

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Sipeki Nóra

Témavezető: Dr. Papp Mária



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2016

Tartalomjegyzék

1.Összefoglalás	5
2.Summary	7
3.Rövidítések jegyzéke	9
4.Bevezetés	11
5. Irodalmi áttekintés	14
5.1 Gyulladásos bélbetegségek (IBD).....	14
A bakteriális transzlokáció szerepe az IBD patogenezisében.....	14
Szerológiai markerek jelentősége IBD-ben	14
Anti-foszfolipid antitestek (APLA)	15
Pankreász ellenes antitestek (PAb)	19
A kutatás jelentősége IBD-ben	23
5.2 Májcirrhosis.....	24
Szerzett immundeficiencia májcirrhosisban.....	24
A bakteriális transzlokáció szerepe májcirrhosisban.....	25
Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA)	29
A kutatás jelentősége májcirrhosisban.....	34
5.Célkitűzések	35
6.Methodikák	37
7.1 Betegek	37
7.1.1 Gyulladásos bélbetegek.....	37

7.1.2 Májcirrhotikus betegek	46
7.2 Laboratóriumi módszerek.....	50
7.2.1. Anti-mikrobiális antitestek mérése.....	50
7.2.2. Autoantitestek mérése.....	51
7.2.2.1. Az Anti-foszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata.....	51
7.2.2.2. Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata	52
7.2.2.3. Az Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata.....	56
7.2.2.3.1. Az ANCA mérése indirekt immunfluoreszcens technikával	56
7.2.2.3.2. Az IgA típusú ANCA karakterizálása a cirrhotikus betegekben (6. ábra)	56
7.2.2.3.3. Az IgA-típusú ANCA antigén specificitásának meghatározása ELISA technikával.....	58
7.2.3. Genetikai vizsgáló eljárások.....	60
7.2.3.1 NOD2/CARD15 polimorfizmusok (SNP8, 12, 13 mutációk) kimutatása	60
7.3 Statisztikai analízis.....	61
7.4 Etikai engedélyek.....	62
7.5 Anyagi források.....	62
8. Eredmények.....	63
8.1 Anti-foszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata IBD-ben.....	63
8.1.1 Az APLA markerek gyakorisága IBD-ben	63
8.1.2 Az APLA pozitivitás összefüggései más szerológiai markerekkel és a NOD2/CARD15 genotípusokkal CD-ben.....	63
8.1.3 Az APLA pozitivitás összefüggései a betegség aktuális klinikai, laboratóriumi, illetve endoszkópos aktivitásával.....	65
8.1.4 APLA markerek és a betegség progressziójának összefüggései CD-ben.....	67
8.1.5 APLA markerek és tromboembóliás események IBD-ben	72

8.1.6 Az APLA markerek stabilitása	74
8.2 Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata IBD-ben.....	76
8.2.1 PAb gyakorisága IBD-ben	76
8.2.2 PAb képződésének összefüggése a teljes betegség tartammal CD-ben: a PAb stabilitása CD-ben.....	76
8.2.3 PAb prognosztikai értéke a betegség lefolyás előrejelzésében CD-ben	79
8.2.4 A PAb pozitivitás összefüggései a Crohn betegség klinikai, szerológiai és genetikai jellemzőivel.....	84
8.2.5 Az anti-GP2 antitestek interassay vizsgálata	87
8.3 Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata májcirrhotikus betegekben	88
ANCA előfordulási gyakorisága krónikus májbetegekben	88
Az IgA típusú ANCA karakterizációja májcirrhotosisban.....	90
Az ANCA jelenlétének összefüggései a betegség súlyosságával, a betegség specifikus szövődmények megjelenésével, illetve az anti-mikrobiális szerológiai/immunválasszal cirrhotikus betegekben.....	90
Bakteriális fertőzések: általános jellemzők	94
A klinikailag jelentős bakteriális fertőzések klinikai és laboratóriumi prediktorai.....	94
Klinikai és laboratóriumi paraméterek, melyek összefüggést mutattak az első klinikailag jelentős bakteriális fertőzésig eltelt idővel.....	95
Túlélési analízis.....	96
9. Megbeszélés.....	99
9.1 Anti-fosfolipid antitestek vizsgálata IBD-ben	99
9.2 Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata IBD-ben.....	103
9.3 Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata májcirrhotikus betegekben ..	107

10. Főbb új tudományos eredmények.....	114
11. Irodalomjegyzék	122
11.1 Felhasznált irodalom	122
11.2 Saját közlemények jegyzéke	133
12. Tárgyszavak.....	141
13. Köszönetnyilvánítás.....	142
14. Függelék	147

1. Összefoglalás

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

CÉLKITŰZÉSEK:

(I) Prospektíven követetett nagy esetszámú gyulladásos bélbeteg kohorszban (n= 458) vizsgáltuk a különféle target specifikus pankreász ellenes antitestek (PAb), valamint antifoszfolipid antitestek (APLA) (1) előfordulási gyakoriságát; (2) új diagnosztikai tesztek közötti egyezést a PAb-ok esetében; (3) antitestválasz hosszú távú stabilitását; (4) képződésének összefüggését a Crohn-betegség [CD] klinikai, szerológiai és genetikai jellegzetességeivel; (5) prognosztikai értékét a betegséglefordulás előrejelzésében CD-ben (betegség specifikus szövődmények, rezekciós műtétek).

(II) Nagyszámú, különböző etiológiájú, prospektíven követett májcirrhosisos beteganyagon (n=385) vizsgáltuk a szérumban IgA és IgG típusú anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) előfordulási gyakoriságát, típusát és mintázatát. Megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e kapcsolat az ANCA jelenléte és a betegség súlyossága ill. portális hipertenzió jelenléte között

májcirrhosisban. Elemeztük, hogy az ANCA jelenléte – mint BT marker – kockázati tényező-e a májcirrhosisos betegek klinikailag jelentős bakteriális fertőzéseinek kialakulásban. Vizsgáltuk a cirrhosishoz társuló ANCA eredetét.

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

KÖVETKEZTETÉSEK: A disszertáció alapját képező három prospektív klinikai tanulmány eredményeit az alábbiak szerint foglalhatjuk össze. **(I)** Fokozott APLA képződést észleltünk CD betegekben, viszont ezen APLA-k jelenléte nem mutatott összefüggést a klinikai fenotípussal, a betegségfolyással, illetve a vénás trombotikus események kialakulásának kockázatával a prospektív követés során. **(II)** A target specifikus PAb-ok összefüggést mutattak CD-ben mind a szövődményes luminális betegség fenotípus, mind pedig a perianális szövődmény kialakulásának kockázatával. Ezek alapján hasznos kiegészítő eszközként szolgálhatnak a szerológiai panelek tagjaiként már a betegség felismerésekor a CD betegek stratifikációjában **(III)** Az IgA típusú ANCA jelenléte gyakori volt cirrhosisos betegekben és összefüggést mutatott az előrehaladott betegséggel és a portális hipertenzióval. Továbbá az ANCA IgA jelenléte független módon összefüggést mutatott a klinikailag jelentős bakteriális fertőzések kialakulásával. **(IV)** Az IgA szubtipizálás során az IgA2 szubtipusú ANCA arányának megemelkedése és a szekretoros komponens jelenléte együttesen alátámasztják a bélnyálkahártya immunrendszerének részvételét és a bakteriális alkotórészek fokozott expozíciójának trigger szerepét az ANCA képződésben májcirrhosisban.

2. Summary

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

AIMS:

(I) We investigated in a large prospective referral IBD cohort (n=458): (1) the prevalence and type of APLAs and PAbs; (2) the agreement between the new diagnostic tools for the evaluation of different target specific PAbs (3) the long-term stability of the PAbs response; (4) the association of APLAs or PAbs formation to the clinical, serologic and genetic characteristics of CD; (5) the predictive potential of the different APLAs or PAbs with regards to the development of disease specific complications or need for surgery.

(II) We investigated in a large prospective referral cohort of cirrhotic patients with different etiologies (n=385) (1) the prevalence, type and staining pattern of IgA and IgG type ANCA; (2) associations between the presence of ANCA and the disease severity or existence of portal hypertension; (3) whether presence of ANCA – as a marker of BT – is associated with the

development of clinically significant bacterial infections; and (4) the possible origin of cirrhosis-associated ANCA.

METHODS: We used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence (IIF) technique for the detection of anti-microbial- and autoantibodies.

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

3. Rövidítések jegyzéke

A.U.: arbitrary unit (tapasztalati/mesterséges egység)	CRP: C-reaktív protein
ABC: antigén-kötőhely	CUZD1: CUB zona pellucida-szerű domén 1
ACA: anti-kardiolipin	CSI: klinikailag jelentős bakteriális fertőzés
ACLF: krónikus májelégtelenségre rakódott akut dekompenzáció állapot	D1: 1-es domén
AID: aktiváció-indukált cytidindeamináz	DAMP: sejtkárosodással összefüggő molekuláris mintázat
ALD: alkoholos májbetegség	dHPLC: denaturáló nagy teljesítőképességű folyadékkromatográfia
AMA: anti-mitokondriális antitest	EGPA: eosinophilias granulomatosis polyangiitis
ANCA: anti-neutrofil citoplazmatikus antitest	ELISA: enzimkapcsolt immunsorbens vizsgálat
ANOVA: egyszempontos egytényezős varianciaanalízis	FcαRI: Fc (fragment, crystallizable) alfa receptor I
anti-PS/PT: foszfatidilszerin/protrombin komplex ellen képződő antitest	FD: fluoreszcencia denzitás
anti-β2-GPI: anti-β2-Glikoprotein-I	FITC: fluoreszcein-izotiocianát
APLA: anti-foszfolipid antitestek	GM-CSF: granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
ApoA-1: apolipoprotein A-I	GP2: glikoprotein 2
APP: akut fázis fehérjék	GP2a: glikoprotein alfa
APRIL: proliferációt indukáló ligand	GP2b: glikoprotein béta
aPS/PT: anti-foszfatidilszerin/protrombin komplex	GPA: granulomatosis polyangiitis
APS: anti-foszfolipid szindróma	HBI: Harvey-Bradshaw Index
ASCA: anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ellenes antitest	HC: egészséges kontroll
AT: artériás tromboembóliás esemény/trombózis	HCV: krónikus hepatitis C-vírusos fertőzés
BAFF: B-sejt aktiváló faktor	HDL: magas sűrűségű lipoprotein
BPI: baktericid permeabilitást fokozó fehérje	HR: kockázati arány/hányados
BT: bakteriális transzlokáció	HRP: tormaperoxidáz
c-ANCA: citoplazmatikus-ANCA	IBD: gyulladásoos bélbetegségek
NOD2/CARD15: nukleotid oligomerisatio domén/caspase recruitment domén	IgA: immunoglobulin A
CCP: komplement szabályozó fehérjék	IgG: immunoglobulin G
CD: Crohn-betegség	IIF: indirekt immunfluoreszcencia
CD40, CD86 stb.: kostimulátor molekulák (CD=cluster of differentiation)	IIFT: indirekt immunfluoreszcens módszer/technika
CI: megbízhatósági tartomány/konfidencia intervallum	IL: Interleukin
CLD: krónikus májbetegség	IL-6: interleukin-6
CLR: C-típusú lektinek	iNOS: indukálható nitrogén monoxid szintetáz
	IQR: inter quartilis tartomány
	KC: Kuppfer sejtek
	LA: lupus antikoaguláns
	LBP: lipopoliszacharidkötő fehérje
	LC: liver cirrhosis – májzsugor

LPS: lipopoliszacharid
 LSEC: máj szinuszoidális endotél sejtjei
 LTA: lipoteikolsav
 m: monomer
 MAMP: mikroba-asszociált molekuláris mintázat
 MBL: mannóz kötő lektin
 MELD: modell for end-stage liver disease
 MP: mikroszkópikus polyangiitis
 MPO: myeloperoxidáz
 mRNS: messenger RNS
 NDL: nukleotid kötő oligomerizációs domén
 (NOD)-szerű receptorok
 NET: neutrofil extracelluláris "csapdák"/neutrophyl
 extracellular trap
 NK sejtek: természetes ölő sejtek (natural killer
 cells)
 NOD: nukleotid kötő oligomerizációs domén
 NOD2: nukleotid oligomerizációs domén2
 OD: optikai denzitás
 OMP: külső membránfehérjék
 OR: esélyhányados
 PAB: pankreász acinus sejt ellenes antitest
 PAb: pankreász ellenes autoantitestek
 PAMP: kórokozó-asszociált molekuláris mintázat
 (pathogen associated molecular pattern)
 p-ANCA: perinukleáris mintázat
 PBC: primer biliáris cirrhosisban
 PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtjei
 PBS: primer biliáris cirrhosis
 PCR-RFLP: polimeráz lánreakció/ restrikciós
 fragmens hossz polimorfizmus
 PE: pulmonalis embolia/tüdőembolia
 PG: peptidoglikán
 pIgA: polimer immunoglobulin A
 pIgR: polimer immunoglobulin receptor
 PLC: foszfolipáz C
 PMN: polimorfonukleáris leukocita
 PR-3: proteináz-3
 PRR: mintázatfelismerő receptor (pattern
 recognition receptor)
 PSC: primer szklerotizáló cholangitis
 SBP: spontán bakteriális peritonitis
 SC: szekretoros komponens
 sCD89: szolubilis CD (cluster of differentiation) 89
 SD: standard deviáció
 SES-CD: egyszerűsített endoszkópos pontrendszer
 Crohn-betegségben
 sIgA: szekretoros immunoglobulin A
 SNP: egy pontos nukleotid polimorfizmus
 SR: scavenger receptorok
 TBB-5: 5-ös izotípusú humán β -tubulin
 TE: tromboembóliás esemény
 TGF: transzformáló növekedési faktor
 TLR: toll-szerű receptorok (toll like receptor)
 TMB: tetrametilbenzidin
 TNF- α : tumor nekrosis faktor-alfa
 UC: colitis ulcerosa
 VT: vénás tromboembóliás esemény/trombózis
 vWF: von Willebrand faktor
 β_2 -GPI: β_2 -Glikoprotein I

4. Bevezetés

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

A PRR-ok különféle formában, szervezet szerte megtalálhatóak: egyrészt szabadon mozgó fehérjék (oldott elemek), másrészt a természetes immunrendszer sejteinek felszínén megkötött vagy a sejtek belsejében, intracellulárisan előforduló receptorok. Minden olyan helyen nagy számban fellelhetőek, amely a mikroorganizmusok számára belépési kaput jelent az emberi szervezetbe. A különféle PRR-ok közé tartoznak a toll-szerű receptorok (TLR), a scavenger receptorok (SR), a C-típusú lektinek (CLR), a nukleotid kötő oligomerizációs domén (NOD)-szerű receptorok (NDL), valamint $\alpha 2$ -integrinek. Működésük alapján két fő csoportba sorolhatóak. A sejthez kötött elemek egyrészt endocitotikus, másrészt jelátvivő receptorok és a gyulladáshoz vezető válasz beindításában, valamint a következményes sejtaktivációban van jelentős szerepük. A szolúbilis elemek ugyanakkor az antitestek funkcionális ősei, fagocita receptorként működnek. A patogén mikróbáknak vagy azok termékeinek a fagociták által történő felvételét közvetlenül, opszoninok jelenléte nélkül is segítik és aktiválják a komplement rendszert. A szolúbilis PRR-ok egy része a neutrofilek granulumaiban raktározódik és a granulocitákat érő stimulus hatására azonnal, percekben belül,

kibocsájtásra kerül az extracelluláris térbe. Másik részük, mint korai géntermék, a mononukleáris és a dendritikus sejtekben újonnan szintetizálódnak. Mindkét esetben a szolúbilis PRR-ok lokálisan, az immunrendszert ért támadás helyszínén képződnek. Fontos azonban, hogy a szolúbilis PRR-ok egyben akut fázis fehérjék (APP) is, késleltetett formában, szisztémásan is képződnek, távol a gyulladás helyétől. Forrásuk bizonyos szövetekben (mint pl. máj) az epitél sejtek. Szintézisüket elsősorban az interleukin (IL)-6, kisebb mértékben az IL-1 és a tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α) fokozzák.

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

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

A PRR-ok által felismert sejt felszíni mikrobiális alkotóelemek ellen a szervezetben antitestek is képződhetnek, melyek szerológiai módszerekkel kimutathatóak. Az **anti-mikrobiális antitestek** közül a legismertebb és legtöbbet vizsgált antitest az **anti-Saccharomyces cerevisiae ellenes antitest (ASCA)**, mely a mikrobák mannóz sejt fal komponense ellen termelődik. Az ASCA-hoz képest az egyéb sejt felszíni glikán komponensek ellen képződő antitestek (**anti-glikán antitestek**) előfordulási gyakorisága lényegesen ritkább. Antitestek ugyanakkor nemcsak a mikrobák szénhidrát, hanem fehérje komponensei ellen is termelődhetnek. A baktériumok külső membrán proteinjei ellen képződő antitestek **anti-OMP antitest** néven ismertek. Az anti-mikrobiális antitestképződés oka és annak pontos mechanizmusa nem ismert. Gyakoribb képződésüket megfigyelték bizonyos funkcionális következménnyel járó variáns PRR genotípusok esetén (MBL deficiencia, NOD2 variánsok). Ezen megfigyelés és az anti-mikrobiális antitestek jellegzetes betegcsoportokban történő előfordulása felveti annak lehetőségét, hogy az antitestképződés

egyik lehetséges oka a genetikai alapon létrejövő bélflóra elleni immuntolerancia vesztes. Újabb irodalmi adatok alapján az emberi szervezet bizonyos fehérjéi ellen kialakult antitestek (**autoantitestek**) jelenléte szintén tükrözheti a szervezetnek a bél mikroflórájára adott rendellenes immunválaszt. Az **anti-neutrofil citoplazmatikus antitest (ANCA)** képződésében szerepet játszik a molekuláris mimikri jelensége. A humán 5-ös izotípusú β -tubulin citoskeletális fehérje és a bélbaktériumok sejtfelszínén ubiquiter módon megtalálható FtsZ fehérje között nagyfokú szerkezeti hasonlóság van, mely keresztreakció kialakulásához szolgálhat alapul. A **pankreász acinus sejt ellenes antitest (PAb)** antigénjéről, a glikoprotein 2 (GP2)-ről, pedig igazolódott, hogy egy intesztinális receptorfehérje, mely a bélbaktériumok érzékelésében vesz részt. Elképzelhető, hogy egy bakteriális komponens és a GP2 együttese a valódi antigén.

Klinikai kutatásunk során két olyan gasztroenterológiai betegcsoportot (**májcirrhosis, gyulladós bélbetegségek [IBD]**) választottunk ki, ahol a betegség patogenezisében és a kórlefolyás során a szövődmények kialakulásában jelentős szerepet játszik a veleszületett immunrendszer működészavara. A három kórkép további közös jellemzője, hogy a vékonybélgyulladás következtében létrejövő strukturális és funkcionális károsodás, a bélnyálkahártya csökkent védekezőképessége és a megváltozott bélflóra együttesen krónikus bakteriális transzlokációhoz (BT) vezetnek. A különféle lumenális baktériumok és/vagy bakteriális termékek kontrollálatlan felvétele tovább súlyosbítja a már zajló lokális és szisztémás proinflammatorikus folyamatokat elősegítve ezáltal a betegség súlyosbodását és a szövődmények kialakulását.

