

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A KÓROS IMMUNVÁLASZ ÉS A BETEGSÉG  
PROGRESSZIÓ BIOMARKEREI KRÓNIKUS  
MÁJBETEGSÉGEKBEN**

Dr. Tornai Dávid



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Laki Kálmán Doktori Iskola**  
Debrecen, 2021

## Doktori (PhD) értekezés tézisei

# A KÓROS IMMUNVÁLASZ ÉS A BETEGSÉG PROGRESSZIÓ BIOMARKEREI KRÓNIKUS MÁJBETEGSÉGEKBEN

Dr. Tornai Dávid

Témavezető: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2021

# A Kóros Immunválasz és a Betegség Progresszió Biomarkerei Krónikus Májbetegségekben

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

Írta: Dr. Tornai Dávid, orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája  
(Hemostasis, thrombosis, vascularis biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Berki Tímea, MTA doktora

Dr. Griger Zoltán, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

DE, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára (online)

2021.06.04. (péntek) 10 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Hagymási Krisztina, PhD

Dr. Horváth Ildikó Fanny, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, MTA doktora

tagok: Dr. Hagymási Krisztina, PhD

Dr. Horváth Ildikó Fanny, PhD

Prof. Dr. Berki Tímea, MTA doktora

Dr. Griger Zoltán, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

DE, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára (online)

2021.06.04. (péntek) 12 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a [tornai.david@med.unideb.hu](mailto:tornai.david@med.unideb.hu) e-mail címre 2021. június 3. (csütörtök) 12 óráig.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### A krónikus májbetegségek végállapota: cirrózis

A májsugor a különböző etiológiájú krónikus májbetegségek utolsó, bár önmagában is stádiumokra osztható, dinamikus szakasza, mely világszerte rendkívül gyakran azonosítható a kórházi felvételek és a halálozás hátterében. Globálisan a 11., míg Közép-Európában a 4. leggyakoribb haláloknak számít. A Központi Statisztikai Hivatal honlapján közzétett adatok szerint Magyarországon 2019-ben 3303 esetben állapították meg májbetegséget a halálozások hátterében.

A kórkép jellemzően a dolgozó korú populációt érinti, ezáltal a korai halálozás miatt elvesztett munkaévek száma cirrózisban jóval magasabb, mint a szív-ér rendszeri betegségek esetében, így nem csak az egészségügy, de a gazdaság számára is jelentős terhet jelent.

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

A krónikus májbetegség nem egy stabil állapot, hanem egy dinamikus folyamat, ami a kompenzált (szövődménymentes), majd a dekompenzált (szövődményes) cirrózis stádiumokon keresztül progrediál a végstádiumú májelégtelenségig, amikor a beteg élete már csak májtranszplantáció révén menthető meg. Májcirrózisban klinikailag hat alcsoport különböztethető meg az eltérő betegség progresszió és a várható halálozás kockázata alapján. Az első két (=kompenzált) klinikai stádiumban a betegek tünetmentesek és a betegség-specifikus szövődmények még hiányoznak. A portális vérnyomás már emelkedett lehet (melyet a II-es stádiumban már a nyelőcsővarixok megjelenése is jelez), de nem éri el a kritikus küszöbértéket ( $>12$  Hgmm). Ekkor még mind a dekompenzáció (4-12%), mind pedig a halálozás (1-3,4%) éves kockázata alacsony, a májtranszplantáció nélküli túlélés pedig elérheti akár a 15-20 évet is. Az előrehaladott (III. és IV.; dekompenzált) stádiumban a nagymértékű májsejtpusztulás eredményeként kialakult májfunkciós-elégtelenség, valamint a klinikailag kritikus szintet meghaladó portális hipertenzió következtében megjelennek a tüneteket okozó, betegség-specifikus szövődmények (aszцитез, nyelőcsővarix-vérzés, hepatikus encefalopátia [HE]). A késői (V. és VI.) stádium pedig már a visszatérő akut események és halmozódó komplikációk szakasza. Az éves halálozás ugrásszerűen növekszik (20-57%), és legfeljebb 3-5 év májtranszplantáció nélküli túlélés várható.

Ráadásul, valamilyen akutan fellépő károsító tényező hatására, a krónikus állapotromlás folyamatának bármelyik klinikai stádiumában

kialakulhat egy kórházi felvételt szükségessé tevő hirtelen állapotromlás, vagyis akut dekompenzáció (AD). A kiváltó okot azonban az esetek körülbelül egyharmadában nem sikerül meghatározni. Az ezidáig azonosított tényezők az extenzív alkoholfogyasztás, a gasztrointesztinális vérzés, egyes gyógyszerhatások, valamint a vena portae trombózisa, azonban legtöbbször valamilyen bakteriális fertőzés oki szerepe állapítható meg. A leggyakoribb ezek közül az aszcitesz jelenlétével szoros összefüggést mutató spontán bakteriális peritonitisz, de a pneumónia vagy a húgyúti infekció is meglehetősen gyakori. AD során, a betegek egy jelentős részében további szervrendszerek működése is elégtelenné válhat, melynek bekövetkezése esetén 50% feletti rövid-távú halálzásról számoltak be. Ezt a klinikai jelenséget, melynek definícióját, stádiumbeosztását és az alapjául szolgáló szervelégtelenségek kritériumrendszerét a CLIF-CANONIC multicentrikus európai prospektív tanulmány dolgozta ki, krónikus májbetegségekre rakódott akut májelégtelenség (acute-on-chronic liver failure, [ACLF]) néven ismeri az irodalom. A CANONIC tanulmányban BF az esetek mintegy harmadának háttérében volt azonosítható, mellyel az ACLF szindróma leggyakoribb kiváltó tényezőjének számít. Ugyanakkor a nem BF okozta ACLF esetén is a fertőzésekkel szembeni fogékonyság jelentős fokozódását észlelték. Az ACLF diagnózisának időpontjában infekciómentes betegek körülbelül 50%-ában 4 héten belül kialakult valamilyen BF. A BF által kiváltott vagy a későbbiekben fertőzéssel szövődött esetek viszont bizonyítottan súlyosabbak, és a mortalitás is jelentősen magasabb az infekciómentes esetekben tapasztaltakhoz képest. A BF jelenlétében a cirrózisos páciensek halálzásának kockázata négyszeresére emelkedik, függetlenül a májbetegség súlyosságától. A betegek közel egyharmada a diagnózist követő első hónapban, míg további 30%-uk az azt követő 1 éven belül meghal.

### **Az immunrendszer működésének zavara és a bakteriális fertőzések összefüggése cirrózisban**

Ahogy az előzőekben láttuk, a BF-ek kiemelt jelentőséggel bírnak mind a májcirrózisos betegek akut állapotromlásának kiváltásában, mind pedig a halálzás incidenciájának jelentős emelésében. Ugyanakkor az előrehaladott májcirrózis maga is egy szerzett immunhiányos állapot, mely kiterjed a felismerést végző, az effektor és a szabályzó funkciók zavarát. Mindez az infekciókkal szemben fokozott fogékonyságot és súlyosabb lefolyású epizódokat eredményez, az alapbetegségben nem szenvedő populációhoz képest.

