismerése elengedhetetlen a megfelelő antimikrobiális immunválasz kialakuláshoz, ugyanakkor jól működő szabályozó mechanizmusok is szükségesek a túlzott mértékű szisztémás és lokális immunválasz megakadályozására és a következményes szövetkárosodás elkerülésére. Ugyanazon ligandot egy időben több PRR is felismeri és ezek együttes, összehangolt működése szükséges a megfelelő válasz kialakulásához.

A PRR-ek különféle formában, szervezetszerte megtalálhatóak: egyrészt szabadon mozgó fehérjék (oldott elemek), másrészt a természetes immunrendszer sejtjeinek felszínén megkötött vagy a sejtek belsejében, intracellulárisan előforduló receptorok. Minden olyan helyen nagy számban fellelhetőek, amely a mikroorganizmusok számára belépési kaput jelent az emberi szervezetbe. A különféle PRR-ek közé tartoznak a tollszerű receptorok (TLR), a scavenger receptorok (SR), a C-típusú lektinek (CLR), a nukleotid kötő oligomerizációs domén (NOD)-szerű receptorok (NDL), valamint a β 2-integrinek. Működésük alapján két fő csoportba sorolhatóak. A sejthez kötött elemek egyrészt endocitotikus, másrészt jelátvivő receptorok és a gyulladásos válasz beindításában, valamint a következményes sejtaktivációban van jelentős szerepük. A szolúbilis elemek ugyanakkor az antitestek funkcionális ősei, fagocitareceptorokként működnek. A patogén mikrobáknak vagy azok termékeinek a fagociták által történő felvételét közvetlenül, opszoninok jelenléte nélkül is segítik és aktiválják a komplementrendszert. A szolúbilis PRR-ek egy része a neutrofilek granulumaiban raktározódik és a granulocitákat érő stimulus hatására azonnal, percekben belül, kibocsátásra kerül az extracelluláris térbe. Másik részük, mint korai géntermék, a mononukleáris és a dendritikus sejtekben újonnan szintetizálódik. Mindkét esetben a szolúbilis PRR-ek lokálisan, az immunrendszert ért támadás helyszínén képződnek. Fontos azonban, hogy a szolúbilis PRR-ek egyben akut fázis fehérjék (APP) is, késleltetett formában, szisztémásan is képződnek, távol a gyulladás helyétől. Forrásuk bizonyos szövetekben (mint pl. máj) az epithelsejtek. Szintézisüket elsősorban az interleukin (IL)-6, kisebb

mértékben az IL-1 és a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF α) fokozzák.

A PRR-ek ligandkötő specificitása széles skálán mozog. Képesek megkötni különféle polisacharidokat (mint pl. a lipopoliszacharid [LPS]), a lipoteikolsavat (LTA), a peptidoglikánt (PG), nukleinsavakat és fehérjéket. Ezen molekulák azonban nemcsak a patogén mikrobák sejt felszíni alkotóelemei, hanem a kommenzális flóra tagjai és az opportunisták kórokozókon is jelen vannak (mikroba-asszociált molekula mintázatok [MAMP]). A szervezet PRR-ek segítségével a számára idegen mikrobiális struktúrák mellett bizonyos endogén molekulák felismerésére és eliminálására is képes. A károsodott saját sejteket azok megváltozott felszíni alkotóelemei (DAMP) alapján ismerik fel.

A PRR-ek és szabályozó mechanizmusai nem megfelelő működése esetén a kórokozók és a saját sérült struktúrák felismerése és eltávolítása, a szöveti regeneráció, valamint a gyulladásos válasz megfelelő kontrollja sérül, amelynek eredményeképpen fokozódhat az akut és krónikus gyulladásos folyamatokkal és társuló kórképekkel szembeni fogékonyság, valamint módosulhat azok lefolyása.