5. Irodalmi áttekintés

5.1 Gyulladásos bélbetegségek (IBD)

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

A bakteriális transzlokáció szerepe az IBD patogenezisében

Annak ellenére, hogy az utóbbi évek kutatásai számos új aspektusát tárták fel a Crohn-betegségnek, az etiológia egyes pontjai továbbra is tisztázatlanok maradtak. A genetikai és környezeti faktorok mellett a lumenális flórának is szerepe van a krónikus intesztinális gyulladás patogenezisében (1). CD-ben szenvedő betegek esetén a mucosális immunitás zavara (2), valamint a bélnyálkahártya barrier integritásának megbomlása (3) antigének és proinflammatorikus molekulák, többek között lumenális baktériumok és bakteriális termékek kontrollálatlan felvételét eredményezheti a bélumenből. A fokozott bakteriális transzlokáció (BT) következtében túlsúlyba kerülő proinflammatorikus folyamatok pedig a szövetkárosodást tovább súlyosbítják.

Szerológiai markerek jelentősége IBD-ben

A fokozott (szerológiai) antitestképződés jól ismert jellemzője az IBD-nek. Számos anti-mikrobiális és autoantitestek esetében találtak összefüggéseket akár CD-vel, illetve UC-vel (4), akár a szövődményes betegségforma kialakulásával. Szérum mintákból kimutatható különféle antitestek szerepe az IBD diagnosztikájában, differenciál diagnosztikájában, illetve a betegség lefolyás, valamint a terápiás válasz előrejelzésében már bizonyított (5). Keresztmetszeti, longitudinális (hosszútávú követéses) vizsgálatok és meta-analízisek révén nyert bizonyítékok is támogatják a különféle szerológiai markerek szerepét a szövődményes betegségforma kialakulásának, illetve a magas műtéti rizikó előrejelzésében CD-ben. Jelenleg CD-ben az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest (ASCA) számít a legmegbízhatóbb markernek, míg a többi ismert marker esetén kérdéses, hogy ezek vajon képesek-e azonosítani a CD betegek specifikus alcsoportjait (4).

Az anti-mikrobiális antitestek a különböző bélben található mikrobák sejtfelszíni szénhidrát komponensei (6) (anti-glikánok), illetve fehérje antigénjei (7) ellen képződnek. Közülük az elsőként azonosított és jelenleg legjelentősebb anti-mikrobiális antitest az ASCA. **Az autoantitestek** pedig különböző, a szervezet saját fehérjéi ellen képződnek. Újabb kutatási eredmények szerint felmerül, hogy egyes autoantitestek jelenléte összefügghet a bélrendszer veleszületett immunrendszerének zavara következtében a bél felől kialakuló fokozott mikrobiális expozícióval (8, 9), illetve ezzel összefüggésben az ezáltal triggerelt felfokozott adaptív immunválasszal. Emellett ezek a szerológiai antitestek aktív szerepet játszhatnak a gyulladás patofiziológiájában IBD-ben (10, 11).

Anti-foszfolipid antitestek (APLA)

Az anti-foszfolipid antitestek az autoantitesteknek egy protrombotikus csoportja, melyek az anti-foszfolipid szindróma (APS) szerológiai markereiként kerültek be a köztudatba (12). Ebbe a csoportba tartozik az **anti-kardiolinin (ACA)**, az **anti- β 2-Glikoprotein-I (anti- β 2-GPI)**, és a **foszfatidilszerin/protrombin komplex ellen képződő antitest (anti-PS/PT)**. APLA-k jelenlétét számos más betegségben (krónikus gyulladásos betegségekben (13-16) és posztinfekciózus állapotokban (17-20)) is kimutatták, ahol nem feltétlenül rendelkeztek protrombotikus aktivitással. Természetesen protrombotikus aktivitás hiányában is lehet ezeknek az antitesteknek meghatározott patogenetikai szerepe számos más betegségben az APS-n kívül (21, 22).

IBD-ben a jelenleg rendelkezésre álló, az APLA-k különféle aspektusait vizsgáló keresztmetszeti tanulmányok igen eltérő következtetésekre jutottak ezen antitestek képződését, előfordulási gyakoriságát és időbeli stabilitását illetően. Az APLA-k klinikai jelentősége IBD-ben, beleértve a trombotikus eseményekkel való összefüggésüket egyelőre nem egyértelműen tisztázott (23-37), amint az az összefoglaló **1. táblázatból** ki is tűnik. Így ezen elsődleges APLA-k átfogó, minden részletre kiterjedő elemzése egy nagy esetszámú, prospektíven követett IBD kohorszban hiánypótlónak számít.

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

A komplement szabályozó fehérjék (CCP) szupercsaládjába tartozó **β 2-Glikoprotein I (β 2-GPI)** elsősorban a hepatocitákban szintetizálódik és magas koncentrációt ér el a szérumban. Ezen kívül a β 2-GPI messenger RNS (mRNS)-ének jelenlétét számos szövetben is kimutatták, így többek között az antifoszfolipid-szindrómában szerepet játszó endotél sejtekben, astrocitákban, illetve neuronokban is (46). A β 2-GPI öt alegységből álló fehérje. A különböző domének a fehérje eltérő funkcióiért felelősek, így az 1-es domén (D1), mely az extracelluláris térbe nyúlik, más plazmafehérjékkel és antitestekkel lép interakcióba, míg a D5 az anionos foszfolipid membránok és különböző receptorok, mint például TLR-ok kötéséért felelős (47). A β 2-GPI veleszületett immunitásban betöltött szerepére utal bakteriális LPS semlegesítő funkciója, mely a D5 és az LPS közvetlen interakciója révén valósul meg (48). Megerősítésre várnak tehát ebből kiindulva azok a feltételezések, melyek szerint akár a β 2-GPI csökkent szintje, akár funkciózavara károsíthatja a szervezet baktériumokkal szembeni védekezőképességét.

A fehérje elleni antitestek kialakulása ismert folyamat, a mechanizmus részletei azonban még nem teljesen tisztázottak. A β 2-GPI gén polimorfizmusainak szerepe lehet a fehérje immunogenitásában, illetve más plazmafehérjékkel való interakciókban. Tanulmányok igazolták, hogy a D5 alegység kódoló régiójában a Val/Leu²⁴⁷ egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP) gyakoribb és reaktívabb anti- β 2-GPI antitest képződéssel jár (49, 50). Az anti- β 2-GPI antitestek az APS szerológiai markerének tekinthetők. Ezek az antitestek ún. „funkciónyerő” (gain-of-function) antitestek, melyek endotélsejtek, monociták és trombociták aktivációja révén ezen sejtek proinflammatorikus, proadhezív és prokoaguláns fenotípusainak megjelenését segítik elő. Ugyanakkor az antitestek jelenléte mellett egy második trigger tényezőre, leggyakrabban egy gyulladásos eseményre is szükség van az érrendszerben lezajló kóros folyamatok beindításához (51). Az anti- β 2-GPI antitestek beavatkoznak a fiziológiás hemosztázisba azáltal, hogy felfüggesztik a β 2-GPI gátló hatását a von Willebrand faktor (vWF)-függő trombocita adhézióra és aggregációra, így a keringő aktív vWF (52) emelkedett szintje a trombotikus folyamatok felé billenti a hemosztázist. Jellemzőes klinikai manifesztációval rendelkeznek az anti- β 2-GPI antitestek különböző altípusai, így a D1

alegység ellen képződő antitestek egyaránt fokozzák a vénás és artériás tromboembóliás események rizikóját, míg a D4/5 alegységek ellen képződő antitestek egyes non-trombotikus állapotok kialakulásáért felelősek (53). Bár ez utóbbi csoport szerepköre kevésbé jól definiált.

Az anti- β 2-GPI antitestek tehát az APS-en kívül számos más, nem feltétlenül trombotikus kórképben is szerepet játszanak (21), így többek között IBD-ben is. Az anti- β 2-GPI antitestek valós prevalenciája és szignifikanciája IBD-ben azonban jelenleg nem teljesen tisztázott (54). APS-ben kimutatták β 2-GPI és *Saccharomyces cerevisiae* keresztreakáló epitópok jelenlétét (55). Papp és mtsai egy előzetes tanulmányban, CD-ben szenvedő betegek körében fokozott anti- β 2-GPI antitestképződést mutattak ki, mely szignifikánsan korrelált az ASCA jelenlétével, valamint a betegség súlyosságával (56). Mindez arra enged következtetni, hogy az anti- β 2-GPI antitestek önmagukban, illetve ASCA-val keresztreakálva felerősíthetik CD-ben az intesztinális mikrovaskulátúrában zajló patológiás folyamatokat azáltal, hogy felfüggesztik a β 2-GPI vWF-függő vérlemezke adhézióra és aggregációra gyakorolt gátló hatását. A gyulladás és a véralvadás szorosan összefüggő, egymással kölcsönhatásban lévő folyamatai a mikrovaskulátúrának. Mucosalis szinten a koagulációs zavarok mikrotrombus képződéshez vezetnek, mely jól ismert komponense a CD patogenezisének, valamint szerepet játszik többek között a betegség progressziójában is (57). Elméletileg az anti- β 2-GPI antitestek jelenlétében a β 2-GPI veleszületett immunitásban betöltött meghatározott funkciói is zavart szenvedhetnek, mely szintén hozzájárulhat az IBD-ben zajló patológiás kórfolyamatok kialakulásához, illetve azok fenntartásához. A β 2-GPI fehérjének ugyanis fontos szerepe van a veleszületett immunitásban LPS „scavenging” („utcaseprő”) funkciója által, mely a β 2-GPI 5-ös domén (D5) és LPS közötti interakció révén valósul meg (48, 58).

Pankreász ellenes antitestek (PAb)

Az exokrin pankreász acinus sejtjei ellen képződő autoantitestek fokozott képződését már korábban kimutatták CD-ben, illetve coeliakiában (59). A PAb jelenlétét először 1980-ban fagyasztott humán pankreász metszeteken mutatták ki indirekt immunfluoreszcens technikával (IIF) (60), majd ezt követően főemlős pankreász szövet szubsztrátokkal egyetemben a PAb kimutatás elsődleges diagnosztikai tesztjének számít napjainkig. Két festődési mintázat - nevezetesen retikulogranuláris és cseppszerű - különböztethető meg IIF módszerrel, melyek azonos gyakorisággal fordulnak elő. Irodalmi adatok szerint a PAb-ok előfordulási gyakorisága CD betegekben 40% körüli. Ezen antitestek az IBD-ben szenvedő

betegek differenciáldiagnosztikájában (CD vs. UC) bizonyultak alkalmazhatónak (4). Mindemellett néhány tanulmány, köztük egy nagyobb betegszámú vizsgálat összefüggést talált a PAb-ok jelenléte és egyes specifikus betegség fenotípusok között, mely felvetette, hogy ezen antitestek meghatározásának klinikai jelentősége lehet (61, 62).

Annak ellenére, hogy a PAb-ok viszonylag korán felfedezésre kerültek, az autoantigének meghatározása közel 20 évet váratott magára, ezáltal hátráltatva ezen antitesteknek a CD immunpatogenezisében betöltött szerepének további vizsgálatát. Nemrégiben két egymástól független kutatócsoportnak különböző módszerek alkalmazásával sikerült azonosítani a PAb-ok cél antigénjeként a hasnyálmirigy zimogén granulumainak membránjában található fő alkotó glikoproteint, nevezetesen a glikoprotein 2-t (GP2) (63, 64). *Komorowski és mtsai.* egy másik hasonlóan releváns cél antigénjét is azonosítottak, a CUB zona pellucida-szerű domén 1-t (CUZD1). Mindemellett ezen tanulmány keretében igazolták, hogy a humán pankreászból készült szövettani metszeteken IIF módszerrel látható immunfluoreszcens mintázatok közül a retikuloendoplazmális típus szoros összefüggést mutatott az **anti-CUZD1** antitestek jelenlétével, míg **anti-GP2 antitest** pozitívitás esetében cseppszerű festődés volt megfigyelhető (65). További vizsgálatok igazolták, hogy a GP2 és a CUZD1 a veleszületett és szerzett immunitásban szerepet játszó fehérjecsaldók tagjai (66, 67) és feltételezhetően a kommenzális flóra tagjaival szembeni tolerancia, illetve a patogénekre adott immunválasz közötti egyensúly fenntartásában játszanak szerepet (11).

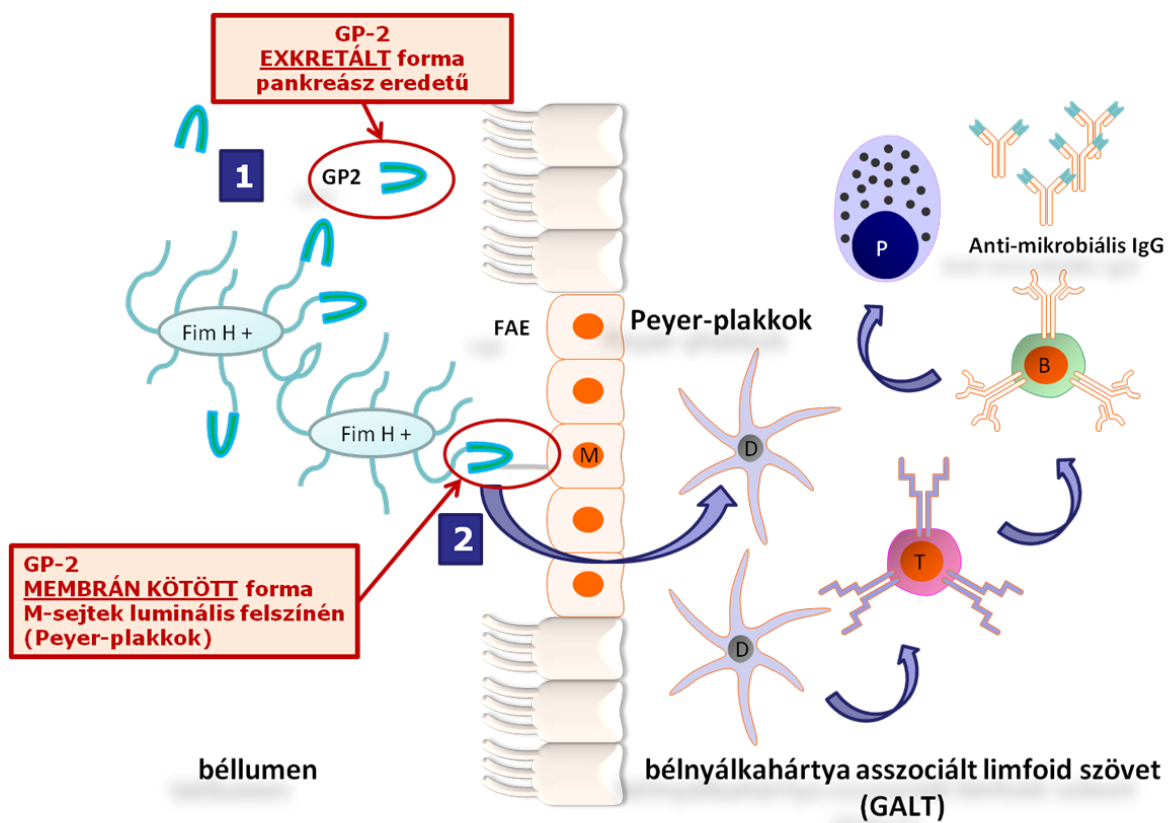
Ezeknek az újonnan felismert autoantigéneknek az azonosítása új diagnosztikus módszerek fejlesztését segítette elő, többek között például a 4-es izoformájú rekombináns GP2-t tartalmazó enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálatot (ELISA) (68) vagy CUZD1-t és GP2-t expresszáló sejt alapú IIF technikát (69). Ezekkel az újonnan elérhető PAb kimutatásra alkalmas technikákkal egyelőre igen kevés a tapasztalat, különös tekintettel ezeknek a PAb-oknak a CD-ben játszott klinikai jelentőségére. Az eddigi CD-ben végzett klinikai tanulmányok elsősorban rekombináns GP2- alapú ELISA rendszert alkalmaztak. Ezzel szemben az anti-CUZD1-gyel kapcsolatosan igen limitált információk állnak rendelkezésre (65) és az anti-CUZD1 antitestek meghatározásnak hiányában ezekben a tanulmányokban a PAb szeroreaktivitás több mint fele hiányzik. Néhány tanulmányban az anti-GP2 antitestek jelenléte összefüggést mutatott a perianális betegséggel szövődött strikturizáló betegségforma kialakulásával (10, 70, 71), míg más tanulmányokban ez nem igazolódott (72). Ezen tanulmányokban korlátozó tényező a keresztmetszeti vizsgálati jelleg. A PAb-ok pontos klinikai jelentőségének megítélésére a CD betegségfolyásának előrejelzésében hosszútávú

longitudinális követéses vizsgálatok szükségesek. Emellett a PAb-ok hosszú távú stabilitása szintén tisztázandó kérdés.

Jelentős mennyiségű PAb antigén választódik ki az exokrin pankreászból a bélumenbe az emésztőenzimokkal egyetemben, melyek a veleszületett és szerzett immunitásban közreműködő fehérjecsaládok tagjai (10, 59). Feltehetőleg a GP2 és a CUZD1 a kommenzális baktériumokkal szembeni tolerancia és a kórokozókra adott immunválasz közötti egyensúly fenntartásában játszik szerepet (71). A GP2-vel kapcsolatosan viszonylag több adat áll rendelkezésre, jelenlétét a gyulladt bélben CD betegeknél már kimutatták (72). Ez a fehérje képes szelektíven kötni a kommenzális és patogén bélbaktériumok bizonyos alcsoportjait, többek között az *Escherichia coli*-t is, a baktériumok külső membránjában található I-es típusú pilusok FimH komponensének felismerése révén (73, 74). GP2 expresszálódik a Peyer-plakkok (folliculusokhoz asszociált epithelium) M-sejtjeinek apikális felszínén az egészséges bélnyálkahártyában (66, 67, 75), ahol mucosális antigének transzcitotikus receptoraként funkcionál, és ezáltal az I-es típusú pilusokkal rendelkező baktériumok elleni mucosális immunválasz iniciációjában kulcsfontosságú szerepet tölt be. A GP2 továbbá a pankreász acinussejtjeinek zimogén granuláinak fő membránfehérjéje (76). A pankreásznedv alkotó részeként a bélumenbe szekretált GP2 az I-es típusú pilussal rendelkező baktériumok szolubilis receptoraként funkcionál. Ezen glikoproteinek ellen képződő autoantitestek egyrészt interferálhatnak egyes veleszületett immunmechanizmusokkal, másrészt akár tükrözhetik a fokozott mikrobiális terhelésnek kitett bél barrier által kiváltott immunválaszt is. Feltételezésünk szerint a GP2 ellen képződő antitestek gátolják a szolubilis receptor baktériumkötő képességét, mely miatt a bélnyálkahártya fokozott bakteriális expozíciónak van kitéve. Feltételezhető, hogy anti-GP2 jelenlétében fokozódik az M-sejtekbe történő baktériumtranszcitózis, s így fokozódik a dendritikus sejtek felé történő antigén prezentáció is, ezáltal beindítva antigén-specifikus mucosális immunválaszt, köztük IgA⁺ B-sejtek képződését is. Mindez a baktériumok fokozott invázióját eredményezi az intesztinális lamina propria-ba. Ezen feltételezésünk azonban további megerősítésre vár. **(1.ábra)**

1. ábra A Glikoprotein 2 (GP2) fiziológiás szerepe a béltraktusban: (1) antimikrobiális és (2) immunmoduláns hatás (11)

A GP2 a pankréász zimogén granulumainak glikozilált membrán fehérjéje (exkretált forma), ugyanakkor megtalálható a Peyer-plakkok M-sejtjein is, mint transzcitotikus receptor (membránkötött forma). Mind az exkretált, mind pedig a membránkötött forma képes az I-es típusú bakteriális fimbriákhoz való kötődésre. A GP2 ezáltal fontos szerepet játszik a kommenzális baktériumokkal szembeni immuntolerancia fenntartásába, illetve az enterális patogénekkal szembeni immunválasz kialakulásában.



