

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS EGYES FEHÉRJÉI
ELLEN KIALAKULÓ AUTOANTITESTEK SZEREPE
KRÓNIKUS GYULLADÁSSAL JÁRÓ
GASZTROENTEROLÓGIAI KÓRKÉPEK
PATOGENEZISÉBEN ÉS JELENTŐSÉGÜK A
KÓRLEFOLYÁS ELŐREJELZÉSÉBEN**

Dr. Sipeki Nóra

Témavezető: Dr. Papp Mária



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2016

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

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

Írta: **Dr. Sipeki Nóra** okleveles általános orvos
Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: **Dr. Papp Mária, PhD**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora

Dr. Szepes Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekgyógyászati Intézet Könyvtára

2016. december 16. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Griger Zoltán, PhD

Dr. Juhász Márk, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora

Dr. Griger Zoltán, PhD

Dr. Juhász Márk, PhD

Dr. Szepes Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület Tanterem

2016. december 16. 13:00 óra

1. Bevezetés

A veleszületett immunrendszer a különböző patogénekkal 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 (komplement rendszer, antimikrobiális peptidok és különböző citokinek) és a celluláris elemek (fagociták, természetes ölő [NK], valamint dendritikus sejtek) a patogének jelenlététől függetlenül funkcióképes állapotban vannak és nagyon rövid idő alatt képesek aktiválódni. A mikrobák felismerése az ún. „mintázatfelismerő receptor (PRR)”-okon keresztül történik, melyek az adott mikróbából származó jellegzetes kémiai szerkezetű molekulákat az ún. „kórokozó-asszociált molekuláris mintázat (PAMP)”-okat ismerik fel. A PAMP-ok korai felismerése elengedhetetlen a megfelelő anti-mikrobiális immunválasz kialakuláshoz, ugyanakkor jól működő szabályozó mechanizmusok is szükségesek a túlzott mértékű szisztémás és lokális immunválasz megakadályozására és a következményes szövetkárosodás elkerülésére. Ugyanazon ligandot egyidőben több PRR is felismeri és ezek együttes, összehangolt működése szükséges a megfelelő válasz kialakulásához.

A PRR-ok különféle formában, szervezet szerte 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-ok közé tartoznak a toll-szerű 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, fagocita receptorként működnek. A patogén mikrobáknak vagy azok termékeinek a fagociták által történő felvételét közvetlenül, opszoninok jelenléte nélkül is segítik és aktiválják a komplement rendszert. A szolúbilis PRR-ok egy része a neutrofilek granulumaiban raktározódik és a granulocitákat érő stimulus hatására azonnal, percekben belül, kibocsájtásra kerül az extracelluláris térbe. Másik részük, mint korai géntermék, a mononukleáris és a dendritikus sejtekben újonnan szintetizálódik. Mindkét esetben a szolúbilis PRR-ok lokálisan, az immunrendszert ért támadás helyszínén képződnek. Fontos azonban, hogy a szolúbilis PRR-ok egyben akut fázis fehérjék (APP) is, késleltetett formában, szisztémásan is képződnek, távol a gyulladás helyétől. Forrásuk bizonyos szövetekben (mint pl. máj) az epitél sejtek. Szintézisüket elsősorban az interleukin (IL)-6, kisebb mértékben az IL-1 és a tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α) fokozzák.

A PRR-ok ligandkötő specificitása széles skálán mozog. Képesek megkötni különféle poliszacharidokat (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 tagjain és az opportunisták kórokozókon is jelen vannak (mikroba-asszociált molekula mintázatok [MAMP]). A szervezet PRR-ok 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-ok és szabályozó mechanizmusaik nem megfelelő működése esetén a kórokozók és a saját sérült struktúrák felismerése és eltávolítása, a szöveti regeneráció, valamint a gyulladással válasz megfelelő kontrollja sérül, melynek eredményeképpen fokozódhat az akut és krónikus gyulladással járó folyamatokkal és társuló kórképekkel szembeni fogékonyság, valamint módosulhat azok lefolyása.

A PRR-ok által felismert sejt felszíni mikrobiális alkotóelemek ellen a szervezetben antitestek is képződhetnek, melyek szerológiai módszerekkel kimutathatóak. Az **anti-mikrobiális antitestek** közül a legismertebb és legtöbbet vizsgált antitest az **anti-Saccharomyces cerevisiae ellenes antitest (ASCA)**, mely 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 anti-mikrobiális 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 anti-mikrobiális antitestek jellegzetes betegcsoportokban történő előfordulása felveti annak lehetőségét, hogy az antitestképződés egyik lehetséges oka a genetikai alapon létrejövő bélflóra elleni immuntolerancia vesztés. Újabb irodalmi adatok alapján az emberi szervezet bizonyos fehérjéi ellen kialakult antitestek (**autoantitestek**) jelenléte szintén tükrözheti a szervezetnek a bél mikroflórájára adott rendellenes immunválaszt. Az **anti-neutrofil 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, mely keresztreakció kialakulásához szolgálhat alapul. A **pankreász acinus sejt ellenes antitest (Pab)** antigénjéről, a glikoprotein 2 (GP2)-ről, pedig igazolódott, hogy egy intesztinális receptorfehérje, mely a bélbaktériumok érzékelésében vesz részt. Elképzelhető, hogy egy bakteriális komponens és a GP2 együttese a valódi antigén.

A klinikai gyakorlat szempontjából nagy jelentőséggel bírnak azok a biomarkerek, melyek segítséget nyújtanak a különféle gastroenterológiai betegségek kimenetelének előrejelzésében. Az utóbbi években az érdeklődés középpontjába került olyan klinikai és laboratóriumi (szerológia és genetikai) tényezők felkutatása, melyek 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 gastroenterológiai betegcsoportot (**májcirrhosis, gyulladással járó 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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Gyulladásos bélbetegségek (IBD)

Gyulladásos bélbetegségek (IBD), nevezetesen a Crohn-betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC) a gasztrointesztinális traktus krónikus gyulladással járó megbetegedései. Mindkét betegcsoport mind (klinikai) megjelenésében, mind pedig a betegség lefolyása tekintetében igen heterogén.

A bakteriális transzlokáció szerepe az IBD patogenezisében

Annak ellenére, hogy az utóbbi évek kutatásai számos új aspektusát tárták fel a Crohn-betegségnek, az etiológia egyes pontjai továbbra is tisztázatlanok maradtak. A genetikai és környezeti faktorok mellett a luminális flórának is szerepe van a krónikus intesztinális gyulladás patogenezisében. CD-ben szenvedő betegek esetén a mucosalis immunitás zavara, valamint a bélnyálkahártya barrier integritásának megbomlása antigének és proinflammatorikus molekulák, többek között luminális baktériumok és bakteriális termékek kontrollálatlan felvételét eredményezheti a béllumenből. A fokozott bakteriális transzlokáció (BT) következtében túlsúlyba kerülő proinflammatorikus folyamatok pedig a szövetkárosodást tovább súlyosbítják.

Szerológiai markerek jelentősége IBD-ben

A fokozott (szerológiai) antitestképződés jól ismert jellemzője az IBD-nek. Számos anti-mikrobiális és autoantitestek esetében találtak összefüggéseket akár CD-vel, illetve UC-vel, akár a szövődményes betegségforma kialakulásával. Szérum mintákból kimutatható különféle antitestek szerepe az IBD diagnosztikájában, differenciál diagnosztikájában, illetve a betegség lefolyás, valamint a terápiás válasz előrejelzésében már bizonyított. Keresztmetszeti, longitudinális (hosszútávú követéses) vizsgálatok és meta-analízisek révén nyert bizonyítékok is támogatják a különféle szerológiai markerek szerepét a szövődményes betegségforma kialakulásának, illetve a magas műtéti rizikó előrejelzésében CD-ben. Jelenleg CD-ben az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest (ASCA) számít a legmegbízhatóbb markernek, míg a többi ismert marker esetén kérdéses, hogy ezek vajon képesek-e azonosítani a CD betegek specifikus alcsoportjait.

Az anti-mikrobiális antitestek a különböző bélben található mikrobák sejtfelszíni szénhidrát komponensei (anti-glikánok), illetve fehérje antigénjei ellen képződnek. Közülük az elsőként azonosított és jelenleg legjelentősebb anti-mikrobiális antitest az ASCA. **Az autoantitestek** pedig különböző, a szervezet saját fehérjéi ellen képződnek. Újabb kutatási eredmények szerint felmerül, hogy egyes autoantitestek jelenléte összefügghet a bélrendszer veleszületett immunrendszerének zavara következtében a bél felől kialakuló fokozott mikrobiális expozícióval, illetve ezzel összefüggésben az ezáltal triggerelt felfokozott adaptív immunválasszal. Emellett ezek a szerológiai antitestek aktív szerepet játszhatnak a gyulladás patofiziológiájában IBD-ben.

Anti-foszfolipid antitestek (APLA)

Az anti-foszfolipid antitestek az autoantitesteknek egy protrombotikus csoportja, melyek az anti-foszfolipid szindróma (APS) szerológiai markereiként kerültek be a köztudatba. Ebbe a csoportba tartozik az **anti-kardiolipin (ACA)**, az **anti- β 2-Glikoprotein-I (anti- β 2-GPI)**, és a

foszfatidilszerin/protrombin komplex ellen képződő antitest (anti-PS/PT). APLA-k jelenlétét számos más betegségben (krónikus gyulladásos betegségekben és posztinfekciózus állapotokban) is kimutatták, ahol nem feltétlenül rendelkeztek protrombotikus aktivitással. Természetesen protrombotikus aktivitás hiányában is lehet ezeknek az antitesteknek meghatározott patogenetikai szerepe számos más betegségben az APS-n kívül.

IBD-ben a jelenleg rendelkezésre álló, az APLA-k különféle aspektusait vizsgáló keresztmetszeti tanulmányok igen eltérő következtetésekre jutottak ezen antitestek képződését, előfordulási gyakoriságát és időbeli stabilitását illetően. Az APLA-k klinikai jelentősége IBD-ben, beleértve a trombotikus eseményekkel való összefüggésüket egyelőre nem egyértelműen tisztázott. Így ezen elsődleges APLA-k átfogó, minden részletre kiterjedő elemzése egy nagy esetszámú, prospektíven követett IBD kohorszban hiánypótlónak számít.

Jelenleg a legtöbb információ az APLA-k lehetséges patogenetikai szerepéről az **anti- β 2-GPI antitest** vonatkozásában áll rendelkezésre, mely akár új fordulatot is jelenthet az IBD patomechanizmusának kutatásában.

A komplement szabályozó fehérjék (CCP) szupercsaládjába tartozó **β 2-Glikoprotein I (β 2-GPI)** elsősorban a hepatocitákban szintetizálódik és magas koncentrációt ér el a szérumban. Ezen kívül a β 2-GPI messenger RNS (mRNS)-ének jelenlétét számos szövetben is kimutatták, így többek között az antifoszfolipid-szindrómában szerepet játszó endotél sejtekben, astrocitákban, illetve neuronokban is. A β 2-GPI öt alegységből álló fehérje. A különböző domének a fehérje eltérő funkcióiért felelősek, így az 1-es domén (D1), mely az extracelluláris térbe nyúlik, más plazmafehérjékkel és antitestekkel lép interakcióba, míg a D5 az anionos foszfolipid membránok és különböző receptorok, mint például TLR-ok kötéséért felelős. A β 2-GPI veleszületett immunitásban betöltött szerepére utal bakteriális LPS semlegesítő funkciója, mely a D5 és az LPS közvetlen interakciója révén valósul meg. Megerősítésre várnak tehát ebből kiindulva azok a feltételezések, melyek szerint akár a β 2-GPI csökkent szintje, akár funkciózavara károsíthatja a szervezet baktériumokkal szembeni védekezőképességét.

A fehérje elleni antitestek kialakulása ismert folyamat, a mechanizmus részletei azonban még nem teljesen tisztázottak. A β 2-GPI gén polimorfizmusainak szerepe lehet a fehérje immunogenitásában, illetve más plazmafehérjékkel való interakciókban. Tanulmányok igazolták, hogy a D5 alegység kódoló régiójában a Val/Leu²⁴⁷ egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP) gyakoribb és reaktívabb anti- β 2-GPI antitest képződéssel jár. Az anti- β 2-GPI antitestek az APS szerológiai markerének tekinthetők. Ezek az antitestek ún. „funkciónyerő” (gain-of-function) antitestek, melyek endotélsejtek, monociták és trombociták aktivációja révén ezen sejtek proinflammatorikus, proadhezív és prokoaguláns fenotípusainak megjelenését segítik elő. Ugyanakkor az antitestek jelenléte mellett egy második trigger tényezőre, leggyakrabban egy gyulladásos eseményre is szükség van az érrendszerben lezajló kóros folyamatok beindításához. Az anti- β 2-GPI antitestek beavatkoznak a fiziológiás hemosztázisba azáltal, hogy felfüggesztik a β 2-GPI gátló hatását a von Willebrand faktor (vWF)-függő trombocita adhézióra és aggregációra, így a keringő aktív vWF emelkedett szintje a trombotikus folyamatok felé billenti a hemosztázist. Jellegzetes klinikai manifesztációval rendelkeznek az anti- β 2-GPI antitestek különböző altípusai, így a D1 alegység ellen képződő antitestek egyaránt fokozzák a vénás és artériás tromboembóliás események rizikóját, míg a D4/5 alegységek ellen képződő antitestek egyes non-trombotikus állapotok kialakulásáért felelősek. Bár ez utóbbi csoport szerepköre kevésbé jól definiált.

Az anti- β 2-GPI antitestek tehát az APS-en kívül számos más, nem feltétlenül trombotikus kórképben is szerepet játszanak, így többek között IBD-ben is. Az anti- β 2-GPI antitestek valós prevalenciája és szignifikanciája IBD-ben azonban jelenleg nem teljesen tisztázott. APS-ben kimutatták β 2-GPI és *Saccharomyces cerevisiae* keresztreakáló epitópok jelenlétét. *Papp és mtsai* egy előzetes tanulmányban, CD-ben szenvedő betegek körében

fokozott anti- β 2-GPI antitestképződést mutattak ki, mely szignifikánsan korrelált az ASCA jelenlétével, valamint a betegség súlyosságával. Mindez arra enged következtetni, hogy az anti- β 2-GPI antitestek önmagukban, illetve ASCA-val keresztreakálva felerősíthetik CD-ben az intesztinális mikrovaszkulátúrában zajló patológiás folyamatokat azáltal, hogy felfüggesztik a β 2-GPI vWF-függő vérlemezke adhézióra és aggregációra gyakorolt gátló hatását. A gyulladás és a véralvadás szorosan összefüggő, egymással kölcsönhatásban lévő folyamatai a mikrovaszkulátúrának. Mucosalis szinten a koagulációs zavarok mikrotrombus képződéshez vezetnek, mely jól ismert komponense a CD patogenezisének, valamint szerepet játszik többek között a betegség progressziójában is. Elméletileg az anti- β 2-GPI antitestek jelenlétében a β 2-GPI veleszületett immunitásban betöltött meghatározott funkciói is zavart szenvedhetnek, mely szintén hozzájárulhat az IBD-ben zajló patológiás kórfolyamatok kialakulásához, illetve azok fenntartásához. A β 2-GPI fehérjének ugyanis fontos szerepe van a veleszületett immunitásban LPS „scavenging” („utcaseprő”) funkciója által, mely a β 2-GPI 5-ös domén (D5) és LPS közötti interakció révén valósul meg.

Pankreász ellenes antitestek (PAb)

Az exokrin pankreász acinus sejtjei ellen képződő autoantitestek fokozott képződését már korábban kimutatták CD-ben, illetve coeliakiában. A PAb-ok jelenlétét először 1980-ban fagyasztott humán pankreász metszeteken mutatták ki indirekt immunfluoreszcens technikával (IIF), majd ezt követően főemlős pankreász szövet szubsztrátokkal egyetemben a PAb kimutatás elsődleges diagnosztikai tesztjének számít napjainkig. Két festődési mintázat - nevezetesen retikulo-granuláris és cseppszerű - különböztethető meg IIF módszerrel, melyek azonos gyakorisággal fordulnak elő. Irodalmi adatok szerint a PAb-ok előfordulási gyakorisága CD betegekben 40% körüli. Ezen antitestek az IBD-ben szenvedő betegek differenciáldiagnosztikájában (CD vs. UC) bizonyultak alkalmazhatónak. Mindemellett néhány tanulmány, köztük egy nagyobb betegszámú vizsgálat összefüggést talált a PAb-ok jelenléte és egyes specifikus betegség fenotípusok között, mely felvetette, hogy ezen antitestek meghatározásának klinikai jelentősége lehet.

Annak ellenére, hogy a PAb-ok viszonylag korán felfedezésre kerültek, az autoantigének meghatározása közel 20 évet váratott magára, ezáltal hátráltatva ezen antitesteknek a CD immunpatogenezisében betöltött szerepének további vizsgálatát. Nemrégiben két egymástól független kutatócsoportnak különböző módszerek alkalmazásával sikerült azonosítani a PAb-ok cél antigénjeként a hasnyálmirigy zimogén granuláriumainak membránjában található fő alkotó glikoproteint, nevezetesen a glikoprotein 2-t (GP2). *Komorowski és mtsai.* egy másik hasonlóan releváns cél antigént is azonosítottak, a CUB zona pellucida-szerű domén 1-t (CUZD1). Mindemellett ezen tanulmány keretében igazolták, hogy a humán pankreászból készült szövettani metszeteken IIF módszerrel látható immunfluoreszcens mintázatok közül a retikulo-granuláris típus szoros összefüggést mutatott az **anti-CUZD1** antitestek jelenlétével, míg **anti-GP2 antitest** pozitívitás esetében cseppszerű festődés volt megfigyelhető. További vizsgálatok igazolták, hogy a GP2 és a CUZD1 a veleszületett és szerzett immunitásban szerepet játszó fehérjecsaldók tagjai és feltételezhetően a kommenzális flóra tagjaival szembeni tolerancia, illetve a patogénekre adott immunválasz közötti egyensúly fenntartásában játszanak szerepet.

Ezeknek az újonnan felismert autoantigéneknek az azonosítása új diagnosztikus módszerek fejlesztését segítette elő, többek között például a 4-es izoformájú rekombináns GP2-t tartalmazó enzimkapcsolt immunsorbens vizsgálatot (ELISA) vagy CUZD1-t és GP2-t expresszáló sejt alapú IIF technikát. Ezekkel az újonnan elérhető PAb kimutatásra alkalmas technikákkal egyelőre igen kevés a tapasztalat, különös tekintettel ezeknek a PAb-oknak a CD-ben játszott klinikai jelentőségére. Az eddigi CD-ben végzett klinikai tanulmányok

elsősorban rekombináns GP2-alapú ELISA rendszert alkalmaztak. Ezzel szemben az anti-CUZD1-gyel kapcsolatosan igen limitált információk állnak rendelkezésre és az anti-CUZD1 antitestek meghatározásnak hiányában, ezekben a tanulmányokban a PAb szeroreaktivitás több mint fele hiányzik. Néhány tanulmányban az anti-GP2 antitestek jelenléte összefüggést mutatott a perianális betegséggel szövődött strikturizáló betegségforma kialakulásával, míg más tanulmányokban ez nem igazolódott. Ezen tanulmányokban korlátozó tényező a keresztmetszeti vizsgálati jelleg. A PAb-ok pontos klinikai jelentőségének megítélésére a CD betegséglefolyásának előrejelzésében hosszútávú longitudinális követéses vizsgálatok szükségesek. Emellett a PAb-ok hosszú távú stabilitása szintén tisztázandó kérdés.