A jelenség cirrózis-asszociált immundiszfunkciós (CAID) szindrómaként ismert, melyre jellemző a szisztémás gyulladáshoz vezető válasz (systemic inflammatory response syndrome [SIRS]) és a kompenzatórikus

antiinflammatorikus válasz (compensatory anti-inflammatory response syndrome [CARS]) dinamikus együttes jelenléte. Míg a folyamat elején a fokozott gyulladási folyamatok dominálnak, addig a májelégtelenség súlyosbodásával egyre inkább a CARS okozta immunparalízis kerül előtérbe.

Tovább súlyosbítja a képet, hogy a fokozott infekciós kockázat ellenére a fertőzések diagnosztikája sokszor kifejezett kihívást jelent mind klinikai, mind laboratóriumi oldalról. Cirrózisos betegekben a BF-ek az esetek kb. felében tüneteizegény, aspecifikus klinikai képpel jelentkeznek.

Jelenleg a CRP és a PCT a BF-ek korai felismerésére használt legelterjedtebb laboratóriumi szűrőmarkerek. Azonban ezek a klasszikus paraméterek májcirrózisban, több okból kifolyólag is eltérő viselkedést mutatnak a normál populációhoz képest. Először is, a bakteriális transzlokáció (BT) mértéke párhuzamosan fokozódik a májbetegség progressziójával (Child-Pugh C stádiumban a legerőteljesebb). Az általa fenntartott gyulladási állapot manifeszt fertőzés nélkül is képes lehet szignifikánsan megemelni az inflammációt jelző markerek szintjét. Másodsor, mivel a CRP elsődlegesen a májban termelődik, a máj funkcionális állapota befolyásolja képződését, következésképpen, előrehaladott májcirrózisban csökken a molekula diagnosztikus pontossága. A marker emelkedésének mértéke tehát nem lesz képes tükrözni az infekció súlyosságát, hiszen minél kifejezettebb a mögöttes májelégtelenség, annál kevésbé képes megemelkedni a CRP szintje egy nyílt BF esetén. Vagyis a marker pont a legesendőbb betegek esetén fogja a legrosszabb teljesítményt mutatni. A PCT koncentrációjára viszont a veseelégtelenség vagy pont annak terápiája (dialízis) van hatással. Ugyanakkor cirrózisos betegekben gyakori az akut vesekárosodás (acute kidney injury [AKI]) kialakulása, különösen infekciós epizódok esetén. A PCT eliminálása döntően renális úton történik, hiszen molekulatömege alig 13 kDa. Emiatt végstádiumú veseelégtelenségben, a kiválasztás zavara következtében, infekció nélkül is emelkedett PCT koncentráció mérhető. Ezzel ellentétben, vesepótló kezelést követően, azon molekulák, melyek mérete nem éri el a 60 kDa-t, kifiltrálódnak a dialízis membránon keresztül, így fals-alacsony PCT szint detektálható.

### **Új markerek a cirrózishoz társuló bakteriális infekciók kimutatására**

Mint láttuk, a BF és a gyulladási reakciók detektálásának klasszikus klinikai és laboratóriumi paraméterei cirrózisban nem működnek kellően hatékonyan. Ezért a BF hatékony korai felismeréséhez és súlyosságának megítéléséhez, valamint megbízható előrejelzéséhez ebben a betegségben további biomarkerekre van szükség, hiszen a progresszió lassítása, a szövődmények megelőzése és a mortalitás csökkentése csak a megfelelő eszközök birtokában lehetséges. Segítségükkel olyan diagnosztikus

laboratóriumi panelek kidolgozására nyílnak lehetőségek, melyek megbízható támpontot szolgáltatnak az infekciók szempontjából leginkább veszélyeztetett betegcsoport kiválasztásához, akiknek szorosabb követése, illetve szupportív és/vagy profilaktikus antibiotikum terápiával történő kezelése leginkább indokolt. Az antibiotikum-profilaxis hatékony tervezése pedig az egyre növekvő bakteriális rezisztencia miatt létfontosságú. Saját kutatásaim során két új, potenciális marker szérumszintjének vizsgálatát végeztem el: a ferritin, illetve a szolúbilis, mieloid sejteken expresszált trigger receptor-1 (soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 [sTREM-1]).

## **Ferritin**

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

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

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

Ugyanakkor a májcirrózisban szenvedő betegekben vastúlterhelés és vashiányos vérszegénység egyaránt jelentkezhet. A vastúlterhelés, úgy tűnik, hogy legalább részben, a hepatociták csökkent szintetikus kapacitása miatt

elégtelen hepcidinszint következménye. Ez a molekula a ferroportin általi vasfelvételt hivatott gátolni az enterociták bazális membránjában, ezért az alacsonyabb hepcidin-koncentráció fokozott vasfelvételhez vezet. Ezenkívül a hepcidin szintjére a fertőzés/gyulladás is csökkentő hatással van. Így tehát májcirrózisban a hepcidinszintézis krónikusan (romló májfunkció és BT), illetve akután (fertőzések) is szupresszálódhat, mely a fokozott vasfelszívódás és emelkedett szabad vasszint irányába hat. A májsejtekben, makrofágokban felhalmozódó vas azonban bizonyítottan toxikus hatású, hozzájárul a peroxidáció, valamint az oxidatív stressz fokozódásához, és további májsejtkárosodást válthat ki.

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

Mindezen komplex folyamatok tehát tükröződnek a ferritin szérumszintjében. A molekula szerepét már tanulmányozták AD során, ahol összefüggést találtak az emelkedett koncentráció és a magasabb rövidtávú halálozás között. A szérum ferritinszint hosszútávú kimenetelekkel való kapcsolata azonban eddig még nem volt vizsgálat tárgya stabil cirrózisos járóbetegekben.

### **Szulúbilis, Mieloid Sejteken Expresszált Trigger Receptor-1 (sTREM-1)**

A sejt felszíni receptorok családjába tartozó TREM-1, a toll-like receptorok (TLR) által indított gyulladási jelet erősíti, tovább fokozva a proinflammatorikus citokinek termelését. A molekula neutrofil granulociták, monociták és makrofágok membránján expresszáldik. A TREM-1 által indított jelátviteli út a Spleen Tirozin Kináz foszforilációjához és aktivációjához vezet. Ezt a kinázt a különböző májbetegségek gyulladási folyamatainak fontos szabályozó molekulájaként azonosították, míg az általa indított útvonal gátlása a kórállapotok javulását eredményezte. Ezenkívül a TREM-1 szerepéről számos más, gyulladással járó betegségekben is beszámoltak, mint a sepszis, az ateroszklerózis, a kolitisz, valamint a hepatocelluláris karcinóma (HCC).

Bár a TREM-1 ligandja a mai napig ismeretlen, megfigyelések szerint BF során, valamint lipopoliszachariddal vagy lipoteicholsavval való stimuláció hatására megnövekszik a sejtek TREM-1 expressziója. Ugyanakkor, fertőzés alatt, a sejt felszíni receptor aktivációjával párhuzamosan, a molekula szulúbilis formájának (sTREM-1) szintje is jelentősen megemelkedik a keringésben. A

szabad forma keletkezésének módja – eltérő mRNS splice variáns vagy a fehérje proteolitikus hasítódása a sejtfelszínről – jelenleg is vita tárgyát képezi, de mindkét mechanizmus mellett szólnak kísérletes bizonyítékok. A sTREM-1 úgynevezett „csali” vagy „csapda” receptorként funkcionál, ugyanis verseng a sejtfelszíni formával az ismeretlen ligandhoz való kötődésért, mely egy negatív visszacsatolási körként gátolja az útvonal aktiválódását. A sTREM-1 szérumkoncentrációja pneumóniában és szepszisben már értékes markernek bizonyult. A molekula fő forrását a mieloid sejtek képzik, így a máj funkcionális állapota várhatóan nem befolyásolja a marker diagnosztikai pontosságát, ami cirrózisban jelentős előnyt jelentene a klinikai hasznosíthatóság szempontjából.