A kutatás jelentősége IBD-ben

Mind CD-ben, mind UC-ben a betegség klinikai megjelenése és a betegség lefolyása rendkívül változatos, és a betegség előrehaladtával változik. A klinikai gyakorlat szempontjából nagy jelentőséggel bírnak azok a biomarkerek, melyek segítséget nyújtanak a betegség kimenetelének előrejelzésében. Az utóbbi években az érdeklődés középpontjába került olyan klinikai és laboratóriumi (szerológia és genetikai) tényezők felkutatása, melyek segítséget nyújthatnak a klinikusok számára azon betegek kiszűrésében, akik fokozott kockázattal rendelkeznek a betegség progressziójára nézve. Mindez lehetővé tenné, hogy betegekre szabottan a lehető legkorábban és a legmegfelelőbb terápiás algoritmus illetőleg betegkövetési terv kerüljön kiválasztásra és alkalmazásra. CD és UC esetén a komplexitás nem csak magára a betegség klinikai megjelenésére vonatkozik, hanem a betegség hátterében meghúzódó patogenetikai mechanizmusokra is. Mivel az IBD kialakulásának pontos oka(i) és mechanizmusa(i) jelenleg nem tisztázott(ak), így minden feltételezett patogenetikai komponens szerepe körültekintő vizsgálatot igényel, jelentőséggel bír. Azon környezeti tényezők, melyeknek szerepük lehet a krónikus intesztinális gyulladás fenntartásában különösen figyelmet érdemelnek az IBD krónikus jellegét tekintetbe véve. A véralvadási rendszer dinamikus részét képezi a krónikus intesztinális gyulladás folyamatának, és így fontos eleme az IBD patogenezisének. Tekintve, hogy egyelőre csak korlátozott adat áll rendelkezésre a véralvadási rendszer és a veleszületett immunrendszer sejtjei közötti kapcsolatáról, így ez a terület ígéretes célpontja lehet az IBD kutatásoknak.

5.2 Májcirrhosis

A májcirrhosis klinikai megjelenése és a betegség lefolyása változatos. A hullámzó betegség lefolyás során alapvetően két különböző klinikai entitással kell számolnunk, melyek esetén eltérő immun patogenetikai folyamatok kerülnek előtérbe. A májműködés akut rosszabbodása során kialakuló állapot (ACLF, krónikus májelégtelenségre rakódott akut dekompenzáció állapot) sok esetben szervelégtelenséggel jár, míg a májműködés krónikus rosszabbodása esetén a májfibrózis progressziója és a szövődmények kialakulása uralja a kórképet. (77)

Szerzett immundeficiencia májcirrhosisban

A májcirrhosis a leggyakoribb szerzett immundeficiens állapot. Az immunrendszernek a kórképhez társuló működészavara „*cirrhosishoz társuló immundiszfunkciós szindróma*” (CAIDS) néven ismert (78). A természetes és az adaptív immunfunkciók zavara májcirrhosisban szerteágazó és mértéke is különböző; a zavar a felismerő-, végrehajtó- és szabályozó mechanizmusokat egyaránt érinti (79). Paradox módon bizonyos esetekben mind a gátolt, mind pedig a túlaktivált állapot párhuzamosan van jelen, mely egyfajta fogékonyságot eredményez az akut gyulladásos folyamatok kialakulásával szemben, mind lokálisan, mind pedig szisztémásan. A pro- és anti-inflammatorikus folyamatok egyensúlyzavarának egyik legszélsőségesebb formája a krónikus májelégtelenségre rakódott akut dekompenzáció állapota (ACLF). A májcirrhosishoz társuló komplex immunzavar sajátossága, hogy kedvez az akut gyulladásos folyamatok perzisztálásának és ezáltal hozzájárul a májfibrózis progressziójához és a szövődmények kialakulásához, (portális hipertenzió és hepatikus encephalopathia). A májműködés akut romlásában és krónikus rosszabbodásában azonban eltérő patogenetikai folyamatok kerülnek előtérbe (80). A fokozott BT (81) és a következményes endotoxémia, továbbá a szisztémás bakteriális fertőzések előfordulásának gyakoribbá válása mindkét klinikai esetben kiemelt fontosságú (82). A betegek immunológiai státusza a betegség lefolyása során folyamatosan változik. Az immunműködés mértékének zavara összefügg a májbetegség súlyosságával és annak etiológiájával. Minél súlyosabb a májbetegség, annál összetettebb és jelentősebb mértékű az immunzavar (83). A májcirrhosis etiológiáját tekintve ezek az elváltozások a krónikus alkoholfogyasztás esetén a legkifejezettebbek (84). Májcirrhosisban az immunrendszer szerzett működészavarai mellett, annak örökletes – a májcirrhosistól függetlenül fennálló – pl. funkcionális következményekkel

járó genetikai polimorfizmusok következtében kialakuló eltérései sokkal kifejezettebb klinikai következményekkel járnak az átlag populációhoz képest. Ennek az az oka, hogy májcirrhosisban a széleskörű szerzett immunműködés zavara miatt a kompenzációs folyamatok korlátozottak.

A bakteriális transzlokáció szerepe májcirrhosisban

A májfibrózis kialakulása összetett folyamatok eredménye, melyet a szervezet genetikai és a környezeti faktorok közötti interakciók befolyásolnak (85). Ennek az interakciónak az egyik fő színtere a gasztrointesztinalis rendszer és a bélnyálkahártya, mely az egyik legnagyobb felület, ahol a szervezet a külvilággal érintkezik. A bél lumenális flórájának a jelentős szerepe a máj krónikus gyulladásának patogenezisében nemrégiben került felfedezésre.

Intesztinális bakteriális túlnövekedés, a bél mikroba flóra összetételének megváltozása, a bél motilitás zavara, a bélnyálkahártya lokális immunzavara, valamint bélnyálkahártya barrier multifaktoriális károsodása (megnövekedett oxidatív stressz, bélnyálkahártya ödéma és ennek következtében kialakuló strukturális változások által létrehozott fokozott bél permeabilitás) együttesen patológiás BT eredményez májzsugorban (81, 86). A BT a fent leírt mechanizmusoknak köszönhetően különböző (*mikrobiális*) eredetű antigének, baktériumok (főként Gram negatívok) és bakteriális termékek (bakteriális DNS CpG motívumokkal, LPS, lipoteicholsav, teicholsav) *kontrollálatlan* felvételét eredményezi a béllumenből a szisztémás keringésbe. A fokozott BT pedig a potenciálisan immunogén bakteriális termékek szintjének emelkedéséhez vezet a szisztémás keringésben. Ehhez járul hozzá, hogy ezen bakteriális termékek eliminációja is több ponton zavart szenved májzsugoros betegekben. A máj rezidens makrofágjai, az ún. Kupffer sejtek (KC) kulcsszerepet játszanak a bakteriális termékek kiszűrésében. A máj ezen szűrő funkciója is zavart szenvedhet májzsugorban. Mindemellett az albumin fokozott oxidációja a fehérje LPS eltávolítása szempontjából jelentős ún. „scavenging” („utcaseprő”) kapacitásának csökkenését eredményezi (87). A hasonló funkciót betöltő magas denzitású lipoprotein (HDL) és apolipoprotein A-I (ApoA-1)(88) csökkent szintje is hozzájárul a bakteriális termékek megemelkedéséhez a *portális* és szisztémás keringésben.

A fokozott BT súlyosbítja a proinflammatorikus folyamatokat, mely hozzájárul a máj szövetkárosodásához, illetve annak fokozódásához (86). A máj **csillagsejtjei** egyfajta **végrehajtó** funkciót töltenek be a fibrogenézis folyamatában (89), ugyanis a máj

homeosztázisának fenntartása különböző pro- és anti-fibrotikus hatások csillagsejteken való szummációjának függvénye. A BT következtében a különféle bakteriális termékek, alkotórészek (LPS, bakteriális DNS) különböző TLR által mediált jelátviteli utakon (elsősorban TLR4 és TLR9) a csillagsejtek aktivációját eredményezik (90), mely a **profibrogenetikus folyamatok** irányába billentik el az egyensúlyt (90-92).

Intesztinális eredetű bakteriális termékek (LPS, nem metilált CpG-DNS és lipoteicholsav [LTA]), testidegen toxikus anyagok (ethanol és acetaldehidből származó adduktok) és károsodott hepatocytákból származó endogén TLR ligandok krónikus expozíciója következtében kialakuló változások a TLR jelátviteli utakban (93) jól ismert elemei a CAIDS-nak (78). A TLR2 a di- és triacil-lipoproteineket, TLR9 nem metilált CpG-DNS-t, TLR4 pedig a lipopoliszacharid (LPS) lipid A komponensét ismeri fel (81-83). A baktériumok felismerése szempontjából legjelentősebb PRR-ok, a TLR2 és TLR4 funkcionális zavara az **elnyújtott LPS expozíció** következtében szignifikáns szerepet játszik májzsugoros betegekben a **fertőzésre való fokozott hajlam** kialakulásában (94). Akut vagy krónikus hatások változásokat hoznak létre a máj parenchymás és nem parenchymás sejteinek, illetve perifériás vér mononukleáris sejteinek (PBMC) TLR expressziójában. LPS és más TLR ligandok különböző jelátviteli utak aktiválására képesek immun és nem immunsejtekben, melyek pro-inflammatorikus és pro-fibrogenetikus kaszkádot indítanak be akut körülmények között. Ezzel párhuzamosan anti-inflammatorikus és anti-fibrogenetikus folyamatok is jelen vannak, hogy ellensúlyozzák az ellentétesen ható mechanizmusokat, így a máj homeosztázisának és az immuntolerancia fenntartását támogatják.

Ismétlődő stimuláció alacsony dózisu LPS-sel ún. csökkent LPS-re adott válaszkészséget, másnéven **LPS toleranciát** eredményez monocytákon, Kupffer sejteken (KC) és a máj szinuszoidális endotél sejtein (LSEC) *in vitro* körülmények között (95). A **monociták** funkcionális deaktivációját, mely hasonlít az *in vitro* LPS toleranciára, leírták Child C stádiumú májzsugorban és ACLF-ben szenvedő betegek esetén (96-99). Ezt a jelenséget a szakirodalom „**immunparalízisnek**” hívja, és a monociták HLA-DR expressziójának down-regulációjaként definiálja. *Lin és mtsai* az „immunparalízis” hátterében a krónikus endotoxémia, mint etiológiai faktor jelentőségét bizonyították (98). A szérumban LPS szintek HLA-DR expresszióval fordított módon korreláltak, míg pozitív összefüggés volt megfigyelhető az anti-inflammatorikus hatású szérumban IL-10 szinttel. Ezt a megfigyelést támasztja alá, hogy *in vitro* LPS stimuláció képes volt szupprimálni a HLA-DR expressziót egészséges egyénekből származó monocytákon IL-10 függő módon. Májcirrhosisos

betegekből származó alacsony HLA-DR expressziót mutató monociták esetén csökkent TNF- α szekréciós kapacitást figyeltek meg, melyet az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) és egyes kostimulátor molekulák (CD40, CD86) csökkent expressziója kísért. A HLA-DR expresszió csökkenése (<40%) ezeken felül összefüggött ACLF-es betegekben a negatív végkimenetellel (96, 97), főként azokban az esetekben, ahol a monociták nem mutattak javulást HLA-DR expresszió szempontjából. Az összesített prognosztikai ereje azonban alulmarad a konvencionális markerekkel szemben (100). A 40% alatti HLA-DR expresszió által meghatározott 90 napos mortalitás 80%-os specificitással és 59%-os szenzitivitással jellemezhető májzsugoros betegekben (100). Összefoglalva az “immunparalízis” anti-inflammatórikus folyamatok dominanciájával (emelkedett szérum IL-6 és IL-10 szintekkel) és a pro-inflammatórikus folyamatok gátlásával (csökkent TNF- α szintekkel) jár (96-99). Nagyon hasonló jelenséget figyelhetünk meg neutrofil granulociták esetében, mely szintén a fokozott BT etiológiai szerepére utal a **“májcirrhosishoz társuló immunológiai disszonanciában”** (98).

Májcirrhosisban a **neutrofil granulociták** (PMN: polimorfonukleáris leukociták) aktivált állapotban vannak jelen a keringésben, melynek hátterében a fokozott endotoxin expozíció áll (92). A neutrofilek folyamatos aktiváltsága ugyanakkor a sejtek kimerülését is eredményezi, egyfajta „energiaszegény” állapotát jön létre és károsodnak a különféle sejtfunkciók (csökkent kemotaxis, fagocitózis és baktericid kapacitás) (93-95). Májcirrhosisban az endotoxin eltávolítása mind *in vitro* (96), mind pedig *in vivo* (97) körülmények között képes volt helyreállítani a neutrofil granulociták működését. Fokozott primingot (98) és az ennek következtében létrejövő “készenléti” állapotát a PMN-eknek jelzik a csökkent L-szelektin szintek, a hidrogén peroxid overexpressziója és a neutrofil elasztáz emelkedett szintje (99). Ez a baktériumok legyőzésére irányuló „készenléti” állapot és a magas „respirációs burst”-tel járó PMN aktiváció (100) a károsító reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyiségének megemelkedését eredményezi a szisztémás keringésben és a PMN-ek mikro környezetében, mely további sejt- és szövetkárosodás alapjául szolgálhat. Szükségszerűen egy idő után a PMN-ek kimerülnek, „energiaszegény” állapotba kerülnek és képtelenek lesznek megfelelő módon reagálni további bakteriális stimulusokra fagocitózissal (93, 94). A zavart tuftsin aktivitás (101), alacsony nátrium- és emelkedett ammóniaszintek (102, 103) együtt a nem megfelelő szuperoxid anion képzést eredményező elégtelen foszfolipáz C (PLC) működéssel (104) mind hozzájárulnak a csökkent PMN fagocita kapacitáshoz. A megnövekedett nyugalmi oxidatív burst és a csökkent fagocita kapacitás

összefüggést mutat a fertőzések gyakoriságával és a halálozással (96). Ezek a változások helyreállíthatónak bizonyultak *in vitro* körülmények között az endotoxin eltávolításával (96), illetve granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor GM-CSF inkubációval (105). A természetes immunrendszer más sejtjeihez hasonlóan a neutrofilek működészavarát is az a kettőség jellemzi, hogy egyszerre van jelen egyfajta túlműködés és elégtelen működés is, mely együttesen járul hozzá a májcirrhosis patogeneziséhez. A májat infiltráló aktivált állapotban lévő neutrofil granulociták a fokozott szabadgyökképződés révén elősegítik a fibrogenezist. A májcirrhosis késői stádiumában azonban a kimerült neutrofilek a kemoattrakciós és migrációs zavar miatt kevésbé tudnak jelen lenni a zajló infekciók helyszínén.

Alkoholos májbetegségben (ALD) már régóta ismert a **B-sejtek** széles körű zavara, mely összefüggést mutat a shunt képződés és a Kuppfer sejtek működészavara következtében kialakuló fokozott antigén expozícióval (101). Számos kutatási eredmény támasztja alá, hogy a szisztémás keringésben jelen lévő bakteriális termékek alapvető szerepet játszhatnak a B-sejtek által közvetített változások kialakulásában májzsugorban. Bakteriális transzlokációval összefüggést mutató szolubilis elemek, mint például az LPS (102, 103) és bakteriális DNS (104) gyakran kimutathatók cirrhotikus betegek plazmájából és képesek *in vitro* körülmények között aktiválni a B-sejteket. A B-sejtek stimulációja különböző TLR ligandok által azok poliklonális aktivációjához és különféle immunoglobulinok (Ig) képződéshez vezet. Emberekben a TLR-2, TLR-4 és TLR-8 receptorok elsősorban monocitákban/makrofágokban expresszálódnak fokozottan, míg B-sejtekben csak gyengén fejeződnek ki. Ezzel szemben a TLR-7 és TLR-9 pedig főként B limfocitákban és plazmocitoid dendritikus sejtekben expresszálódnak (105, 106). Cirrhosisban, főleg ALD talaján kialakult májzsugorban, fokozott szérum IgA képződést figyeltek meg. Azonban az emelkedett IgA szinthez vezető folyamatok egyelőre nem teljesen tisztázottak (107). Korábban ezt a jelenséget legalábbis részben az IgA és az IgA-immunkomplexek csökkent eliminációjával hozták összefüggésbe, melyet a monociták megváltozott Fc receptor expressziójával és a következményesen károsodott Fc α receptor által közvetített endocitózis zavarával magyaráztak (108). Hosszú ideig csak feltételezés volt, de az utóbbi időben számos tanulmány alátámasztotta azt a feltételezést, hogy a fokozott Ig szintézis alkoholos cirrhosisban összefügghet a bakteriális stimulussal (101). *Massonett és mtsai* (109) által közölt tanulmányban egészséges kontrollhoz viszonyítva a TLR-9 ligand CpG által aktivált B-sejtek szignifikánsan emelkedett abszolút IgA produkcióját figyelték meg alkoholos cirrhosisban, mely összecseng ezen sejtek intrinsic

képességével, hogy spontán több IgA-t termeljenek, mint az egészséges egyénekből szeparált B-sejtek. Ezzel szemben az alkoholos cirrhosisban szenvedő betegekből szeparált B-sejtek relatív TLR9 ligand CpG által indukált IgA termelése kevésbé volt kifejezett, mely összefüggést mutat ezen sejteknek az egészséges egyének B-sejtjeihez viszonyított csökkent TLR-9 expressziójával. *In vitro* körülmények között CpG kezelés hatására a B-sejtek TLR-9 expressziójának csökkenését („down” regulációját) figyelték meg. Ez pedig felveti a lehetőségét annak, hogy az alkoholos cirrhosisban szenvedő betegekből szeparált B-sejtek csökkent TLR-9 expressziója a fokozott BT következtében fellépő, a bakteriális DNS által közvetített *in vivo* priming következménye (110). Az IgA képződés tekintetében a májcirrhosisnak van mégegy jellegzetessége, mégpedig a különféle, IgA típusú antimikrobiális- és auto-antitestek fokozott képződése, mely egyrészt a bélnyálkahártya megnövekedett mikrobiális terheltségét tükrözhetik, másrészt egyes patogenetikai folyamatok aktív résztvevői lehetnek. Míg ezen antimikrobiális antitestek a bélben található baktériumok egyes fehérjéi ellen képződnek (106, 111-114), addig az autoantitestek esetében ismertek olyan keresztreakáló epitópok, melyek a szervezet egyes fehérjéi és bakteriális alkotórészek között alakulnak ki (9, 107, 115). Ezek a specifikus antitestek elsősorban előrehaladott betegség és portális hipertenzió esetén vannak jelen.