Jelentős mennyiségű PAb antigén választódik ki az exokrin pankreászból a béllumenbe az emésztőenzimokkal egyetemben, melyek a veleszületett és szerzett immunitásban közreműködő fehérjecsaldók tagjai. Feltehetőleg a GP2 és a CUZD1 a kommenzális baktériumokkal szembeni tolerancia és a kórokozókra adott immunválasz közötti egyensúly fenntartásában játszik szerepet. A GP2-vel kapcsolatosan viszonylag több adat áll rendelkezésre, jelenlétét a gyulladt bélben CD betegekben már kimutatták. Ez a fehérje képes szelektíven kötni a kommenzális és patogén bélbaktériumok bizonyos alcsoportjait, többek között az *Escherichia coli*-t is, a baktériumok külső membránjában található I-es típusú pilusok FimH komponensének felismerése révén. GP2 expresszálódik a Peyer-plakkok (folliculusokhoz asszociált epithelium) M-sejtjeinek apikális felszínén az egészséges bélnyálkahártyában, ahol mucosális antigének transzcitotikus receptoraként funkcionál, és ezáltal az I-es típusú pilusokkal rendelkező baktériumok elleni mucosális immunválasz iniciációjában kulcsfontosságú szerepet tölt be. A GP2 továbbá a pankréász acinussejtjeinek zimogén granuláinak fő membránfehérjéje. A pankréásznedv alkotó részeként a béllumenbe szekretált GP2 az I-es típusú pilussal rendelkező baktériumok szolubilis receptoraként funkcionál. Ezen glikoproteinek ellen képződő autoantitestek egyrészt interferálhatnak egyes veleszületett immunmechanizmusokkal, másrészt akár tükrözhetik a fokozott mikrobiális terhelésnek kitett bél barrier által kiváltott immunválaszt is. Feltételezésünk szerint a GP2 ellen képződő antitestek gátolják a szolubilis receptor baktériumkötő képességét, mely miatt a bélnyálkahártya fokozott bakteriális expozíciónak van kitéve. Feltételezhető, hogy anti-GP2 jelenlétében fokozódik az M-sejtekbe történő baktériumtranszcitózis, s így fokozódik a dendritikus sejtek felé történő antigén prezentáció is, ezáltal beindítva antigén-specifikus mucosális immunválaszt, köztük IgA⁺ B-sejtek képződését is. Mindez a baktériumok fokozott invázióját eredményezi az intesztinális lamina propria-ba. Ezen feltételezésünk azonban további megerősítésre vár.

A kutatás jelentősége IBD-ben

Mind CD-ben, mind UC-ben a betegség klinikai megjelenése és a betegség lefolyása rendkívül változatos, és a betegség előrehaladtával változik. A klinikai gyakorlat szempontjából nagy jelentőséggel bírnak azok a biomarkerek, melyek segítséget nyújtanak a betegség kimenetelének előrejelzésében. Az utóbbi években az érdeklődés középpontjába került olyan klinikai és laboratóriumi (szerológia és genetikai) tényezők felkutatása, melyek segítséget nyújthatnak a klinikusok számára azon betegek kiszűrésében, akik fokozott kockázattal rendelkeznek a betegség progressziójára nézve. Mindez lehetővé tenné, hogy betegekre szabottan a lehető legkorábban és a legmegfelelőbb terápiás algoritmus illetőleg betegkövetési terv kerüljön kiválasztásra és alkalmazásra. CD és UC esetén a komplexitás nem csak magára a betegség klinikai megjelenésére vonatkozik, hanem a betegség hátterében meghúzódó patogenetikai mechanizmusokra is. Mivel az IBD kialakulásának pontos oka(i) és mechanizmusa(i) jelenleg nem tisztázott(ak), így minden feltételezett patogenetikai komponens szerepe körültekintő vizsgálatot igényel, jelentőséggel bír. Azon környezeti

tényezők, melyeknek szerepük lehet a krónikus intesztinális gyulladás fenntartásában különösen figyelmet érdemelnek az IBD krónikus jellegét tekintetbe véve. A véralvadási rendszer dinamikus részét képezi a krónikus intesztinális gyulladás folyamatának, és így fontos eleme az IBD patogenezisének. Tekintve, hogy egyelőre csak korlátozott adat áll rendelkezésre a véralvadási rendszer és a veleszületett immunrendszer sejtjei közötti kapcsolatáról, így ez a terület ígéretes célpontja lehet az IBD kutatásoknak.

2.2 Májcirrhosis

A májcirrhosis klinikai megjelenése és a betegség lefolyása változatos. A hullámzó betegséglefolyás során alapvetően két különböző klinikai entitással kell számolnunk, melyek esetén eltérő immun patogenetikai folyamatok kerülnek előtérbe. A májműködés akut rosszabbodása során kialakuló állapot (ACLF, krónikus májelégtelenségre rakódott akut dekompenzáció állapot) sok esetben szervelegtelenséggel jár, míg a májműködés krónikus rosszabbodása esetén a májfibrózis progressziója és a szövődmények kialakulása uralja a kórképet.

Szerzett immundeficiencia májcirrhosisban

A májcirrhosis a leggyakoribb szerzett immundeficiens állapot. Az immunrendszernek a kórképhez társuló működészavara „*cirrhosishoz társuló immundiszfunkciós szindróma*” (CAIDS) néven ismert. A természetes és az adaptív immunfunkciók zavara májcirrhosisban szerteágazó és mértéke is különböző; a zavar a felismerő-, végrehajtó- és szabályozó mechanizmusokat egyaránt érinti. Paradox módon bizonyos esetekben mind a gátolt, mind pedig a túlaktivált állapot párhuzamosan van jelen, mely egyfajta fogékonyságot eredményez az akut gyulladásos folyamatok kialakulásával szemben, mind lokálisan, mind pedig szisztémásan. A pro- és anti-inflammatorikus folyamatok egyensúlyzavarának egyik legszélsőségesebb formája a krónikus májelégtelenségre rakódott akut dekompenzáció állapota (ACLF). A májcirrhosishoz társuló komplex immunzavar sajátossága, hogy kedvez az akut gyulladásos folyamatok perzisztálásának és ezáltal hozzájárul a májfibrózis progressziójához és a szövődmények kialakulásához, (portális hipertenzió és hepatikus encephalopathia). A májműködés akut romlásában és krónikus rosszabbodásában azonban eltérő patogenetikai folyamatok kerülnek előtérbe. A fokozott BT és a következményes endotoxémia, továbbá a szisztémás bakteriális fertőzések előfordulásának gyakoribbá válása mindkét klinikai esetben kiemelt fontosságú. A betegek immunológiai státusza a betegség lefolyása során folyamatosan változik. Az immunműködés mértékének zavara összefügg a májbetegség súlyosságával és annak etiológiájával. Minél súlyosabb a májbetegség, annál összetettebb és jelentősebb mértékű az immunzavar. A májcirrhosis etiológiáját tekintve ezek az elváltozások a krónikus alkoholfogyasztás esetén a legkifejezettebbek. Májcirrhosisban az immunrendszer szerzett működészavara mellett, annak örökletes – a májcirrhosistól függetlenül fennálló – pl. funkcionális következményekkel járó genetikai polimorfizmusok következtében kialakuló eltérései sokkal kifejezettebb klinikai következményekkel járnak az átlag populációhoz képest. Ennek az az oka, hogy májcirrhosisban a széleskörű szerzett immunműködési zavar miatt a kompenzációs folyamatok korlátozottak.

A bakteriális transzlokáció szerepe májcirrhosisban

A májfibrózis kialakulása összetett folyamatok eredménye, melyet a szervezet genetikai és a környezeti faktorok közötti interakciók befolyásolnak. Ennek az interakciónak az egyik fő

színtere a gasztrointesztinalis rendszer és a bélnyálkahártya, mely az egyik legnagyobb felület, ahol a szervezet a külvilággal érintkezik. A bél lumenális flórájának a jelentős szerepe a máj krónikus gyulladásának patogenezisében nemrégiben került felfedezésre.

Intesztinális bakteriális túlnövekedés, a bél mikroba flóra összetételének megváltozása, a bél motilitás zavara, a bélnyálkahártya lokális immunzavara, valamint bélnyálkahártya barrier multifaktoriális károsodása (megnövekedett oxidatív stressz, bélnyálkahártya ödéma és ennek következtében kialakuló strukturális változások által létrehozott fokozott bél permeabilitás) együttesen patológiás BT eredményez májzsugorban. A BT a fent leírt mechanizmusoknak köszönhetően különböző (*mikrobiális*) eredetű antigének, baktériumok (főként Gram negatívok) és bakteriális termékek (bakteriális DNS CpG motívumokkal, LPS, lipoteicholsav, teicholsav) *kontrollálatlan* felvételét eredményezi a béllumenből a szisztémás keringésbe. A fokozott BT pedig a potenciálisan immunogén bakteriális termékek szintjének emelkedéséhez vezet a szisztémás keringésben. Ehhez járul hozzá, hogy ezen bakteriális termékek eliminációja is több ponton zavart szenved májzsugoros betegekben. A máj rezidens makrofágjai, az ún. Kuppfer sejtek (KC) kulcsszerepet játszanak a bakteriális termékek kiszűrésében. A máj ezen szűrő funkciója is zavart szenvedhet májzsugorban. Mindemellett az albumin fokozott oxidációja a fehérje LPS eltávolítása szempontjából jelentős ún. „scavenging” („utcaseprő”) kapacitásának csökkenését eredményezi. A hasonló funkciót betöltő magas denzitású lipoprotein (HDL) és apolipoprotein A-I (ApoA-1) csökkent szintje is hozzájárul a bakteriális termékek megemelkedéséhez a *portális* és szisztémás keringésben.

A fokozott BT súlyosbítja a proinflammatorikus folyamatokat, mely hozzájárul a máj szövetkárosodásához, illetve annak fokozódásához. A máj **csillagsejtjei** egyfajta **végrehajtó** funkciót töltenek be a fibrogenézis folyamatában, ugyanis a máj homeosztázisának fenntartása különböző pro- és anti-fibrotikus hatások csillagsejteken való szummációjának függvénye. A BT következtében a különféle bakteriális termékek, alkotórészek (LPS, bakteriális DNS) különböző TLR által mediált jelátviteli utakon (elsősorban TLR4 és TLR9) a csillagsejtek aktivációját eredményezik, mely a **profibrogenetikus folyamatok** irányába billentik el az egyensúlyt.

Intesztinális eredetű bakteriális termékek (LPS, nem metilált CpG-DNS és lipoteicholsav [LTA]), testidegen toxikus anyagok (ethanol és acetaldehidből származó adduktok) és károsodott hepatocytákból származó endogén TLR ligandok krónikus expozíciója következtében kialakuló változások a TLR jelátviteli utakban jól ismert elemei a CAIDS-nak. A TLR2 a di- és triacil-lipoproteineket, TLR9 nem metilált CpG-DNS-t, TLR4 pedig a lipopoliszacharid (LPS) lipid A komponensét ismeri fel. A baktériumok felismerése szempontjából legjelentősebb PRR-ok, a TLR2 és TLR4 funkcionális zavara az **elnyújtott LPS expozíció** következtében szignifikáns szerepet játszik májzsugoros betegekben a **fertőzésre való fokozott hajlam** kialakulásában. Akut vagy krónikus hatások változásokat hoznak létre a máj parenchymás és nem parenchymás sejtjeinek, illetve perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) TLR expressziójában. LPS és más TLR ligandok különböző jelátviteli utak aktiválására képesek immun és nem immunsejtben, melyek proinflammatorikus és pro-fibrogenetikus kaszkádot indítanak be akut körülmények között. Ezzel párhuzamosan anti-inflammatorikus és anti-fibrogenetikus folyamatok is jelen vannak, hogy ellensúlyozzák az ellentétesen ható mechanizmusokat, így a máj homeosztázisának és az immuntoleranciának a fenntartását támogatják.

Ismétlődő stimuláció alacsony dóziszú LPS-sel ún. csökkent LPS-re adott válaszkészséget, másnéven **LPS toleranciát** eredményez monocytákon, Kuppfer sejteken (KC) és a máj szinuszoidális endotél sejtjein (LSEC) *in vitro* körülmények között. A **monociták** funkcionális deaktivációját, mely hasonlít az *in vitro* LPS toleranciára, leírták Child C stádiumú májzsugorban és ACLF-ben szenvedő betegek esetén. Ezt a jelenséget a

szakirodalom „**immunparalízisnek**” hívja, és a monociták HLA-DR expressziójának down-regulációjaként definiálja. *Lin és mtsai* az „immunparalízis” háttérben a krónikus endotoxémia, mint etiológiai faktor jelentőségét bizonyították. A szérumban LPS szintek HLA-DR expresszióval fordított módon korreláltak, míg pozitív összefüggés volt megfigyelhető az anti-inflammatorikus hatású szérumban IL-10 szinttel. Ezt a megfigyelést támasztja alá, hogy *in vitro* LPS stimuláció képes volt szupprimálni a HLA-DR expressziót egészséges egyénekből származó monocitákon IL-10 függő módon. Májcirrhosisos betegekből származó alacsony HLA-DR expressziót mutató monociták esetén csökkent TNF- α szekréciónak kapacitást figyeltek meg, melyet az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) és egyes kostimulátor molekulák (CD40, CD86) csökkent expressziója kísért. A HLA-DR expresszió csökkenése (<40%) ezeken felül összefüggött ACLF-es betegeknél a negatív végkimenettel, főként azokban az esetekben, ahol a monociták nem mutattak javulást HLA-DR expresszió szempontjából. Az összesített prognosztikai ereje azonban alulmarad a konvencionális markerekkel szemben. A 40% alatti HLA-DR expresszió által meghatározott 90 napos mortalitás 80%-os specificitással és 59%-os szenzitivitással jellemezhető májsugoros betegeknél. Összefoglalva az „immunparalízis” anti-inflammatorikus folyamatok dominanciájával (emelkedett szérumban IL-6 és IL-10 szintekkel) és a pro-inflammatorikus folyamatok gátlásával (csökkent TNF- α szintekkel) jár. Nagyon hasonló jelenséget figyelhetünk meg neutrofil granulociták esetében, mely szintén a fokozott BT etiológiai szerepére utal a „**májcirrhosishoz társuló immunológiai disszonanciában**”.

Májcirrhosisban a **neutrofil granulociták** (PMN: polimorfonukleáris leukociták) aktivált állapotban vannak jelen a keringésben, melynek háttérben a fokozott endotoxin expozíció áll. A neutrofilek folyamatos aktiváltsága ugyanakkor a sejtek kimerülését is eredményezi, egyfajta „energiaszegény” állapotát jön létre és károsodnak a különféle sejtfunkciók (csökkent kemotaxis, fagocitózis és baktericid kapacitás). Májcirrhosisban az endotoxin eltávolítása mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* körülmények között képes volt helyreállítani a neutrofil granulociták működését. Fokozott primingot és a PMN-eknek ennek következtében létrejövő „készenléti” állapotát jelzik a csökkent L-szelektin szintek, a hidrogén peroxid overexpressziója és a neutrofil elasztáz emelkedett szintje. Ez a baktériumok legyőzésére irányuló „készenléti” állapot és a magas „respirációs burst”-tel járó PMN aktiváció a károsító reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyiségének megemelkedését eredményezi a szisztémás keringésben és a PMN-ek mikro környezetében, mely további sejt- és szövetkárosodás alapjául szolgálhat. Szükségszerűen egy idő után a PMN-ek kimerülnek, „energiaszegény” állapotba kerülnek és képtelenek lesznek megfelelő módon reagálni további bakteriális stimulusokra fagocitózissal. A zavart tuftsin aktivitás, alacsony nátrium- és emelkedett ammóniaszintek együtt a nem megfelelő szuperoxid anion képzést eredményező elégtelen foszfolipáz C (PLC) működéssel mind hozzájárulnak a csökkent PMN fagocita kapacitáshoz. A megnövekedett nyugalmi oxidatív burst és a csökkent fagocita kapacitás összefüggést mutat a fertőzések gyakoriságával és a halálozással. Ezek a változások helyreállíthatónak bizonyultak *in vitro* körülmények között az endotoxin eltávolításával, illetve granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor GM-CSF inkubációval. A természetes immunrendszer más sejtjeihez hasonlóan a neutrofilek működészavarát is az a kettőség jellemzi, hogy egyszerre van jelen egyfajta túlműködés és elégtelenműködés is, mely együttesen járul hozzá a májcirrhosis patogeneziséhez. A májat infiltráló aktivált állapotban lévő neutrofil granulociták a fokozott szabadgyökképződés révén elősegítik a fibrogenézist. A májcirrhosis késői stádiumában azonban a kimerült neutrofilek a kemoattrakciós és migrációs zavar miatt kevésbé tudnak jelen lenni a zajló infekciók helyszínén.

Alkoholos májbetegségben (ALD) már régóta ismert a **B-sejtek** széles körű zavara, mely összefüggést mutat a shunt képződés és a Kuppfer sejtek működészavara következtében kialakuló fokozott antigén expozícióval. Számos kutatási eredmény támasztja alá, hogy a

szisztémás keringésben jelen lévő bakteriális termékek alapvető szerepet játszhatnak a B-sejtek által közvetített változások kialakulásában májzsugorban. Bakteriális transzlokációval összefüggést mutató szolubilis elemek, mint például az LPS és bakteriális DNS gyakran kimutathatók cirrhotikus betegek plazmájából és képesek *in vitro* körülmények között aktiválni a B-sejteket. A B-sejtek stimulációja különböző TLR ligandok által azok poliklonális aktivációjához és különféle immunoglobulinok (Ig) képződéshez vezet. Emberekben a TLR-2, TLR-4 és TLR-8 receptorok elsősorban monocitákban/makrofágokban expresszálódnak fokozottan, míg B-sejtekben csak gyengén fejeződnek ki. Ezzel szemben a TLR-7 és TLR-9 pedig főként B limfocitákban és plazmocitoid dendritikus sejtekben expresszálódik. Cirrhotisban, főleg ALD talaján kialakult májzsugorban, fokozott szérums IgA képződést figyeltek meg. Azonban az emelkedett IgA szinthez vezető folyamatok egyelőre nem teljesen tisztázottak. Korábban ezt a jelenséget legalábbis részben az IgA és az IgA-immunkomplexek csökkent eliminációjával hozták összefüggésbe, melyet a monociták megváltozott Fc receptor expressziójával és a következményesen károsodott Fc α receptor által közvetített endocitózis zavarával magyaráztak. Hosszú ideig csak feltételezés volt, de az utóbbi időben számos tanulmány alátámasztotta azt a feltételezést, hogy a fokozott Ig szintézis alkoholos cirrhotisban összefügg a bakteriális stimulussal. *Massonett és mtsai* által közölt tanulmányban egészséges kontrollhoz viszonyítva a TLR-9 ligand CpG által aktivált B-sejtek szignifikánsan emelkedett abszolút IgA produkcióját figyelték meg alkoholos cirrhotisban, mely összecseng ezen sejtek intrinsic képességével, hogy spontán több IgA-t termeljenek, mint az egészséges egyénekből szeparált B-sejtek. Ezzel szemben az alkoholos cirrhotisban szenvedő betegekből szeparált B-sejtek relatív TLR9 ligand CpG által indukált IgA termelése kevésbé volt kifejezett, mely összefüggést mutat ezen sejteknek az egészséges egyének B-sejtjeihez viszonyított csökkent TLR-9 expressziójával. *In vitro* körülmények között CpG kezelés hatására a B-sejtek TLR-9 expressziójának csökkenését („down” regulációját) figyelték meg. Ez pedig felveti a lehetőségét annak, hogy az alkoholos cirrhotisban szenvedő betegekből szeparált B-sejtek csökkent TLR-9 expressziója a fokozott BT következtében fellépő, a bakteriális DNS által közvetített *in vivo* priming következménye. Az IgA képződés tekintetében a májcirrhotisnak van még egy jellegzetessége, mégpedig a különféle, IgA típusú antimikrobiális- és auto-antitestek fokozott képződése, mely egyrészt a bélnyálkahártya megnövekedett mikrobiális terheltségét tükrözhetik, másrészt egyes patogenetikai folyamatok aktív résztvevői lehetnek. Míg ezen antimikrobiális antitestek a bélben található baktériumok egyes fehérjéi ellen képződnek, addig az autoantitestek esetében ismertek olyan keresztreakáló epitópok, melyek a szervezet egyes fehérjéi és bakteriális alkotórészek között alakulnak ki. Ezek a specifikus antitestek elsősorban előrehaladott betegség és portális hipertenzió esetén vannak jelen.

Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA)

Az anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek különböző antitestek által létrehozott heterogén csoport. Indirekt immunfluoreszcens módszerrel két klasszikus ANCA mintázat különíthető el normál perifériás vérből szeparált neutrofil granulocitákat használva szubsztrátként: a citoplazmatikus (c-ANCA) és perinukleáris mintázat (p-ANCA). A c-ANCA esetében az etanollal fixált granulocitákon diffúz, granulált citoplazmatikus jelölődést látunk, a sejtmag lebenyei között fokozott pozitivitással, míg a p-ANCA-k a sejtmag körül mutatnak intenzív pozitivitást, az esetek egy részében enyhe nukleáris festődéssel kombinálva. Ez utóbbi mintázat - érdekes módon - technikai artefactum, mert az alkoholos permeabilizálás során mobilissá váló erősen pozitív töltésű citoplazmatikus lokalizációjú molekulák a negatív töltésű sejtmagmembrán közelébe diffundálnak és ahhoz kötődnek. Formalin+acetonsos fixálást/permeabilizálást alkalmazva a keresztkötött fehérjék a helyükön maradnak és ilyenkor

a citoplazmatikus lokalizációjú pozitívítást látunk a p-ANCA esetében is, a c-ANCA-hoz hasonlóan.

Ezeket az antitesteket korábban elsősorban a primer kísér vasculitisek diagnosztikájában, illetve a gyulladásos aktivitás monitorozásában alkalmazták, illetve alkalmazzák napjainkban is. Ezekben a betegségekben jól ismert ezen antitestek antigénspecifitása is; a leggyakrabban felismert cél antigének a c-ANCA esetében a proteináz-3 (PR-3), illetve a p-ANCA esetén pedig a mieloperoxidáz (MPO). Vasculitisekben felvetődött, hogy az ANCA-nak patogenetikai szerepe lehet az autoimmun folyamatokban. Ebbe a csoportba a granulomatosis polyangiitis-szel (GPA; Wegener-granulomatosis), mikroszkópikus polyangiitis (MP) és az eosinophilias granulomatosis polyangiitis-szel (EGPA; Churg-Strauss szindróma) tartozik, illetve ezek egy-egy szervre (vese, tüdő) lokalizálódó limitált variánsai. Bár a c-ANCA elsősorban GPA-ban fordul elő, míg a p-ANCA inkább az MPA-t és EGPA-t jellemzi, de alapvetően az ANCA mintázatok és antigénspecifitás nem segíti a felsorolt 3 forma közötti differenciálást, ugyanakkor az indirekt immunfluoreszcens detektálás és az MPO+PR3 ELISA-k kombinált alkalmazása közel 99% specifitással mellett kb. 85%-os szenzitivitással képes ezeknek a kórképeknek az azonosítására a hasonló klinikai tünetekkel járó, de nem vasculitis alapú betegségekkel összevetve.

Az ANCA jelenlétét számos más, a vasculitisek közé nem sorolható betegségben kimutatták, többek között IBD-ben, reumatoid arthritisben, krónikus autoimmun májbetegségekben és különböző infekciók esetén. Az ANCA-pozitivitás gyakorisága 50-90% UC-ben, 10-30% CD-ben, 40-95% I-es típusú autoimmun hepatitisben, 25-90% primer szklerotizáló cholangitisben, 0-25% primer biliáris cirrhosisban, kb. 30% reumatoid arthritisben és 10-20% szisztémás lupus erythematosusban (SLE). Ezekben a betegségekben megfigyelt p-ANCA mind antigén specifitásában, mind festődési mintázatában eltér a klasszikus p-ANCA-tól. Elkülönítésképpen atípusos p-ANCA-nak nevezték el, bár számos más néven is szerepel a szakirodalomban, mint például x-ANCA, pANNA vagy DNA-ANCA. Az atípusos p-ANCA számos különböző még egyelőre kevésbé jól definiált neutrofil antigén (nukleáris vagy sejtmaghoz asszociált citoplazmatikus) ellen képződik. Az esetek egy részében az etanol fixált granulocytákon perinucleáris mintázat látható, elvélve erősebb nukleáris foltokkal is, ami formalin fixált sejteken is változatlan marad jelezve az autoantigén valós nukleáris/perinukleáris lokalizációját. Más betegeknél kombinált citoplazmatikus/perinukleáris mintázat látható, ami többféle autoantigént felismerő ANCA-k egyidejű jelenlétére utal. A jellemző autoantigének közé a katepszin G, elasztáz, BPI (baktericid permeabilitást fokozó fehérje), laktoferrin, α -enoláz, kataláz tartozik. Az atípusos p-ANCA-k esetében különösen jelentős az anti-nukleáris antitestek (ANA) jelenlétének egyidejű vizsgálata (pl. Hep2 sejteken), ami álpozitív ANCA reakciót adhat IIF technika alkalmazása mellett. Az atípusos ANCA-k klinikai, illetve patofiziológiai jelentősége még egyelőre nem tisztázott, de hasonlóan a vasculitises esetekhez az antitest jelenléte súlyosabb betegség lefolyással társulhat.

Számos teória létezik ezeknek az antitesteknek a keletkezését illetően. Az ANCA képződés összefügghet a gyulladásos folyamatokkal. A gyulladásos válaszreakcióban résztvevő neutrofilek degradációja olyan mértékű lehet, hogy meghaladja a sejttörmeléket eltávolító kapacitást. Így a gyulladás helyén lokálisan olyan citoplazmatikus fehérjék szabadulhatnak fel a neutrofilekből, melyek egy autoimmun válaszreakciót indít(hat)anak be a szervezetben, ami az egészségesekben is megtalálható természetes ANCA-k mellett nagy koncentrációjú, nagy affinitású, megváltozott epitópspecifitású és funkcionálisan is aktív patológiás ANCA-k megjelenését eredményezi. Ezt a folyamatot segítheti elő a neutrofil extracelluláris "csapdák" (neutrofil extracellular trap, NET) keletkezése is. Az extracelluláris mátrixhoz kötődő hálózatos struktúráról van szó, ami a neutrofilek degradációja során jön létre, nagy mennyiségben tartalmaz kromatin elemeket, hiszton komponenseket és

citoplazmatikus fehérjéket, így PR3-at és MPO-t is. Ezek a struktúrák elősegítik a neutrofil eredetű autoantigének bemutatását az immunrendszernek. Az ANCA képződés mechanizmusára egy másik lehetséges magyarázat egyes bakteriális fehérjék és a szervezet saját antigénjei közötti keresztreakció. Lehetséges, hogy elhúzódó fertőzések a molekuláris mimikri jelensége révén képesek triggerelni az ANCA képződést. Érdekes módon az atípusos p-ANCA jelenléte jelezhet a bélben található mikroorganizmusokra adott egyfajta rendellenes immunválaszt. Autoimmun májbetegségekben az atípusos p-ANCA az 5-ös izotípusú humán β -tubulin (TBB-5) ellen alakul ki és keresztreakciót ad a bakteriális FtsZ fehérjével. Ez annak lehet a következménye, hogy a TBB-5 kifejezetten nagy strukturális homológiát mutat ezzel a mikrobiális sejtszótódásban szerepet játszó fehérjével, mely szinte minden intesztinális flórában előforduló baktériumban megtalálható. Más betegségekben az ANCA jelenlétét az enterális bakteriális antigénekre adott immunválasz jelének tekintik. Ezt az összefüggést támasztja alá az is, hogy állakísérletes modellekben csíramentes környezetben nem mutatható ki p-ANCA.

Az anti-mikrobiális antitestek jelenléte főként előrehaladott májbetegség és portális hipertenzió esetében gyakoribbnak bizonyult májcirrhotikus betegekben munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya szerint. Mindez arra utalhat, hogy a különféle mikrobiális alkotórészekre adott szerológiai válasz tükrözheti a mikrobiális antigének fokozott expozícióját. A cirrhotikus betegekben jelen lévő, a fentiekben viszonylag részletesebben is ismertetett komplex immunzavar fogékonyra teszi őket a bakteriális fertőzésekre, mely súlyosbítja a betegség lefolyását és szignifikáns morbiditással és mortalitással is jár. Fontos jellemzője a cirrhotikus betegekben előforduló infekcióknak az enterális organizmusok által okozott fertőzéses epizódok magas incidenciája. A BT a baktériumoknak, illetve bakteriális termékeknek a bél lumenből a szisztémás keringésbe való fokozott felvételét jelenti. A BT alapvető mechanizmus a fertőzések kialakulásában és jelentősen befolyásolhatja a betegség klinikai lefolyását is. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az ANCA előfordulása gyakoribb cirrhotisban és jelenlétük összefüggést mutathat a betegség klinikai lefolyásával és a bakteriális fertőzéssel járó szövődmények kialakulásával. Jelen tanulmány elkészültekor ezzel kapcsolatosan a szakirodalomban nem álltak rendelkezésre átfogó adatok.

A kutatás jelentősége májcirrhotisban

A BT folyamatának pontosabb megismerése segíthet (1) a májcirrhotis progressziójának és a bakteriális infekciók kialakulásának szempontjából leginkább veszélyeztetett betegcsoport elkülönítésében (2) a folyamatot megbízhatóan azonosító diagnosztikus laboratóriumi módszerek kidolgozásában illetőleg (3) nem antibiotikum alapú, célzott terápiás eljárások kifejlesztésében. Mindezen célok elérésével a klinikusok számára lehetővé válhat a mindennapi klinikai gyakorlatban olyan kezelési és gondozási stratégiák kialakítása májcirrhotisban, melyek alkalmazása elősegíti a szövődmények kialakulásának megelőzését és azok uralását, késlelteti a betegség progresszióját és csökkenti a halálozást.

Májcirrhotisban nemcsak a betegség klinikai megjelenése és lefolyása, hanem a háttérben meghúzódó patogenetikai folyamatok is összetettek, azonban még számos vonatkozásban nem tisztáztak. Részletes vizsgálatuk azonban jelentőséggel bír.

3. Célkitűzések

I. Célul tűztük ki, hogy nagyszámú IBD-ben szenvedő beteget vizsgálva a klinikai gyakorlat számára olyan szerológiai markereket azonosítunk, amelyek (1) egyrészt segítenek a konvencionális kritériumok alapján bizonytalan esetekben a diagnózis pontosabb meghatározásában, másrészt alkalmazásukkal pontosabban valószínűsíthető a betegség lefolyása, a különféle szövődmények megjelenésének kockázata, a kezelésre adott válasz, valamint a várható sebészeti igény előrejelzése. Továbbá szerológiai módszerek alkalmazásával (2) optimalizáljuk az aktív betegségállapot kimutatását és a várható klinikai fellángolás előrejelzését.

Ezek alapján tehát célul tűztük ki, hogy **prospektíven követett nagy esetszámú gyulladós bélbeteg kohorszban (n=458)** vizsgáljuk a különféle target specifikus **pankreasz 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 klinikai, szerológiai és genetikai jellegzetességeivel
5. prognosztikai értékét a betegség lefolyás előrejelzésében CD-ben (betegség specifikus szövődmények, rezekciós műtétek).

II. Célul tűztük ki, hogy egy nagyszámú, különböző etiológiájú, prospektíven követett májcirrhosisos beteganyagot vizsgálva a klinikai gyakorlat számára szerológiai módszerek alkalmazásával (1) optimalizáljuk a bakteriális infekciók jelenlétének kimutatását. (2) Továbbá olyan új markereket azonosítunk, melyek hatékonyan képesek előre jelezni a bakteriális infekciók kialakulását.

Ezek alapján célul tűztük ki, hogy egy **nagyszámú, különböző etiológiájú, prospektíven követett májcirrhosisos beteganyagban (n=385)** vizsgáljuk a szérum IgA és IgG típusú **anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA)**

1. előfordulási gyakoriságát, típusát és mintázatát.
2. megvizsgáljuk, hogy kimutatható-e kapcsolat az ANCA jelenléte és a betegség súlyossága ill. portális hipertenzió jelenléte között májcirrhosisban.
3. ANCA jelenléte – mint bakteriális transzlokációs marker – kockázati tényező-e a májcirrhosisos betegek klinikailag jelentős bakteriális fertőzéseinek kialakulásában.
4. annak megállapítása, hogy mi a cirrhosishoz társuló ANCA eredete.

4. Metodikák

4.1 Betegek

Gyulladásos bélbetegek

2005 januárjában a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Gasztroenterológiai Tanszéke által rendszeresen gondozott IBD betegek (Crohn-betegek [CD] és colitis ulcerosában szenvedők [UC]) részére elindult egy saját prospektív szerológiai mintabank és egy ahhoz tartozó klinikai adatbázis létrehozása, mely lehetővé tette a keresztmetszeti klinikai tanulmányok mellett longitudinális vizsgálatok elvégzését is. Az eddig elkészült prospektív klinikai vizsgálatokból a jelen disszertációban két tanulmány kerül ismertetésre IBD vonatkozásában. 2005. Január 1. és 2010. Június 1. között a járóbetegellátásban megjelenő páciens közül a fent említett két szerológiai vizsgálatba 458 jól karakterizált, egymással rokonsági kapcsolatot nem mutató, teljes klinikai követéssel rendelkező, konsekutív IBD beteg került bevonásra (CD: 271, [férfi/nő: 115/156, medián életkor a diagnózis időpontjában: 25 év (inter quartilis tartomány [IQR], 19-33)]; UC: 187, [férfi/nő: 86/101, medián életkor a diagnózis időpontjában: 33 év (inter quartilis tartomány [IQR], 23-43)]). A betegek jelentős részétől (n=316) a későbbiek során több alkalommal is történt vérvétel, a betegség különböző aktivitású szakaszaiban. A nyilvántartott mintaszám jelenleg 1068.

Az IBD diagnózisának felállítása a Lennard–Jones kritériumrendszer alapján történt (klinikai, endoszkópos, radiológiai és kórszövettani vizsgálat alapján). A klinikai adatbázisba a mintavételkor rögzítettük a betegség klinikai klasszifikációját a montreáli beosztás szerint (életkor a betegség jelentkezésekor, a betegség fennállásának ideje, lokalizáció, viselkedés és perianális érintettség). A bevonás során a mintavétel mellett rögzítésre került a betegség részletes klinikai fenotípusa is. A klinikai adatok gyűjtése egységes formában, a betegek orvosi dokumentációjának alapos tanulmányozása mentén zajlott. A prospektív követési időszakot megelőző időszakra jellemző klinikai adatokat, melyek a klinikai fenotípusra, az extraintesztinális manifesztációk jelenlétére (pl. arthritis: perifériás és axiális típusú; szemtünetek: conjunctivitis, uveitis, iridocyclitis; bőrtünetek: erythema nodosum, pyoderma gangrenosum; máj érintettség: primer szklerotizáló cholangitis [PSC]), a korábbi relapszusok gyakoriságára (gyakori relapszus: > 1 klinikai relapszus/év), gyógyszerigényre (pl. szteroid, immunszuppresszív és/vagy biológiai terápia), a családi IBD előfordulásra, dohányzási szokásokra, a betegség kimenetelére (korábbi sebészeti beavatkozások, tromboembóliás események, szövődményes betegségforma kialakulása, perianális érintettség) vonatkoznak, retrospektív módon elemeztük. A klinikai aktivitást bevonáskor CD esetén a Harvey-Bradshaw Index [HBI] segítségével, UC esetén pedig a parciális Mayo pontrendszer alapján határoztuk meg. Ezen tanulmányokban az Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) irányelveit követtük és klinikai relapszusként értékeltük, ha a HBI 5 pont volt, míg HBI ≤4 pont esetében klinikai remissziót vélelmeztünk. UC esetén ≤ 3 parciális Mayo pont esetében tekintettük a beteget klinikai remisszióban lévőnek, ezzel szemben ≥4 pont jelentett klinikailag aktív betegséget. Az endoszkópos aktivitás meghatározására a Crohn-betegségben használt egyszerűsített endoszkópos pontrendszert (SES-CD) használtuk CD-ben, míg UC esetében Mayo pontrendszer endoszkópos komponensét. A SES-CD endoszkópos aktivitást vélelmeztünk ≥3 pont esetén és inaktívnak tekintettük ≤2 pontnál CD-ben, míg az UC-ben alkalmazott Mayo pontrendszer aktivitást vélelmeztünk ≥ 1 pont esetén. Az adatbázisból a betegség aktivitására és kimenetelére vonatkozó adatok mind folyamatában, mind pedig időszakokra lebontva elérhetőek (3 hónap, 6 hónap, 1 év, 2 év, teljes követési idő).

Prospektív követés során a Crohn-betegek esetén a betegség klinikai fenotípusának jellemzése

A CD betegeket bevontuk egy prospektív követéses vizsgálatba, mely folyamán a tervezett (3-6 havonta) és soron kívüli ambuláns betegvizitek, valamint a kórházi bennfekvések alkalmával folyamatosan rögzítettük a betegség klinikai, radiológiai, endoszkópos és laboratóriumi aktivitására, a gyógyszeres kezelés hatékonyságára és a betegség kimenetelére vonatkozó adatokat (szövődmény kialakulása, tromboembóliás esemény bekövetkezése, sebészeti beavatkozás szükségessége). A kezelési sémák, mind gyógyszeres, mind műtéti terápiai szempontból egységesítettek és a jelenlegi ECCO irányelveket követik. A műtéti igény és a rezekció időzítésének elbírálása multidiszciplináris feladat, mely a gasztroenterológus, radiológus és sebész szakmai együttműködése révén valósul meg. Az összegyűjtött adatokat további értékelés céljából egy egységes adatbázisba importáltuk és abban tároljuk betegcsoportonként. 2013. Október 1-ig minden beteg dokumentációja ismételt átnézésre került, az adatbázis adatainak átnézése és felfrissítése megtörtént a fent említett szempontok (klinikai végpontok) szerint. Adott beteg követését termináltuk azokban az esetekben, melyekben nem volt elegendő elérhető adat. A diagnózistól eltelt medián követési idő 108 hónap volt (IQR, 65-178). CD-ben szövődményes betegségformaként definiáltuk szűkülettel (sztenózis, strikturizáló forma) járó, illetve belső penetráló betegség kialakulását. A perianális fisztulizáló betegséget fontos megkülönböztetni a belső penetráló formától, melyet minden értékelésünkben külön entitásként elemeztünk. Műtéti igénynek kizárólag a CD-asszociált hasi műtéteket (rezekciókat) tekintettük.

Kontroll csoport: A különböző betegcsoportok mintáinak összegyűjtésével párhuzamosan, 100 egészséges egyén (HC) (férfi/nő: 46/54) szérummintáit is összegyűjtöttük Debrecenben. A kontroll csoportok összeállítása az egyes tanulmányok esetén úgy történt, hogy az életkorban és nemben illesztett legyen a vizsgált betegcsoportéhoz. A kontroll csoport tagjainak nem volt ismert gasztrointesztinális és/vagy májbetegsége.

Májcirrhosisos betegek

2006 májusa és 2009 áprilisa között 385 különböző etiológiájú májcirrhosisban szenvedő betegtől (férfi/nő: 206/179, átlagéletkor: $56,6 \pm 11,0$ év) történt mintavétel a Debreceni Egyetem, Belgyógyászati Intézetének Gasztroenterológiai Tanszékén a 2006 májusában témavezetőm, Dr. Papp Mária által elindított és koordinált szerológiai mintabank számára. Bevonáskor ezen májcirrhosisos betegeknek a májzsugor diagnózistól számított átlagos betegségstartama $3,9 \pm 4,2$ év volt. A májcirrhosis diagnózisának felállítása a klinikai, biokémiai, képalkotó vizsgálatok és amennyiben elérhető volt, szövettani lelet alapján történt. A szerológiai mintabank mellett egy klinikai adatbázist is létrehoztunk, melyben a mintavételkor rögzítettük a betegség súlyosságát (Child-Pugh stádium, MELD score), valamint az ascites jelenlétére és súlyossági fokára, illetve az encephalopathiára vonatkozó adatokat.