### **Primer szklerotizáló kolangitisz (PSC)**

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

Bár a betegség etiológiai háttere kevésbé ismert, úgy tűnik, hogy kialakulásában a bél-máj kölcsönhatásnak fontos szerepe van. Nagy valószínűséggel egyes genetikai faktorok (mint pl. egyes Human Leukocita Antigének) és a mikrobiom kölcsönhatása vezet a felborult immunológiai útvonalak kialakulásához, melynek hátterében ezidáig ismeretlen antigén(ek) hatására kialakuló autoimmunreakció áll. Ez magyarázhatja a kórkép gyakori társulását gyulladós bélbetegséggel (IBD). A genetikai kutatások által feltárt legtöbb eltérés a T-sejtek funkció zavarát támasztja alá. A béleredetű antigének jelentős mértékben indukálják az antigénprezentáló sejtek felszínén elhelyezkedő MHC komplexek antigénbemutatását a T-sejtek felé, melyek a klonális expanziót követően mind a béltraktusba, mind pedig a májba eljuthatnak. A kóros T-sejt aktiváció különféle, a fibrózis kialakulásában szerepet játszó citokinin (mint a transzformáló növekedési faktor- $\beta$ ) fokozott felszabadulását eredményezi. A B-sejtek aktiválódását jelzi a BT-hoz kapcsolható szerológia antitestek (pl. anti-neutrofil citoplazmatikus antitest [ANCA]) gyakori megjelenése.

Az endotoxin-expozíció és gyulladás hatására a kolangiociták tight-junction-jei szétválnak, mely további károsító tényezők (pl. epesavak) hatásával szemben teszi még sérülékenyebbé ezeket a sejteket. A károsodott kolangiociták mindezidáig tisztázatlan molekuláris mechanizmusú kereszt-kommunikációja a máj csillagsejtjeivel és a portális miofibroblasztokkal eredményezi az epeutak körüli koncentrikus fibrózis kialakulását PSC-ben, mely epeúti szűkületek kialakulásához, valamint a kolangiokarcinóma (CCA) kockázatának jelentős megnövekedéséhez vezet.

A kórképet azonban nehéz diagnosztizálni, mivel nem áll birtokunkban olyan biomarker, mely a PSC-re specifikus lenne. A PSC diagnózisa a kolangiográfiás kép alapján kerül felállításra, amely többszörös szűkületet és dilatációt mutat, rendszerint olyan betegeknél, akiknél a laboratóriumi vizsgálatok perzisztáló kolesztázist jeleznek.

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

### **A pankreatikus glikoprotein 2 (GP2) ellenes IgA autoantitestek**

A GP2 az exokrin hasnyálmirigy zimogén granulumáiból jelentős mennyiségben szekretálódik a pankréasznedvbe és a fimbrális-adhezin H (FimH) komponensű, 1-es típusú bakteriális pilusok szolubilízis-receptoraként funkcionál. Ugyanakkor a Peyer-plakkok M-sejtjeinek apikális felszínén a fehérje membránkötött formában is expresszálódik, ahol a mukózális antigének detektálásában játszik szerepet. A GP2 így esszenciális jelentőséggel bír a FimH komponensű bélbaktériumokkal szembeni nyálkahártya-immunválasz kialakításában. Valószínűleg a kommenzális baktériumokkal szembeni tolerancia és a patogén törzsekre adott immunválasz egyensúlyát hivatott fenntartani.

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

A hasnyálmirigy acináris sejtjei ellen termelődő autoantitestekről ismert, hogy Crohn-betegségben (CD) szenvedő páciensek akár 40%-ában is jelen lehetnek. Egy nemrégiben megjelent tanulmány a GP2-öt azonosította ezen antitestek egyik antigénjeként. Saját munkacsoportunk, egy nagyetszámú IBD kohorszt vizsgálva, az irodalomban elsőként számolt be az anti-GP2 antitestek, valamint a CD gyorsabb progressziója és a különböző extraintesztinális manifesztációinak megjelenése közötti összefüggésről.

Érdekes módon, mindezt csak az IgA és nem az IgG antitestek jelenlétében figyeltük meg.

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

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

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

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

## **CÉLKITŰZÉSEK**

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

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

## **BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

### **Betegpopulációk**

#### **Májcirrózis**

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

2006 májusa és 2011 októbere között összesen 244, jól karakterizált cirrózisos járóbeteg került beválasztásra, negatív hemokromatózis teszttel. Ezen betegeinket 2 évig követtük a ferritinszint hosszútávú kimenetelekkel való összefüggését vizsgáló tanulmányunkban.

2014 decembere és 2016 júniusa között 269 (172 ambuláns és 97 AD-val hospitalizált) beteget választottunk be abba a vizsgálatba, amelyben a sTREM-1 alkalmazásának lehetőségét vizsgáltuk meg a BF diagnózisának felállításában, valamint a fertőzött betegek 90 napos halálózásának előrejelzésében.

A májcirrózis kórisméje a szükséges klinikai, laboratóriumi és képalkotó vizsgálatok, illetve (amennyiben rendelkezésre állt) a májbiopszia szövettani kiértékelése alapján került megállapításra.

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

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

A májbetegség súlyosságát a Child-Pugh és a MELD (Model for End-Stage Liver Disease) pontrendszerek segítségével mértük fel, valamint a betegség klinikai stádiuma is meghatározásra került (kompenzált/dekompenzált állapot). AD-val jelentkező betegek esetében rögzítettük annak fajtáját, mely egy vagy több szövődmény egyidejű fennállását jelenthette a következők közül: hirtelen felszaporodó aszcitesz, heveny gasztrointesztinális vérzés, akut HE, valamint BF. A fertőzések jelenlétének megállapítása az infekcióra utaló klinikai tünetek, a képalkotó vizsgálatok és a laboratóriumi leletek eredményeire alapozva történt. Ezenkívül az AD-s betegekben meghatároztuk a CLIFF-AD pontszámot, valamint az esetlegesen kialakuló ACLF grádusát.

Az adatokat egy elektronikus adatbázisban tároltuk. A vizsgálati időszak végén, minden klinikai adatot kinyertünk további analízis céljából.

### **Primer szklerotizáló kolangitisz**

A PSC ritka előfordulására tekintettel ezen betegek mintáinak és klinikai adatainak gyűjtését más magyar klinikai centrumokkal együttműködve végeztük. 2006 januárja és 2007 decembere között összesen 65 (55 felnőtt és 10 gyermekek), jól karakterizált PSC-s beteget tudtunk bevonni.

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

A PSC-s betegek követése alatt az ambuláns kontroll látogatások, illetve a kórházi bennfekvések során a gondozó gasztroenterológus rögzítette a laboratóriumi, a képalkotó és az endoszkópos vizsgálatok eredményét, a szövődmények típusát (cirrózis, a biliáris traktus daganata [epeúti karcinoma, epehólyag daganat], epeúti gyulladás vagy kolorektális daganat) és idejét, valamint a gyógyszeres kezelést. Ha a májbetegség szövődményeinek következtében a beteg meghalt vagy annak megelőzésére ortotopikus májátültetést (OLTx-et) hajtottak végre azt egységesen kedvezőtlen

betegségkimenetelként definiáltuk (összetett végpont). A követési időszak 10 évig vagy az összetett végpont bekövetkeztéig, esetlegesen a követésből való kiesésig tartott (amennyiben az adott betegről nem volt elérhető további adat). A gyűjtött adatokat egy elektronikus adatbázisban tároltuk. A vizsgálati időszak végén, minden klinikai adatot kinyertünk további analízis céljából.