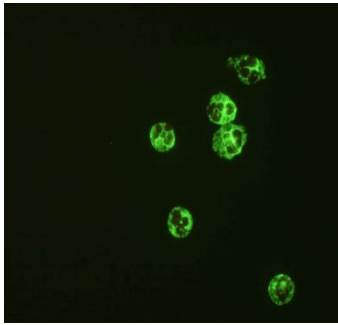
Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA)

Az anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek különböző antitestek által létrehozott heterogén csoport. Indirekt immunfluoreszcens módszerrel két klasszikus ANCA mintázat különíthető el normál perifériás vérből szeparált neutrofil granulocitákat használva szubsztrátként: a citoplazmatikus (c-ANCA) és perinukleáris mintázat (p-ANCA). A c-ANCA esetében az etanollal fixált granulocitákon diffúz, granulált citoplazmatikus jelölődést látunk, a sejtmag lebenyei között fokozott pozitivitással, míg a p-ANCA-k a sejtmag körül mutatnak intenzív pozitivitást, az esetek egy részében enyhe nukleáris festődéssel kombinálva. Ez utóbbi mintázat - érdekes módon - technikai artefactum, mert az alkoholos permeabilizálás során mobilissá váló erősen pozitív töltésű citoplazmatikus lokalizációjú molekulák a negatív töltésű sejtmagmembrán közelébe diffundálnak és ahhoz kötődnek. Formalin+acetonsos fixálást/permeabilizálást alkalmazva a keresztkött fehérjék a helyükön maradnak és ilyenkor a citoplazmatikus lokalizációjú pozitivitást látunk a p-ANCA esetében is, a c-ANCA-hoz hasonlóan. (116-122) **(2. ábra)**

2. ábra Neutrofil granulocita ellenes antitestek (ANCA) mikroszkópos immunfluoreszcens mintázata etanol- és formalin-fixált normál perifériás neutrofil granulocita preparátumokon.

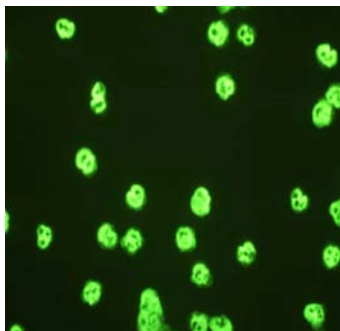
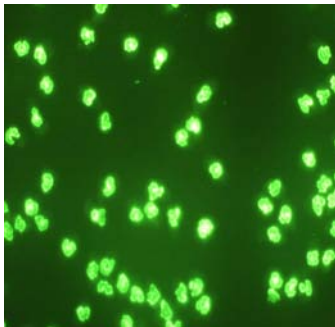
A: Citoplazmatikus (c)-ANCA mintázat (etanol-és formalin fixálás során egyaránt): durva, granuláris citoplazma fluoreszcencia, mely a maglebenyek között hangsúlyozottabban jelentkezik. **B:** A sematikus ábra a típusos és atípusos perinuclearis (p)-ANCA target antigénjeinek (szubcelluláris eloszlását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

A

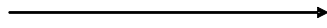


B

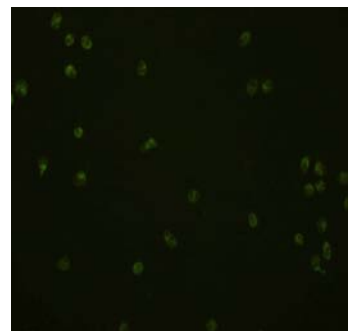
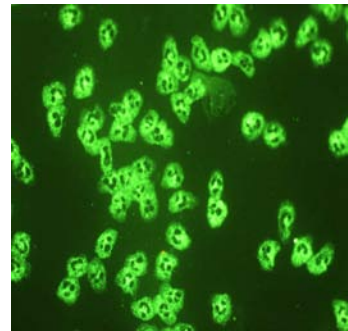
Etanol fixálás: P-ANCA



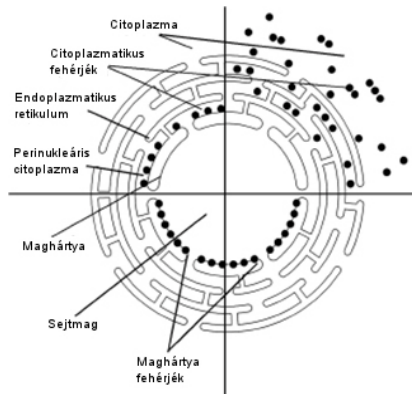
Etanol fixálás: atípusos P-ANCA



Formalin fixálás: P-ANCA



Formalin fixálás: atípusos P-ANCA



Ezeket az antitesteket korábban elsősorban a primer kísér vasculitisek diagnosztikájában, illetve a gyulladásos aktivitás monitorozásában alkalmazták, illetve alkalmazzák napjainkban is. Ezekben a betegségekben jól ismert ezen antitestek antigénspecificitása is; a leggyakrabban felismert cél antigének a c-ANCA esetében a proteináz-3 (PR-3), illetve a p-ANCA esetén pedig a mieloperoxidáz (MPO). Vasculitisekben felvetődött, hogy az ANCA-nak patogenetikai szerepe lehet az autoimmun folyamatokban (116). Ebbe a csoportba a granulomatosis polyangiitis-szel (GPA; Wegener-granulomatosis), mikroszkópikus polyangiitis (MP) és az eosinophilias granulomatosis polyangiitis-szel (EGPA; Churg-Strauss szindróma) tartozik, illetve ezek egy-egy szervre (vese, tüdő) lokalizálódó limitált variánsai. Bár a c-ANCA elsősorban GPA-ban fordul elő, míg a p-ANCA inkább az MPA-t és EGPA-t jellemzi, de alapvetően az ANCA mintázatok és antigén-specificitás nem segíti a felsorolt 3 forma közötti differenciálást, ugyanakkor az indirekt immunfluoreszcens detektálás és az MPO+PR3 ELISA-k kombinált alkalmazása közel 99% specificitás mellett kb. 85%-os szenzitivitással képes ezeknek a kórképeknek az azonosítására a hasonló klinikai tünetekkel járó, de nem vasculitis alapú betegségekkel összevetve. (116, 117, 121-125)

Az ANCA jelenlétét számos más, a vasculitisek közé nem sorolható betegségben kimutatták, többek között IBD-ben (126), reumatoid arthritisben (127), krónikus autoimmun májbetegségekben (128, 129) és különböző infekciók esetén (130). Az ANCA-pozitivitás gyakorisága 50-90% UC-ben, 10-30% CD-ben, 40-95% I-es típusú autoimmun hepatitisben, 25-90% primer szklerotizáló cholangitisben, 0-25% primer biliáris cirrhosisban, kb. 30% rheumatoid arthritisben és 10-20% szisztémás lupus erythematosusban (SLE). Ezekben a betegségekben megfigyelt p-ANCA mind antigén specificitásában, mind festődési mintázatában eltér a klasszikus p-ANCA-tól (120). Elkülönítésképpen atípusos p-ANCA-nak nevezték el, bár számos más néven is szerepel a szakirodalomban, mint például x-ANCA, pANNA vagy DNA-ANCA. Az atípusos p-ANCA számos különböző még egyelőre kevésbé jól definiált neutrofil antigén (nukleáris vagy sejtmaghoz asszociált citoplazmatikus) ellen képződik. Az esetek egy részében az etanol fixált granulocytákon perinucleáris mintázat látható, elvétve erősebb nukleáris foltokkal is, ami formalin fixált sejteken is változatlan marad jelezve az autoantigén valós nukleáris/perinukleáris lokalizációját. Más betegeknél kombinált citoplazmatikus/perinukleáris mintázat látható, ami többféle autoantigént felismerő ANCA-k egyidejű jelenlétére utal. A jellemző autoantigének közé a katepszin G, elasztáz, BPI (baktericid permeabilitást fokozó fehérje), laktoferrin, α -enoláz, kataláz tartozik. Az

atípusos p-ANCA-k esetében különösen jelentős az anti-nukleáris antitestek (ANA) jelenlétének egyidejű vizsgálata (pl. Hep2 sejteken), ami álpozitív ANCA reakciót adhat IIF technika alkalmazása mellett. Az atípusos ANCA-k klinikai, illetve patofiziológiai jelentősége még egyelőre nem tisztázott, de hasonlóan a vasculitises esetekhez az antitest jelenléte súlyosabb betegség lefolyással társulhat (117-122, 127-132).

Számos teória létezik ezeknek az antitesteknek a keletkezését illetően. Az ANCA képződés összefügghet a gyulladáshoz vezető folyamatokkal. A gyulladáshoz vezető válaszreakcióban résztvevő neutrofilek degradációja olyan mértékű lehet, hogy meghaladja a sejt-törmelék eltávolító kapacitást. Így a gyulladás helyén lokálisan olyan citoplazmatikus fehérjék szabadulhatnak fel a neutrofilekből, melyek egy autoimmun válaszreakciót indít(hat)anak be a szervezetben (133), ami az egészségesekben is megtalálható természetes ANCA-k mellett nagy koncentrációjú, nagy affinitású, megváltozott epitópspecifitású és funkcionálisan is aktív patológiás ANCA-k megjelenését eredményezi. Ezt a folyamatot segítheti elő a neutrofil extracelluláris "csapdák" (neutrofil extracellular trap, NET) keletkezése is. Az extracelluláris mátrixhoz kötődő hálózatos struktúráról van szó, ami a neutrofilek degradációja során jön létre, nagy mennyiségben tartalmaz kromatin elemeket, hiszton komponenseket és citoplazmatikus fehérjéket, így PR3-at és MPO-t is. Ezek a struktúrák elősegítik a neutrofil eredetű autoantigének bemutatását az immunrendszernek (133-138). Az ANCA képződés mechanizmusára egy másik lehetséges magyarázat egyes bakteriális fehérjék és a szervezet saját antigénjei közötti keresztreakció (139). Lehetséges, hogy elhúzódó fertőzések a molekuláris mimikri jelensége révén képesek triggerelni az ANCA képződést (130). Érdekes módon az atípusos p-ANCA jelenléte jelezhet a bélben található mikroorganizmusokra adott egyfajta rendellenes immunválaszt (8). Autoimmun májbetegségekben az atípusos p-ANCA az 5-ös izotípusú humán β -tubulin (TBB-5) ellen alakul ki és keresztreakciót ad a bakteriális FtsZ fehérjével. Ez annak lehet a következménye, hogy a TBB-5 kifejezetten nagy strukturális homológiát mutat ezzel a mikrobiális sejtostódásban szerepet játszó fehérjével, mely szinte minden intesztinális flórában előforduló baktériumban megtalálható (8). Más betegségekben az ANCA jelenlétét az enterális bakteriális antigénekre adott immunválasz jelének tekintik (140, 141). Ezt az összefüggést támasztja alá az is, hogy állakísérletes modellekben csíramentes környezetben nem mutatható ki p-ANCA (142).

Az anti-mikrobiális antitestek jelenléte főként előrehaladott májbetegség és portális hipertenzió esetében gyakoribbnak bizonyult májcirrhotikus betegekben munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya szerint (143). Mindez arra utalhat, hogy a különféle mikrobiális

alkotórészekre adott szerológiai válasz tükrözheti a mikrobiális antigének fokozott expozícióját. A cirrhotikus betegekben jelen lévő, a fentiekben viszonylag részletesebben is ismertetett komplex immunzavar fogékonyá teszi őket a bakteriális fertőzésekre (79), mely súlyosbítja a betegség lefolyását és szignifikáns morbiditással és mortalitással is jár (83). Fontos jellemzője a cirrhotikus betegekben előforduló infekcióknak az enterális organizmusok által okozott fertőzések magas incidenciája (144). A BT a baktériumoknak, illetve bakteriális termékeknek a bél lumenből a szisztémás keringésbe való fokozott felvételét jelenti. A BT alapvető mechanizmus a fertőzések kialakulásában és jelentősen befolyásolhatja a betegség klinikai lefolyását is (145, 146). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az ANCA előfordulása gyakoribb cirrhotikusban és jelenlétük összefüggést mutathat a betegség klinikai lefolyásával és a bakteriális fertőzéssel járó szövődmények kialakulásával. Jelen tanulmány elkészültekor ezzel kapcsolatosan a szakirodalomban nem álltak rendelkezésre átfogó adatok.

A kutatás jelentősége májcirrhosisban

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

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

6. Célkitűzések

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

Ezek alapján tehát célul tűztük ki, hogy **prospektíven követetett nagy esetszámú gyulladásoos bélbeteg kohorszban (n=458)** vizsgáljuk a különféle target specifikus **pankreász ellenes antitestek (PAb)**, valamint **antifoszfolipid antitestek (APLA)**

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

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

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

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

7. Metodikák

7.1 Betegek

7.1.1 Gyulladásos bélbetegek

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

2. táblázat. Gyulladásos bélbetegek (IBD) klinikai jellemzői a PAb tanulmányba történő bevonáskor

	CD (n= 271)	UC (n= 187)
Férfi/nő (n)	115/156	86/101
Diagnóziskori életkor (év)*	25 (19-33)	33 (23-43)
Követési idő (hónap)* [□]	108 (65-178)	104 (62-182)
Családi IBD ¹	12 (4,4%)	6 (3,2%)
Lokalizáció/kiterjedés diagnóziskor ¹		
L1	60 (22,1%)	proctitis 30 (16,0%)
L2	88 (32,5%)	bal oldali 104 (55,6%)
L3	122 (45,0%)	extenzív
kizárólag L4	1 (0,4%)	colitis 53 (28,3%)
összes L4	16 (5,9%)	
A betegség viselkedése diagnóziskor ¹		
B1	216 (79,7%)	
B2	33 (12,2%)	
B3	22 (8,1%)	
Perianális érintettség ¹ diagnóziskor	49 (18,1)	
a követési idő végén [□]	93 (35,1)	
Kumulatív gyógyszer- illetve műtéti igény a követési idő alatt		
Szteroid igény/refrakter ¹	239 (88,2%) / 31 (13,0%)	144 (77,0%)/ 11 (7,6%)
Azathioprin igény ¹	200 (73,8%)	66 (35,3%)
Műtét/multiplex CD-ben colectomia UC-ben ¹	109 (41,1%)/ 31 (11,7%)	7 (3,7%)
Biológiai terápia ¹	113 (41,7%)	25 (13,4%)
Dohányzási szokások ¹		
soha	219 (80,8%)	167 (89,3%)
igen	47 (17,3%)	18 (9,6%)
korábban	5 (1,8%)	2 (1,1%)

[□]: 265 CD betegnek volt követése

¹n (%), *: medián (IQR)

Lokalizáció: L1: ileális, L2: colon, L3: ileocolon, L4: felső gasztrointesztinális érintettség

Viselkedés: B1: nem strikturizáló/nem penetráló, B2: sztenotizáló, B3: penetráló

Műtét: CD-asszociált hasi műtétek, illetve colectomia UC esetén

3. táblázat. IBD betegek klinikai jellemzői az APLA tanulmányba történő bevonáskor

	CD (n= 271)		UC (n= 187)
Férfi/nő (n)	115/ 156		86/101
Életkor (év)*	31,0 (24,0-41,0)		40,0 (29,0-52,0)
Életkor - diagnóziskor (év)*	25,0 (19,0-33,0)		33,0 (23,0-43,0)
Betegség tartam (év)*	4,0 (1,0-9,0)		4,0 (1,0-11,0)
Családi IBD¹	12 (4,4%)		6 (3,2%)
Lokalizáció/kiterjedés bevonáskor¹			
L1	46 (17,0%)	proctitis bal oldali extenzív	30 (16,0%)
L2	67 (24,7%)		104 (55,6%)
L3	157 (57,9%)		53 (28,3%)
kizárólag L4	1 (0,4%)		
Össz. L4	18		
Viselkedési fenotípus bevonáskor¹			
B1	154 (56,5%)	remittáló folyamatos tartós remisszió	174 (93,0%)
B2	56 (20,7%)		12 (6,4%)
B3	61 (22,5%)		1 (0,5%)
Perianális érintettség¹	76 (27,5%)		-
Arthritis¹	54 (19,9%)		26 (13,9%)
Szem érintettség¹	65 (24,0%)		12 (6,4%)
Bőr érintettség¹	35 (12,9%)		16 (8,6%)
PSC¹	9 (3,3%)		8 (4,3%)
Szteroid igény/refrakter¹	242 (89,3%) / 32 (13,2%)		144 (77,0%)/ 11 (7,6%)
Azathioprin igény¹	196 (72,3%)		66 (35,3%)
Műtét/multiplex CD-ben colectomia UC-ben¹	54 (19,6%)/ 19 (7,0%)		7 (3,7%)
Biológiai terápia¹	106 (39,1%)		25 (13,4%)
Dohányzási szokások¹			
soha	219 (80,8%)		167 (89,3%)
igen	47 (17,3%)		18 (9,6%)
korábban	5 (1,8%)		2 (1,1%)
Klinikai aktivitás¹			
Inaktív HBI ≤ 4	199 (73,4%)	Inaktív partialis Mayo ≤ 3 Aktív partialis Mayo > 4	135 (72,2%)
Aktív HBI ≥ 5	72 (26,6%)		52 (27,8%)

¹n (%), *: medián (IQR)

Lokalizáció: L1: ileális, L2: colon, L3: ileocolon, L4: felső gasztrointesztinális érintettség

Viselkedés: B1: nem strikturizáló/nem penetráló, B2: sztenotizáló, B3: penetráló

PSC: primer szklerotizáló cholangitis

Műtét: CD-asszociált hasi műtétek, illetve colectomia UC esetén

HBI: Harvey–Bradshaw Index

A betegek klinikai jellemzőit a két tanulmányban a diagnózis időpontjában a **2. és 3.** számú **táblázat** szemlélteti. Az IBD diagnózisának felállítása a Lennard–Jones kritériumrendszer alapján történt (klinikai, endoszkópos, radiológiai és kórszövettani vizsgálat alapján) (**4. táblázat**) (147).

4. táblázat Diagnosztikus kritériumok CD-ben (147).

Mikrobiológiai	Fertőző hasmenés kizárása (bakteriális, parazita)
Kórtörténet	Több mint 3 hete tartó hasmenés, véres széklettel, vagy anélkül, hasi fájdalom, fogyás
Endoszkópos	Aphtoid, vagy mély, résszerű, fekélyek, utcakő rajzolat, szűkületek, szakaszos, „skip” léziók
Radiológiai	Szakaszos megjelenés, utcakő rajzolat, szűkületek
Szövettani	CD-vel kompatibilis akut vagy krónikus gyulladás, epitheloid granuloma

A klinikai adatbázisba a mintavételkor rögzítettük a betegség klinikai klasszifikációját a montreáli beosztás szerint (életkor a betegség jelentkezésekor, a betegség fennállásának ideje, lokalizáció, viselkedés és perianális érintettség) (**5. és 6. táblázat**) (148).