A betegek orvosi dokumentációjának részletes tanulmányozásakor rögzítésre került számos klinikai adat, úgy mint a diagnóziskori életkor, nyelőcsővarixok jelenléte, korábbi varixvérzéses, illetve hepatikus encephalopathiával járó epizódok, megelőző időszakban lezajlott spontán bakteriális peritonitis (SBP), extrahepatikus társbetegségek (myocardialis infarktus, pangásos szívelégtelenség, perifériás artériás betegség, cerebrovaszkuláris-, valamint krónikus tüdőbetegség, krónikus veseelégtelenség, gasztrointesztinális fekély,

diabetes mellitus, nem metasztatizáló, illetve metasztatizáló daganatos betegségek, beleértve a hepatocelluláris carcinomát is, vasculitis), és az aktuális gyógyszeres terápia. A vizsgálati idő alatt az aktuális irányelveket vettük figyelembe a varixvérzés és SBP elsődleges és másodlagos megelőzésében alkalmazott nem szelektív béta-blokkolók és fel nem szívódó antibiotikumok indikációjának mérlegelésekor. Protonpumpagátlók alkalmazási köre a gastrooesophagealis reflux betegség, az erozív gastritis, peptikus fekélybetegség, illetve a *Helicobacter pylori* fertőzés kezelése volt. A májcirrhosis 63,0%-ban alkoholos, 29,6%-ban hepatitis C vagy B vírus okozta, 4,7%-ban autoimmun és 2,6%-ban egyéb etiológiájú volt.

Az induló beteg kohorszból 345 beteg volt bevonható egy jelenleg is zajló prospektív követéses vizsgálatba, ahol a követés a követési idő felső határáig (24 hónap), a beteg haláláig, illetve a követésből való kiesésig (medián követési idő: 729 nap [tartomány: 5-730]) tartott. A tervezett (1-3 havonta) és soron kívüli ambuláns betegvizitek, valamint a kórházi bennfekvések alkalmával folyamatosan rögzítettük a betegség kimenetelére vonatkozó adatok (betegség súlyosságának változása, szövődmény megjelenése, mortalitás [22,3%]) és a CSI epizódok (típusa, időpontja) előfordulását. Azon bakteriális fertőzések epizódokat tekintettük klinikailag jelentősnek, amelyek a beteg állapotromlása következtében kórházi felvételt tettek indokolttá, a májfunkció jelentős romlása vagy egyéb súlyos szövődmény (nyelőcső varixvérzés, hepatikus encephalopathia, diuretikum rezisztens ascites vagy veseelégtelenség) jelentkezése miatt. Az infekciós epizódokat az alábbi adatokat figyelembe véve azonosítottuk: klinikai tünetek, láz jelenléte, labor eredmények (fehérvérsejt szám abszolút [$>10,8 \times 10^9/L$] vagy relatív emelkedését balra tolt vérképpel, emelkedett CRP [$>10,0 \text{ mg/L}$] és/vagy PCT szint [$>0,15 \text{ } \mu\text{g/L}$]) beleértve a mikrobiológiai eredményeket is, amennyiben történt tenyésztés, valamint a képalkotó eljárások eredményei és az antibiotikus kezelés hatása. A követési idő alatt elhunyt betegek esetén (n=77) a kórbonctani leletek is kikérésre és átnézésre kerültek. Az alábbi bakteriális fertőzéseket a konvencionális kritériumok alapján diagnosztizáltuk: bőr- és lágyrészes-, szájüregi-, felső- és alsó légúti- (akut bronchitis, pneumonia), epeúti- (cholecystitis, cholangitis, májtályog), gyomor-bélrendszeri (gastroenteritis), húgyúti fertőzések (szövődménymentes cystitist kizártuk), osteomyelitis, és endocarditis. Spontán bakteriális peritonitis diagnózisa intraabdominalis fertőzésforrás hiánya esetén abban az esetben volt felállítható, amennyiben az ascites fehérvérsejtszám nagyobb volt $250/\text{mm}^3$ -nél, függetlenül a tenyésztési lelet eredményétől. Bacteraemia (véráramfertőzés) volt véleményezhető azokban az esetekben, amelyekben a fent említett lokalizált fertőzés jeleinek hiánya mellett infekció klinikai tünetei állnak fenn és mikrobiológiailag kimutatható/igazolható kórokozó hemokultúrából, melynek oki szerepe feltételezhető. Az adatbázisból a betegség kimenetelére és CSI-re vonatkozó adatok mind folyamatában, mind pedig időszakokra lebontva elérhetőek (3 hónap, 6 hónap, 1 év, 2 év, teljes követési idő).

Beteg kontroll: Krónikus hepatitis C-vírus fertőzésben (krónikus HCV, n=119, férfi/nő: 50/69, átlagéletkor: $54,6 \pm 11,7$ év) és primer biliáris cirrhosisban (PBC, n=102, férfi/nő: 4/98, átlagéletkor: $58,8 \pm 11,8$ év) szenvedő egyénből, akikben a májbetegség végstádiumát jelentő cirrhosist még nem érte el a betegségfejlődés, alakítottunk ki egy betegkontroll csoportot. A májfibrózis és a nekroinflammatorikus aktivitás mértékének megítélésére a METAVIR pontrendszert alkalmaztuk. Kizártuk a betegkontroll csoportból azokat a betegeket, akik a fibrózis 4. stádiumába (F4) voltak sorolhatók, őket cirrhosisban szenvedő csoportba soroltuk. PBC diagnózisának az alapját képezik a cholestasisra utaló biokémiai paraméterek, a szérumban kimutatható anti-mitochondriális antitest (AMA) és/vagy PBC-specifikus AMA-M2 pozitivitás, ezekkel egybehangzó szövettani lelet, és extrahepaticus cholestasis kizárása. Krónikus HCV fertőzésre utal, annak diagnózisát erősíti meg a pozitív HCV ribonukleinsav kimutatása mellett emelkedett májfunkciós tesztek és ezzel egybehangzó májbiopsziás eredmény.

Kontroll csoport: Kontrollcsoportként 100 életkorban és nemben illesztett, egészséges egyén (HC) (férfi/nő: 45/55; életkor: 50,5±16,7 év) szérummintáit használtuk fel ehhez a tanulmányhoz, ahol a kontroll csoport tagjainak nem volt ismert gasztrointesztinális és/vagy májbetegsége.

Az adott klinikai tanulmányban a vizsgált betegszám és a követési idő mind a májcirrhosisos, mind pedig az IBD betegcsoportban esetén aszerint változott, hogy a tanulmány idején a beteg kohorszba hány beteg került már beválasztásra, illetőleg azokat milyen hosszan követtük.

4.2 Laboratóriumi módszerek

Szerológiai vizsgálatok: A vérvételt követően a vizsgálatokhoz a szérummintákat az adott laboratóriumi tesztek elvégzéséig -80°C-on tároltuk. A szerológiai vizsgálatok kivitelezése során a kísérletet végző személy nem volt tudatában sem a betegek diagnózisának, sem más klinikai információknak.

4.2.1. Anti-mikrobiális antitestek mérése

Az **anti-mikrobiális antitestek** közül a legismertebb és legtöbbet vizsgált antitest az **anti-Saccharomyces cerevisiae ellenes antitest (ASCA)**, mely az élesztőgomba, más néven sörélesztő 200 kDa molekulatömegű foszfopeptidomannán sejtfa komponense ellen termelődik. Az ASCA-hoz képest az egyéb sejtfelszíni 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, melyek közül az általunk vizsgált **anti-OMP PlusTM antitestek** két bélbaktérium speciesből (egy Gram-pozitív és egy Gram-negatív) származó bakteriális fehérjék ellen képződnek. Ezen baktériumok egyike sem tagja annak a Proteobacteria törzsnek, ahová az *Escherichia coli* is tartozik.

Az ASCA IgG, IgA és az anti-OMP Plus IgA antitestek meghatározása a betegek szérumából gyári enzimhez kapcsolt immunszorbens assay (ELISA) kettek segítségével történt (QUANTATM Lite; INOVA Diagnostics, San Diego, CA) a gyártó útmutatásainak megfelelően. Az eredményt mesterséges egység (unit) formájában adtuk meg és a pozitivitási küszöb 25 U volt. Az eredmények értékelésekor az abszolútértékek mellett a pozitívitas gyakoriságát is felhasználtuk.

4.2.2. Autoantitestek mérése

Az Anti-foszfolid antitestek (APLA) vizsgálata

Az anti-foszfolid antitestek közül az anti-β₂-glikoprotein I (aβ₂-GPI), anti-kardioplin (ACA) és anti-foszfadilszerin/protrombin komplex (aPS/PT) szintek meghatározása szérummintákból ELISA módszerrel történt szemikvantitatív QUANTA LiteTM aβ₂-GPI, ACAIII és aPS/PT IgA, IgG and IgM kettek (INOVA Diagnostics, San Diego, California) segítségével. Ezen antifoszfolid antitestek különböző izotípusai (IgG/A/M), melyek kimutatására a human szérumból ezek az ELISA kettek alkalmasak, a β₂-GPI, a kardioplin és a PS/PT komplex ellen képződnek. Az APLA meghatározás során használt ELISA lemezek

tisztított β 2-GPI-vel, kardiolipinnel és PS/PT komplexszel voltak fedve, melyhez az inkubáció során a szérumban lévő α β 2-GPI, ACA és aPS/PT antitestek (IgA, IgG és IgM izotípusok) képesek kikötődni, amennyiben jelen vannak a vizsgált szérummintákban. A be nem kötődött fehérjék eltávolításra kerültek a mosási lépések során, míg a bekötődött antitestek detektálását tormaperoxidázzal (HRP) jelölt anti-humán IgA, IgG és IgM antitestekkel végeztük. Majd ezt követően a reakció láthatóvá tételéhez kromogén reakciót adó peroxidáz szubsztrátot adtunk a rendszerhez. Az α β 2-GPI, ACA és aPS/PT antitestek szérumszintjének meghatározása során a spektrofotometriás módszerrel mért optikai denzitásokat (OD) az egyedi beteg, illetve kontroll minták esetében 5 pontos kalibrációs görbe segítségével az adott antitestek szérumkoncentrációját reprezentáló titer értékeknek (mesterséges egység, unit) feleltettük meg. Minden ELISA-t a gyártó utasításai szerint hajtottunk végre és az általuk megadott titer küszöbértékek (anti- β 2-GPI és ACA IgA, IgG és IgM esszék esetén ≥ 20 unit; anti-PS/PT IgG és IgM esszék ≥ 30 unit) alapján állapítottuk meg az adott minták pozitivitását. Az anti-PS/PT IgA esetén nem állt rendelkezésre kalibrátor, így az eredmények értékelésekor az OD-k nyers adatait használtuk, illetve az egészséges kontrollcsoport segítségével meghatároztunk egy pozitivitási küszöbértéket is. A 0,795 feletti OD-vel (átlag+2SD) rendelkező mintákat tekintettük ez alapján anti-PS/PT IgA pozitívnak. Az eredmények értékelésekor az abszolút OD értékek mellett a pozitivitas gyakoriságát is felhasználtuk. A 458 vizsgálatba bevont IBD-s betegből 451 esetben volt technikailag sikeres a szerológiai analízis.

Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata

Glycoprotein 2 (GP2) ellenes antitestek kimutatása enzimkapcsolt immunoszorbens módszerrel (ELISA)

A PAb meghatározásokat a betegek és kontroll egyének szérumból két különböző cég által gyártott rekombináns 4-es isoformájú GP2-t tartalmazó (anti-MZGP2 IgA és IgG QUANTA Lite® ELISA [Inova Diagnostics, San Diego, CA, Research Use Only] illetve anti-GP2 IgA és IgG ELISA [GA Generic Assays, Dahlewitz/Berlin, Németország]) enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálattal végeztük a gyártó utasításai szerint. Az alábbiakban röviden ismertetjük az eljárást. A polisztirén mikrotiter lemezek felülete gyárilag fedve van MZGP2, illetve GP2 antigénekkkel, melyeket szobahőmérsékleten 30, illetve 60 percig inkubáltunk 100 μ l előhígított szérummal (1:100). A felesleges, be nem kötődött szérumot mosási lépések során eltávolítottuk, majd hozzáadtuk az egyes ELISA lemezek lyukaihoz a peroxidázzal konjugált kecske anti-humán IgA vagy IgG típusú antitesteket. A bekötődött specifikus antitestek kimutatásához használatra kész hidrogén-peroxid/tetrametilbenzidin (TMB) kromogén szubsztrátot adtunk a rendszerhez, majd az inkubációs idő leteltét követően a reakciót kénsavval leállítottuk és a minták optikai denzitását spektrofotometriás módszerrel 450/620 nm-es hullámhosszon olvastuk le Labsystem Multiscan MS készülékkel (Thermo Scientific, Budapest, Magyarország). A kitben található kalibrátorok segítségével illesztett standard görbe segítségével az egyes minták optikai denzitását (OD) mesterséges egységeknek (arbitrary units, AU/ml) feleltettük meg, melyek az adott mintákból kimutatható szérum antitest koncentrációt hivatottak reprezentálni. A szérumminták antitest pozitivitását az anti-MZGP2 esetében ≥ 25 AU/ml, míg az anti-GP2 esetén ≥ 20 AU/ml kapott értékeknél állapítottuk meg.

CUZD1 és GP2 ellenes antitestek kimutatása indirekt immunfluoreszcens módszerrel (IIF)

A PAb meghatározásokat (anti-GP2 illetve anti-CUZD1 IgA és IgG) a betegek és egészséges kontroll egyének szérumból GP2-t ill. CUZD1-t expresszáló transzfektált HEK 293 sejteket tartalmazó biochippen (Morbus-Crohn Mosaic 1, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Németország) indirekt immunfluoreszcens módszerrel (anti-rPAG2 és rPAG1) is elvégeztük. Ebben a kísérleti rendszerben a GP2-t ill. CUZD1-t expresszáló transzfektált HEK 293 sejtek szolgálnak antigén szubsztrátként, így az ezekkel a sejtekkel fedett biochipeket szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk a kihígított szérumminták hígítási sorával (nevezetesen 1:10, 1:100 és 1:1000 hígításokat alkalmaztunk). A felesleges, be nem kötődött szérumot mosási lépések során eltávolítottuk, majd ezt követően fluoreszcinnel jelölt kecske anti-humán IgA vagy IgG antitestekkel tettük láthatóvá a betegek szérumból kikötődött antitesteket. A lemezek leolvasását egy EUROStar Plus mikroszkóp kékfényű LED-jének segítségével (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG) végeztük. *Komorowski és mtsai.* gyakorlati tapasztalatai szerint a CUZD1-t expresszáló HEK293 sejteken megfigyelhető IIF kép megfeleltethető volt a korábban fagyasztott humán pankreászöveten leírt retikulogranuláris (2-es típusú) PAb mintázattal, míg a GP2-t expresszáló sejteken látható mintázatot a cseppszerű festődéssel (1-es típus) találták identikusnak.

Az Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata

Az ANCA mérése indirekt immunfluoreszcens technikával

Az antitestek meghatározása szemikvantitatív indirekt immunfluoreszcens módszerrel (IIF) az EUROIMMUN cég (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Németország) ethanol illetve formalin fixált humán neutrofil granulocitákat tartalmazó biochipjeinek segítségével történt. A lemezen lévő granulocita preparátumokat a betegek szérumával (1:10 hígítás PBS-sel) inkubáltuk együtt, majd a megkötött ANCA detektálása fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett anti-humán IgG illetve IgA másodlagos antitestek (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG) segítségével történt. A lemezek értékelését egy EUROStar II Plus mikroszkóppal (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG) végeztük 400x-os nagyítást alkalmazva. Az immunfluoreszcens eredmények értékelése az etanol- és formalin-fixált granulocita preparátumokon kapott mintázatok alapján történt: c-ANCA, p-ANCA, atípusos p-ANCA. Az 1:10 vagy annál nagyobb hígítási végpontoknál kapott pozitív szignál esetén tekintettük a mintát pozitívnak. Az ANCA-titer meghatározása ezekben a mintákban sorozat hígítással (hígítási faktor 3,2x) történt, ahol a sorozatkezdő hígítás 1:10 volt.

Az IgA típusú ANCA karakterizálása a cirrhotikus betegekben

A szérumban jelenlévő IgA típusú ANCA antitestek karakterizálását (IgA₁ és IgA₂ alosztályú ANCA arányának, illetve a szekretoros komponenst hordozó IgA ANCA mennyiségét meghatározása) a fentiekhez hasonló rendszerben szemikvantitatív indirekt immunfluoreszcens módszerrel (IIF) végeztük. A vizsgálathoz az EUROIMMUN ethanolal fixált neutrofil granulocitákat tartalmazó lemezeit használtuk (Granulocyte Mosaic, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG). A sejteket a szérumminták 1:10-es hígításával inkubáltuk, majd az IgA alosztályok illetve szekretoros komponens detektálása 3 specifikus FITC-vel jelölt monoklonális antitest segítségével (egérben termeltetett anti-humán IgA₁ NI69-11; anti-humán IgA₂ NI512 és anti-humán sIgA NI194-4; Acris Antibodies, Herford, Németország), egymástól függetlenül történt. Ezen antitesteket 1:30-as hígításban alkalmaztuk. A fluoreszcens szignál erősítéséhez FITC-cel jelölt, poliklonális F(ab')₂ IgG típusú anti-egér antitestet használtunk 1:10 hígításban (DAKO, Glostrup, Dánia). Az IgA₁ és

IgA₂ ANCA antitestek mennyiségének meghatározása egy image analízis alapú kvantitálási technika segítségével történt, egyetlen mintahígítást (1:10) tesztelve.

A lemezeket egy MicroOptix MX 300 TF (West Medica, Perchtoldsdorf, Ausztria) mikroszkóp segítségével 400x-os nagyítást használva értékeltük ki. A fluoreszcens képeket 32-bites ".bmp" formátumban egy MicroOptix/Vision CAM V330 kamera segítségével rögzítettük az SB Video&Audio AV Grabber (West Medica) program segítségével. Egy zöld háttér lemezt is exponáltunk minden mérési napon a megvilágítási erősség és inhomogenitás korrigálására (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA). A képeket az "ImageJ 1.46r" software segítségével értékeltük. A zöld csatornán mért fluoreszcencia intenzitások meghatározása mesterséges egységekben (A.U., arbitrary unit) történik látóterenként 20 db egyedi granulocita értékelésével, majd a kapott értékekből minden minta esetén átlagos fluoreszcencia denzitás (FD)/sejt \pm SD értékeket számoltunk. Minden szérum minta esetén három A.U./sejt értéket adtunk meg a három IgA izotípusnak megfelelően (IgA₁, IgA₂ és sIgA).

Az anti-IgA₁ és anti-IgA₂ antitestekkel kapott FD szignálok mennyiségi összehasonlíthatósága végett és az IgA₁/A₂ arány pontos meghatározásához Quantum™ Simply Cellular® (QSC) mikropartikulumok/beadok (Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA) segítségével standardizáltuk a mikroszkópos kvantitálás technikáját. Ezek a beadok ismert számú kecske anti-egér antitestet tartalmaznak a felszínükön és megfelelő telítő koncentráció esetén ennyi antitest megkötésére képesek. A vizsgálat során az indirekt immunfluoreszcens jelölésnek megfelelő hígításban anti-IgA₁ és IgA₂ antitesteket majd a GaM-FITC konjugátumot adtuk a beadokhoz. Ezután a tárgylemezre cseppentve a fentiekben leírt képanalizáló módszernek megfelelően értékeltük a beadok fluoreszcencia intenzitását. A 172189 antigén-kötőhelyet (ABC) tartalmazó beadok esetében a fluoreszcencia intenzitás $44,6 \pm 8,2$ volt az IgA₁ és $48,4 \pm 10,4$ az IgA₂ antitestek jelenlétében, míg a 490505 kötőhelyet tartalmazó beadok esetén $100,0 \pm 12,2$ (IgA₁) és $103,2 \pm 9,7$ (IgA₂) volt a szignál. Ezek a különbségek az IgA₁ és IgA₂ antitestek között statisztikailag nem voltak szignifikánsak, ez alapján arra következtettünk, hogy az IgA₁ és IgA₂ típusú ANCA egyenlő mennyiségben egyforma fluoreszcens szignált ad rendszerünkben, így a kapott jelintenzitások hányadosa közvetlenül megadja az IgA₁/IgA₂ antitestek arányát a mintáinkban.