### **Kontroll csoportok a PSC-s betegekhez**

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

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

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

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

### **Szerológiai vizsgálatok**

A rutin laboratóriumi paraméterek (májenzimek, máj- és vesefunkciós tesztek, CRP, vérkép) a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében kerültek meghatározásra.

A szérumferritin-szintek meghatározását szintén rutin laboratóriumi egységünk végezte, Cobas e602 automata (Roche) segítségével. Mivel az irodalomban nincs a cirrózisos populációra vonatkozó elfogadott kórosan alacsony, illetve magas ferritinérték meghatározva, a különböző kimenetelek egységes értékeléséhez a kohorsz alsó és felső 25%-os percentilértékei alapján

osztottuk betegeinket alacsony (első kvartilis [Q1]), közepes (IQR [Q2-3]), illetve magas (negyedik kvartilis [Q4]) ferritinszinttel rendelkező csoportokba.

A szérumszérumszint és a vércézés összefüggésének vizsgálatához betegeinket, hemoglobin- és hematokritértékük alapján, anémiás és nem anémiás csoportokba soroltuk. Laboratóriumunkban a hemoglobin és a hematokrit normáltartománya nőknél 115-150 g/L, illetve 0,35-0,47, míg férfiaknál 130-165 g/L, valamint 0,39-0,50. Ha ezen paraméterek közül legalább az egyik alacsonyabb volt, mint a hozzátartozó referenciatartomány alsó határa, úgy az adott beteget a vérszegény csoportba soroltuk.

A betegek bevélasztásakor gyűjtött natív és citráttal alvadásgátolt vérmintákból izolált szérumot, valamint a plazmát -70°C-on tároltuk a további vizsgálatok elvégzéséig. A sTREM-1 szérumszintjét kereskedelmi forgalomban kapható enzim kapcsolt immunoszorbens esszével (ELISA) határoztuk meg, a gyártó (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Cat.#: DY1278B) utasításai szerint. A szérumszintjét duplikátumban mértük ugyanazon a lemezen és a későbbi statisztikai analízisekhez az értékek matematikai átlagait használtuk. A mérések közötti variációs koefficiens 9%, az analitikai érzékenység 7 pg/mL volt.

Az IgA és IgG típusú anti-GP2 antitestek jelenlétét a betegek és kontrollok szérumában, kereskedelmi forgalomban kapható, sejt-alapú indirekt immunofluoreszcens (IIF) esszé segítségével detektáltuk, a teszthez mellékelt útmutató utasításai szerint [CIBD Mosaic, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Németország]. A gyártó ajánlásának megfelelően, az 1:10-szeres vagy ennél nagyobb hígításnál miért specifikus fluoreszcens jelet tekintettünk pozitívnak.

A totál sIgA koncentráció meghatározása egy házilag beállított szendvics ELISA módszer segítségével történt PSC-s betegek és egészséges kontrollok szérumszintjében.

Az IgA izotípusú anti-GP2 antitestek karakterizálására saját fejlesztésű, GP2 fehérjével fedett gyöngy-alapú, áramlási citometriás immunoesszé használtunk, anti-GP2 IgA-ra pozitív CD-s beteg- és negatív egészséges kontrollminták bevonásával.

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

### **Statisztikai módszerek**

A folyamatos változók eloszlását Shapiro-Wilk W-teszt segítségével vizsgáltuk. Az adatok, medián (interkvartilis [25-75 percentilis] tartomány [IQR]) vagy esetszám (%) formában kerültek összegzésre. Két csoport összehasonlítását Mann-Whitney U-teszttel, 3 vagy több csoport esetén a

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

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

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

## EREDMÉNYEK

### Ferritin

#### **A ferritinszint összefüggése a klinikai és laboratóriumi paraméterekkel**

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

Ezt követően a szérumferritinszint és más laboratóriumi paraméterek összefüggését, mint folyamatos változókat vizsgáltuk. A ferritin szintje korrelált a vashomeosztázis és a májfunkció markereivel kompenzált és dekompenzált betegeknél egyaránt. A szervezet gyulladáshoz vezető állapotát jelző CRP és a fehérvérsejtszám, valamint a betegség súlyosságát mérő Child-Pugh és MELD pontszámok csak a dekompenzált betegek esetében korreláltak a ferritinszinttel.

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

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

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

Egyváltozós Fine-Gray regressziós analízisben, az alacsony (Q1) szérumferritin-koncentráció szignifikáns összefüggést mutatott az első AD-s epizód kialakulásával [sHR: 2,782 (95%CI: 1,156-6,696), p=0,022], a MELD 5 pontos növekedés, a társbetegségek és a HCC jelenléte, a >10 mg/L CRP-szint, valamint a vérszegénység mellett. Az ezt követő többváltozós Fine-Gray regressziós modellben a MELD pontszám 5-tel való növekedése, a HCC jelenléte, az anémiás státusz és az alacsony (Q1) szérumferritin-koncentráció [sHR: 3,762 (95%CI: 1,616-8,760), p=0,002] bizonyult független kockázati tényezőnek az első AD kialakulásában.

### **A magas ferritinszint összefüggést mutat a BF-ek 2 éven belüli magasabb előfordulási gyakoriságával dekompenzált cirrózisos betegek körében**

Dekompenzált cirrózisos betegeinknél a BF előfordulási gyakoriságát - mint a komplikációk és a halálozás leggyakoribb okát - vizsgáltuk, a betegségnek ebben a már számottevően immundeprimált szakaszában. Ezen betegek közül 70-nél alakult ki legalább egy AD-s epizód a követés során, melyek közül 45 eset volt BF-nek tulajdonítható. Ezért ezen események Aalan-Johansen gráfon való ábrázolásakor ebben a populációban kompetíciós tényezőként vettük figyelembe a mortalitáson kívül a BF-sel nem szövődött AD eseményeket is. A betegek emelkedett gyulladási állapotával összhangban, a magas (Q4) ferritinszint társult a BF megjelenésének megnövekedett előfordulási gyakoriságával (50,2%) a 2 éves követés alatt, szemben az alacsonyabb (Q1-3) értékekkel [30,9%, p=0,035].

Egyváltozós Fine-Gray regressziós analízisben az 50 éves vagy annál idősebb kor, a női nem, az aszcitesz jelenléte, a korábbi BF-es epizód, a >10 mg/L CRP-szint és magas (Q4) szérumferritin-koncentráció [sHR: 1,991 (95%CI: 1,054-3,758), p=0,034] mutattak összefüggést a BF gyakoribb kialakulásával. Többváltozós Fine-Gray regressziós modellben a női nemet, az aszcitesz jelenlétét, az előző BF epizódot és a magas (Q4) szérumferritin-

koncentrációt [sHR: 2,335 (95%CI: 1,193-4,568),  $p=0,013$ ] találtuk független rizikófaktornak a BF gyakoribb kialakulásában a 2 éves követés alatt.