5. táblázat A Crohn-betegség (CD) Montreáli Klasszifikációja (148).

A (Age): Életkor a betegség diagnoszisakor		
A1	≤ 16 év	
A2	16-40 év	
A3	≥ 40 év	
L (Location): Lokalizáció		
L1	Terminalis ileum	L1+L4
L2	Colon	L2+L4
L3	Ileocolon	L3+L4
L4	Felső GI traktus	A felső tápcsatornai érintettség külön módosító faktorként szerepel
B (Behaviour): Klinikai viselkedés		A perianális betegség külön módosító faktorként szerepel, mint a lumenális betegségtől elkülönülő entitás
B1	Nem strikturizáló, nem penetráló/gyulladásos (NSNP)	B1p
B2	Sztenotizáló/stikturizáló (S)	B2p
B3	Penetráló (P)	B3p

6. táblázat A colitis ulcerosa (UC) Montreáli Klasszifikációja (148).

E (Extent): Kiterjedés		
E1	Ulceratív proctitis	A gyulladás a rectumra lokalizálódik, a rectosigmoid átmeneten nem terjed túl
E2	Baloldali (distalis) UC	A gyulladás nem terjed túl a flexura splenicán
E3	Extenzív UC (pancolitis)	A gyulladás túlterjed a flexura splenicán
S (Severity): Súlyosság		
S0	Klinikai remisszió	Nincsenek klinikai tünetek
S1	Enyhe UC	4≤véres széklet/nap, láz hiánya, pulzus<90/perc, Hb>105 g/l, We<30mm/h
S2	Közepesen súlyos UC	Enyhe és súlyos UC közötti kép, szisztémás és toxikus tünetek hiánya
S3	Súlyos UC	≥6 véres hasmenés, pulzus>90/perc, ≥37,5C°, Hb<105 g/l, We≥30mm/h

A bevonás során a mintavétel mellett rögzítésre került a betegség részletes klinikai fenotípusa is. A klinikai adatok gyűjtése egységes formában, a betegek orvosi dokumentációjának alapos tanulmányozása mentén zajlott. A prospektív követési időszakot megelőző időszakra jellemző klinikai adatokat, melyek a klinikai fenotípusra, az extraintesztinális manifesztációk jelenlétére (pl. arthritis: perifériás és axiális típusú; szemtünetek: conjunctivitis, uveitis, iridocyclitis; bőrtünetek: erythema nodosum, pyoderma gangrenosum; máj érintettség: primer szklerotizáló cholangitis [PSC]), a korábbi relapszusok gyakoriságára (gyakori relapszus: > 1 klinikai relapszus/év) (149), gyógyszerigényre (pl. szteroid, immunszuppresszív és/vagy biológiai terápia), a családi IBD előfordulásra, dohányzási szokásokra, a betegség kimenetelére (korábbi sebészeti beavatkozások, tromboembóliás események, szövődményes betegségforma kialakulása, perianális érintettség) vonatkoznak, retrospektív módon elemeztük. A klinikai aktivitást bevonáskor CD esetén a Harvey-Bradshaw Index [HBI] (150) segítségével (**7. táblázat**), UC esetén pedig a parciális Mayo pontrendszer (151) alapján (**8. táblázat**) határoztuk meg. Ezen tanulmányokban az Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) irányelveit (152) követtük és klinikai relapszusként értékeltük, ha a HBI 5 pont volt, míg HBI ≤4 pont esetében klinikai remissziót véleményeztünk. UC esetén ≤ 3 parciális Mayo pont esetében tekintettük a beteget klinikai remisszióban lévőnek, ezzel szemben ≥4 pont jelentett klinikailag aktív betegséget. Az endoszkópos aktivitás meghatározására a Crohn-betegségben használt egyszerűsített endoszkópos pontrendszert (SES-CD) (**9. táblázat**) (153) használtuk CD-ben, míg UC esetében Mayo pontrendszer endoszkópos komponensét (**8. táblázat**) (154). A SES-CD endoszkópos aktivitást véleményez ≥3 pont esetén és inaktívnak tekinti betegséget ≤2 pontnál CD-ben, míg az UC-ben alkalmazott Mayo pontrendszer aktivitást véleményez 1 pont

esetén. Az adatbázisból a betegség aktivitására és kimenetelére vonatkozó adatok mind folyamatában, mind pedig időszakokra lebontva elérhetőek (3 hónap, 6 hónap, 1 év, 2 év, teljes követési idő).

7. táblázat A Crohn-betegség aktuális klinikai aktivitásának megítéléséhez használt Harvey-Bradshaw Index (HBI) pontszámítási rendszerének összefoglalója (150).
(Remisszió<5 pont; Enyhe 5-7 pont; Középsúlyos 8-16 pont; Súlyos 16<pont)

Általános közérzet az elmúlt 24 órában (pontérték)	Nagyon jó (0); Kissé a normális alatt (1); Rossz (2); Nagyon rossz (3); Kifejezetten rossz.
Hasi fájdalom az elmúlt 24 órában (pont)	Nem volt (0); Enyhe (1); Középsúlyos (2); Súlyos (3).
Híg székletek száma az elmúlt 24 órában	<i>Székletszámmal egyező pontszám</i>
Tapintható hasi rezisztencia (pont)	Nincs (0); Lehetséges (1); Egyértelműen tapintható (2); Jelen van és kifejezetten érzékeny/fájdalmas (3).
Komplikáció jelenléte (a szövődmények pontjai összeadódnak)	Arthralgia (1); Uveitis (1); Erythema nodosum (1); Aphthosus fekélyek (1); Pyoderma gangrenosum (1); Anális fissura (1); Újjonnan felfedezett fistula (1); Abscessus (1).

8. táblázat Colitis ulcerosa aktuális klinikai, illetve endoszkópos aktivitásának megítéléséhez használt Mayo pontszámítási rendszerének összefoglalója (151).

Székletszám (pont)	Normál (0); A normál székletszámhoz képest: 1-2-vel (1); 3-4-gyel (2); 5≤ (3) több.
Vér a székletben(pont)	Nincs (0); Vércsíkos kevesebb, mint az esetek felében (1); Látható vér az esetek felében, vagy annál többször (2); Legalább az esetek felében véres a széklet+legalább 1 alkalommal kizárólag vér ürül (3)
Kezelőorvos átlagos megítélése a betegség aktivitását illetően (pont)	Normál (0), Enyhe (1), Közepes (2), Súlyos (3)colitis
Endoszkópos kép (pont)	Normál vagy inaktív colitis (0)
	Enyhe colitis (1):enyhe sérülékenység, erythema, csökkent vaszkularizáltság
	Középsúlyos colitis (2): kifejezett sérülékenység, körülírt erythema, vaszkuláris mintázat hiányzik, eróziók láthatók
	Súlyos colitis (3): ulceráció és spontán vérzések.

9. táblázat A Crohn-betegség aktuális endoszkópos aktivitásának megítéléséhez használt egyszerűsített endoszkópos pontszámítási rendszerének (SES-CD) összefoglalója (153).

SES-CD pontszám				
Változó	0	1	2	3
Fekély mérete	Nincs	Aphthosus fekélyek (Ø 0,1-0,5 cm)	Nagy fekélyek (Ø 0,5-2 cm)	Kifejezetten nagy fekélyek (Ø >2 cm)
Kifekélyesedett nyálkahártya felület	Nincs	<10%	10-30%	>30%
Érintett nyálkahártya felület	Nem érintett	<50%	50-75%	>75%
Szűkület jelenléte	Nincs	Egy, mely átjárható	Multiplex, de átjárható	Nem járható át

	Ileum	Colon ascendens	Colon transversum	Colon descendens	Rectum	TOTAL
Érintett szegmentum (0=nem, 1=igen)						
Fekélyek jelenléte és mérete (0-3 pont)						
Kifekélyesedett felület kiterjedése (0-3 pont)						
Érintett nyálkahártya felület (0-3 pont)						
Szűkületek jelenléte és mértéke (0-3 pont)						
					TOTAL=	
SES-CD=TOT-1,4*érintett szegmentumok száma					SES-CD=	

Az egyes szegmentumok pontszámai a fenti táblázat szerint összeadódnak, majd a végleges pontszám egy képlet segítségével számítható ki, mely számításba veszi az érintett szegmentumok számát is.

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

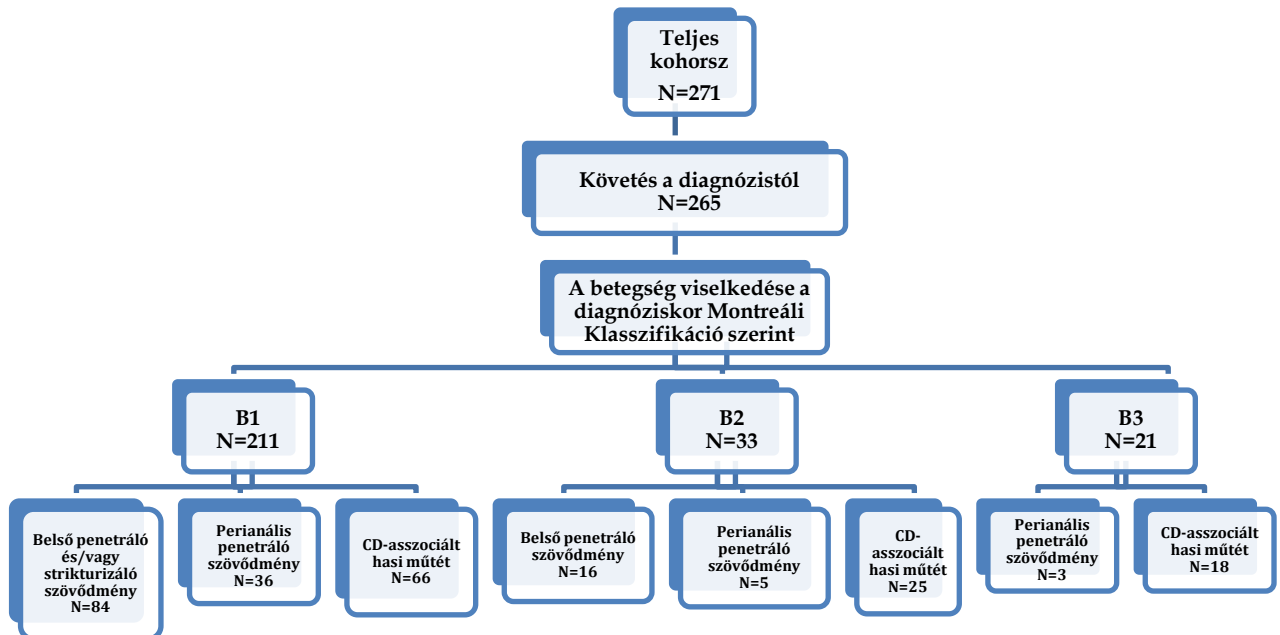
A CD betegeket bevontuk egy prospektív követéses vizsgálatba, mely folyamán a tervezett (3-6 havonta) és soron kívüli ambuláns betegvizitek, valamint a kórházi bennfekvések alkalmával folyamatosan rögzítettük a betegség klinikai, radiológiai, endoszkópos és laboratóriumi aktivitására, a gyógyszeres kezelés hatékonyságára és a betegség kimenetelére vonatkozó adatokat (szövődmény kialakulása, tromboembóliás esemény bekövetkezése, sebészeti beavatkozás szükségessége). A kezelési sémák, mind gyógyszeres, mind műtéti terápia szempontból egységesítettek és a jelenlegi ECCO irányelveket követik (152, 155-158). A műtéti igény és a rezekció időzítésének elbírálása multidiszciplináris feladat, mely a gastroenterológus, radiológus és sebész szakmai együttműködése révén valósul meg. Az összegyűjtött adatokat további értékelés céljából egy egységes adatbázisba importáltuk és abban tároljuk betegcsoportonként. 2013. Október 1-ig minden beteg dokumentációja ismételten átnézésre került, az adatbázis adatainak átnézése és felfrissítése megtörtént a fent említett szempontok (klinikai végpontok) szerint. Adott beteg követését termináltuk azokban az esetekben, melyekben nem volt elegendő elérhető adat. A diagnózistól eltelt medián követési idő 108 hónap volt (IQR, 65-178). CD-ben szövődményes betegségformaként definiáltuk szűkülettel (sztenózis, strikturizáló forma) járó, illetve belső penetráló betegség kialakulását. A perianális fisztulizáló betegséget fontos megkülönböztetni a belső penetráló formától, melyet minden értékelésünkben külön entitásként elemeztünk. Műtéti igénynek kizárólag a CD-asszociált hasi műtéteket (rezekciókat) tekintettük. Az **3. ábra** szemlélteti folyamatábra formájában a CD betegek kohorsz vizsgálatának jellemzőit.

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

3. ábra Folyamatábra a Crohn-betegek (CD) kohorszvizsgálatáról

Esemény: szövődmény és/vagy műtét; Szövődmény: strikturizáló betegségforma/szűkület kialakulása és/vagy belső penetráló és/vagy perianális penetráló betegségforma; Műtét: CD-asszociált műtét (kizárólag rezekció).

Pts: betegek



7.1.2 Májcirrhosisos betegek

2006 májusa és 2009 áprilisa között 385 különböző etiológiájú májcirrhosisban szenvedő betegről (férfi/nő: 206/179, átlagéletkor: 56,6±11,0 év) történt mintavétel a Debreceni Egyetem, Belgyógyászati Intézetének Gasztroenterológiai Tanszékén a 2006 májusában témavezetőm, Dr. Papp Mária által elindított és koordinált szerológiai mintabank számára. Bevonáskor ezen májcirrhosisos betegeknek a májzsugor diagnózistól számított átlagos betegségstartama 3,9±4,2 év volt. A májcirrhosis diagnózisának felállítása a klinikai, biokémiai, képalkotó vizsgálatok (159) és amennyiben elérhető volt, szövettani lelet alapján történt. A szerológiai mintabank mellett egy klinikai adatbázist is létrehoztunk, melyben a mintavételkor rögzítettük a betegség súlyosságát (Child-Pugh stádium (10. táblázat), MELD score (160)), valamint az ascites jelenlétére és súlyossági fokára, illetve az encephalopathiára vonatkozó adatokat.

10. táblázat A májcirrhosis aktuális klinikai aktivitásának megítéléséhez használt Child-Pugh pontszámítási rendszerének összefoglalója (160). (Child A stádium: 5-6 pont, Child B stádium: 7-9 pont, Child C stádium 10-15 pont.)

	1 pont	2 pont	3 pont
Encephalopathia	Nincs	Enyhe-közepes (Gr. 1-2)	Súlyos (Gr. 3-4)
Ascites	Nincs	Enyhe-közepes	Súlyos, refrakter
Bilirubin (µmol/L)	<34,2	34,2-51,3	51,3<
Albumin (g/l)	>35	28-35	28>
Protrombin idő megnyúlása/INR	<4 s <1,7	4-6 s 1,7-2,3	6 s< 2,3<

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

hepatocelluláris carcinomát is, vasculitis), és az aktuális gyógyszeres terápia. A vizsgálati idő alatt az aktuális irányelveket (161, 162) vettük figyelembe a varixvérzés és SBP elsődleges és másodlagos megelőzésében alkalmazott nem szelektív béta-blokkolók és fel nem szívódó antibiotikumok indikációjának mérlegelésekor. Protonpumpagátlók alkalmazási köre a gastrooesophagealis reflux betegség, az erozív gastritis, peptikus fekélybetegség, illetve a *Helicobacter pylori* fertőzés kezelése volt (163). A májcirrhosis 63,0%-ban alkoholos, 29,6%-ban hepatitis C vagy B vírus okozta, 4,7%-ban autoimmun és 2,6%-ban egyéb etiológiájú volt. A betegek klinikai jellemzőit a diagnózis időpontjában az **11. táblázat** foglalja össze.

11. táblázat. Cirrhosisban szenvedő betegek klinikai jellemzői

	TELJES (N = 385)	Alkoholos cirrhosisban szenvedő betegek (n = 246)	Nem-alkoholos cirrhosisban szenvedő betegek (n = 139)
Nem (férfi/nő)	206/179	144/102	62/77
Életkor (átlag ± SD, év)	56,6 ± 11,0	57,6 ± 9,7	54,8 ± 12,8
Child-Pugh stádium, n (%) [*]			
A	144 (37,4%)	58 (23,6%)	86 (61,9%)
B	136 (35,3%)	101 (41,1%)	35 (25,2%)
C	105 (27,3%)	87 (35,4%)	18 (12,9%)
Meld score (pontok) [§]	14,3 ± 6,0	15,1 ± 6,4	12,8 ± 4,8
Szérum bilirubin (μmol/L) [*]	67,4 ± 96,3	44,0 ± 70,4	79,0 ± 105,1
Szérum albumin (g/L) [*]	33,0 ± 8,0	35,6 ± 7,5	31,9 ± 7,9
Társbetegség jelenléte, n (%)	177 (46,0%)	114 (46,3%)	63 (45,3%)
HCC, n (%) [*]	34 (8,8%)	11 (4,5%)	23 (16,5%)

SD: standard deviáció, HCC: hepatocelluláris carcinoma

^{*} $p < 0.001$ és [§] $p < 0.01$ alkoholos vs. nem-alkoholos cirrhosis

Az induló beteg kohorszból 345 beteg volt bevonható egy jelenleg is zajló prospektív követéses vizsgálatba, ahol a követés a követési idő felső határáig (24 hónap), a beteg haláláig, illetve a követésből való kiesésig (medián követési idő: 729 nap [tartomány: 5-730]) tartott. A tervezett (1-3 havonta) és soron kívüli ambuláns betegvizitek, valamint a kórházi bennfekvések alkalmával folyamatosan rögzítettük a betegség kimenetelére vonatkozó adatok (betegség súlyosságának változása, szövődmény megjelenése, mortalitás [22,3%]) és a CSI

epizódok (típusa, időpontja) előfordulását. Azon bakteriális fertőzéses epizódokat tekintettük klinikailag jelentősnek, amelyek a beteg állapotromlása következtében kórházi felvételt tettek indokolttá, a májfunkció jelentős romlása vagy egyéb súlyos szövődmény (nyelőcső varixvérzés, hepatikus encephalopathia, diuretikum rezisztens ascites vagy veseelégtelenség) jelentkezése miatt. Az infekciós epizódokat az alábbi adatokat figyelembe véve azonosítottuk: klinikai tünetek, láz jelenléte, labor eredmények (fehérvérsejt szám abszolút [$>10,8 \times 10^9/L$] vagy relatív emelkedését balra tolt vérképpel, emelkedett CRP [$>10,0 \text{ mg/L}$] és/vagy PCT szint [$>0,15 \mu\text{g/L}$] (164)) beleértve a mikrobiológiai eredményeket is, amennyiben történt tenyésztés, valamint a képalkotó eljárások eredményei és az antibiotikus kezelés hatása. A követési idő alatt elhunyt betegek esetén ($n=77$) a kórbonctani leletek is kikérésre és átnézésre kerültek. Az alábbi bakteriális fertőzéseket a konvencionális kritériumok alapján diagnosztizáltuk: bőr- és lágyrész-, szájüregi-, felső- és alsó légúti- (akut bronchitis, pneumonia), epeúti- (cholecystitis, cholangitis, májtályog), gyomor-bélrendszeri (gastroenteritis), húgyúti fertőzések (szövődménymentes cystitist kizártuk), osteomyelitis, és endocarditis. Spontán bakteriális peritonitis diagnózisa intraabdominalis fertőzésforrás hiánya esetén abban az esetben volt felállítható, amennyiben az ascites fehérvérsejtszám nagyobb volt $250/\text{mm}^3$ -nél, függetlenül a tenyésztési lelet eredményétől. Bacteraemia (véráramfertőzés) volt véleményezhető azokban az esetekben, amelyekben a fent említett lokalizált fertőzés jeleinek hiánya mellett infekció klinikai tünetei állnak fenn és mikrobiológiailag kimutatható/igazolható kórokozó hemokultúrából, melynek oki szerepe feltételezhető. Az adatbázisból a betegség kimenetelére és CSI-re vonatkozó adatok mind folyamatában, mind pedig időszakokra lebontva elérhetőek (3 hónap, 6 hónap, 1 év, 2 év, teljes követési idő).