A módszer reprodukálhatóságát (intra- és inter-assay variabilitás) 5-5 mérés alapján teszteltük. Az intra-assay variációs együttható (coefficient of variation; CV%) 8,0%, 5,6% és 10,2%, míg az inter-assay CV% 10,4%, 14,9% és 13,2% volt az IgA₁, IgA₂ és a szekretoros komponens esetében.

A módszer egyértelműen képes volt elkülöníteni az ANCA IgA pozitív és negatív mintákat. Ezt bizonyítja, hogy az ANCA IgA₁, IgA₂, illetve sIgA fluoreszcencia intenzitások szignifikánsan magasabbak voltak az ANCA IgA-pozitív cirrhotikus betegekben az egészséges kontrollcsoporthoz viszonyítva (IgA₁: $38,4 \pm 12,4$ vs. $14,4 \pm 4,5$, IgA₂: $31,7 \pm 5,7$ vs. $14,4 \pm 4,0$ és sIgA: $35,1 \pm 9,4$ vs. $14,0 \pm 3,1$; $p < 0,001$ minden csoportban). Mindemellett a kapott fluoreszcencia intenzitások erős korrelációt mutattak a szemikvantitatív módszerrel korábban meghatározott ANCA IgA-titer értékekkel (IgA₁: Spearman korrelációs koefficiens, $R=0,63$ [95%CI: 0,51-0,73], IgA₂: $R=0,37$ [95%CI: 0,21-0,52] és sIgA: $R=0,55$ [95%CI: 0,41-0,66]; $p < 0,001$ minden csoportban). Ezen eredmények alátámasztják, hogy a két IIF technika (képanalízis alapú kvantitatív és a korábban ismertetett szemikvantitatív IIF módszer) egymással erősen egybehangzó eredményeket ad.

142 ANCA IgA-pozitív, 20 ANCA IgA-negatív cirrhotikus beteg és 20 egészséges kontroll egyén esetén végeztük el az ANCA IgA szubtypusok analízisét. Mivel az ANCA IgA₁, IgA₂, illetve sIgA fluoreszcencia intenzitások között nem volt szignifikáns különbség az egészséges és beteg kontrollcsoportokban (egészséges kontroll: IgA₁= $12,8 \pm 3,3$, IgA₂= $14,1 \pm 4,5$, sIgA= $13,0 \pm 2,7$; beteg kontroll: IgA₁= $16,0 \pm 4,9$, $p=0,08$, IgA₂= $14,6 \pm 3,4$,

$p=0,98$, $sIgA=14,9\pm 3,1$, $p=0,06$), ezen csoportokat összevontuk egy egységes kontrollcsoportba ($n=40$). Az IgA_2/IgA_1 arányok meghatározásakor minden egyes minta esetén elosztottuk az ANCA IgA_1 vagy IgA_2 fluoreszcencia intenzitását ezen két érték összegével. A szekretoros komponens pozitívításának megítélésére egy fluoreszcencia küszöbértéket határoztunk meg a 40 kontroll minta mérése alapján: az átlag + 3 SD ebben a csoportban 23.4 AU fluoreszcencia intenzitás volt.

Az IgA-típusú ANCA antigén specificitásának meghatározása ELISA technikával

Az anti-mieloperoxidáz (MPO) IgA és anti-proteináz 3 (PR-3) IgA antitestek mennyiségét az indirekt immunfluoreszcens technikával IgA pozitívnak bizonyult mintákban ($n=162$) határoztuk meg kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-k (QUANTA Lite™ MPO and QUANTA Lite™ PR-3 INOVA Diagnostics, San Diego, CA) segítségével. Az eredményeket OD-ban adtuk meg. Az anti-MPO és anti-PR3 pozitívítás küszöb OD értéke 0,159 és 0,140 volt, amit 92 egészséges kontroll mintáiban mért átlag+3SD kalkulálás alapján határoztunk meg.

4.2.3. Genetikai vizsgáló eljárások

NOD2/CARD15 polimorfizmusok (SNP8, 12, 13 mutációk) kimutatása

NOD2/CARD15 polimorfizmusok (SNP8, 12, 13 genotípusok) kimutatását egy korábbi tanulmány (172) során Crohn-betegekben már elvégeztük ($n=235$). A NOD2/CARD15 variánsokat denaturáló nagy teljesítőképességű folyadékkromatográfiával (dHPLC, Wave DNA Fragment Analysis System, Transgenomic Limited, UK) vizsgálták. A dHPLC profilban megfigyelt szekvencia variánsokat mindkét szálon direkt szekvenálással bizonyították. A szekvenálást ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) és ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével kivitelezték. A PRR funkcionális polimorfizmus vizsgálatoknál a genotípus megoszlásokat Hardy-Weinberg equilibrium teszt segítségével vizsgáltuk. Minden vizsgált polimorfizmus megoszlása megfelelt a Hardy-Weinberg equilibriumnak/eloszlásnak.

Genetikai vizsgálatok: A genetikai vizsgálatokat korábban már más intézményben végezték (Dr. Tordai Attila Országos Vérellátó Szolgálat Molekuláris Diagnosztikai Labor). Teljes vérből történő DNS szeparálást követően polimeráz láncreakció/ restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) segítségével határozták meg a különféle PRR polimorfizmusokat, melyek a következők voltak: NOD2/CARD15 (egy pontos nukleotid polimorfizmus [SNP] 8: rs2066844, p.Arg702Trp, g.19877C>T, SNP12: rs2066845, p.Gly908Arg, g.30491C>T, és SNP13: rs5743293, g.37732_37733insC) polimorfizmusok.

4.3 Statisztikai analízis

A statisztikai módszerek részletes ismertetése az egyes közleményekben érhető el. A statisztikai elemzéseket Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) és SPSS 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) programokkal statisztikus ellenőrzése mellett (Dr. Dinya Elek) magunk végeztük. A normalitást Shapiro-Wilk's W teszt segítségével vizsgáltuk. A folytonos (valószínűségi) változók leírásakor az adatok eloszlásának megfelelően azok átlagértékét [standard deviációval (SD)] vagy mediánját [interkvartilis tartománnyal (IQR)] adtuk meg. A különböző betegcsoportok (CD, UC, LC) egymáshoz, alcsoportokhoz, illetve az egészséges kontrollhoz viszonyított különbségeit az alábbi statisztikai módszerekkel elemeztük. A kategorikus változók összehasonlítását Fisher-exact teszttel, illetve χ^2 -próbával helyenként Yates korrekcióval végeztük. A folytonos változókat az összehasonlított csoportok számának, az adott adatok eloszlásának függvényében parametrikus és nonparametrikus eljárásokkal, többek között Student-féle t-teszttel, egyszempontos egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA), Mann-Whitney U-teszttel illetve post hoc analízissel (Dunn-féle többszörös összehasonlítás) kiegészített Kruskal-Wallis H-teszttel hasonlítottuk össze. A NOD2/CARD15 funkcionális genetikai polimorfizmus vizsgálatoknál a genotípus megoszlásokat Hardy-Weinberg equilibrium teszt segítségével vizsgáltuk. Az autoantitestek esetén a folyamatos tényezők alcsoport analízise során Pearson vagy Spearman korrelációt számoltunk. A különféle tesztek egyezését súlyozott Kappa teszt segítségével határoztuk meg. Időfüggő modellekben az egyes faktorok (kategorikus klinikai változók vagy szerológiai antitestek) összefüggését a betegség időbeni lefolyásával, szövődményes betegségforma kialakulásával Kaplan-Meier analízisben, a különböző alcsoportok szignifikanciáját LogRank illetve Breslow tesztek segítségével vizsgáltuk. A multivariancia analízishez Cox regresszió analízist használtunk. Az univariációs analízisben $p < 0,1$ tényezők illetve egyes a priori kiválasztott tényezők kerültek bevonásra a multivariancia analízisbe. Amennyiben nincs külön más kritérium jelezve a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A nyers adatokat „átlag \pm szórás”, „medián (kvartilis)” illetve „esetszám (%)” formában adtuk meg. Az összefüggések jellemzésére Spearman-féle korrelációs koefficiens, esélyhányadost (OR, odds ratio), illetve kockázati arány/hányadost (HR) és ezek 95%-os megbízhatósági intervallumát (95%CI) számoltunk.

4.4 Etikai engedélyek

A tanulmányok protokolljait a Debreceni Egyetem OEC Etikai és Tudományos Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is elfogadta. Etikai engedélyszámok: DEOEC RKEB/IKEB 2006-2007, 2595-2007, 2735-2008, 2860-2008, 3515-2011, 3514-2011; ETT-TUKEB 321-81/2005-1018-EKU, 80/2007-EKU, 25403/2011-EKU, 26186/2011-EKU, 3880/2012/EKU (59/PI/2012). A betegek megfelelő tájékoztatást kaptak az adott tanulmányról és aláírták a betegtájékoztató bejegyzési nyilatkozatot.

4.5 Anyagi források

MSD Pharma Kutatási Pályázat (2012-2013), IOIBD Amerikai Kutatási Ösztöndíj (2012-2015, Debreceni Egyetem Belső Kutatási Pályázata (2013-2016), TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024

5. Eredmények

5.1 Anti-foszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata IBD-ben

Az APLA markerek gyakorisága IBD-ben

Az ACA pozitívitas a Crohn betegség (CD) kialakulásának fokozott rizikójával függött össze a kontroll csoporthoz képest ($OR_{ACA}=10,18$; 95% CI: 3,12-33,24). A különböző izotípusokat vizsgálva a legszorosabb összefüggést az ACA IgA-val ($OR_{ACA\ IgA}=49,70$; 95% CI: 3,04-813,8, χ^2 -teszt Yates korrekcióval) találtuk CD-ben. Szignifikáns különbséget találtunk az ACA pozitívitasban a CD és UC csoport között. Hasonló módon szignifikáns volt a különbség az anti-PS/PT prevalenciájában is a CD és UC csoportok között, ugyanakkor a CD és a kontroll csoport vonatkozásában nem volt szignifikáns eltérés. Nem találtunk viszont különbséget az anti- β 2-GPI előfordulási gyakoriságában a különböző vizsgált csoportok között.

Az APLA pozitívitas összefüggései más szerológiai markerekkel és a NOD2/CARD15 genotípusokkal CD-ben

Nem találtunk összefüggést CD-ben a betegek APLA és ASCA státusza között. Sem az ACA IgA, sem az IgG pozitívitas rátájában sem volt szignifikáns különbség az ASCA IgA és ASCA IgG jelenlététől, illetve hiányától függően. Hasonló módon nem volt összefüggés az ACA előfordulási gyakorisága és a főbb NOD2/CARD15 mutációk között. 235 CD beteg NOD2/CARD15 genotípusa állt rendelkezésre. Nem volt különbség az „ACA egyáltalán” prevalenciái között a NOD2/CARD15 mutációval rendelkező csoportban, illetve annak hiánya esetén (16,1% és 26,1%, $p=NS$, χ^2 -teszt Yates korrekcióval).

Az APLA pozitívitas összefüggései a betegség aktuális klinikai, laboratóriumi, illetve endoszkópos aktivitásával

Bevonáskor a CD betegek 26,6%-ban, illetve az UC-ben szenvedő betegek 27,8%-ban volt aktívnak minősíthető a betegség klinikai aktivitási pontrendszeret alkalmazva. Nem volt szignifikáns különbség az anti- β 2-GPI, ACA és anti-PS/PT előfordulási gyakoriságában CD-ben a klinikailag aktív (2,8%; 29,2% és 18,1%) és inaktív (8,8%; 21,2% és 21,2% a fent említett antitestek esetén) csoportok között. Klinikailag aktívnak tekintettük a betegséget CD-ben, ha a HBI5 volt. Hasonló módon nem találtunk korrelációt UC-ben a partialis Mayo score alapján (>4) meghatározott betegség aktivitás és az APLA státusz között (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

Az ACA „egyáltalán” prevalenciája hasonlóan bizonyult a 10 mg/l feletti C-reaktív proteinnel (CRP), illetve a 10 mg/l vagy ez alatti CRP-vel rendelkező betegcsoportban (29,0% és 21,1%; $p=NS$, χ^2 -teszt Yates korrekcióval).

87 CD betegnek volt a bevonáskor ileokolonoszkópiája. Az ACA „egyáltalán” előfordulási gyakorisága nem különbözött a SES-CD szerint (vágópont/cut off \geq 3) megállapított endoszkópos aktivitás alapján szétbontott csoportok között (inaktív vs. aktív: 25,6% és 29,5%). A fentiekhez hasonlóan nem találtunk szignifikáns összefüggést a Spearman korrelációs analízist elvégezve az ACA IgA, valamint ACA IgG szintek és a CRP szint, az aktuális HBI, illetve a SES-CD pontszám között CD-ben (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

A CD betegek 20,3%-ban észleltünk a követési idő során gyakori relapszusokat. Az ACA prevalencia nem különbözött a relapszusok gyakorisága szerint (gyakori vs. gyakori relapszussal nem rendelkező csoport; ACA IgA 23,5% vs. 16,7%; ACA IgG 3,9% vs. 10,1%

és ACA IgM 2,0% vs. 3,5%; p=NS minden esetben).

Végül elemeztük a mintavételkorai betegség tartam és a szerológiai válasz jelenlétének, illetve mértékének összefüggéseit CD-ben. A betegség tartam quartilis beosztását követően az ACA „egyáltalán” pozitivitási gyakoriság az egyes csoportokban nem különbözött (Q1: 26,9%; Q2: 22,7%; Q3: 22,4% és Q4: 23,0%; p=NS, χ^2 -teszt Yates korrekcióval). Az ACA IgA, illetve IgG szintek és a betegség tartam között sem találtunk összefüggést (Kruskal-Wallis teszt).

APLA markerek és a betegség progressziójának összefüggései CD-ben

Mintavételkor 154 (56,5%) CD betegnek volt a Montreáli Klasszifikáció szerint gyulladásozó (*nem strikturizáló és nem penetráló*=szövődménymentes) viselkedési fenotípusú (B1) betegsége. Közülük 143 beteg volt alkalmas arra, hogy bevonjuk őket egy prospektív követéses vizsgálatba. A medián követési idő 53,4 hónap volt (IQR; 38,0-79,3). Ezen betegség specifikus szövődménytől mentes és műtéti szempontból naiv/korábban műtéten át nem esett beteg közül 20,3%-ukban (29/143) alakult ki valamely szövődmény a követés során (31,03%-ukban alakultak ki striktúrák, 44,83%-ukban belső penetráló betegség és 24,14%-ukban kizárólag perianális perforáció). A komplikációig eltelt medián idő 21,4 hónap volt (IQR; 8,1-43,1). A követési idő folyamán összességében 9,1%-uk (13/143) ment át CD-asszociált hasi műtéten (rezekció). Két beteg, akiknek korábban nem volt szövődményes betegsége, esett át műtéten colorectalis carcinoma miatt. A többi beteg esetén a műtéti indikációt valamely betegség specifikus szövődmény megjelenése jelentette (23,1%-ban stenosis/szűkület; 46,2%-ban belső penetráló betegség; 15,4%-ban mindkettő). A műtétiig eltelt medián idő 50,0 hónap volt (IQR; 30,5-54,5).

A B1 csoportba sorolt betegek esetén nem találtunk összefüggést a betegség első betegség specifikus eseménybe történő progressziója és az APLA pozitív jelenléte, illetve hiánya között. Betegség specifikus eseményként definiáltuk a betegség specifikus szövődmények (stenózis, belső penetráló betegség és/vagy perianális érintettség kialakulása) mellett a CD-asszociált műtétet. Mindemellett időfüggő univariációs modellben (Kaplan-Meier analízis) a korai progresszió valószínűsége APLA pozitív és negatív csoportban azonosnak bizonyult. A klinikai faktorok közül a betegség lokalizációja és a dohányzás függött össze az első belső penetráló betegség és/vagy strikturizáló forma kialakulásáig eltelt idővel, míg a gyakori relapszus pedig a perianális érintettség kialakulásával korrelált időfüggő modellben.

Külön értékeltük az APLA-k jelentőségét azon betegcsoportban, ahol a mintavételt megelőzően már jelen volt valamely betegség specifikus szövődmény és/vagy korábban már műtéten átesett a beteg. Összesen 117 CD betegnek (43,5%) volt a mintavétel időpontjában a Montreáli Klasszifikáció értelmében szövődményes betegség formája (56 beteg tartozott a B2, míg 61 beteg pedig a B3 csoportba). Közülük 109 beteg volt alkalmas rá, hogy bevonjuk őket egy prospektív jellegű követéses vizsgálatba. Ezen betegek 39,4%-ának (43/109) lett újabb betegség specifikus eseménye a követés során. Betegség specifikus eseményként definiáltuk a belső penetráló és/vagy perianális penetráló betegség kialakulását, illetve CD asszociált műtétet. Kizárólag betegség specifikus szövődmény a betegek 11,6%-ban, kizárólag műtét a betegek 58,1%-ban, míg mindkettő a betegek 30,2%-ban következett be. Egy újabb betegség specifikus eseménybe való progresszió nem mutatott összefüggést sem az APLA pozitívással, sem annak hiányával. Kaplan-Meier analízist végezve az új betegség specifikus szövődménybe való korai progresszió valószínűsége az APLA pozitív és negatív betegcsoportban nem különbözött (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

Az UC betegcsoportban az APLA-k alacsony előfordulási gyakorisága miatt eltekintettünk az APLA pozitív és a klinikai fenotípus, illetve a betegség progresszió összefüggéseinek kiértékelésétől.

APLA markerek és tromboembóliás események IBD-ben

Összességében az IBD betegek 5,1%-a (23/452) esett át legalább egy tromboembóliás eseményen (TE) (14 CD és 9 UC beteg). CD-ben 18 vénás tromboembóliás esemény (VT), 1 pulmonális embóliás (PE) esemény és 3 artériás tromboembóliás esemény (AT) került diagnosztizálásra. UC-ben 8 VT és 1 AT eseményt regisztráltunk. 7 beteg (1,6%) esett át az IBD diagnózisát megelőzően TE-n, illetve 4 CD betegnek (1,5%) volt visszatérő/ismételt TE-je. A CD beteg nők 6,4%-ban (10/156) és az UC-s nőbetegek 6,9%-ban (7/101) történt spontán vetélés.

A VT eseményen átesett CD betegek szignifikánsan idősebbek voltak, mint akiknek a követése során nem szenvedtek el VT eseményt (medián életkor: 30,0 vs. 38,5 év; $p=0,003$). A vizsgált klinikai faktorok és laboratóriumi markerek közül a korábbi VT esemény (RR: 23,0; 95%CI: 10,6-50,1), valamint faktor V Leiden mutáció (RR: 8,3; 95%CI: 2,2-31,3) esetében találtunk összefüggést a VT esemény fokozott rizikójával. Ugyanakkor UC betegekben a gyakori relapszusok mutattak összefüggést a VT esemény fokozott kockázatával (RR: 6,4; 95%CI: 1,7-24,1). Egyik APLA marker sem mutatott összefüggést IBD-ben a VT esemény megnövekedett rizikójával.

Az egyes APLA-k összefüggéseit a tromboembóliás esemény bekövetkezésének valószínűségével nem csak külön-külön, hanem az APLA antitest pozitivitások számának függvényében is vizsgáltuk. Sem CD, sem pedig UC esetében sem volt nagyobb a tromboembóliás esemény kialakulásának valószínűsége az APLA-ra többszörösen pozitív betegekben.