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

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

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

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

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

### **Szolúbilis, Mieloid Sejteken Expresszált Trigger Receptor-1**

#### **A sTREM-1 szérum szintje összefüggést mutat a betegség súlyosságával és a bakteriális infekció jelenlétével**

A sTREM-1 szérum koncentráció 8 és 3016 pg/mL között változott a teljes populációban, és a Child-Pugh szerinti betegség súlyossággal párhuzamosan növekvő tendenciát mutatott [A: medián (IQR): 203 (124-332), B: 350 (211-555), C: 725 (452-986) pg/mL;  $p<0,0001$ ]. Hasonlóan, AD betegeknél szignifikánsan magasabb sTREM-1 szintet mértünk, mint az ambuláns betegeknél [medián (IQR): 509 (323-850) vs. 211 (130-366) pg/mL;  $p<0,0001$ ]. Ez az emelkedés a járóbetegek betegség súlyosságától függetlenül

kimutatható volt [Child-Pugh A: medián (IQR): 202 (123-330) pg/mL,  $p < 0,0001$ ; Child-Pugh B&C: medián (IQR): 265 (167-455) pg/mL,  $p = 0,0004$ ], míg az ambuláns betegek két csoportja között nem tapasztaltunk különbséget. Ugyanezt a megfigyelést tettük, mikor a járóbetegeket klinikai stádium szerint kategorizáltuk [kompenzált: medián (IQR): 190 (123-325) pg/mL,  $p < 0,0001$ ; dekompenzált: medián (IQR): 235 (148-397) pg/mL,  $p < 0,0001$  (az AD-s betegekhez képest)]. Az AD-s páciensek közül a Child-Pugh C súlyosságú egyénekben szignifikánsan magasabb sTREM-1 szinteket mértünk, mint a Child-Pugh A vagy B stádiumú betegek esetében [medián (IQR): A: 286 (128-830), B: 401 (279-659), C: 787 (475-1013) pg/mL,  $p = 0,0106$  és  $p = 0,0002$ ]. Továbbá szignifikánsan megnövekedett sTREM-1 koncentrációt észleltük BF-ben szenvedő AD-s betegekben [medián (IQR): 711 (442-1026) pg/mL] a fertőzéssel nem komplikált AD-s esetekhez képest [medián (IQR): 323 (205-507) pg/mL,  $p < 0,0001$ ]. A BF-ben szenvedő betegek közül további emelkedést mértünk azokban, akiben szepszis is kialakult [medián (IQR): 636 (395-989) vs. 946 (774-1192) pg/mL,  $p = 0,0072$ ]. Azonban BF hiányában, az AD esetek csak a Child-Pugh A súlyosságú [ $p = 0,0096$ ] vagy a kompenzált klinikai stádiumú [ $p = 0,0087$ ] ambuláns-csoportokhoz képest mutattak megnövekedett sTREM-1 szintet.

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

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

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

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

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

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

Hogy fokozzuk az egyedi markerek diagnosztikus hatékonyságát, bináris logisztikus regresszió segítségével kombináltuk őket. A legjobb eredményt a sTREM-1 természetes logaritmusának ( $\ln$ ) és a CRP legjobb diszkriminációs határértékének egyesítésével kaptuk. Egy klinikai faktor, a mérsékelt/súlyos (tehát fizikai vizsgálattal detektálható) aszcitesz jelenlétét is a modellhez adva az új AD infekció (ADI) pontrendszer ( $= 1,016 \times \ln(\text{sTREM-1}) + 3,138_{[\text{ha CRP} > 36,2 \text{ mg/L}]} + 1,994_{[\text{ha aszcitesz jelen van}]}$ ) szignifikánsan magasabb AUROC értéket ért el, mint a rutinszerűen alkalmazott CRP önmagában [AUROC: 0,878 (95%CI: 0,812-0,944),  $p < 0,0001$ , összesített pontosság: 79,4%, szenzitivitás: 76,8%, specificitás: 82,9%, +PÉ & -PÉ: 86,0% és 72,3%; a  $>8,38$ -as legjobb diszkriminációs határértéknél;  $\Delta$ AUROC: 0,087 (95%CI: 0,004-0,168);  $p=0,0394$ ]. Végül az ADI pontrendszer ROC görbéjének CI-át bootstrap megközelítést alkalmazva belső validálásnak vetettük alá, ami megerősítette az új pontrendszer diagnosztikus megbízhatóságát (a 95%CI a

bootstrap analízis során: 0,798-0,932). A két marker kombinációjának másik, egyszerűbb megközelítése az, hogy az infekzív eseteket "legalább egy pozitív teszt a kettőből" elv alapján definiáljuk (a fent azonosított küszöbértékek alapján). Ez a fajta bináris pontozás nem elemezhető ROC analízissel, de az összesített pontosság (77,3%), szenzitivitás (71,4%), specificitás (85,4%), +PÉ (87,0%) és -PÉ (68,6%) meghatározhatóak, és meglehetősen hasonlóak az ADI pontrendszer paramétereire.

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

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

A különböző klinikai pontrendszereket úgy alkották meg, hogy a mortalitás bekövetkezésének esélyével párhuzamosan emelkedjenek, így folyamatos változóként jó becslést adjanak a halálozás várható esélyéről. Másrészt viszont, a klinikus szemszögéből nézve, egy egyszerű határérték - a pozitív/negatív kimeneteleket "bináris" formában meghatározó megközelítés - hasznosabb lehet az egyedi markerek tekintetében, a módszer egyszerűsége miatt. Hogy elkerüljük a folyamatos változó és a legjobb diszkriminációs határértékek összehasonlításából adódó statisztikai torzítást, a MELD és a CLIF-AD pontrendszerek, valamint a CRP és a sTREM-1 prediktív teljesítményét mind folyamatos, mind kategorikus változóként (a legjobb diszkriminatív értéküket alapul véve) meghatároztuk.

Az egyváltozós Cox-regressziós analízis során mind a  $\ln(\text{sTREM-1})$  [HR: 2,606 (95% CI: 1,468-4,627),  $p=0,001$ ], mind a magas ( $>660$  pg/mL) sTREM-1 szint [HR: 5,095 (95% CI: 1,920-13,524),  $p=0,001$ ] összefüggést mutatott a 90 napos halálozással, a következő klinikai tényezők mellett: MELD és CLIF-AD pontrendszerek, valamint magas értékek ( $>18$  és  $>60$ ), ACLF grádus, tüdőgyulladás (mint a fertőzés helye), másodlagos fertőzés

megjelenése, ln(CRP) és magas CRP szint (>36,5 mg/L), míg a a gasztro-intesztinális vérzés éppen nem érte el a szignifikancia határát.

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

### **A pankreatikus glikoprotein 2 elleni autoantitestek**

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

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

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

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

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

Hét beteg esett át ortotóp májtranszplantáción (OLTx) a követési időszak alatt. Az indikációt kivétel nélkül a végstádiumú májbetegség kifejlődése adta. Májbetegséghez kötődő szövödmények miatt 6 páciens

vesztettünk el. Ebből három haláleset már az OLTx után történt, tehát összesen 10 betegben következett be az összetett végpont (OLTx és/vagy májbetegséggel összefüggő halálozás). Egy beteg halálához akut miokardiális infarktus vezetett, így ez az eset az esemény bekövetkeztekor cenzorálva lett. Kolonkarcinómát két betegben, míg epeúti malignitást egy betegben diagnosztizáltunk. A bevont betegek közül 9-nek volt legalább egyszer kolangitise.