Beteg kontroll: Krónikus hepatitis C-vírus fertőzésben (krónikus HCV, $n=119$, férfi/nő: 50/69, átlagéletkor: $54,6 \pm 11,7$ év) és primer biliáris cirrhosisban (PBC, $n=102$, férfi/nő: 4/98, átlagéletkor: $58,8 \pm 11,8$ év) szenvedő egyénből, akikben a májbetegség végstádiumát jelentő cirrhosist még nem érte el a betegségfejlődés, alakítottunk ki egy betegkontroll csoportot. A májfibrózis és a nekroinflammatorikus aktivitás mértékének megítélésére a METAVIR pontrendszert alkalmaztuk (165-167). Kizártuk a betegkontroll csoportból azokat a betegeket, akik a fibrózis 4. stádiumába (F4) voltak sorolhatók, őket cirrhosisban szenvedő csoportba soroltuk. PBC diagnózisának az alapját képezik a cholestasisra utaló biokémiai paraméterek, a szérumban kimutatható anti-mitochondriális antitest (AMA) és/vagy PBC-specifikus AMA-M2 pozitivitás, ezekkel egybehangzó

szöveti lelet, és extrahepaticus cholestasis kizárása (168). Krónikus HCV fertőzésre utal, annak diagnózisát erősíti meg a pozitív HCV ribonukleinsav kimutatása mellett emelkedett májfunkciós tesztek és ezzel egybehangzó májbiopsziás eredmény.

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

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

7.2 Laboratóriumi módszerek

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

7.2.1. Anti-mikrobiális antitestek mérése

Az **anti-mikrobiális antitestek** közül a legismertebb és legtöbbet vizsgált antitest az **anti-*Saccharomyces cerevisiae* ellenes antitest (ASCA)**, mely az élesztőgomba, más néven sörélesztő 200 kDa molekulatömegű foszfopeptidomannán sejtfa komponense ellen termelődik (169). Az ASCA-hoz képest az egyéb sejtfa glikán komponensek ellen képződő antitestek (**anti-glikán antitestek**) előfordulási gyakorisága lényegesen ritkább. Antitestek ugyanakkor nemcsak a mikrobák szénhidrát, hanem fehérje komponensei ellen is termelődhetnek. A baktériumok külső membrán proteinjai ellen képződő antitestek **anti-OMP antitest** néven ismertek, melyek közül az általunk vizsgált **anti-OMP PlusTM antitestek** két bélbaktérium speciesből (egy Gram-pozitív és egy Gram-negatív) származó bakteriális fehérjék ellen képződnek. Ezen baktériumok egyike sem tagja annak a Proteobacteria törzsnek, ahová az *Escherichia coli* is tartozik (143).

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

7.2.2. Autoantitestek mérése

7.2.2.1. Az Anti-foszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata

Az anti-foszfolipid antitestek közül az anti- β 2-glikoprotein I (α β 2-GPI), anti-kardiolipin (ACA) és anti-foszfatidilszerin/protrombin komplex (aPS/PT) szintek meghatározása szérumból ELISA módszerrel történt szemikvantitatív QUANTA Lite™ α β 2-GPI, ACAIII és aPS/PT IgA, IgG and IgM kittek (INOVA Diagnostics, San Diego, California) segítségével. Ezen antifoszfolipid antitestek különböző izotípusai (IgG/A/M), melyek kimutatására a human szérumból ezek az ELISA kittek alkalmasak, a β 2-GPI, a cardiolipin és a PS/PT komplex ellen képződnek. Az APLA meghatározás során használt ELISA lemezek tisztított β 2-GPI-vel, kardiolipinnel és PS/PT komplexszel voltak fedve, melyhez az inkubáció során a szérumban lévő α β 2-GPI, ACA és aPS/PT antitestek (IgA, IgG és IgM izotípusok) képesek kikötödni, amennyiben jelen vannak a vizsgált szérumból. A be nem kötődött fehérjék eltávolításra kerültek a mosási lépések során, míg a bekötődött antitestek detektálását tormaperoxidázzal (HRP) jelölt anti-humán IgA, IgG és IgM antitestekkel végeztük. Majd ezt követően a reakció láthatóvá tételéhez kromogén reakciót adó peroxidáz szubsztrátot adtunk a rendszerhez. Az α β 2-GPI, ACA és aPS/PT antitestek szérumszintjének meghatározása során a spektrofotometriás módszerrel mért optikai denzitásokat (OD) az egyedi beteg, illetve kontroll minták esetében 5 pontos kalibrációs görbe segítségével az adott antitestek szérumkoncentrációját reprezentáló titer értékeknek (mesterséges egység, unit) feleltettük meg. Minden ELISA-t a gyártó utasításai szerint hajtottunk végre és az általuk megadott titer küszöbértékek (anti- β 2-GPI és ACA IgA, IgG és IgM esszék esetén ≥ 20 unit; anti-PS/PT IgG és IgM esszék ≥ 30 unit) alapján állapítottuk meg az adott minták pozitivitását. Az anti-PS/PT IgA esetén nem állt rendelkezésre kalibrátor, így az eredmények értékelésekor az OD-k nyers adatait használtuk, illetve az egészséges kontrollcsoport segítségével meghatároztunk egy pozitívítási küszöbértéket is. A 0,795 feletti OD-vel (átlag+2SD) rendelkező mintákat tekintettük ez alapján anti-PS/PT IgA pozitívnak. Az eredmények értékelésekor az abszolút OD értékek mellett a pozitívítási gyakoriságát is felhasználtuk. A 458 vizsgálatba bevont IBD-s betegből 451 esetben volt technikailag sikeres a szerológiai analízis.

7.2.2.2. Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata

7.2.2.2.1. Glycoprotein 2 (GP2) ellenes antitestek kimutatása enzimkapcsolt immunszorbens módszerrel (ELISA)

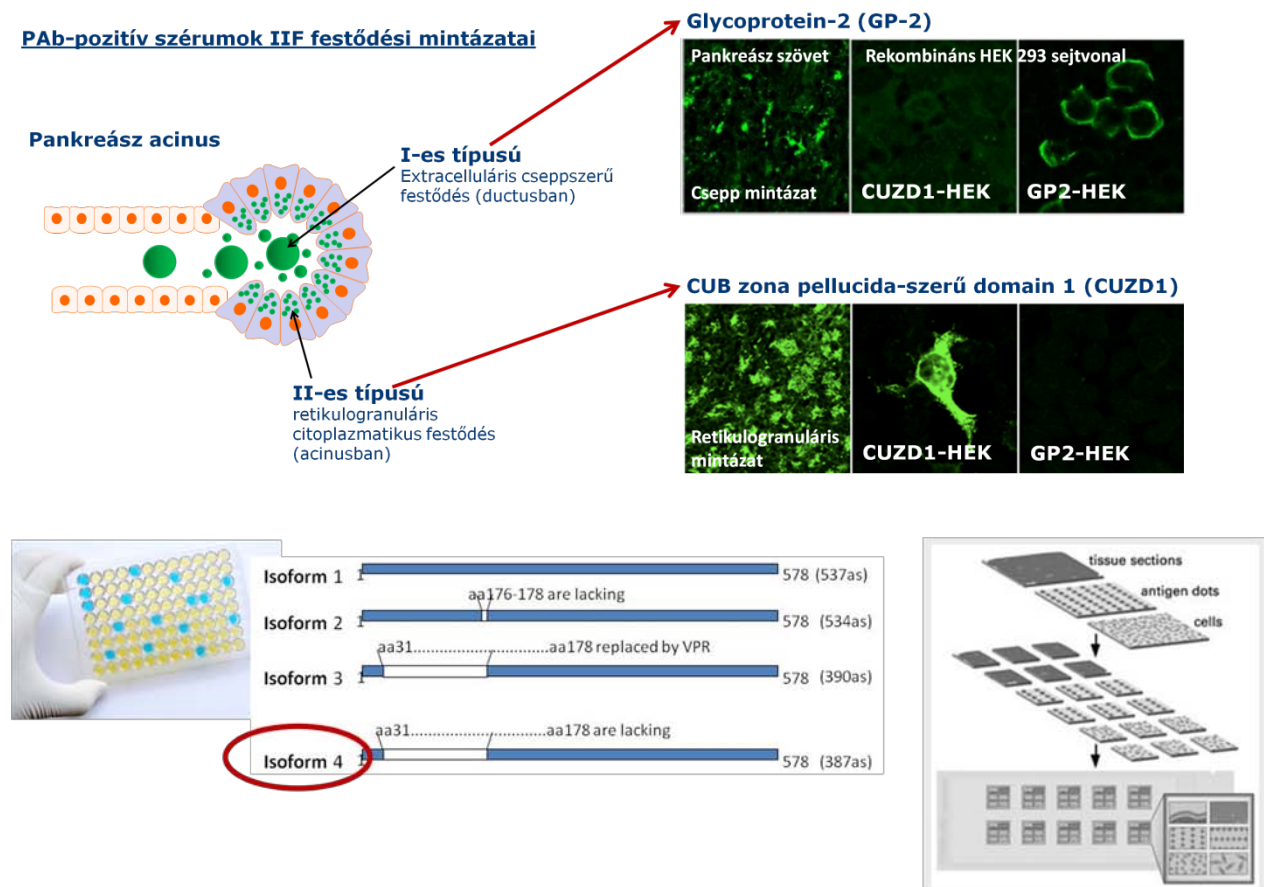
A PAb meghatározásokat a betegek és kontroll egyének szérumból két különböző cég által gyártott rekombináns 4-es isoformájú GP2-t tartalmazó (anti-MZGP2 IgA és IgG QUANTA Lite® ELISA [Inova Diagnostics, San Diego, CA, Research Use Only] illetve anti-GP2 IgA és IgG ELISA [GA Generic Assays, Dahlewitz/Berlin,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

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

A PAb meghatározásokat (anti-GP2 illetve anti-CUZD1 IgA és IgG) a betegek és egészséges kontroll egyének szérumból GP2-t ill. CUZD1-t expresszáló transzfektált HEK 293 sejteket tartalmazó biochippen (Morbus-Crohn Mosaic 1, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Németország) indirekt immunfluoreszcens módszerrel (anti-rPAg2 és rPAg1) is elvégeztük. Ebben a kísérleti rendszerben a GP2-t ill. CUZD1-t expresszáló transzfektált HEK

293 sejtek szolgálnak antigén szubsztrátként, így az ezekkel a sejtekkel fedett biochipeket szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk a kihígított szérumminták hígítási sorával (nevezetesen 1:10, 1:100 és 1:1000 hígításokat alkalmaztunk). A felesleges, be nem kötődött szérumot mosási lépések során eltávolítottuk, majd ezt követően fluoreszcenncel jelölt kecske anti-humán IgA vagy IgG antitestekkel tettük láthatóvá a betegek szérumából kikötődött antitesteket. A lemezek leolvasását egy EUROStar Plus mikroszkóp kékfényű LED-jének segítségével (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG) végeztük. **4. és 5. ábra** a különféle immunfluoreszcens festődési mintázatokat ábrázolja a GP2-t ill. CUZD1-t expresszáló transzfektált HEK 293 sejteken. *Komorowski és mtsai.* (65) gyakorlati tapasztalatai szerint a CUZD1-t expresszáló HEK293 sejteken megfigyelhető IIF kép megfeleltethető volt a korábban fagyasztott humán pankréaszszöveten leírt retikulogranuláris (2-es típusú) PAb mintázattal, míg a GP2-t expresszáló sejteken látható mintázatot a cseppszerű festődéssel (1-es típus) találták identikusnak.

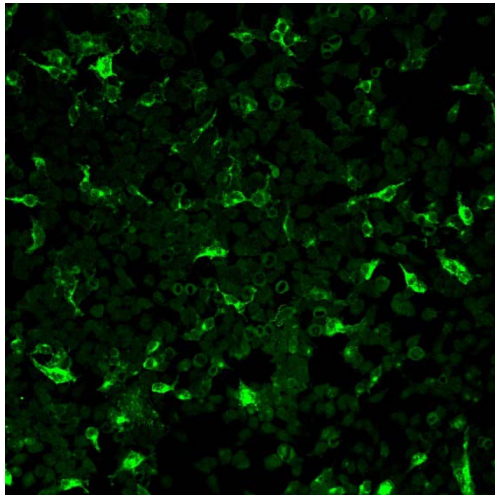
4. ábra Pankréász ellenes antitestek (PAb) meghatározása IIF és ELISA módszerekkel



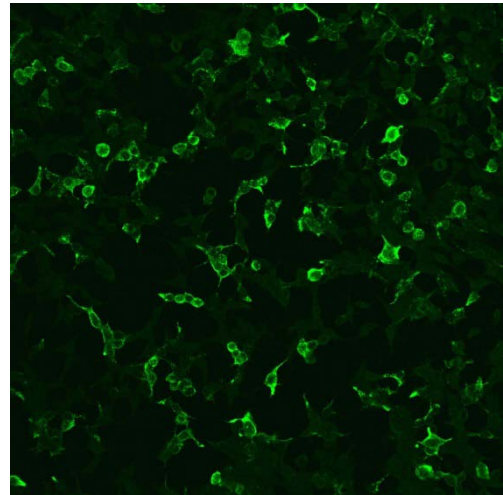
5. ábra. Immunfluoreszcens festődési mintázat CUZD1-nal illetve GP2-vel transzfektált HEK293.

Transzfektált HEK293 fagyasztott metszeteit inkubáltuk különböző hígítású human szérummal (1:10, 1:100, 1:1000 hígításokkal), majd ezt követően a betegek szérumából bekötődött antitestek láthatóvá tételéhez anti-humán IgA vagy IgG monoklonális antitestekkel (A) IgG PAb monoklonális antitest a CUZD1 ellen; (B) IgA monoklonális antitest a GP2 ellen; (C) negatív minták.

LSM 700, Zeiss

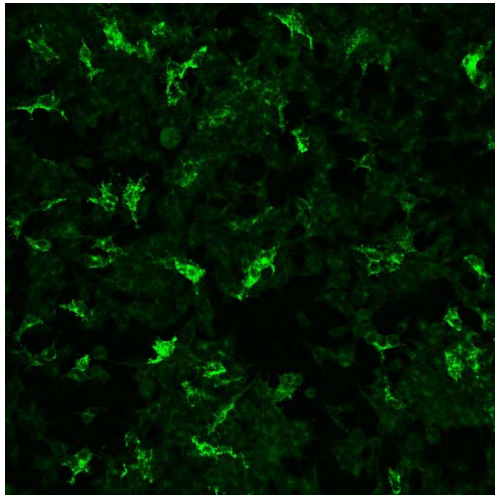


A

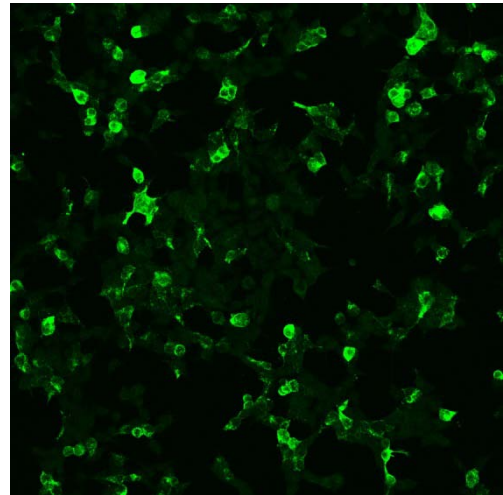


CD990 - IgG - Anti CUZD1 - pozitív - 10000 - 200x

CD995 - IgG - Anti GP2 - pozitív - 3200 - 200x

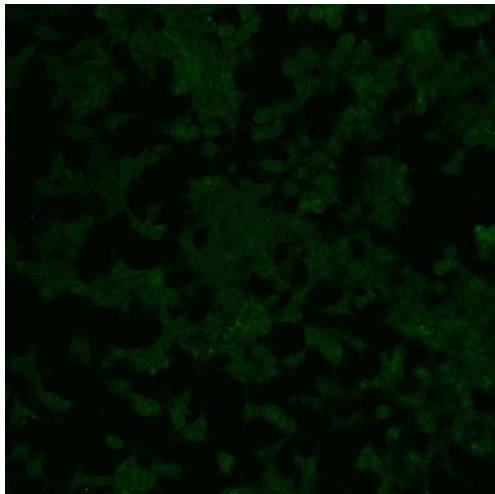


B

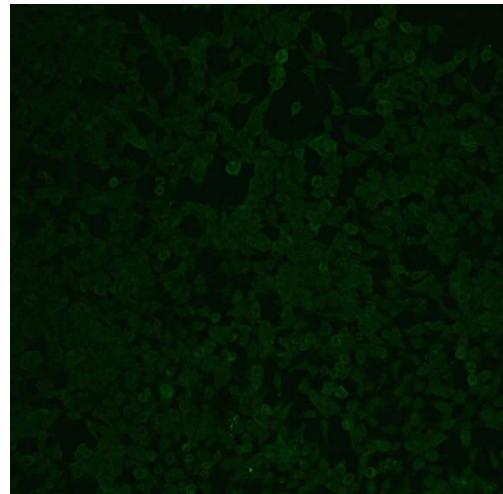


CD1015 - IgA - Anti CUZD1 - pozitív - 1000 - 200x

CD1098 - IgA - Anti GP2 - pozitív - 3200 200x



C



CD970- Anti CUZD1negatív-200x

CD970-Anti GP2 negatív -200x

7.2.2.3. Az Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) vizsgálata

7.2.2.3.1. Az ANCA mérése indirekt immunfluoreszcens technikával

Az antitestek meghatározása szemikvantitatív indirekt immunfluoreszcens módszerrel (IIF) az EUROIMMUN cég (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Németország) ethanol illetve formalin fixált humán neutrofil granulocitákat tartalmazó biochipjeinek segítségével történt. A lemezen lévő granulocita preparátumokat a betegek szérumával (1:10 hígítás PBS-sel) inkubáltuk együtt, majd a megkötött ANCA detektálása fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett anti-humán IgG illetve IgA másodlagos antitestek (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG) segítségével történt. A lemezek értékelését egy EUROStar II Plus mikroszkóppal (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG) végeztük 400x-os nagyítást alkalmazva. Az immunfluoreszcens eredmények értékelése az etanol- és formalin-fixált granulocita preparátumokon kapott mintázatok alapján történt (**2. ábra**) (120, 170): c-ANCA, p-ANCA, atípusos p-ANCA. Az 1:10 vagy annál nagyobb hígítási végpontoknál kapott pozitív szignál esetén tekintettük a mintát pozitívnak. Az ANCA-titer meghatározása ezekben a mintákban sorozat hígítással (hígítási faktor 3,2x) történt, ahol a sorozatkezdő hígítás 1:10 volt.