Az APLA markerek stabilitása

A CD ($n=198$) és UC-ben szenvedő betegek ($n=103$) egy alcsoportjában betegenként legalább két szérum minta került levételre a követés során, így lehetőségünk nyílt a betegségfolyásának különböző időpontjaiban levett minták analízisét elvégezve az APLA státusz (pozitív vagy negatív az adott antitestekre nézve) időbeli stabilitására vonatkozó vizsgálatokra. A mintavételek között eltelt medián idő CD-ben 13,5 hónap [IQR; 6,8–22,9 hónap], UC-ben 12,1 hónap [IQR; 5,7–20,4 hónap] volt. Az anti- β 2-GPI státusz időben meglehetősen stabilnak bizonyult mindhárom Ig szubtípus esetén. A CD, illetve UC betegeknek mindössze 1,5%-5,8%-a változtatta meg az anti- β 2-GPI antitest státuszát az első mintavételhez viszonyítva. Ugyanakkor jelentős különbségeket találtunk az ACA Ig szubtípusok tekintetében. Az ACA IgM státusz az anti- β 2-GPI-hez hasonlóan stabilnak bizonyult. Ezzel szemben az ACA IgG, illetve ennél még kifejezettebben az ACA IgA státuszban történt idővel szignifikáns változás, elsősorban a negatív antitest státuszról lett pozitív. Az antitest státuszban történt változások sokkal kifejezettebbek voltak CD-ben az UC-hoz képest (ACA IgA: 49,9% vs. 23,3% és ACA IgG: 21,2% vs. 5,8%). Stabilitásra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre az anti-PS/PT antitestek esetén, mivel itt mérés a betegeknek csak az első elérhető szérum mintájából történt.

A tumor nekrozis faktor (TNF) antagonistá terápia 2008-tól vált elérhetővé hazánkban, így ezt követően a kutatásba bevont betegek 43,7%-a (110/252) kapott infliximab vagy adalimumab terápiát a követés során. Megvizsgáltuk a bevonást követően az anti-TNF terápia hatását az új ACA antitestképződésre. Azon betegek körében, akik anti-TNF terápiát kaptak és a bevonás időpontjában ACA IgA-ra negatívak voltak, a későbbiekben ezen betegek 59,1%-a (55/93) vált pozitívvá ACA IgA antitest státusz szempontjából. Ez az arány szignifikánsan magasabb ahhoz a csoporthoz viszonyítva ($p=0,004$), akik egyáltalán nem kaptak anti-TNF terápiát, itt ugyanis a betegek 35,6%-a (36/101) vált idővel antitest pozitívvá. Ezek az arányok ACA IgG esetében 30,1% vs. 12,9% ($p=0,033$).

5.2 Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata IBD-ben

PAb gyakorisága IBD-ben

Szignifikánsan több CD beteg bizonyult pozitívnak az általunk vizsgált IgA/IgG típusú PAb-okra (anti-GP2 IgA/IgG: 10,2%; anti-MZGP2 IgA/IgG: 12,2%; anti-rPAg2 IgA/IgG: 10,2%; anti-CUZD1 (\approx anti-rPAg1): 20,8%) mind az UC szenvedő, mind az egészséges kontrollcsoporthoz képest ($p < 0,01$ mindkettő esetén). Emellett szignifikáns különbségeket találtunk az IgA és IgG szubtypusok esetén is. Ezzel szemben az UC-s és kontroll csoportok között nem volt szignifikáns különbség az antitestek előfordulási gyakoriságában.

Az anti-GP2 és anti-MZGP2 antitest titerok is szignifikánsan magasabbak voltak CD-ben az UC-hez képest. Az anti-MZGP2 IgA kivételével az összes antitest esetében szignifikáns különbség volt kimutatható az antitestek medián titerértékei között (Mann-Whitney, anti-GP2 IgA $p < 0,001$; anti-GP2 IgG $p < 0,001$; anti-MZGP2 IgA $p = 0,12$; anti-MZGP2 IgG $p < 0,001$).

PAb képződésének összefüggése a teljes betegségtartammal CD-ben: a PAb stabilitása CD-ben

A mintavétel időpontjában az antitest státusz és a klinikai, illetve endoszkópos aktivitás (aktuális HBI vagy SES-CD) között nem találtunk összefüggést (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra). A CD betegek többségénél ($n=192$) betegenként legalább két szérum minta került levételre a követés során, így lehetőségünk nyílt a betegségfolyásának különböző időpontjaiban levett minták analizését elvégezve a PAb státusz (pozitív vagy negatív az adott antitestekre nézve) időbeli stabilitására vonatkozóan következtetések levonására/megítélésére. A mintavételek között eltelt medián idő 30,3 hónap volt [IQR, 15.3-48.7]. Érdekes módon a különféle PAb-ok státusza mind az IgA és IgG szubtypusok esetében meglehetősen stabilnak bizonyult, nevezetesen a CD betegek 5%-ban változott idővel a PAb státusz. Ezzel egybehangzó módon a szövődményes betegségforma kialakulása, illetve a műtéti igény sem érintette a különféle PAb-ok esetében az antitest státuszt (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

PAb prognosztikai értéke a betegségfolyás előrejelzésében CD-ben

Ezt követően időfüggő univariációs modellekben vizsgáltuk a különféle PAb markerek jelenlétének összefüggését a negatív betegség kimentel/szövődményes betegségforma (belső penetráló és/vagy strikturizáló betegségforma kialakulása, perianális penetráló betegség és első, illetve ismételt műtéti rezekciós igény) kialakulásával.

Egyik PAb marker sem bizonyult alkalmasnak a szövődményes betegségforma (belső penetráló és/vagy strikturizáló betegség) kialakulásának előrejelzésére a gyulladással viselkedésbeli fenotípussal (B1) induló betegekben ($n=211$).

Azon betegek közül, akik korábban nem rendelkeztek perianális érintettséggel (bármely luminális fenotípussal rendelkező beteg bevonásával) ($n=216$) az anti-CUZD1 IgA/IgG pozitív betegekben nagyobb valószínűséggel alakult ki perianális komplikáció szemben az ezen antitestekre negatív betegcsoporttal ($p\text{LogRank}=0,008$). Ezen összefüggés erősebbnek bizonyult az IgA antitest szubtypus esetében ($p\text{LogRank} < 0,001$), valamint kvantitatív összefüggést találtunk az IgA antitest titerokkal is ($p\text{LogRank} < 0,001$).

Kizárva a fent vizsgált csoportból azokat a betegeket, akik ugyan perianális érintettséggel nem rendelkeztek a diagnózis időpontjában, viszont valamely szövődményes betegségformával igen (B2/3-p fenotípus) alcsoport analízist végeztünk a perianális érintettséggel kezdetben nem rendelkező gyulladással fenotípusú (B1-p) betegekben ($n=169$),

melynek eredményeként a fentiekben ismertetetthez hasonló eredményeket kaptunk a perianális betegség kialakulását illetően időfüggő univariációs modellekben (pLogRank<0,001 az anti-CUZD1 IgA esetén).

A műtéti szempontból naív, műtéten korábban át nem esett betegcsoportot (n=234) elemezve az első rezektív műtéti eltelte idő rövidebbnek bizonyult az anti-GP2 IgA antitest pozitív betegcsoportban (pLogRank=0.002). Ugyanakkor a posztoperatív körülményeket vizsgálva a korábban már műtéten átesett betegcsoportban (n=109) az anti-GP2 IgA antitest jelenléte nem bizonyult alkalmasnak egy esetleges következő műtét predikciójára.

A különféle PAb markerek prediktív értékének további elemzése végett többváltozós Cox regressziós analízist végeztünk, melyekben az univariációs modellekben (Kaplan-Meier és Log-rank analízis) 0,1 alatti p értéket adó változókkal (nem, klinikai változók) korrigáltunk. Az anti-CUZD1 IgA és anti-GP2 IgA antitesteket a modellben külön értékeltük. Az anti-CUZD1 IgA független kockázati tényezőnek bizonyult a perianális betegség kialakulására nézve mind az elsőként ismertetett, mind pedig az alcsoport vizsgálat szerint (ezen utóbbi adatok nem kerülnek bemutatásra). Ezzel szemben az univariációs modellben talált anti-GP2 és a rezektív műtéti igény közötti összefüggés multivariációs modellben már nem bizonyult szignifikánsnak.

A PAb pozitivitás összefüggései a CD klinikai, szerológiai és genetikai jellemzőivel

Fiatal korban kezdődő betegség esetén az anti-MZGP2 IgA/IgG antitestek gyakoribbnak bizonyultak (A1: 28,6%; A2: 11,3%; A3: 5,7%; p=0,012). Ileális érintettség esetén pedig az anti-rPAg2 IgA/IgG antitestek prevalenciája volt szignifikánsan magasabb a kizárólag colon érintettséggel rendelkező csoporthoz képest (L1/3 vs. L2; 13,2% vs. 4,5%; p=0,032). A követési idő végén penetráló betegség fenotípussal rendelkező betegek körében gyakoribb volt az anti-GP2 IgA/IgG (17,9% vs. 7,3%; p=0,026), anti-MZGP2 IgA/IgG (20,2% vs. 8,9%; p=0,040) és anti-rPAg2 IgA antitest (13,1% vs. 4,8%; p=0,040) pozitivitás. Szintén kimutatható volt összefüggés a teljes követési idő alatt a rezektív műtéti igény és az anti-GP2 IgA/IgG pozitivitás (14,5% vs. 6,6%; p=0,036) között. Az extraintesztinális manifesztációk tekintetében pedig az anti-rPAg2 IgA/IgG pozitivitás és a PSC jelenléte között találtunk összefüggést (37,5% vs. 9,4%; p=0,038). Ezzel szemben a CUZD1 ellen termelődő PAb pozitivitás (≈anti-rPAg1) összefüggést mutatott a colon érintettséggel (L2/L3 vs. L1; 23,7% vs. 10,5%; p=0,041 az IgA/IgG szubtípus esetén), a teljes követési idő végén a perianális betegséggel (P1 vs. P0, 32,6% vs. 15,0%; p=0,001 az IgA/IgG szubtípus esetén) és az IBDs bőr érintettséggel kialakulásával (23,5% vs. 10,4%; p=0,044 az IgA szubtípus esetén). Emellett összefüggést találtunk a különféle IgA típusú PAb-ok jelenléte és az ASCA antitest pozitivitás között. A különböző PAb IgA antitestek szignifikánsan gyakoribbak voltak az ASCA IgA pozitív csoportban az ASCA IgA negatív csoporthoz képest (anti-GP2 IgA: 6,7% vs. 0,0%; anti-MZGP2 IgA: 14,6% vs. 1,7%; anti-rPAg1: 17,5% vs. 4,9% és anti-rPAg2: 11,7% vs. 2,4%; p<0,01 minden esetben). A PAb IgG pozitivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget az ASCA IgG jelenlétének, illetve hiányának függvényében. A különféle PAb-ok prevalenciája vizsgálatunkban nem függött össze a főbb NOD2/CARD15 mutációk jelenlétével vagy ezek hiányával (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

Az anti-GP2 antitestek interassay vizsgálata

Összességében a három különböző módszer közötti egyezés 94,0% és 95,6% közé esik az anti-GP2 IgG esetében, míg ez az anti-GP2 IgA-nál 91,6%-tól 96,4%-ig terjed. A vizsgálatunk során alkalmazott különféle módszerek közötti konkordancia (egyezőség) jónak bizonyult a κ együtthatók (koefficiensek) alapján.

5.3 Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata májcirrhosisos betegekben

ANCA előfordulási gyakorisága krónikus májbeteggekben

Az egészséges kontroll csoporthoz képest az ANCA szeropozitivitás gyakoriságát tekintetbe véve az ANCA IgA és/vagy IgG pozitivitást szignifikánsan magasabbnak bizonyult minden CLD csoportban. A CLD csoporton belül az ANCA szeropozitivitás szignifikánsan magasabb volt a cirrhosisos csoportban szemben azokkal a krónikus májbeteggekkel, akikben még nem alakult ki cirrhosis ($OR_{ANCA_{Total}}$ 1,96; 95% CI: 1,28–3,00; $p < 0,01$ krónikus HCV fertőzés esetén és $OR_{ANCA_{Total}}$: 4,37; 95% CI: 2,76–6,90; $p < 0,001$ PBC esetén). Immunglobulin szubtypus tekintetében az IgA típusú ANCA szignifikánsan gyakoribb volt a cirrhosisos betegek körében (52,2%) szemben a krónikus HCV fertőzésben (10,9%), illetve PBC-ben (27,4%) szenvedőkkel ($p < 0,001$ mindkét esetben). Ezzel szemben az IgG típusú ANCA krónikus HCV fertőzött betegcsoportban (52,1%) volt gyakoribb összehasonlítva a cirrhosisban (36,4%; $p < 0,01$), illetve PBC-ben (14,7%; $p < 0,001$) szenvedőkkel. A HCV fertőzött betegek közül egy sem szenvedett ANCA asszociált vasculitisben.

Az ANCA izotípusok fluoreszcens festődési mintázatai is eltérőek voltak a különböző CLD csoportok között. Cirrhosisos betegekben az IgA típusú ANCA dominánsan c-ANCA-nak megfelelő mintázatot mutatott (46,3%), míg az IgG izotípusú ANCA elsősorban atípusos p-ANCA mintázatnak felelt meg leggyakrabban (51,1%). A másik két mintázat megközelítőleg azonos gyakorisággal fordult elő mindkét esetben (IgA izotípusú ANCA esetében atípusos p-ANCA: 22,4% és p-ANCA: 31,3%; IgG típusú ANCA esetében p-ANCA: 27,3% és c-ANCA: 21,6%). Ezzel szemben izotípustól függetlenül (IgA és IgG esetén is) krónikus HCV-ben szenvedők (84,6% és 82,5%), illetve PBC-s betegek (82,5% és 86,7%) között a leggyakoribb fluoreszcens festődési mintázat az atípusos p-ANCA volt. Cirrhosisban az ANCA pozitív betegek 15,6%-a, krónikus HCV-s betegek 5,0%-a, míg a PBC-s betegek 3,9%-a esetén volt mindkét ANCA izotípusra (IgA és IgG) pozitívak a szérum minták. Ezen kettős pozitivitással rendelkező szérum mintákban a különféle Ig izotípusokat összehasonlítva a fluoreszcens festődési mintázat egyezőségében eltérést tapasztaltunk a különböző betegcsoportok között. Krónikus HCV-s betegekben teljes volt az egyezés (100%-os konkordancia) ANCA mintázat szempontjából anti-IgA és anti-IgG szekunder antitesteket alkalmazva, míg PBC-s betegek 50,0%-a és a cirrhosisos betegek 35,0%-a esetén volt azonos a festődés.

Az IgA típusú ANCA karakterizációja májcirrhosisban

Az IgA izotípusú ANCA antitestek karakterizálását szemikvantitatív IIF módszerrel végeztük el cirrhosisos betegek ANCA IgA pozitív szérum mintáinak felhasználásával. Az IgA szubtypusok arányát és a szekretoros komponens (SC) jelenlétét szimultán vizsgáltuk minden minta esetén. Az ANCA IgA2 szubtypus aránya jelentősen emelkedett ($46,2 \pm 8,5\%$) és csak egy árnyalatnyit volt alacsonyabb az ANCA IgA1 szubtypushoz képest ($53,8 \pm 8,5\%$). Az IgA2 arány megoszlása a három különböző ANCA mintázatok esetében nagyon hasonlóan volt (c-ANCA: $45,8 \pm 8,1\%$; p-ANCA: $48,0 \pm 6,8\%$ és atípusos p-ANCA: $44,9 \pm 8,6\%$). A szekretoros komponens jelenléte magasnak bizonyult, történetesen az ANCA IgA pozitív szérumminták 86,8%-a volt pozitív SC-re.

Megvizsgáltuk az ANCA IgA pozitív szérum minták antigénspecificitását MPO és PR-3 tekintetében. Az anti-PR3 és anti-MPO pozitívitás gyakorisága alacsonynak bizonyult: a p-ANCA pozitív minták 4,9%-a volt pozitív anti-MPO antitestre, míg a c-ANCA pozitív mintáknak 16,5%-a volt pozitív anti-PR3-ra.

Az ANCA jelenlétének összefüggései a betegség súlyosságával, a betegség-specifikus szövődmények megjelenésével, illetve az anti-mikrobiális szerológiai válasszal cirrhotikus betegekben

Cirrhotikus betegekben az ANCA IgA pozitivitás (ide érte/beleértve az IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ eseteket is) a betegség Child-Pugh stádiummal jellemzett súlyosságával arányosan fokozatosan nőtt. Az ANCA IgA jelenléte (ide számolva az IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ eseteket is) emellett összefüggést mutatott ($OR_{ANCAIgA}$: 3,0; 95%CI: 1,90-4,71) az ascites jelenlétével is. A szeropozitivitás esetén kapott eredményekhez hasonló módon minél súlyosabbnak bizonyult a májcirrhosis/betegség, annál magasabb ANCA IgA titer értékeket figyeltünk meg. Az ANCA IgA titerértékek szignifikánsan magasabbak voltak az asciteses beteg körében szemben azokkal a betegekkel, akiknél nem volt ascites.

Az adatokat az alkoholos és nem alkoholos etiológiájú csoportokban külön-külön újraelemelve, ugyanezeket az összefüggéseket kaptuk, bár észleltünk néhány különbséget etiológiai szempontból az ANCA IgA válasz tekintetében. Alkoholos etiológia esetén fokozottabb ANCA IgA képződést észleltünk a nem alkoholos etiológiájú csoporttal szemben. Összehasonlítva a két csoportban az azonos súlyossági fokú alcsoportokat az alkoholos etiológiájú betegek körében az ANCA IgA pozitív betegek száma szignifikánsan magasabbnak bizonyult (többnyire 20%-kal). Alkoholos etiológiájú betegekben már kevésbé súlyos betegség esetén (Child A stádium vagy ascites jelenlétének hiánya esetén/fennállásakor) emelkedett ANCA IgA pozitivitást észleltünk (53,4% vagy 55,9%).

Ezzel szemben nem alkoholos etiológiájú betegekben az ANCA IgG válasz ellenkezőképpen viselkedett az ANCA IgA válasszal hoz viszonyítva. A kizárólag ANCA IgG pozitivitás jelenléte (IgA-/IgG+ esetek) fokozatosan csökkent a Child-Pugh stádiummal jellemzett betegség súlyosságával párhuzamosan, illetve negatív összefüggést tapasztaltunk az ascites jelenlétét illetően ($OR_{ANCAIgGkizárólag}$: 0,28; 95%CI: 0,12-0,66). Alkoholos etiológiájú betegekben a kizárólagos ANCA IgG pozitivitás (IgA-/IgG+ esetek) aránya a betegség súlyosságától, illetve az ascites jelenlététől függetlenül alacsonynak bizonyult. Ezekben a betegekben már kevésbé súlyos betegség esetén (Child A stádium vagy ascites jelenlétének hiánya esetén/fennállásakor) is észlelhető volt jelzetten csökkent kizárólagos ANCA IgG pozitivitási arány (15,5% vagy 13,5%). Ezek az arányok szignifikánsan alacsonyabbak voltak a nem alkoholos etiológiájú azonos súlyossági fokú alcsoporthoz viszonyítva (41,9% vagy 43,0%; $p < 0,001$ mindkét esetben). Ezek a különbségek a Child C csoportban megszűntek.

Az ASCA IgA és anti-OMP^{Plus} IgA antitestek gyakoribbnak bizonyultak az ANCA IgA pozitív csoportban összevetve az ANCA IgA negatív csoporttal (59,0% vs. 23,4%; $p < 0,001$ és 75,5% vs. 50,5%; $p < 0,001$). Hasonló összefüggést találtunk az ASCA IgG és ANCA IgG antitestek jelenléte között. Az ANCA IgG pozitív betegek 23,6%-ban volt az ASCA IgG jelenléte kimutatható, míg ez az ANCA IgG negatív betegcsoport 11,5%-ban volt így ($p < 0,01$).