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

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

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

A PSC-s betegekben jelentősen magasabb totál sIgA-szinteket mértünk az egészséges kontrollokhöz képest [medián (IQR): 96 (73-180) vs. 30 (21-42)  $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0,001$ ]. Továbbá az anti-GP2 IgA pozitívitás esetén további sIgA-szint emelkedést detektáltunk az anti-GP2 IgA-ra negatív esetekhez képest [medián (IQR): 149 (86-246) vs. 89 (71-118)  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p = 0,021$ ].

### **Az anti-GP2 IgA antitestek karakterizálása**

Végül karakterizáltuk az anti-GP2 IgA antitesteket PSC-s és CD-ben szenvedő pácienseinkben egy áramlási-citometriás szubtipizáló esszé segítségével. PSC-ben a szekretoros komponens 68,4%-ban (13/19) volt jelen az anti-GP2 IgA antitestek felszínén hasonlóan a PSC nélküli CD-s betegekben

(75%; 9/12) észleltekhez. Mind PSC-ben, mind CD-ben az IgA1 volt a domináns izotípus, viszont míg a CD-ben szenvedő betegekben az IgA2 arányának medián értéke mindössze 2,02% [IQR: 1,53-2,47%] volt, addig a PSC-s betegekben ez 6,75%-nak [IQR: 4,19-9,79%] adódott.

## **MEGBESZÉLÉS**

### **Mind a csökkent, mind az emelkedett szérumszint jelezhet kóros folyamatokat egyes cirrózisos járóbeteg csoportokban**

Vizsgálataink során egy nagylétszámú cirrózisos járóbeteg csoportban megmértük a bevételekor szérumszintjeiket, és 2 éves követési periódus alatt vizsgáltuk annak összefüggését a betegség-specifikus szövődmények kialakulásával és a halálozással. Ahogy arról előtünk már mások is beszámoltak, mi is szignifikánsan magasabbnak találtuk a molekula szérumszintjét férfiakban és idősebb betegekben. Továbbá, szignifikánsan alacsonyabb szintet figyeltünk meg azoknál a betegekben, akiknél korábban varixvérzés zajlott le, azonban az anémiához ezeknél a betegekben nem társult a szérumszint hasonló csökkenése.

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

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

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

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

mechanizmusú dekompenzációs események valószínűleg kevésbé súlyosak/jobban kezelhetőek.

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

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

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

### **A szérum sTREM-1 szint mérése segítheti a cirrózishoz társuló BF-ek diagnosztikáját és a rövidtávú halálozás előrejelzését**

A cirrózisban szenvedő betegek, a társuló immunhiányos állapot miatt, fokozottan fogékonyak a BF-ekre, amelyek gyakran súlyos betegség-specifikus szövődmények kialakulásához és a halálozás jelentős emelkedéséhez vezetnek. A megbízható laboratóriumi markerek elengedhetetlenek a BF-ek korai diagnosztizálásához, és ezáltal lehetővé teszik a megfelelő beavatkozás(ok) időben történő elvégzését. A CRP a legszélesebb körben alkalmazott gyulladási marker a mindennapi klinikai gyakorlatban, azonban a cirrózisban

szenvedő betegeknél diagnosztikai értéke korlátozott. Ezért új biomarkerek azonosítása szükséges ahhoz, hogy ebben a betegcsoportban is időben felismerhessük a fertőzések és az akut gyulladási reakciók jelenlétét.

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

Kutatásunk során először megvizsgáltuk az összefüggést a sTREM-1 koncentráció és a cirrózisos pácienseink betegség-specifikus jellemzői között. Megállapítottuk, hogy a teljes kohorszban a sTREM-1 koncentráció fokozatosan növekszik a betegség súlyosságával (Child-Pugh stádium) párhuzamosan. Azonban, amikor AD jelenléte szerint osztottuk fel betegeinket azt találtuk, hogy AD hiányában a sTREM-1 szintje nem magasabb szignifikánsan a krónikusan dekompenzált betegekben a kompenzáltakhoz képest. Továbbá, a BF nélküli AD esetek csak a kompenzált klinikai stádiumhoz vagy a Child-Pugh A súlyosságú járóbeteg-csoportokhoz képest mutattak emelkedett sTREM-1 szintet. Ezzel ellentétben, a BF-ben szenvedő AD betegek sTREM-1 szérumszintje kiugróan magas volt. Hasonlóképpen, az ambuláns és AD-s esemény alkalmával begyűjtött mintapárok csak abban az esetben mutattak szignifikánsan eltérő sTREM-1 szintet, ha az AD-kor BF is jelen volt. Jelentős korrelációt észleltünk azonban a sTREM-1 koncentráció és a betegség súlyosságát mérő pontrendszerek között, különösen az AD csoportban, ahol a sTREM-1 értékek és a CLIF-AD pontszám összefüggése volt a legszembetűnőbb. Ezen eredményeket úgy összegezhethetjük, hogy a sTREM-1 szint erősen függ a cirrózisban szenvedő betegekben kialakuló fertőzések jelenlététől, míg a betegség stádiuma csak kisebb mértékben befolyásolja azt. Továbbá egyértelmű összefüggés van a sTREM-1 koncentráció és a fertőzés súlyossága között, mivel a szepszis betegekben még magasabb értékeket mértünk. Ezt támasztja alá a sTREM-1 szint szoros korrelációja a fehérvérsejtek és a neutrofilek számával, valamint a CRP-vel, melyek köztudottan jelentős emelkedést mutatnak BF-ben.

Ezután megvizsgáltuk a sTREM-1 diagnosztikus teljesítményét a cirrózishoz társuló BF-ek vonatkozásában, összehasonlítva a CRP-vel. A sTREM-1 és a CRP egyaránt a nem specifikus gyulladási markerek közé sorolhatóak, celluláris eredetűek azonban eltérő. A CRP a májban szintetizálódik, ezért a molekula felszabadulásának mértéke elméletben a májműködés függvénye. Egy korábbi tanulmány ki is mutatta, hogy minél súlyosabb a májműködés zavara, annál alacsonyabb a bakterémiára adott CRP-válasz. Hasonlóképpen saját munkacsoportunk is beszámolt arról, hogy előrehaladott cirrózisban, illetve ascitesz jelenlétében a CRP megbízhatósága csökken a BF-ek diagnosztizálásában. Míg alacsony stádiumú májbetegségben

a CRP 10 mg/L-nél magasabb szintje már jelezte a BF jelenlétét, addig előrehaladott májbetegekben ez a határérték  $>30$  mg/L volt, ami nagyságrendileg megfelel a jelen tanulmányban bemutatott eredményeinknek ( $>9,1$  és  $>36,2$  mg/L). Ezzel szemben a sTREM-1-et főként neutrofilek, monociták és makrofágok termelik, bár beszámoltak arról is, hogy a molekula expressziója indukálható az endotélsejtekben is. Ez alapján feltételeztük, hogy a sTREM-1 alkalmasabb marker lehet a cirrózishoz társuló BF-ek szűrésére. Ezen hipotézisünk tesztelésére ROC analízist végeztünk, összevetve a BF-ben szenvedő AD-s betegeket a járóbetegekkel, illetve a fertőzésmentes AD-s esetekkel. A várakozásoknak megfelelően a CRP teljesítménye jelentősen csökkent a második esetben, viszont a sTREM-1 diszkriminatív képessége is mindkét szituációban a CRP-éhez hasonlóan mutatkozott. Fontos azonban, hogy a CRP diagnosztikus pontosságának abszolút csökkenése meghaladta a sTREM-1 esetében megfigyelt értéket, ami alátámasztja a molekulák sejtes eredetének hatására vonatkozó hipotézisünknek.