7.2.2.3.2. Az IgA típusú ANCA karakterizálása a cirrhosisos betegekben (6. ábra)

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

A lemezeket egy MicroOptix MX 300 TF (West Medica, Perchtoldsdorf, Ausztria) mikroszkóp segítségével 400x-os nagyítást használva értékeltük ki. A fluoreszcens képeket 32-bites ".bmp" formátumban egy MicroOptix/Vision CAM V330 kamera segítségével rögzítettük az SB Video&Audio AV Grabber (West Medica) program segítségével. Egy zöld háttér lemezt is exponáltunk minden mérési napon a megvilágítási erősség és inhomogenitás korrigálására (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA). A képeket az "ImageJ 1.46r" software segítségével értékeltük (171). A zöld csatornán mért fluoreszcencia intenzitások meghatározása mesterséges egységekben (A.U., arbitrary unit) történik látóterenként 20 db egyedi granulocita értékelésével, majd a kapott értékekből minden minta esetén átlagos fluoreszcencia denzitás (FD)/sejt \pm SD értékeket számoltunk. Minden szérum minta esetén három A.U./sejt értéket adtunk meg a három IgA izotípusnak megfelelően (IgA₁, IgA₂ és sIgA).

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

A módszer reprodukálhatóságát (intra- és inter-assay variabilitás) 5-5 mérés alapján teszteltük. Az intra-assay variációs együttható (coefficient of variation; CV%) 8,0%, 5,6% és

10,2%, míg az inter-assay CV% 10,4%, 14,9% és 13,2% volt az IgA₁, IgA₂ és a szekretoros komponens esetében.

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

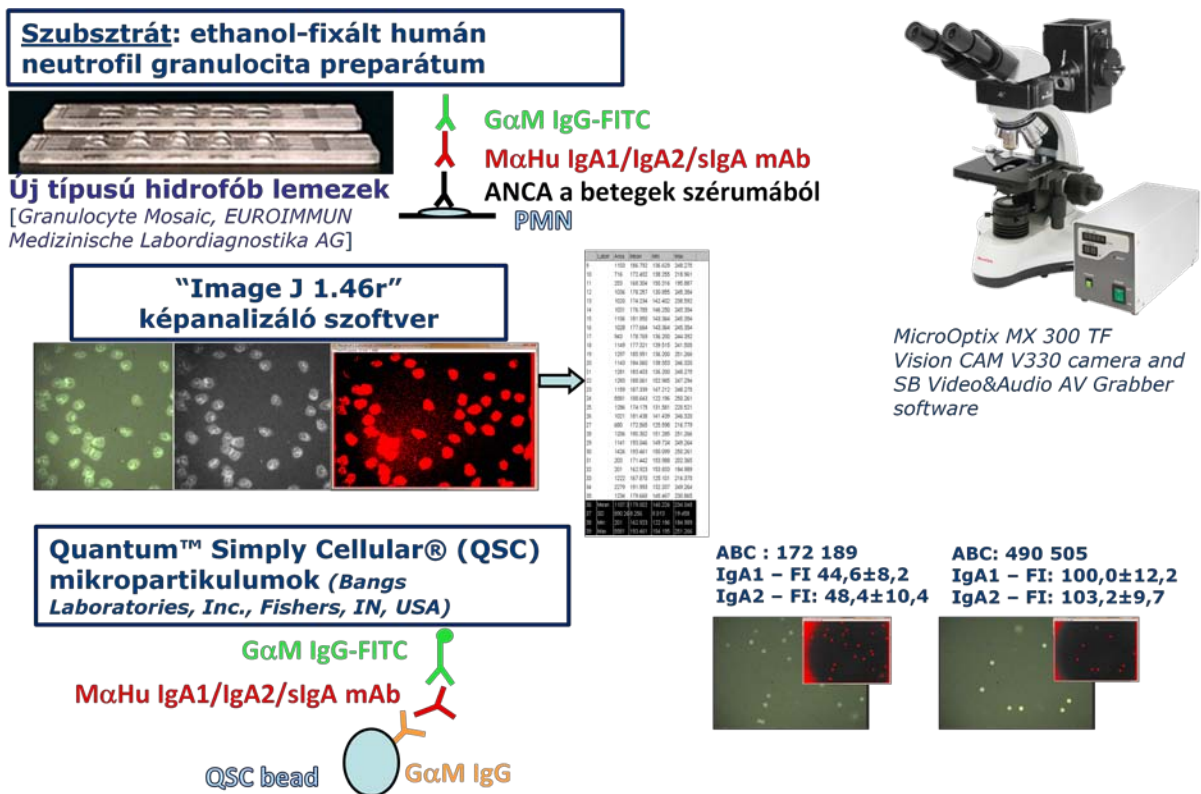
142 ANCA IgA-pozitív, 20 ANCA IgA-negatív cirrhotikus beteg és 20 egészséges kontroll egyén esetén végeztük el az ANCA IgA szubtypusok analízisét. Mivel az ANCA IgA₁, IgA₂, illetve sIgA fluoreszcencia intenzitások között nem volt szignifikáns különbség az egészséges és beteg kontrollcsoportokban (egészséges kontroll: IgA₁=12,8±3,3, IgA₂=14,1±4,5, sIgA=13,0±2,7; beteg kontroll: IgA₁=16,0±4,9, $p=0,08$, IgA₂=14,6±3,4, $p=0,98$, sIgA=14,9±3,1, $p=0,06$), ezen csoportokat összevontuk egy egységes kontrollcsoportba (n=40). Az IgA₂/IgA₁ arányok meghatározásakor minden egyes minta esetén elosztottuk az ANCA IgA₁ vagy IgA₂ fluoreszcencia intenzitását ezen két érték összegével. A szekretoros komponens pozitívításának megítélésére egy fluoreszcencia küszöbértéket határoztunk meg a 40 kontroll minta mérése alapján: az átlag + 3 SD ebben a csoportban 23.4 AU fluoreszcencia intenzitás volt.

7.2.2.3.3. Az IgA-típusú ANCA antigén specificitásának meghatározása ELISA technikával

Az anti-mieloperoxidáz (MPO) IgA és anti-proteináz 3 (PR-3) IgA antitestek mennyiségét az indirekt immunfluoreszcens technikával IgA pozitívnek bizonyult mintákban (n=162) határoztuk meg kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-k (QUANTA Lite™ MPO and QUANTA Lite™ PR-3 INOVA Diagnostics, San Diego, CA) segítségével. Az eredményeket

OD-ban adtuk meg. Az anti-MPO és anti-PR3 pozitivitás küszöb OD értéke 0,159 és 0,140 volt, amit 92 egészséges kontroll mintáiban mért átlag+3SD kalkulálás alapján határoztunk meg.

6. ábra Az IgA típusú anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) karakterizálásának összefoglaló ábrája IIF módszerrel



7.2.3. Genetikai vizsgáló eljárások

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

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

Genetikai vizsgálatok: A genetikai vizsgálatokat korábban már más intézményben végezték (Dr. Tordai Attila Országos Vérellátó Szolgálat Molekuláris Diagnosztikai Labor). Teljes vérből történő DNS szeparálást követően polimeráz láncreakció/ restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) segítségével határozták meg a különféle PRR polimorfizmusokat, melyek a következőek voltak: NOD2/CARD15 (egy pontos nukleotid polimorfizmus [SNP] 8: rs2066844, p.Arg702Trp, g.19877C>T, SNP12: rs2066845, pGly908Arg, g.30491C>T, és SNP13: rs5743293, g.37732_37733insC) polimorfizmusok.

7.3 Statisztikai analízis

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

7.4 Etikai engedélyek

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

7.5 Anyagi források

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

8. Eredmények

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

8.1.1 Az APLA markerek gyakorisága IBD-ben

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

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

Nem találtunk összefüggést CD-ben a betegek APLA és ASCA státusza között. Sem az ACA IgA, sem az IgG pozitívitas rátájában sem volt szignifikáns különbség az ASCA IgA és ASCA IgG jelenlététől, illetve hiányától függően. Hasonló módon nem volt összefüggés az ACA előfordulási gyakorisága és a főbb NOD2/CARD15 mutációk között. 235 CD beteg NOD2/CARD15 genotípusa állt rendelkezésre. Nem volt különbség az „ACA egyáltalán” prevalenciái között a NOD2/CARD15 mutációval rendelkező csoportban, illetve annak hiánya esetén (16,1% és 26,1%, $p=NS$, χ^2 -teszt Yates korrekcióval). (**7. ábra**)

12. táblázat. Anti-foszfolid antitestek (APLA) előfordulási gyakorisága Crohn betegségben (CD), colitis ulcerosában (UC), és egészséges kontrollcsoportban (HC)

	CD (n= 265)	UC (n= 186)	HC (n= 103)
Anti-β2-GPI IgG	5 (1,9%)	4 (2,2%)	2 (1,9%)
Anti-β2-GPI IgM	8 (3,0%)	12 (6,5%)	3 (2,9%)
Anti-β2-GPI IgA	7 (2,6%)	7 (3,8%)	3 (2,9%)
<i>Anti-β2-GPI egyáltalán</i>	<i>19 (7,2%)</i>	<i>18 (9,7%)</i>	<i>8 (7,8%)</i>
ACA IgG	27 (10,2%)*#	4 (2,2%)#	2 (1,9%)*
ACA IgM	8 (3,0%)	4 (2,2%)	1 (1,0%)
ACA IgA	51 (19,2%)***‡	1 (0,5%)‡	0 (0,0%)***
<i>ACA egyáltalán</i>	<i>62 (23,4%)***‡</i>	<i>9 (4,8%)‡</i>	<i>3 (2,9%)***</i>
Anti-PS/PT IgG	20 (7,5%)	9 (4,8%)	9 (8,7%)
Anti-PS/PT IgM	25 (9,4%)***†	8 (4,3%)†	1 (1,0%)***
Anti-PS/PT IgA	24 (9,1%)□	7 (3,8%)□	9 (8,7%)
<i>Anti-PS/PT egyáltalán</i>	<i>54 (20,4%)***‡</i>	<i>19 (10,2%)***‡</i>	<i>16 (15,5%)***</i>

β2-GPI: béta2-glikoprotein-I, ACA: anti-kardiolipin antitest,

PS/PT: foszfatidilszerin/protrombin komplex

CD vs. kontroll: * $p=0,008$; ** $p=0,004$; *** $p<0,0001$.

CD vs. UC: † $p=0,039$; □ $p=0,029$; # $p=0,001$; ‡ $p<0,0001$; ¶ $p=0,004$.

² χ^2 -teszt Yates korrekcióval.

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

Bevonáskor a CD betegek 26,6%-ban, illetve az UC-ben szenvedő betegek 27,8%-ban volt aktívnak minősíthető a betegség klinikai aktivitási pontrendszerét alkalmazva (**3. táblázat**). Nem volt szignifikáns különbség az anti- β 2-GPI, ACA és anti-PS/PT előfordulási gyakoriságában CD-ben a klinikailag aktív (2,8%; 29,2% és 18,1%) és inaktív (8,8%; 21,2% és 21,2% a fent említett antitestek esetén) csoportok között. Klinikailag aktívnak tekintettük a betegséget CD-ben, ha a HBI volt. Hasonló módon nem találtunk korrelációt UC-ben a partialis Mayo score alapján (>4) meghatározott betegség aktivitás és az APLA státusz között (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

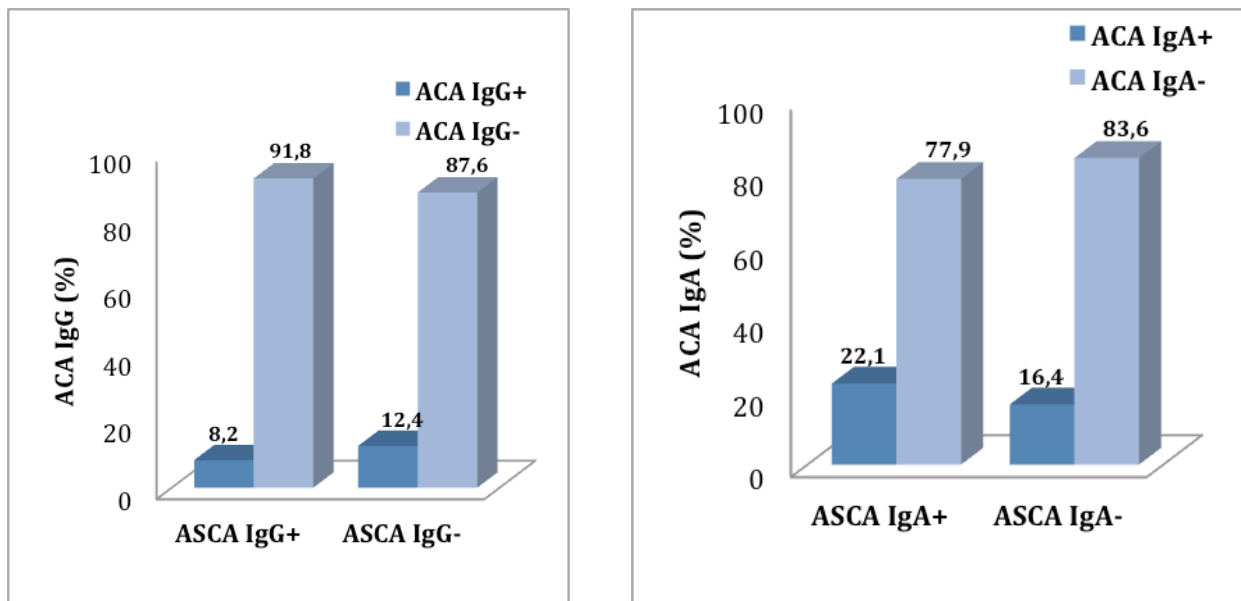
Az ACA „egyáltalán” prevalenciája hasonlóan bizonyult a 10 mg/l feletti C-reaktív proteinnel (CRP), illetve a 10 mg/l vagy ez alatti CRP-vel rendelkező betegcsoportban (29,0% és 21,1%; $p=NS$, χ^2 -teszt Yates korrekcióval).

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

A CD betegek 20,3%-ban észleltünk a követési idő során gyakori relapszusokat. Az ACA prevalencia nem különbözött a relapszusok gyakorisága szerint (gyakori vs. gyakori relapszussal nem rendelkező csoport; ACA IgA 23,5% vs. 16,7%; ACA IgG 3,9% vs. 10,1% és ACA IgM 2,0% vs. 3,5%; $p=NS$ minden esetben).

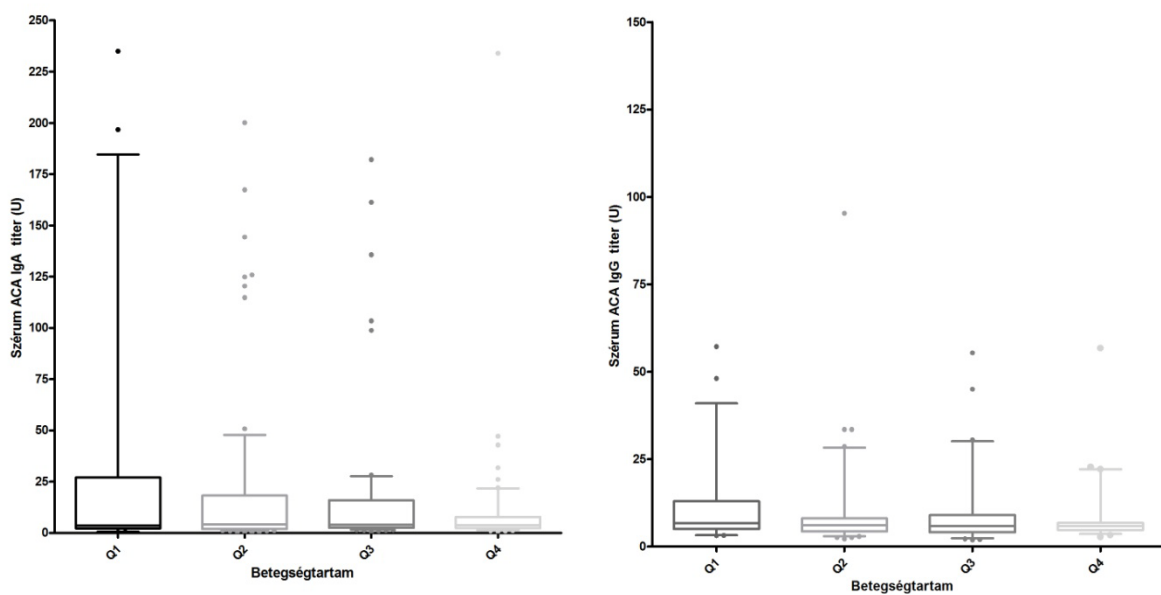
Végül elemeztük a mintavételkori betegségteret és a szerológiai válasz jelenlétének, illetve mértékének összefüggéseit CD-ben. A betegségteret quartilis beosztását követően az ACA „egyáltalán” pozitivitási gyakoriság az egyes csoportokban nem különbözött (Q1: 26,9%; Q2: 22,7%; Q3: 22,4% és Q4: 23,0%; $p=NS$, χ^2 -teszt Yates korrekcióval). Az ACA IgA, illetve IgG szintek és a betegségteret között sem találtunk összefüggést (Kruskal-Wallis teszt). (**8. ábra**)

7. ábra. Anti-kardiolipin antitest (ACA) pozitivitás megoszlása anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest (ASCA) státusz függvényében Crohn-betegekben.



8. ábra. ACA IgA (A) és IgG (B) antitest válasz mértéke a betegség tartam függvényében.

A betegség tartam a 4 kvartilis szerinti bontásban: <1 év (Q1), 1-4 év (Q2), 5-9 év (Q3), és >9 év (Q4). p=NS minden esetben Kruskal-Wallis teszttel. A dobozok a 25diktől a 75dik percentileket jelzik, A vízszintes vonalak a dobozokon belül a median értékeket jelképezik. A "bajszok" pedig az 5diktől a 95dik percentileket jelölik. A pontok az egyes betegek egyedi értékeit jelzik.