Bakteriális fertőzések: általános jellemzők

A két éves követési idő során a 345 cirrhotikus beteg esetében összesen 187 klinikailag jelentős bakteriális infektív epizódot azonosítottunk. 110 beteg (31,9%) esetében alakult ki a követés során valamely klinikailag szignifikáns infekció, 39,4%-uk szenvedett el több mint egy epizódot. A különböző súlyosságú fertőzések megoszlása a következőképpen alakult: 27,5% SBP, 17,5% pneumonia, 12,5% húgyúti fertőzés, 8,9% bőr- és lágyrészfertőzés és 16,5% egyéb. A fertőzésforrás az esetek 17,1%-ban nem volt azonosítható. Pozitív tenyésztési leletek alapján a baktériumok 60,9%-ban Gram-negatívak voltak, illetve 39,1%-ban Gram-pozitívak. A különböző típusú fertőzések aránya lokalizáció, illetve Gram specificitás

szempontjából hasonló volt az ANCA pozitív és negatív csoportokban (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

A vizsgált populációban elemeztük azokat a klinikai faktorokat, melyek ismert módon kockázati tényezőnek számítanak a fertőzések kialakulásában. 84 betegnek (24,3%) volt előrehaladott betegsége, illetve 158 (45,8%) betegnek pedig ascitese. Az asciteses beteg körében 36-nak (22,8%) volt korábban SBP epizódja, melyek közül 14 beteg (38,9%) szenvedett el azt megelőzően több mint egy epizódot. 76 betegnek (22,0%) volt a tanulmányba való belépést megelőzően varix vérzéses epizódja, valamint 57 betegnek (16,5%) pedig hepaticus encephalopathiája. Összesen 183 beteg (53,0%) kapott nem szelektív béta blokkolót, mely arány az ANCA IgA pozitív betegek körében szignifikánsan magasabb volt az ANCA IgA negatív betegekhez viszonyítva (60,0% vs. 45,6%; $p < 0,01$). Ez utóbbi egybecseng azzal a megfigyeléssel, hogy az ANCA IgA pozitív betegek jóval előrehaladottabb a betegsége. 38,2%-ban használtak protonpumpa gátlókat a betegek kezelése során és ez az arány az ANCA IgA pozitív és negatív betegekben megegyezett (37,4% vs. 39,1%).

A klinikailag jelentős bakteriális fertőzések klinikai és laboratóriumi prediktorai

Univariációs analízisben (χ^2 -teszt vagy χ^2 -teszt Yates korrekcióval) a klinikai faktorok közül a betegség súlyosságának Child-Pugh stádium szerinti besorolása ($p < 0,001$), az ascites jelenléte (OR: 3,02; 95% CI: 1,89–4,84; $p < 0,001$), hepaticus encephalopathia előfordulása a kórtörténetben (OR: 2,15; 95% CI: 1,20–3,86; $p < 0,01$) és a társbetegségek (OR: 2,03; 95% CI: 1,28–3,22; $p < 0,01$) bizonyultak rizikótényezőnek a klinikailag jelentős fertőzések kialakulásában (CSI). A kórelőzményben előforduló korábbi SBP epizód pedig kockázati tényezőnek bizonyult újabb SBP epizód kialakulása szempontjából (OR: 2,87; 95% CI: 1,20–6,89; $p < 0,01$).

Azokban a betegekben, ahol az IgA izotípusú ANCA jelenléte kimutatható volt szignifikánsan gyakoribban alakultak ki bakteriális infekció azokkal a betegekkel szemben, akik ANCA IgA negatívak voltak (38,9% vs. 24,1%; $p < 0,01$ amennyiben a pozitivitási vágópontot 1:10-es titerértéknél határoztuk meg, illetve 41,8% vs. 23,4%; $p < 0,001$ pedig 1:32-es vágópont esetén). Az az infekciók előfordulási gyakorisága összefüggést mutatott az ANCA IgA szerológiai válasz nagyságával (negatív: 24,1%, 1:10-es titer: 18,2%; 1:32-es titer: 42,9% és $\geq 1:100$ -as titer: 54,7%; $p < 0,001$). A legmagasabb arányt az 1:100-as vagy afeletti (≥ 100) titerérték esetében is ANCA IgA pozitív betegek körében észleltünk. Ebben a csoportban a CSI előfordulása 54,7% volt. Az ANCA IgA pozitív betegek 51,1%-a (90/176) tartozott ebbe a csoportba, mely a teljes betegkohorszot vizsgálva, ide értve az ANCA IgA negatív betegeket is 26,1% (90/345) volt. Ehhez hasonlóan az ANCA IgA mintázatok is összefüggést mutattak a CSI-vel (OR: 2,71; 95% CI: 1,54–4,75; $p < 0,001$). A c-ANCA mintázatot mutató szérumok 80,2%-a esetében volt az ANCA IgA titer ≥ 100 szemben azzal a csoporttal, ahol nem c-ANCA volt az IIF festődési mintázat (25,8%; $p < 0,001$).

Klinikai és laboratóriumi paraméterek, melyek összefüggést mutattak az első klinikailag jelentős bakteriális fertőzésig eltelt idővel

Kaplan-Meier analízisben a Child-Pugh stádium, az ascites jelenléte, a társbetegségek jelenléte, hepaticus encephalopathia előfordulása a kórtörténetben ($p < 0,01$) és a varix vérzés ($p = 0,046$) mutatott összefüggést az első CSI-ig eltelt idővel. Továbbá a kórelőzményben előforduló korábbi SBP epizód összefüggést mutatott a következő SBP epizódig eltelt idővel ($p < 0,01$).

A két éves követési idő során rövidebbnek bizonyult az első infekcióig eltelt idő az ANCA IgA pozitív betegek körében szemben az ANCA IgA negatív betegekkel (HR: 1,83 95%CI: 1,26-2,66; $p < 0,01$ – 1:10-es titer, mint pozitivitási küszöb esetén és HR: 2,15 95%CI: 1,46-3,15; $p < 0,001$ – 1:32-es titer, mint pozitivitási küszöb esetén). A különböző ANCA IgA típusok közül a c-ANCA mintázat jelenléte függött össze a legmagasabb CSI kockázattal (HR: 3,04 95%CI: 1,83-5,04; $p < 0,001$).

Multivariációs analízisben Cox-regressziós modellt használva is megvizsgáltuk az ANCA IgA pozitívítás hatását a CSI kialakulására. Nemre, társbetegségekre és a Child-Pugh stádiummal jellemzett betegség súlyosságra korrigálva az ANCA IgA pozitívítás (1:32-es titer, mint pozitivitási küszöb esetén) független kockázati tényezőnek bizonyult és összefüggést mutatott az első infekcióig eltelt rövidebb idővel ($p=0,006$). Ebben a multivariációs modellben a betegség súlyosságának jellemzésére azért választottuk a Child-Pugh stádium beosztást, mert egyrészt az ismert klinikai változók közül ez az, amelynek a bakteriális fertőzések kialakulása szempontjából májcirrhosisban a legjelentősebb befolyásoló hatása van, másrészt mivel a legösszetettebb módon jellemzi mind a máj parenchymás elégtelenségét, mind pedig a portális hipertenziót. A redundancia elkerülésére a Child-Pugh pontrendszer egyes komponenseit, illetve az ezzel összefüggő faktorokat nem alkalmaztuk párhuzamosan multivariációs modellünkben, még akkor sem, ha azok az univariációs analízisekben szignifikáns összefüggést mutattak a CSI kialakulásával.

Túlélési analízis

Összesen 77 beteg (22,3%) halt meg a két éves követési idő alatt. Kaplan-Meier túlélési analízisben szignifikánsan rosszabb volt a túlélési esélye azoknak a betegeknek, akiknek a Child-Pugh stádium szerint előrehaladott volt a betegsége ($p < 0,001$), ascitese volt ($p < 0,001$) vagy valamely társbetegsége ($p < 0,01$). Az ANCA IgA pozitívítás nem mutatott összefüggést a halálozással ($p=0,117$), viszont a CSI jelenléte szignifikánsan magasabb halálozási rátával járt együtt ($p < 0,001$).

6. Főbb új tudományos eredmények

- 1.1 Jelenleg rendelkezésre álló információink szerint ezidáig ez a legnagyobb tanulmány, mely szimultán vizsgálta több APLA prevalenciáját, típusát és klinikai jelentőségét nagy esetszámú, prospektív módon követett IBD betegkohorszban.
- 1.2 Három különböző antitestet vizsgáltunk ELISA módszerrel. A hagyományos, rutin laboratóriumi gyakorlattal szemben az APLA-knak nem csak az IgG és IgM altípusait, hanem IgA altípusát is meghatároztuk
- 1.3 Emellett áttekintést nyújtottunk a szakirodalomban jelenleg fellelhető releváns APLA tanulmányokról IBD-ben.
- 1.4 Főbb erőssége jelen tanulmányunknak a prospektív követési mód és a jelenleg elérhető APLA-k széles körének alkalmazása a vizsgálat során.
- 1.5 Elsőként igazoltuk, hogy a fokozott ACA IgA képződés a CD jellemzője; az ACA IgA előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabb volt az UC és HC csoportokhoz képest.
- 1.6 Nem találtunk összefüggést az APLA-k jelenléte és más jól ismert prognosztikai szempontból jelentős szerológiai (a betegek ASCA IgA és IgG státusza), illetve genetikai markerek (NOD2/CARD15 genetikai mutációk/polimorfizmusok) között.
- 1.7 Jelen tanulmányban komplex módon vizsgáltuk a betegség aktivitása (klinikai, laboratóriumi és endoszkópos) és az APLA képződés közötti kapcsolatot, de nem találtunk közöttük szignifikáns összefüggést.
- 1.8 Az ACA jelenléte szubtípusok szerinti bontásban sem mutatott összefüggést CD-ben a gyakori relapszusokkal. Az ACA esetén nem találtunk továbbá összefüggést a betegség tartam és a szerológiai válasz mértéke között.
- 1.9 Bár a szakirodalmi adatok alapján a bakteriális transzlokációnak (BT) az ACA képződés indukciójában betöltött szerepe az anti-mikrobiális antitestekéhez hasonlóan kézenfekvőnek tűnik, ezek az általunk kapott eredmények megkérdőjelezzik a BT szerepét az ACA képződés mechanizmusában és más, a BT-n kívüli mechanizmusok lehetséges szerepére utalnak az ACA képződésben.
- 1.10 Jelen tanulmányunkban alkalmazott prospektív követési módszer lehetővé tette az APLA-k lehetséges prediktív értékének a vizsgálatát, melynek révén ezen markerek klinikai értéke is jobban karakterizálható. Egyik APLA sem bizonyult a szövődményes betegségforma (stenotizáló, belső penetráló, illetve perianális betegségforma), valamint a CD-asszociált műtéti igény prediktív markerének a CD egyik klinikai fennállásban sem.
- 1.11 A különféle tromboembóliás szövődmények alacsony gyakorisága miatt ezeknek az eseményeknek az előfordulását a diagnózistól kezdődően vizsgáltuk, mely magába foglalta a mintavétel előtti időszakot is. Egyik APLA jelenléte sem mutatott összefüggést IBD-s betegekben a tromboembóliás események (VT, AT), illetve a spontán vetélés kialakulásával. A klinikai és laboratóriumi markerek közül CD-ben a korábbi vénás tromboembóliás esemény (VT) és a faktor V. Leiden mutáció, UC-ben a gyakori relapszus függött össze a VT fokozott kockázatával.
- 1.12 Az APLA-k közül az anti- β 2-GPI státusz mindhárom Ig szubtípus esetén, illetve az ACA IgM időben stabilnak bizonyult. Ezek szemben az ACA IgG, illetve ennél még kifejezettebben az ACA IgA státuszban történt idővel szignifikáns változás, elsősorban a negatív antitest státuszról lett pozitív. Az antitest státuszban történt változások sokkal kifejezettebbek voltak CD-ben az UC-hoz képest. Megvizsgáltuk a TNF antagonistá terápia lehetséges szerepét prospektíven követett CD kohorszunkban. Az anti-TNF terápiát kapott csoportban lévő betegek, akik kezdetben ACA negatívak voltak szignifikánsan gyakrabban lettek ACA IgA vagy ACA IgG pozitívak, mely egy ok-okozati kapcsolat lehetőségét is felveti.

- 1.13 Összefoglalásként tehát elmondhatjuk, hogy annak ellenére, hogy az APLA-k előfordulása IBD-ben gyakoribbnak bizonyult, használatuk a mindennapi gyakorlatban IBD-ben a fenti eredményeinket tekintetbe véve a jelenleg rendelkezésre álló információink birtokában nem javasolható. További vizsgálatokra IBD vonatkozásában újabb nézőpontok látótérbe kerüléséig egyelőre nincs szükség.
- 2.1 Jelen tanulmányunkban felnőtt CD betegekben vizsgáltuk a különböző target specifikus PAb-ok klinikai jelentőségét a szövődményes betegségforma és a műtéti igény predikciójában. Tudomásunk szerint ez az első prospektív tanulmány az új PAb-ok vonatkozásában.
- 2.2 A szerológiai markerek hosszútávú predikcióra való alkalmazhatóságának megítéléséhez nélkülözhetetlen az antitest státusz időbeli stabilitásának vizsgálata. Az anti-GP2 antitest stabilitásról csak limitált és egymással ellentmondó adat állt eddig rendelkezésre. Jelen tanulmányban a különféle PAb-ok hosszútávú stabilitását részletesen kielemeztük. A PAb státusz nem függött össze az aktuális betegség aktivitással és a pozitívítási ráta is időben stabilnak bizonyult IBD betegekben.
- 2.3 Jó laboratóriumi egyezést tapasztaltunk az anti-GP2 antitestek kimutatására alkalmazott új diagnosztikai eszközök között. A klinikai fenotípusokban észlelt különbségeket az is magyarázhatja, hogy minden teszt egy további betegpopulációt ismert fel, mely a másik(ak) által nem lett felismerve, mely részben át nem fedő epitópok jelenlétét valószínűsíti.
- 2.4 Szignifikánsan több CD beteg bizonyult pozitívnek a különféle PAb-okra az UC, illetve egészséges kontroll csoporthoz képest. A GP2 és CUZD1 glikoproteinek ellen képződő autoantitestek képződése tükrözheti a bél barriert érő fokozott mikrobiális terhelésre adott immunválaszt. Az anti-GP2 antitest titerek is szignifikánsan magasabbak voltak CD-ben az UC csoporthoz képest. Az antitest válasz nagysága eszerint korrelálhat a bakteriális transzlokáció (BT) mértékével, mely kifejezettebb CD-ben az UC-hez viszonyítva.
- 2.5 Jelen kohorszunkban az anti-GP2 és anti-CUZD1 esetében eltérő klinika összefüggéseket találtunk. Az anti-GP2 antitestek prevalenciája magasabb volt korai betegségkezdet, ileális érintettséggel járó kiterjedt betegség, penetráló betegségforma esetében. A betegség lokalizációját illetően az anti-CUZD1 antitestek pedig colon érintettség esetében bizonyultak szignifikánsan gyakoribbnak. Ezidáig egyik vizsgálatban sem elemezték a target specifikus PAb-ok összefüggéseit az extraintesztinális manifesztációkkal: az anti-GP2 jelenléte a PSC-vel, míg az anti-CUZD1 antitesteké pedig a bőrérítettséggel függött össze.
- 2.6 Eredményeink szerint a PAb-ok alkalmazása hozzájárulhat a CD betegek jobb stratifikációjához. A PAb-ok prevalenciája és klinikai alkalmazhatósága a diagnózisban viszonylag alacsony és a betegséglefolyás predikciójában CD-ben az ASCA-hoz képest némileg alulmarad. Habár az anti-GP2 antitest specifikusabbnak bizonyult CD szempontjából az ASCA-hoz képest, illetve a kettősen pozitív CD betegek specificitása 100%.
- 2.7 Ki kell emelni, hogy CD betegek körében az anti-GP2 IgA/IgG prevalencia rátája alacsonyabb volt a korábbi tanulmányokban közölt adatokhoz képest (10,2-12,4% vs. 21,0-45,0%). A szerológiai markerek előfordulási gyakoriságában észlelt különbségek a tanulmányok között, illetve különböző etnikai populációkban jól ismert jelenség. Mindemellett metodikai eltérések is hozzájárulhatnak ezen különbségek kialakulásához.
- 2.8 Az általunk jelen tanulmányban alkalmazott ELISA-k mindegyike rekombináns humán GP2 4-es izoformáját tartalmazzák, mint szolid fázis antigént, mely a GP2 rövidebb

izoformájának feleltethető meg (GP2b) és a CD betegek jobb elkülöníthetőségét biztosítja az UC betegekkel szemben.

- 2.9 Ezidáig csak keresztmetszeti asszociatív analízisek álltak rendelkezésre CD betegekben. Jelen tanulmányunkban a betegség-specifikus szövődmények és a műtéti igény vonatkozásában a PAb-ok prediktív értékéről szolgáltatunk longitudinális prospektív adatokat. Betegkohorszunkban a PAb pozitivitás képes volt előrejelezni a gyorsabb progressziót a szövődményes betegségforma irányába. Az anti-GP2 pozitivitás összefüggött a műtéti igénnyel, míg az anti-CUZD1 a perianális komplikáció kialakulását volt képes előrejelezni. Egyik főbb erőssége jelen tanulmánynak, hogy a különböző kimenetek analízise prospektív követési periódust követően történt. A végső Cox-regressziós multivariációs modellben az anti-CUZD1 pozitivitás a perianális szövődmény erős független prediktorának bizonyult a diagnóziskori életkorral, nemmel, betegség lokalizációval, viselkedési fenotípussal és gyakori relapsussal, mint lehetséges torzító tényezőkkel korrigálva.
- 2.10 Érdekes módon tanulmányunkban az IgA és nem az IgG PAb típusok esetén találtunk összefüggéseket a szövődményes betegségfolyással CD-ben. A bél mucosális immunrendszere központi szerepet játszik az IgA antitestképződésben, mely legalább részben tükrözheti a fokozott mikrobiális terhelésre adott immunválaszt. Emellett az IgA típusú autoantitesteket az enterális antigénekre adott immunválasz jelének tekintik, mely más betegségekben a fokozott bakteriális transzlokációval függött össze. A bélnyálkahártya mikrobiális túlterhelése pedig fokozhatja/felgyorsíthatja a bélben zajló gyulladási folyamatokat.
- 2.11 Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált prospektív kohorszban talált eredmények alapján a target specifikus PAb-ok hasznos markerei lehetnek a CD betegek stratifikációjának és összefüggést mutattak a szövődményes betegség fenotípus kialakulásával, illetve a perianális szövődmény kialakulásának kockázatával. Ezek alapján hasznos kiegészítő eszközként szolgálhatnak a szerológiai panelek tagjaiként a betegség predikciójában.
- 3.1 Tudomásunk szerint ezidáig ez a legnagyobb tanulmány, mely az ANCA-k előfordulási gyakoriságát, típusát és klinikai jelentőségét vizsgálta különböző etiológiájú májcirrhotikus betegcsoportban.
- 3.2 Krónikus májbetegségekben (CLD) az ANCA IgA-ról korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre. Az ANCA jelenlétét IIF technika segítségével vizsgáltuk etanol- és formalin fixált humán neutrofil szubsztrátokon. A rutin laboratóriumi eljárásokkal szemben az ANCA meghatározását nemcsak anti-IgG, hanem anti-IgA szekunder antitestekkel is elvégeztük. Ezt követően az ANCA IgA szubtypusok is meghatározásra kerültek.
- 3.3 Jelen tanulmányban először sikerült igazolni az ANCA IgA fokozott képződését májcirrhosisban, mely függetlennek bizonyult a cirrhosis etiológiájától, valamint összefüggést mutatott a betegség súlyosságával és a portális hipertenzióval. A cirrhotikus csoporton belül az alkoholos etiológiájú alcsoportban magasabb volt az ANCA IgA pozitivitás gyakorisága és magasabbak voltak a titerértékek is.
- 3.4 A fokozott szérumban IgA képződés oka cirrhosisban jelenleg nem teljesen tisztázott. A gasztrointesztinális traktus részvétele a folyamatban azonban igen valószínűnek tűnik. A bél barrier integritásának megbomlása mind mechanikus, mind immunológiai szinten jól ismert jellemzője a cirrhosisnak és a betegség előrehaladásával egyre kifejezettebbé válik. A bél barrier integritásának zavara a vékonybél bakteriális túlnovelkedésével együtt lehetővé teszi a bakteriális alkotórészeknek a béllumenből való fokozott lokális felvételét (BT), mely stimulálja a szekretoros immunrendszert és részt vesz a betegség-specifikus

szövődmények kialakulásának patogenetikai folyamataiban cirrhosisban. Az IgA régóta jelentős tényezőnek számít a mucosalis immunitásban, melyet az alap kutatásokból származó adatok is alátámasztanak.