Bár már számos biomarker tesztelésre került, eddig egyetlen molekula teljesítménye sem tudta meghaladni a CRP klinikai hatékonyságát a cirrózisos betegek BF-einek kimutatásában. Talán csak a PCT és a presepsin jelenthet kivételt, de ezek is kizárólag a rendkívül súlyos fertőzésekben bizonyultak megbízhatóbbnak. A laboratóriumi medicina egy új irányvonala az egyedi markerek kombinálása olyan összetett pontrendszerekké, amelyek hatékonysága egyértelműen meghaladja a különálló paramétereikét. Az eljárás során az egyes analitok egyedi vagy multiplex eszközzel történő mérését a tesztek modern matematikai módszerek segítségével történő egyesítése követi, mely egy összetett paramétert eredményez. Ilyen matematikai algoritmus például a logisztikus regresszió, a fő komponens- vagy a „random forest” analízis. Ebben a tanulmányban ezt a megközelítést követve, logisztikus regressziós modell segítségével komplex pontrendszert hoztunk létre a CRP, a sTREM-1, valamint egy klinikai paraméter (aszцитesz jelenléte) kombinálásával. Az aszцитesz megjelenése a májműködés dekompenzációját jelző klinikai mérőföldkő, így ezen információ beépítése képes lehet a görbe korrekciójára ott, ahol a vizsgált markerek várhatóan alulteljesítenének. Ezenkívül az aszцитesz a cirrózisos betegek BF-ének jól ismert kockázati tényezője is. Az új pontrendszer – melynek alapját a sTREM-1 természetes logaritmus képezi, figyelembe véve, a CRP szintjét, annak legjobb diszkriminációs határértékéhez képest, valamint a mérsékelt/súlyos aszцитesz jelenlétét – lényegesen pontosabb diagnosztikai eszköznek bizonyult, az egyedi paraméterekhez viszonyítva. Eredményeink tehát alátámasztják azt a koncepciót, miszerint az egyedi tesztek egyetlen paraméterbe való összevonása szolgálhat megoldásul bizonyos klinikai helyzetek speciális igényeire.

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

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

Fontos hangsúlyozni, hogy a sTREM-1 értékek összefüggést mutattak a szervkárosodás (AKI) és -elégtelenség (ACLF) jelenlétével is, amelyek a cirrhotikus betegeknél a BF gyakori szövödményei. Tekintettel arra, hogy a sTREM-1 egy 15 kDa-os molekula, a vesekárosodás közvetlenül is

hozzájárulhat a marker szintjének emelkedéséhez, mivel csökken a sTREM-1 vesén keresztül történő kiválasztása. Ezért az AKI-ban szenvedő betegeknél, a BF sTREM-1-re alapozott diagnózisa nagyobb körültekintést igényelhet. Az AKI azonban elsősorban az álpozitív arányát lenne képes növelni, túlbecsülve a BF-sel rendelkező betegek számát, ami klinikailag egy elfogadhatóbb scenárió, mint az ellenkezője. Érdekes módon, ezt a hatást nem figyeltük meg saját kohorszunkban, mivel BF nélkül nem volt szignifikáns különbség a cirrózisos betegek sTREM-1 koncentrációjában AKI hiánya vagy jelenléte esetén (bár az utóbbi csoportba csak 5 egyén tartozott). Ezen túlmenően a cirrózisos betegeknél az AKI kialakulásának oka leggyakrabban maga a BF, ezért elképzelhető, hogy a vesefunkció károsodása amúgy sem emelné meg szignifikánsan a BF szempontjából álpozitív esetek számát. Hasonlóképpen, mivel a vesekárosodás maga is a halálozás egyik jól ismert kockázati tényezője, úgy gondoljuk, hogy az AKI jelenléte nem teszi a magas sTREM-1 szintet alkalmatlanná a 90 napos mortalitás előrejelzésére sem. Ezt támasztja alá az is, hogy a magas sTREM-1 koncentráció képes volt a 90 napos mortalitás előrejelzésére az ACLF-től függetlenül, amelyben a veseelégtelenséget találták a halálozás szempontjából a legfontosabb tényezőnek. Ezen kérdésekre azonban csak egy, a sTREM-1-et specifikusan AKI-ban szenvedő cirrózisos betegek körében vizsgáló tanulmány tudna pontos választ adni.

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

A jelen vizsgálat egyik korlátja vitathatatlanul az, hogy a szérum sTREM-1 koncentrációját csak a bevételekor mértük, és így a betegség lefolyás során nem tudtuk a molekula szintjének dinamikus változását értékelni. Eredményeink általános alkalmazhatóságának igazolására validációs

tanulmányokra lesz szükség. Ezek miatt a sTREM-1 koncentráció további klinikai vizsgálata indokolt, ideértve az időbeni változások értékelését és azok lehetséges összefüggésének vizsgálatát a fertőzés során bekövetkező különböző kimenetekkel.

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

### **Az anti-GP2 IgA autoantitestek a progresszív betegség lefolyás specifikus prognosztikai markerei PSC-ben, és bizonyítékként szolgálnak a bél-máj interakciók jelentőségére**

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

Egy német kutatócsoporttal egyidőben demonstráltuk az IgA típusú anti-GP2 antitestek fokozott képződést PSC-ben. Mindketten ugyanazt a sejt alapú IIF tesztet alkalmaztuk azonos határértékkel. Ahogy korábban már bemutatásra került, az IIF teszt PSC-s betegeknél alkalmasabb módszer az anti-GP2 IgA detektálására, mint az ELISA, ugyanis ez a típusú IIF teszt érzékeli egy speciális IgA jelenlétét is, mely a HEK239 sejtek felszínén a glycosylphosphatidylinositol-hoz horgonyzott GP2-t ismeri fel. Az említett struktúra egy speciális GP2 epitóp kialakulásához vezet, ami valószínűleg nincsen jelen az ELISA lemez felszínén immobilizált GP2 molekulákon.

Összevetve a saját eredményeinket a Jendrek és munkatársai által publikáltakkal, néhány különbséget is fellelhetünk. Az általunk vizsgált PSC-s beteg populációkban az anti-GP2 IgA alacsonyabb előfordulási arányt mutatott (30,8% vs. 48,7%), mely nagy valószínűséggel a vizsgált betegcsoportok összetételében lévő különbségekkel magyarázható. Először is, a Jendrek féle populációba bevont betegek, az MRS átlagok alapján, súlyosabb

állapotúak voltak. Másodszer, a CCA előfordulása náluk 12,3% volt, míg a mi betegeink közül senkinek sem volt CCA-ja a bevéasztáskor. Harmadszor, az ő tanulmányukban az anti-GP2 IgA antitestek a májbetegek közül nem csak a PSC-s páciensekben voltak jelen, hanem a nagy epeutakat érintő kórképekben is, függetlenül azok malignus vagy benignus jellegétől, ahogy az a betegkontroll csoportjuk adatai alapján látszik. Végül, tanulmányunkban mi egy kiterjedt, különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedő kohorszt használtunk betegkontrollként ellentétben Jendrek és kollégái munkájával. Sem a kis epeutakat érintő betegségben (PBC) szenvedő páciensekben, sem az alkoholos májcirrózisos betegekben nem detektáltunk emelkedett anti-GP2 antitest előfordulást. Ezen utóbbi eredmény különösen érdekes mivel cirrózisban - a PSC-hez nagyon hasonlóan - a különböző specifikus antitestek, mint az ASCA vagy az ANCA, gyakoribb előfordulását tapasztaltuk, (38,5% és 52,2%), elsősorban az IgA izotípusból.