A PRR-ek által felismert sejt felszíni mikrobiális alkotóelemek ellen a szervezetben antitestek is képződhetnek, amelyek szerológiai módszerekkel kimutathatóak. Az antimikrobiális antitestek közül a legismertebb és legtöbbet vizsgált antitest az anti-Saccharomyces cerevisiae ellenes antitest (ASCA), amely a mikrobák mannóz sejt fal komponense ellen termelődik. Az ASCA-hoz képest az egyéb sejt felszíni glikán komponensek ellen képződő antitestek (anti-glikán antitestek) előfordulási gyakorisága lényegesen ritkább. Antitestek ugyanakkor nemcsak a mikrobák szénhidrát, hanem fehérje komponensei ellen is termelődhetnek. A baktériumok külső membrán proteinjei ellen képződő antitestek anti-OMP antitest néven ismertek. Az antimikrobiális antitestképződés oka és annak pontos mechanizmusa nem ismert. Gyakoribb képződésüket megfigyelték bizonyos funkcionális következménnyel járó variáns PRR-genotípusok esetén (MBL-deficiencia, NOD2-variánsok). Ezen megfigyelés és az antimikrobiális antitestek jellegzetes betegcsoportokban történő előfordulása felveti annak lehetőségét, hogy az antitestképződés egyik lehetséges oka a genetikai alapon létrejövő bélflóra elleni immuntolerancia veszteség. Újabb irodalmi adatok alapján az emberi szervezet bizonyos fehérjéi ellen kialakult antitestek (autoantitestek) jelenléte szintén tükrözheti a szervezetnek a bél mikroflórájára adott rendellenes immunválaszát. Az antineutrofil citoplazmatikus antitest (ANCA) képződésében szerepet játszik a molekuláris mimikri jelensége. A humán 5-ös izotípusú β -tubulin citoskeletális fehérje és a bélbaktériumok sejt felszínén ubiquiter módon megtalálható FtsZ-fehérje között nagyfokú szerkezeti hasonlóság van, amely keresztreakció kialakulásához szolgálhat alapul. A pancreas acinus sejt ellenes antitest (PAb) antigénjéről, a glikoprotein-2 (GP2)-ről, pedig igazolódott, hogy egy intesztinális receptorfehérje, amely a bélbaktériumok érzékelésében vesz részt. Elképzelhető, hogy egy bakteriális komponens és a GP2 együttese a valódi antigén.

Célkitűzések

I. Prospektíven követett nagy esetszámú gyulladásos bélbeteg kohorszban (n=458) vizsgáltuk a különféle target specifikus pancreas ellenes antitestek (PAb), valamint antifoszfolipid antitestek (APLA)

1. előfordulási gyakoriságát;
2. új diagnosztikai tesztek közötti egyezést a PAb-ok esetében;
3. antitestválasz hosszú távú stabilitását;
4. képződésének összefüggését a Crohn-betegség [CD] klinikai, szerológiai és genetikai jellegzetességeivel;
5. prognosztikai értékét a betegségfolyás előrejelzésében CD-ben (betegség specifikus szövődmények, reszekciós műtétek).

II. Nagyszámú, különböző etiológiájú, prospektíven követett májcirrózisos beteganyagon (n=385) vizsgáltuk a szérum IgA- és IgG-típusú antineutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) előfordulási gyakoriságát, típusát és mintázatát. Megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e kapcsolat az ANCA jelenléte és a betegség súlyossága, illetve portális hipertenzió jelenléte között májcirrózisban. Elemeztük, hogy az ANCA jelenléte – mint BT-marker – kockázati tényező-e a májcirrózisos betegek klinikailag jelentős bakteriális fertőzéseinek kialakulásában. Vizsgáltuk a cirrózishoz társuló ANCA eredetét.

Módszerek

A különféle autoantitestek meghatározása enzimhez kapcsolt immunszorbens assay (ELISA) segítségével, illetve indirekt immunfluoreszcens módszerrel (IIF) történt.

Következtetések

A disszertáció alapját képző három prospektív klinikai tanulmány (1–4) eredményeit az alábbiak szerint foglalhatjuk össze.

1. Fokozott APLA-képződést észleltünk CD-betegeknél, viszont ezen APLA-k jelenléte nem mutatott összefüggést a klinikai fenotípussal, a betegségfolyással, illetve a vénás trombotikus események kialakulásának kockázatával a prospektív követés során.
2. A target specifikus PAb-ok összefüggést mutattak CD-ben mind a szövődményes lumenális betegség fenotípus, mind pedig a perianális szövődmény kialakulá-

sának kockázatával. Ezek alapján hasznos kiegészítő eszközként szolgálhatnak a szerológiai panelek tagjaként már a betegség felismerésekor a CD-betegek stratifikációjában.

3. Az IgA-típusú ANCA jelenléte gyakori volt cirrózisos betegekben és összefüggést mutatott az előrehaladott betegséggel és a portális hipertenzióval. Továbbá az ANCA IgA jelenléte független módon összefüggést mutatott a klinikailag jelentős bakteriális fertőzések kialakulásával.
4. Az IgA szubtipizálás során az IgA2 szubtípusú ANCA arányának megemelkedése és a szekretoros komponens jelenléte együttesen alátámasztják a bélnyálkahártya immunrendszerének részvételét és a bakteriális alkotórészek fokozott expozíciójának trigger szerepét az ANCA-képződésben májcirrózisban.

Conclusions

Conclusions of the three prospective studies representing the basis of this PhD thesis (1–4):

1. Although we detected enhanced formation of APLAs in CD patients, the presence of the APLAs was not associated with the clinical phenotype, disease course, or risk of venous thrombotic events during the prospective follow-up.
2. In conclusions, the findings of our prospective referral cohort study indicate that target-specific PABs may be useful markers in the stratification of CD patients and are associated with complicated disease phenotype and risk of developing perianal complications. In addition, they may be valuable additional tools as a member of serology panels for the prediction of disease course.
3. In summary, the presence of IgA class ANCA was common in patients with cirrhosis and was associated with advanced disease and portal hypertension. Furthermore, presence of ANCA IgA was independently associated with the development of clinically significant bacterial infections during a 2-year follow-up.
4. Marked increase in the proportion of IgA2 type of ANCA with the presence of secretory component supports the involvement of gut mucosal immune system and sustained exposure to bacterial constituents as a trigger of ANCA formation in liver cirrhosis.