- 3.5 Mivel a bél bakteriális flórájának az összetétele, illetve a bakteriális terheltség mértéke egyértelműen hatással van az IgA képződésre, valamint mivel a fokozott bakteriális transzlokáció (BT) a májcirrhosis jól ismert jellemzője, így feltételeztük, hogy mukozális kompartmentekből származó bakteriális antigének és ezek keresztreakciója a granulocyták citoszolban lévő vagy granuláris fehérjével központi szerepet játszanak az IgA típusú ANCA fokozott képződésében májcirrhosisban.
- 3.6 Korábbi tanulmányokban az IgA₂ szubtípus arányának megnövekedését és a SC párhuzamos jelenlétét az IgA szekréció mukozális eredetére nézve bizonyító erejűnek tekintették. Az általunk vizsgált ANCA IgA pozitív cirrhosisos betegcsoport mintáiban az IIF ANCA mintázattól függetlenül az ANCA IgA₂ szubtípus aránya jelentősen emelkedett volt (46%) és az SC jelenlétét is nagy arányban sikerült kimutatni (87%).
- 3.7 Egyik hiányossága ugyan jelen tanulmánynak, hogy az ANCA IgA antitestek jelenlétét nem vizsgáltuk közvetlenül a különböző mukozális kompartmentekben, illetve azokban a szervekben, kompartmentekben, ahová baktériumok transzlokációja feltételezhető (pl. a májban vagy az ascitesben).
- 3.8 Jelen tanulmányunk klinikai részének eredményei szintén alátámasztják a kapcsolatot a bakteriális fertőzések és az ANCA képződés indukciója között. Az ANCA IgA pozitivitás szignifikánsan gyakoribb volt azon betegek körében, akiknek a kórelőzményében szerepelt klinikailag jelentős bakteriális fertőzés (CSI). Emellett a két éves követési idő során az IgA típusú ANCA jelenléte független kockázati tényezőnek bizonyult egy következő CSI epizód kialakulásának szempontjából.
- 3.9 Betegkohorszunkban az IgA típusú ANCA jelenléte nem mutatott összefüggést sem a teljes, sem pedig az infekcióhoz társuló halálozással. Eredményeink azt sugallják, hogy az ANCA IgA-nak nincs patogenetikai szerepe a cirrhosis progressziójában (károsodás, fibrogenézis), illetve a bakteriális szövődmények kimenetele szempontjából. Ennek ellenére a fokozott IgA típusú ANCA képződése valószínűleg nem csak a krónikus gyulladás epifenomenonja/másodlagos jelensége csupán, hanem olyan a háttérben zajló (alap)folyamatok indikátora, melyek végső soron CSI-hez vezetnek.
- 3.10 Az IgA típusú ANCA antigénjei feltehetőleg nem a klasszikus citoszol/granuláris neutrofil fehérjék, melyek vasculitisekben az IgG típusú ANCA-k antigénjei. Ezt támasztja alá, hogy betegkohorszunkban az anti-PR3 és anti-MPO pozitivitás igen alacsonynak bizonyult. Saját eredményeink alapján, mivel az IgA típusú ANCA esetben mindhárom klasszikus ANCA mintázat előfordult, ez is inkább arra utalhat, hogy a képződés háttérében számos különböző antigén jelenléte állhat.
- 3.11 Jelen tanulmányban az ANCA IgG válasz és ennek változása nem mutatott párhuzamot az ANCA IgA válasszal. Alkoholos etiológiájú betegek körében az ANCA IgG előfordulása alacsonyabb volt, nagyjából az IgA típus fele, még a legkevésbé súlyos stádiumok esetében is. Nem alkoholos etiológia esetén az ANCA IgG pozitivitás gyakorisága fokozatosan csökkent a betegség súlyosságával párhuzamosan és jelentősen csökkent szintet ért el. Ezek az eltérések az ANCA IgA és IgG válaszban nagyon hasonló tendenciát mutatnak, mint a vakcinációs vizsgálatok eredményei ebben a betegcsoportban. Ezek (a tendenciák) feltehetőleg egyrészt az adaptív immunrendszer zavarát tükrözik cirrhosisban, mely főként az előrehaladott stádiumokban kifejezett, másrészt az alkohol direkt gátló hatását is reflektálják a T-sejt közvetített immunitásra.



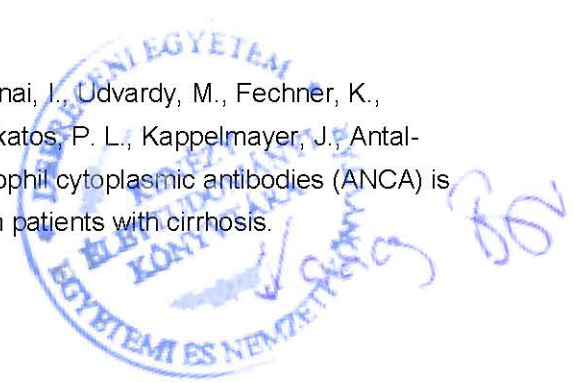
Nyilvántartási szám: DEENK/226/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sipeki Nóra
Neptun kód: JLUETN
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10040193

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sipeki, N.**, Dávida, L., Pályu, E., Altorjay, I., Hársfalvi, J., Antal-Szalmás, P., Szabó, Z., Veres, G., Shums, Z., Norman, G. L., Lakatos, P. L., Papp, M.: Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn's disease.
World J. Gastroenterol. 21 (22), 6952-6964, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i22.6952>.
IF: 2.787
2. Papp, M.*, **Sipeki, N.***, Tornai, T., Altorjay, I., Norman, G. L., Shums, Z., Roggenbuck, D., Fechner, K., Stocker, W., Antal-Szalmás, P., Veres, G., Lakatos, P. L.: 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).
J. Crohns Colitis. 9 (8), 659-668, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv087>

*These authors contributed equally to the work and both should be considered as first authors.
IF: 6.585
3. **Sipeki, N.**, Antal-Szalmás, P., Lakatos, P. L., Papp, M.: Immune dysfunction in cirrhosis.
World J. Gastroenterol. 20 (10), 2564-2577, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2564>
IF: 2.369
4. Papp, M., **Sipeki, N.**, Vitális, Z., Tornai, T., Altorjay, I., Tornai, J., Udvardy, M., Fechner, K., Jacobsen, S., Teegen, B., Sümegi, A., Veres, G., Lakatos, P. L., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, 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. 59 (3), 457-466, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.018>
IF: 10.401





További közlemények

5. Tornai, T., Vitális, Z., **Sipeki, N.**, Dinya, T., Tornai, D., Antal-Szalmás, P., Karányi, Z., Tornai, I., Papp, M.: Macrophage activation marker, soluble CD163 is an independent predictor of short-term mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection.

Liver Int. [Epub ahead of print], 2016.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/liv.13133>

IF: 4.47 (2015)

6. Lakatos, P. L., **Sipeki, N.**, Kovács, G., Pályu, E., Norman, G. L., Shums, Z., Golovics, P. A., Lovász, B. D., Antal-Szalmás, P., Papp, M.: Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's disease.

J. Crohns. Colitis. 9 (10), 891-898, 2015.

IF: 6.585

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33,197

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
22,142**

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

Debrecen, 2016.09.07.



Előadások

- 2013.06.15 **Sipeki N.** Az IgA típusú anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) előfordulása májcirrhosisban gyakori és jelenlétük összefüggést mutat a bakteriális infekciók kialakulásával. (Laki Kálmán Doktori Iskola hallgatóinak PhD Konferenciája; Debrecen, 2013.06.15)
- 2013.11.15 **Sipeki N.**, Tornai T, Vitális Zs, Altorjay I, Tornai I, Antal-Szalmás P, Papp M. Az IgA típusú anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) előfordulása májcirrhosisban gyakori és jelenlétük összefüggést mutat a bakteriális infekciók kialakulásával. (Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Kongresszusa, Nyíregyháza, 2013.11.15, **E-28.**)
- 2014.03.08 **Sipeki N.**, Norman GL, Lakatos PL, Papp M. Antifoszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata gyulladásoos bélbetegségekben (IBD). (Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekciójának Tudományos Ülése, Balatonalmádi, 2014.03.07-08.)
- 2014.06.06 **Sipeki N.** Anti-foszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata gyulladásoos bélbetegségekben (IBD) (Laki Kálmán Doktori Iskola hallgatóinak PhD Konferenciája; Debrecen, 2014.06.06)
- 2014.08.27-30 P. Antal-Szalmás, T. Tornai, **N. Sipeki**, D. Tornai, Zs. Vitalis, I. Tornai, Z. Szabo, R. Foldesi, A. Sumegi, P.L. Lakatos, M. Papp. Presepsin: a new biomarker in the diagnosis and prognosis of bacterial infection in cirrhosis (Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 57. Nagygyűlése, Nyíregyháza, 2014. augusztus 27-30. **SE 1.5**)
- 2015.02.19-21 M. Papp[#], **N. Sipeki**[#], T. Tornai, I. Földi, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmás, G. Veres, P.L. Lakatos. Presence of anti-MZGP2 IgG and IgA antibodies assessed by 2 different ELISA assays is associated with younger age at onset, stricturing disease behaviour, need for surgery and ASCA/anti-OMP PlusTM positivity in Crohn's Disease. (Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) 10. Kongresszusa; Barcelona, Spanyolország, 2015.02.19-21. **DOP044**) ^{#These authors contributed equally to the work and both should be considered as first authors.}
- 2015.05.31 Kurti Z., Rutka M., Farkas K., **Sipeki N.**, Golovics P.A., Lovasz B., Vegh Z., Gecse K., Kiss L., Altorjay I., Papp M., Molnar T., Lakatos P. Accelerated treatment strategy in Inflammatory Bowel Diseases: Is it associated with a change in the disease course? (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 57. Nagygyűlése; Siófok, 2015.05.30-06.02 **E102**)
- 2015.05.31 Papp M., **Sipeki N.**, Altorjay I., Norman G.L., Roggenbuck D., Fechner K., Antal-Szalmás P., Veres G., Lakatos P.L.. Pankréász ellenes antitestek (PAb) újrafelfedezése és prognosztikai szerepük egy prospektíven követett Crohn-beteg (CD) kohorszban: specifikus target antigének jelentősége (GP2 és CUZD1). (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 57. Nagygyűlése; Siófok, 2015.05.30-06.02, **E138**)
- 2015.05.31 Lakatos P.L., **Sipeki N.**, Altorjay I., Norman G.L., Shums Z., Antal-Szalmás P., Veres G., Papp M. Rizikó mátrix modell a betegség progresszió előrejelzésére IBD centrumban gondozott Crohn-beteg csoportban. (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 57. Nagygyűlése; Siófok, 2015.05.30-06.02, **E104**)
- 2015.06.05 **Sipeki N.** Pankréász ellenes antitestek (PAb) újrafelfedezése és prognosztikai szerepük egy prospektíven követett Crohn-beteg (CD) kohorszban: specifikus target antigének jelentősége (GP2 és CUZD1). (Laki Kálmán Doktori Iskola hallgatóinak PhD Konferenciája; Debrecen, 2015.06.05)
- 2016.06.04-7 G. Kovacs, **N. Sipeki**, K. Palatka, I. Altorjay, K. Fechner, G. Norman, Z. Shums, G. Veres, P.L. Lakatos, M. Papp. Szerológiai markerek jelentősége a colitis ulcerosa körlefoiyásában. (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 58. Nagygyűlése; Siófok, 2016.06.04-06.07, **Bébetegségek A/9**)
- 2016.10.16-19 M. Papp, T. Tornai, Gy. Kovacs, **N. Sipeki**, Zs. Vitalis, I. Tornai, K. Fechner, D. Roggenbuck, D. Tornai, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Orosz, B. Lombay Jr., J. Gervain, G. Par, A. Par, P. L. Lakatos, F. Szalay, P. Antal-Szalmás. Target-specific anti-pancreatic antibodies are frequent in patients with primary sclerosing cholangitis and associated with poor disease outcome. (United European Gastroenterology Week (UEG Week), 2015. 10.16-19, Bécs, **OP032**) (Session Title: 215 - Mechanisms of Primary Sclerosing Cholangitis, Session Type: Free Paper, Session Date: October 17, 2016)
- 2016.10.16-19 T. Tornai, Gy. Kovacs, **N. Sipeki**, Zs. Vitalis, I. Tornai, K. Fechner, D. Roggenbuck, D. Tornai, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Orosz, B. Lombay Jr., J. Gervain, G. Par, A. Par, P. L. Lakatos, F. Szalay, P. Antal-Szalmás, M. Papp. Gut barrier failure biomarkers are associated with poor disease outcome in patients with primary sclerosing cholangitis. (United European Gastroenterology Week (UEG Week), 2015. 10.16-19, Bécs, **OP033**) (Session Title: 215 - Mechanisms of Primary Sclerosing Cholangitis, Session Type: Free Paper Session, Session October 17, 2016)

Poszterek

- 1: M Papp, **N. Sipeki**, Zs Vitalis, T Tornai, I Altorjay, I Tornai, M Udvardy, K Fechner, S Jacobsen, B Teegen, A Sumegi, G Veres, PL Lakatos, J Kappelmayer, P Antal-Szalmas. Presence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in cirrhosis – possible hint towards the involvement of gut mucosal immune system? **Falk Symposia** 191, 2013 október 3-5 (P62).
- 2: P Antal-Szalmas, **N. Sipeki**, Zs Vitalis, T Tornai, I Altorjay, I Tornai, M Udvardy, K Fechner, S Jacobsen, B Teegen, A Sumegi, G Veres, PL Lakatos, J Kappelmayer, M Papp. Presence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in cirrhosis – possible hint towards the involvement of gut mucosal immune system? **Magyar Immunológiai Társaság 42. Kongresszusa**, 2013. október 16-18., Pécs
- 3: P.L. Lakatos, **N. Sipeki**, T. Tornai, I. Földi, I. Altorjay, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Antal-Szalmas, M. Papp. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's Disease. **Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) 10. Kongresszusa**; Barcelona, Spanyolország, 2015.02.19-21. (P117)
- 4: L. Kiss, K. Farkas, **N. Sipeki**, Z. Kurti, P.A. Golovics, M. Rutka, B. Lovasz, Z. Vegh, K. Gecse, I. Altorjay, M. Papp, T. Molnar, P. Lakatos. Accelerated treatment strategy in Inflammatory Bowel Diseases: Is it associated with a change in the disease course? **Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) 10. Kongresszusa**; Barcelona, Spanyolország, 2015.02.19-21. (P469)
- 5: M. Papp, **N. Sipeki**, T. Tornai, I. Földi, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmas, G. Veres, P.L. Lakatos. Presence of anti-MZGP2 IgG and IgA antibodies assessed by 2 different ELISA assays is associated with younger age at onset, stricturing disease behaviour, need for surgery and ASCA/anti-OMP Plus™ positivity in Crohn's Disease. **Falk Symposium 196**; Frankfurt, Németország, 2015.03.05-08. (P72)
- 6: P.L. Lakatos, **N. Sipeki**, T. Tornai, I. Földi, G.L. Norman, Z. Shums, P. Antal-Szalmas, G. Veres, M. Papp. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's Disease. **Falk Symposium 196**; Frankfurt, Németország, 2015.03.05-08. (P52)
- 7: T. Tornai, D. Tornai, **N. Sipeki**, I. Foldi, T. Dinya, Z. Vitalis, P. Antal-Szalmas, I. Tornai, M. Papp. Soluble CD163 (sCD163) is a marker of infection in patients with cirrhosis and acute decompensation and an independent predictor of the short-term mortality. **Európai Májkutató Társaság (EASL) 50. Kongresszusa** (50th International Liver Congress); Bécs, Ausztria, 2015.04.22-26. (P0174) – Poster of distinction
- 8: T. Tornai, D. Tornai, **N. Sipeki**, I. Foldi, T. Dinya, Z. Vitalis, P. Antal-Szalmas, I. Tornai, M. Papp. Soluble CD163 (sCD163) is a marker of infection in patients with cirrhosis and acute decompensation and an independent predictor of the short-term mortality. **Falk Symposium 197**; Lisbon, Portugal, 2015.05.08-09. (P77) – Poster of distinction
- 9: P.L. Lakatos, **N. Sipeki**, I. Altorjay, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Antal-Szalmas, M. Papp. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's Disease. **Digestive Disease Week 2015**; Washington, DC, USA, 2015.05.16-19. (Su1271 – Session – IBD: Disease Complications)
- 10: P.A. Golovics, K. Farkas, **N. Sipeki**, Z. Kurti, M. Rutka, L. Kiss, B. Lovasz, Z. Vegh, K. Gecse, I. Altorjay, M. Papp, T. Molnar, P. Lakatos. Accelerated treatment strategy in Inflammatory Bowel Diseases: Is it associated with a change in the disease course? **Digestive Disease Week 2015**; Washington, DC, USA, 2015.05.16-19. (Sa1156 – Session – IBD: Clinical Outcomes)
- 11: M. Papp, **N. Sipeki**, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmas, G. Veres, P.L. Lakatos. Presence of anti-MZGP2 IgG and IgA antibodies assessed by 2 different ELISA assays is associated with younger age at onset, stricturing disease behaviour, need for surgery and ASCA/anti-OMP Plus™ positivity in Crohn's Disease. **Digestive Disease Week 2015**; Washington, DC, USA, 2015.05.16-19. (Su1272 – Session – IBD: Disease Complications)
- 12: M. Papp, **N. Sipeki**, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmas, G. Veres, P.L. Lakatos. 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). **United European Gastroenterology Week (UEG Week)**, Barcelona, 2015. 10.24-28. (P0956) (IBD II: Diagnosis and monitoring, Session Date: October 27, 2015)

13: P.L. Lakatos, **N. Sipeki**, G.L. Norman, Z.Shums, P. Antal-Szalmas, G. Veres, M. Papp. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's disease. **United European Gastroenterology Week (UEG Week)**, Barcelona, 2015. 10.24-28. (P0957) (Session IBD II: Diagnosis and monitoring, Session Date: October 27, 2015)

14: G. Kovacs, **N. Sipeki**, K. Palatka, I. Altorjay, K. Fechner, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P.L. Lakatos, M. Papp. Significance of serological markers in the disease course of ulcerative colitis. (A-1446) **Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) 10. Kongresszusa; Amsterdam, Hollandia, 2016.03.16–19.** (P123) (Session Title: Clinical: Diagnosis and outcome, Session Date: March 16-19, 2016).

15: Gy. Kovacs, **N. Sipeki**, K. Fechner, G. L. Norman, Z. Shums, P. Antal-Szalmas, P.L. Lakatos, P.L. Lakatos, P. Antal-Szalmas, M. Papp. Significance of serological markers in the disease course of ulcerative colitis. **Digestive Disease Week (DDW); San Diego, CA, USA, 2016. 05.21-24.** (Su1836) (Session Title: IBD: Disease Complications, Session Date: May 22, 2016).

16: Gy. Kovacs, **N. Sipeki**, K. Fechner, G. L. Norman, Z. Shums, P. Antal-Szalmas, P.L. Lakatos, P.L. Lakatos, P. Antal-Szalmas, M. Papp. Significance of serological markers in the disease course of ulcerative colitis. **United European Gastroenterology Week (UEG Week)**; Bécs, 2016. 10.16-19 (P0291) (Session Title: IBD I., Session Date: October 17, 2016)