A bevéasztáskor jelenlévő anti-GP2 IgA pozitívitas összefüggést mutatott a súlyosabb betegség forma kialakulásával és a gyorsabb betegség progresszióval, a betegség súlyosságát jelző faktorokra való korrigálás után is. Tanulmányunkban, a máj-specifikus halálozás, illetve az OLTx azonos végkimenetelt jelentett, mivel mindkettő a progresszív fibrózis eredményeként kialakuló végstádiumú májbetegség kifejlődésére utalt. Jendrek és munkatársai által publikált közleményben az IgA izotípusú anti-GP2 pozitívitas szintén a betegek egy rosszabb prognózisú csoportját azonosította. Megjegyzendő azonban, hogy az ő esetükben a magasabb halálozási arány a CCA jelenlétével volt összefüggésben, nem pedig a végstádiumú májbetegség kialakulásával. A mi kohorszunkban csupán egy páciensben (1,5%) fejlődött ki CCA a betegek követése során, így az anti-GP2 IgA szerepének felmérése az epeúti rák kialakulásában nem volt lehetséges. Ez a CCA arány alacsonyabb, mint a más tanulmányokban közölt 8,0-13,2%, de nagyságrendileg megegyezik az Izraelből (2,1%) és Hollandiából (3,6%) hasonló követési idő után, nemrégiben publikált adatokkal. Az a korábbi megfigyelés, miszerint az anti-GP2 IgA gyakori sztenotizáló betegségben is szenvedő CD páciensek esetén, klinikai bizonyítékként támogathatja az anti-GP2 IgA és a fibrózis kapcsolatára vonatkozó elképzeléseket PSC-ben. Ezt az elgondolást egy további közlemény eredményei is megerősítik, melyben a GP2 fehérje 1-es és 4-es izoformája elleni IgA autoantitestek jelenlétét PSC-ben a társuló cirrózis és a súlyosabb betegség fenotípus rizikótényezőjeként azonosították. Továbbá, egy nemrégiben elfogadott tanulmány szerint, az 1-es izoformára specifikus antitestek a rövidebb transzplantációmentes túlélés, míg a 4-es izoformát felismerő antitestek a CCA kialakulásának független rizikótényezői voltak két egymástól független betegpopulációban. Mindezek már elégséges bizonyítékul szolgálnak az anti-GP2 IgA antitestek klinikai gyakorlatba való integrációjának

hasznosságáról, ami egy hosszú ideje fennálló és megoldatlan klinikai problémára kínál első alkalommal megoldást.

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

Az áramlási citometriás analízis során a PSC-s betegek 68,4%-ában volt kimutatható az SC jelenléte az anti-GP2 antitesteken, ugyanakkor az IgA2 izotípusú anti-GP2 aránya nem növekedett az egészséges populációban még normálisnak tekintett 10% felé. Ennek oka lehet, a GP2 antigén protein természete, ugyanis egy korábbi tanulmány szerint a fehérjeantigének sokkal gyengébb induktorai az IgA2 termelésnek a poliszacharidoknál. Az SC ilyen nagy arányú előfordulása viszont erősen arra utal, hogy a bélbe való szekréció után az anti-GP2 antitestek felvételre kerülnek a mukózális epitheliumon keresztül. Azonban az sIgA molekulák jellemzően antigénjükhöz kötött állapotban vannak jelen a béllumenben, ezért visszavételük során az anti-GP2 autoantitestek GP2-vel borított FimH-pozitív baktériumokat juttathatnak be a nyálkahártyába. Ez a folyamat hozzájárulhat a bélmukóza mikrobiális túltelítődéséhez, és fenntartja az antigének indukálta immunválaszt. A bélnyálkahártya gyulladása a biliáris rendszerre is kiterjedhet a gyulladt bélben aktiválódott memória T-limfociták közvetítésével, melyek az aberránsan expresszált adhéziós molekuláik segítségével az epeutakba is bevándorolhatnak. Érdekes módon, a FimH-t nemrégiben a TLR-4 ligandjaként azonosították. A hosszantartó TLR-4 aktiváció, a transzformáló növekedésifaktor- $\beta$  közvetítésével fokozhatja a fibrotikus folyamatokat, a FimH által indukált I-es típusú interferon termelés, pedig összefüggésben áll az autoimmun reakciók felerősödésével. Elképzelhető, hogy ez a folyamat áll a bélben bekövetkező GP2 elleni tolerancia elvesztése és a májban kialakuló fibrózis fokozódása, valamint a betegségprogresszió kapcsolatának hátterében. A GP2 és a FimH molekula interakciója és szerepe, azonban még mindenképpen további kutatásokat igényel a PSC patogenezisében, különös tekintettel arra, hogy ez a mechanizmus terápiás szempontból is rendkívüli jelentőséggel bírhat. Már fejlesztés alatt áll a rekombináns FimH adhéziós fehérjéje elleni vakcina a visszatérő húgyúti infekciók kezelésére, ugyanis a

GP2 és a húgyutakban található uromodulin (Tamm-Horsfall protein) szerkezete és funkciója nagyon hasonlít egymáshoz. Ráadásul a mannóz-vezérelt FimH antagonisták is ígéretes jelöltnek tűnnek az UTI és Crohn-betegség terápiájában.

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

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

## A PhD disszertáció új eredményei és klinikai jelentőségük

Két éves követés alatt, a szérumferritin:

1. alacsony (<40 µg/L) koncentrációja kompenzált cirrózisos betegeknél a dekompenzált klinikai stádium kialakulásának független kockázati tényezője
2. magas (>310 µg/L) szintje a dekompenzált betegekben előforduló bakteriális fertőzések független kockázati tényezője
3. valamint a teljes járóbeteg populáció halálózásának független kockázati tényezője.
4. A sTREM-1 diagnosztikus hatékonysága a májcirrózisos betegek bakteriális fertőzéseinek azonosításában hasonló a CRP-éhez.
5. E két molekula és az ascitesz jelenlétének kombinációja egy összetett pontszámmá szignifikánsan növeli a molekulák egyedi diagnosztikus képességét.
6. A 660 pg/mL-nél magasabb sTREM-1 szint a 90 napos halálozás független kockázati tényezője bakteriális fertőzésben szenvedő akut dekompenzált cirrózisos betegekben.

Az anti-GP2 jelenléte PSC-ben:

7. a betegség súlyosabb formájával társult
8. a Mayo kockázati pontszámra való korrigálás után is a rövidebb transzplantációmentes túlélés független előrejelzője.



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

Jelölt: Tornai Dávid

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





### További közlemények

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





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





17. Vitális, Z., Altorjay, I., Tornai, I., Palatka, K., Kacska, S., Havasiné Pályu, E., **Tornai, D.**, Udvardy, M., Hársfalvi, J., Dinya, T., Veres, G., Lakatos, P. L., Papp, M.: Phenotypic polymorphism of haptoglobin: a novel risk factor for the development of infection in liver cirrhosis.

*Hum. Immunol.* 72 (4), 348-354, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2011.01.008>

IF: 2.837

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

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

**9,218**

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

Debrecen, 2021.03.11.