2016. december 16-án Sipeki Nóra dr. sikeres védési procedúrát követően *summa cum laude* PhD fokozatot szerzett.

Irodalom

1. Papp M, Sipeki N, Vitalis Z, Tornai T, Altörjay I, Tornai I, Udvardy M, Fechner K, Jacobsen S, Teegen B, Sumegi A, Veres G, Laszlo Lakatos P, Kapelmayer J, Antal-Szalmas P. High prevalence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is associated with increased risk of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013 Sep; 59(3): 457–66. doi:pii: S0168-8278(13)00272-9. 10.1016/j.jhep.2013.04.018. PubMed PMID: 23639483. IF:10.401 – „Az év legjobb klinikai témájú tudományos közleménye” (2014, Adományozó: Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar)
2. Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 14; 20(10): 2564–2577. Epub 2014/03/15. doi: 10.3748/wjg.v20.i10.2564. PubMed PMID: 24627592; PubMed Central PMCID: PMC3949265. IF:2.369
3. Sipeki N, Davida L, Palyu E, Altörjay I, Harsfalvi J, Antal Szalmas P, Szabo Z, Veres G, Shums Z, Norman GL, Lakatos PL, Papp M. Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies (APLA) in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21(22): 6952–6964. Epub 2015/06/14. doi: 10.3748/wjg.v21.i22.6952. IF:2.787
4. Papp M^{*}, Sipeki N^{*}, Tornai T, Altörjay I, Norman GL, Shums Z, Roggenbuck D, Fechner K, Stöcker W, Antal-Szalmas P, Veres G, Lakatos PL. Rediscovery of the anti-pancreatic antibodies and evaluation of their prognostic value in a prospective clinical cohort of Crohn's patients: the importance of specific target antigens (GP2 and CUZD1). *Journal of Crohn's and Colitis*. *These authors contributed equally to the work and both should be considered as first authors. 2015 May 12; 9(8): 659–668. pii: jiv087. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jiv087> IF:6.585
5. Lakatos PL, Sipeki N, Kovács GY, Pályu E, Norman GL, Shums Z, Antal-Szalmas P, Papp M. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 2015; 9(10): 891–898. doi: 10.1093/ecco-jcc/jiv127. Epub 2015 Jul 18. PMID: 26188353 IF:6.585
6. Tornai T, Vitalis Z, Sipeki N, Dinya T, Tornai D, Antal-Szalmas P, Karanyi Z, Tornai I, Papp M. Macrophage activation marker, soluble CD163 is an independent predictor of short-term mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection. *Liver Int* 216; 36(11): 1628–1638. Epub 2016 Mar 31. doi: 10.1111/liv.13133. PMID: 27031405 IF:4.470 (2015)
7. Földi I, Tornai T, Tornai D, Sipeki N, Vítális Z, Tornai I, Dinya T, Antal-Szalmas P, Papp M. Lectin complement pathway molecules are decreased in patients with cirrhosis and constitute the risk of bacterial infections. *Liver Int* 2017 Jan 20. doi: 10.1111/liv.13368. (Epub ahead of print). IF:4.470 (2015)
8. Papp M, Tornai T, Vítális Z, Tornai I, Sipeki N, Balogh B, Antal-Szalmas P, Trebica J. PREDICT (Predicting Acute-on- Chronic Liver Failure in Cirrhosis) multicentrikus európai prospektív obszervációs tanulmány: EASL-CLIF Consortium 2017–2018. *CEU-JGH* 2017; 3(2): 151–154.
9. Kovacs G^{*}, Sipeki N^{*}, Suga B, Tornai T, Fechner K, Norman GL, Shums Z, Antal-Szalmas P, Papp M. Significance of serological markers in the disease course of ulcerative colitis in a prospective clinical cohort of patients. *These authors contributed equally to the work and both should be considered as first authors. (Manuscript Under Revision)
10. Sipeki N, Suga B, Norman GL, Shums Z, Roggenbuck D, Fechner K, Veres G, Lakatos PL, Antal-Szalmas P, Papp M. Reconsidering the prognostic value of (traditional) serological antibodies in Crohn's disease – IgA subtypes to take the center stage. (Manuscript Under Preparation)

Összesített impact factor (IF): 37.667

AASLD
THE LIVER MEETING®
2017 WASHINGTON, DC
OCTOBER 20-24

68th Annual Meeting
of the American Association
for the Study of Liver Diseases
(AASLD 2017)