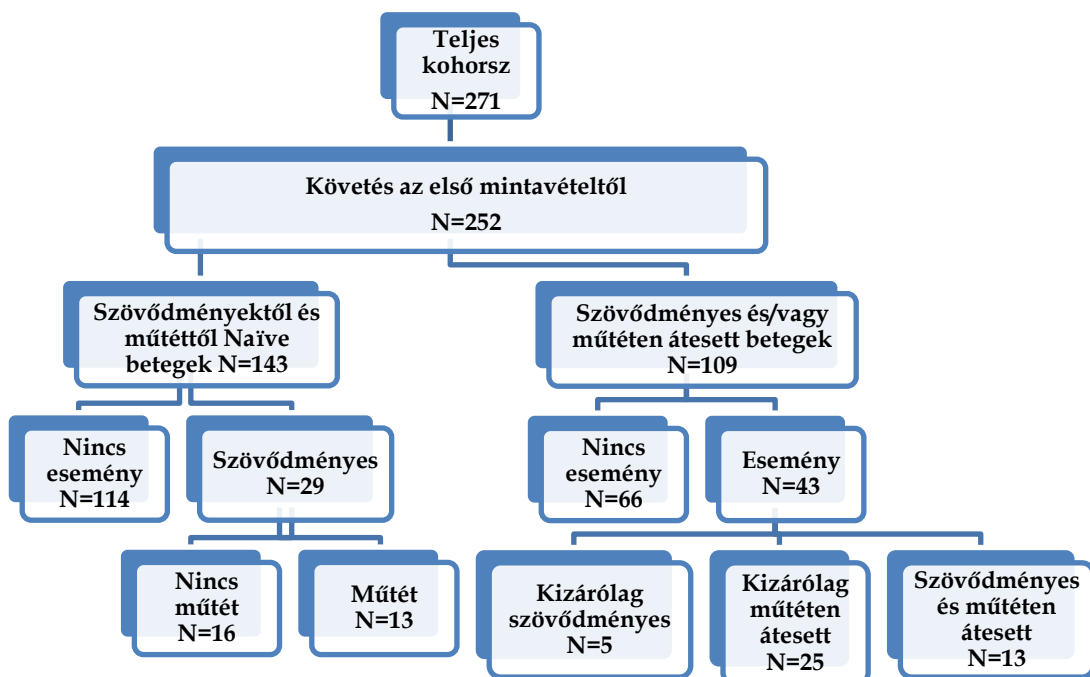


8.1.4 APLA markerek és a betegség progressziójának összefüggései CD-ben

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

9. ábra. Folyamatábra Crohn-betegek kohorsz vizsgálata – APLA tanulmány.

Esemény: szövődmény és/vagy műtét; Szövődmény: strikturizáló és/vagy belső penetráló és/vagy perianális betegség; Műtét: CD-asszociált rezekció.



A B1 csoportba sorolt betegek esetén nem találtunk összefüggést a betegség első betegség-specifikus eseménybe történő progressziója és az APLA pozitivitás jelenléte, illetve hiánya között (**13. táblázat**). Betegség-specifikus eseményként definiáltuk a betegség-specifikus szövődmények (stenózis, belső penetráló betegség és/vagy perianális érintettség kialakulása) mellett a CD-asszociált műtétet. Mindemellett időfüggő univariációs modellben (Kaplan-Meier analízis) a korai progresszió valószínűsége APLA pozitív és negatív csoportban azonosnak bizonyult. A klinikai faktorok közül a betegség lokalizációja és a dohányzás függött össze az első belső penetráló betegség és/vagy stikturizáló forma kialakulásáig eltelt idővel, míg a gyakori relapszus pedig a perianális érintettség kialakulásával korrelált időfüggő modellben (**14. táblázat**).

Külön értékeltük az APLA-k jelentőségét azon betegcsoportban, ahol a mintavételt megelőzően már jelen volt valamely betegség-specifikus szövődmény és/vagy korábban már műtéten átesett a beteg. Összesen 117 CD betegnek (43,5%) volt a mintavétel időpontjában a Montreáli Klasszifikáció értelmében szövődményes betegségformája (56 beteg tartozott a B2, míg 61 beteg pedig a B3 csoportba). Közülük 109 beteg volt alkalmas rá, hogy bevonjuk őket egy prospektív jellegű követéses vizsgálatba. Ezen betegek 39,4%-ának (43/109) lett újabb betegség-specifikus eseménye a követés során. Betegség-specifikus eseményként definiáltuk a belső penetráló és/vagy perianális penetráló betegség kialakulását, illetve CD asszociált műtétet. Kizárólag betegség-specifikus szövődmény a betegek 11,6%-ban, kizárólag műtét a betegek 58,1%-ban, míg mindkettő a betegek 30,2%-ban következett be (**9. ábra**). Egy újabb betegség-specifikus eseménybe való progresszió nem mutatott összefüggést sem az APLA pozitivitással, sem annak hiányával (**15. táblázat**). Kaplan-Meier analízist végezve az új betegség-specifikus szövődménybe való korai progresszió valószínűsége az APLA pozitív és negatív betegcsoportban nem különbözött (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

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

13. táblázat. Anti-foszfolipid antitestek (APLA) előfordulási gyakorisága és betegség-specifikus szövődménytől mentes és műtéti szempontból naiv/korábban műtéten át nem esett Crohn beteg (CD) kohorsz klinikai jellemzői

Faktorok	A mintavételkor CD B1 csoportba tartozó betegek követése (n=143)					
	CD B1 Összesen (n= 143)	Szövődménytől mentes (n=114)	Perianális változás kizárólag (B1p) (n=7)	Viselkedés változás B2-be vagy B3-ba (n=22)	Műtéten át nem esett (n=130)	Műtéten átesett (n=13)
Férfi/nő (n)	60/83	45/69	5/2	10/12	55/75	5/8
Életkor - diagnóziskor (év)*	25,0 (19,0-34,0)	26,0 (20,0-34,3)	17,0 (14,0-31,0)	25,0 (18,8-34,8)	25,0 (19,0-34,0)	31,0 (18,0-35,5)
Betegség tartam (év)*	3,0 (1,0-6,0)	2,0 (1,0-7,0)	3,0 (1,0-5,0)	3,0 (1,0-5,0)	2,0 (1,0-6,0)	3,0 (1,0-10,0)
Lokalizáció ¹						
L1	30 (21,0%)	24 (21,1%)	0 (0,0%)	6 (27,3%)	26 (20,0%)	4 (30,8%)
L2	51 (35,7%)	44 (38,6%)	3 (42,9%)	4 (18,2%)	48 (36,9%)	3 (23,1%)
L3	62 (43,3%)	46 (40,4%)	4 (57,1%)	12 (54,5%)	56 (43,1%)	6 (46,2%)
kizárólag L4	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Gyakori relapszus ¹	27 (18,9%)	18 (15,8%) [†]	4 (57,1%) [†]	5 (22,7%)	23 (17,7%)	4 (30,8%)
Dohányzási szokások ¹ igen	21 (16,2%)	14 (12,3%) [□]	2 (28,6%)	8 (36,4%) [□]	21 (16,2%)	3 (23,1%)
Követési idő a mintavételkor, hónap*	53,4 (38,0-79,3)	51,7 (36,9-73,9)	79,8 (42,9-91,4)	64,7 (45,6-85,0)	50,9 [‡] (37,25-74,2)	84,0 [‡] (60,0-91,7)
Pozitív markerek (%)						
Anti-β2-GPI IgG	1,4	1,8	0,0	0,0	1,6	0,0
Anti-β2-GPI IgM	5,0	5,3	16,7	0,0	5,5	0,0
Anti-β2-GPI IgA	2,8	1,8	16,7	4,5	3,1	0,0
<i>Anti-β2-GPI egyáltalán</i>	8,5	8,8	16,7	4,5	9,4	0,0
ACA IgG	9,2	11,5	0,0	0,0	10,2	0,0
ACA IgM	2,8	3,5	0,0	0,0	3,1	0,0
ACA IgA	17,0	18,6	33,3	4,5	18,8	0,0
<i>ACA egyáltalán</i>	19,9	22,1	33,3	4,5	21,9	0,0
Anti-PS/PT IgG	8,5	8,0	0,0	13,6	7,8	15,4
Anti-PS/PT IgM	7,8	8,8	16,7	0,0	7,8	7,7
Anti-PS/PT IgA	9,9	9,7	16,7	9,1	10,9	0,0
<i>Anti-PS/PT egyáltalán</i>	20,6	19,5	33,3	22,7	20,3	23,1

¹n (%), *: medián (IQR)

Lokalizáció: L1: ileális, L2: colon, L3: ileocolon, L4: felső gasztrointesztinális érintettség

Viselkedés: B1: nem strikturizáló/nem penetráló, B2: sztenotizáló, B3: penetráló

□ p=0,01; †p=0,02 χ^2 -teszt Yates korrekcióval, ‡p<0,01 Mann-Whitney teszt,

14. táblázat. Szerológiai és klinikai faktorok összefüggésének a vizsgálata időfüggő modellben (univariációs Kaplan Meier és Log-rank analízis) a szövődményes betegségforma kialakulásával B1 viselkedési fenotípusú Crohn betegekben (CD) (n=143)

Változó	Belső penetráló és/vagy strikturizáló szövődmény		Perianális penetráló szövődmény		CD-hez kapcsolódó hasi műtét	
	HR (95%CI)	P _{LogRank}	HR (95%CI)	P _{LogRank}	HR (95%CI)	P _{LogRank}
Nem (férfi)	1,10 (0,47-2,55)	0,83	2,69 (0,80-9,03)	0,11	0,91 (0,33-2,55)	0,86
Dohányzás	3,72 (1,23-11,21)	0,02	1,61 (0,36-7,19)	0,53	1,64 (0,45-5,97)	0,45
Lokalizáció (kizárólag vastagbél érintettség)	0,41 (0,17-0,96)	0,04	1,00 (0,29-3,43)	0,99	0,61 (0,22-1,74)	0,36
Gyakori relapszus	1,10 (0,39-3,07)	0,85	7,29 (1,72-30,99)	0,007	1,64 (0,44-6,10)	0,46
APLA egyáltalán	1,36 (0,59-3,16)	0,47	1,30 (0,40-4,27)	0,66	1,37 (0,49-3,80)	0,55
Anti-β2-GPI egyáltalán	0,56 (0,13-2,32)	0,42	0,99 (0,13-7,70)	0,99	0,33 (0,06-1,81)	0,20
ACA egyáltalán	0,41 (0,13-1,26)	0,12	1,12 (0,23-5,49)	0,89	0,30 (0,07-1,27)	0,10
Anti-PS/PT egyáltalán	1,07 (0,39-2,97)	0,89	1,74 (0,38-8,03)	0,48	1,11 (0,29-4,18)	0,88

APLA: anti-foszfolid antitestek, β2-GPI: béta2-glikoprotein-I, ACA: anti-kardiolipin antitest, PS/PT: foszfatidilszerin/protrombin komplex

HR: hazard ratio, 95%CI: 95% megbízhatósági tartomány (konfidencia intervallum), félkövér betűvel jeleztük, amikor $p < 0,05$

15. táblázat. Anti-foszfolipid antitestek (APLA) előfordulási gyakorisága és betegség-specifikus szövődéssel az első mintavétel időpontjában már rendelkező illetve korábbi műtéten átesett Crohn beteg (CD) kohorsz klinikai jellemzői

Faktorok	A mintavételkor CD B2 és B3 csoportokba tartozó betegek követése Teljes kohorsz (n=109)						
	Korábban szövődményes és/vagy műtéten átesett CD betegek Teljes kohorsz (n= 109)	Szövődmény mentes ill, műtéten át nem esett (n=66)	Szövődményes és/vagy műtéten átesett (n=43)	Szövődmény mentes (n=91)	Szövődményes (n=18)	Műtéten át nem esett (n=71)	Műtéten átesett (n=38)
Férfi/nő (n)	45/64	27/39	18/25	40/51	5/13	28/43	17/21
Életkor – első mintavételkor (év)*	32,0 (27,0-43,0)	35,5 (27,0-48,3)	30,0 (23,0-41,0)	34,0 (27,0-46,0)	30,5 (19,0-39,5)	36,0 (27,0-46,0)	30,0 (22,8-38,3)
Életkor - diagnóziskor (év)*	24,0 (20,0-33,5)	26,5 (21,8-35,3)	21,0 (17,0-30,0)	26,0 (20,0-34,0)	20,0 (14,5-26,3)	26,0 (21,0-35,0)	21,0 (17,0-29,3)
Betegség tartam (év)*	7,0 (2,0-11,0)	7,0 (2,0-12,0)	8,0 (2,0-11,0)	7,0 (2,0-12,0)	9,0 (5,8-10,3)	7,0 (2,0-12,0)	7,5 (2,0-10,3)
Lokalizáció¹							
L1	12 (11,0%)	7 (10,6%)	5 (11,6%)	11 (12,1%)	1 (5,6%)	7 (9,9%)	5 (13,2%)
L2	14 (12,8%)	9 (13,6%)	5 (11,6%)	12 (13,2%)	2 (11,1%)	10 (14,1%)	4 (10,5%)
L3	82 (75,2%)	49 (74,2%)	33 (76,7%)	67 (73,6%)	15 (83,3%)	53 (74,6%)	29 (76,3%)
kizárólag L4	1 (1,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)	0 (0,0%)
Gyakori relapszus¹	25 (22,9%)	14 (21,2%)	11 (25,6%)	21 (23,1%)	4 (22,2%)	14 (19,7%)	11 (28,9%)
Dohányzási szokások¹ igen	22 (20,2%)	13 (19,7%)	9 (20,9%)	20 (22,0%)	2 (11,1%)	15 (21,1%)	7 (18,4%)
Követési idő a mintavételkor, hónap*	64,2 (50,9-81,4)	58,95 (45,8-80,5)	67,3 (52,1-83,3)	57,9 (45,5-78,6) ‡	82,4 (64,3-87,6) ‡	64,2 (45,9-81,5)	62,9 (51,8-79,9)
Pozitív markerek (%)							
Anti-β2GPI IgG	2,8	1,5	4,7	1,1	11,1	1,4	5,3
Anti-β2GPI IgM	0,9	1,5	0,0	1,1	0,0	1,4	0,0
Anti-β2GPI IgA	2,8	3,1	2,3	3,3	0,0	2,9	2,6
Anti-β2GPI egyáltalán	6,5	6,2	7,0	5,6	11,1	5,7	7,9
ACA IgG	8,3	10,8	4,7	8,9	5,6	11,4	2,6
ACA IgM	3,7	3,1	4,7	4,4	0,0	2,9	5,3
ACA IgA	19,4	20,0	18,6	18,9	22,2	20,0	18,4
ACA egyáltalán	25,0	27,7	20,9	25,6	22,2	27,1	21,1
Anti-PS/PT IgG	7,4	7,7	7,0	6,7	11,1	7,1	7,9
Anti-PS/PT IgM	12,0	12,3	11,6	11,1	16,7	12,9	10,5
Anti-PS/PT IgA	9,3	9,2	9,3	10,0	5,6	8,6	10,5
AntiPS/PT egyáltalán	22,2	21,5	23,3	21,1	27,8	21,4	23,7

¹n (%),*: medián (IQR) Lokalizáció: L1: ileális, L2: colon, L3: ileocolon, L4: felső gasztrointesztinális érintettség. Viselkedés: B1: nem strikturizáló/nem penetráló, B2: sztenotizáló, B3: penetráló. ‡p<0,01 Mann-Whitney teszt alkalmazásával.

8.1.5 APLA markerek és tromboembóliás események IBD-ben

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

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

16. táblázat foglalja össze CD betegekben a trombotikus esemény jelenléte és típusa szerinti felosztásban a betegek klinikai jellemzőit, az APLA prevalenciáját, illetve a trombofiliák jelenleg ismert genetikai és szerológiai markereit. Az egyes APLA-k összefüggéseit a tromboembóliás esemény bekövetkezésének valószínűségével nem csak külön-külön, hanem az APLA antitest pozitivitások számának függvényében is vizsgáltuk. Sem CD, sem pedig UC esetében sem volt nagyobb a tromboembóliás esemény kialakulásának valószínűsége az APLA-ra többszörösen pozitív betegekben.

16. táblázat. Anti-fosfolipid antitestek (APLA) és trombofília markerek megoszlása, illetve az adott csoport klinikai jellemzői a teljes Crohn beteg (CD) kohorszban a trombózis jelenlétének és típusának megfelelő felosztás szerint

Faktor	A teljes CD beteg kohorsz követése a diagnózistól (n=265)				
	Trombózis nem volt (n=251)	Arteriás Trombózis (n=3)	Vénás Trombózis (n=11)	Spontán vetélés nem történt (n=146)	Spontán vetélés történt (n=10)
Férfi/nő	104/147	1/2	7/4	146/0	10/0
Életkor - diagnóziskor (év)*	25,0 (19,0-33,0)	40,0 (28,0-42,0)	29,5 (23,3-39,3)	26,0 (20,0-35,0)	25,5 (21,0-35,0)
Gyakori relapszus ¹	48 (20,2%)	0 (0,0%)	4 (36,4%)	33 (24,1%)	2 (20,0%)
Korábbi trombózis ¹	1 (0,4%) [□]	0 (0,0%)	4 (36,4%) [□]	2 (1,4%)	0 (0,0%)
Dohányzási szokások ¹ igen	48 (19,1%)	0 (0,0%)	3 (27,3%)	22 (15,1%)	2 (20,0%)
Követési idő a diagnózistól, hónap*	102,2 (63,3-172,8) [†]	149,9 (130,8-219,8)	186,3 (142,0-244,2) [†]	109,0 (61,8-184,6)	136,5 (95,4-180,6)
Pozitív markerek (%)					
Anti-β2-GPI IgG és/vagy IgM	4,8	0,0	9,1	4,9	10,0
Anti-β2-GPI IgA	2,8	0,0	0,0	4,9	0,0
ACA IgG és/vagy IgM	12,1	0,0	27,3	13,9	10,0
ACA IgA	19,0	66,7	0,0	20,1	10,0
Anti-PS/PT IgG és/vagy IgM	14,6	50,0	36,4	18,3	40,0
Anti-PS/PT IgA	8,9	50,0	9,1	7,7	10,0
Legalább 1 APLA poz.	48,0	66,7	54,5	52,8	60,0
Legalább 2 APLA poz.	16,1	33,3	9,1	18,1	10,0
Legalább 3 APLA poz.	3,2	0,0	9,1	4,9	0,0
Trombofília markerek[⌘] (%)					
LA	7,5	0,0	0,0	5,1	0,0
PS deficiencia (öröklött és/vagy szerzett)	8,1	0,0	25,0	12,7	0,0
ATIII deficiencia (öröklött és/vagy szerzett)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PC deficiencia (öröklött és/vagy szerzett)	3,0	0,0	0,0	4,8	0,0
FV Leiden	5,9[⌘]	0,0	42,9[⌘]	7,8	0,0
FII20210A	5,9	0,0	16,7	7,8	0,0

¹n (%), *: medián (IQR), [⌘] Trombofiliák ismert főbb szerológiai és genetikai markerei 105 beteg esetén álltak rendelkezésre

[†]p=0,003; * p=0,009; [†]p=0,01 Kruskal-Wallis tesztet alkalmazva.

[□] p<0,0001; [⌘] p=0,012 χ^2 -teszt Yates korrekcióval

8.1.6 Az APLA markerek stabilitása

A CD (n=198) és UC-ben szenvedő betegek (n=103) egy alcsoportjában betegenként legalább két szérum minta került levételre a követés során, így lehetőségünk nyílt a betegségfolyásának különböző időpontjaiban levett minták analízisét elvégezve az APLA státusz (pozitív vagy negatív az adott antitestekre nézve) időbeli stabilitására vonatkozó vizsgálatokra. A mintavételek között eltelt medián idő CD-ben 13,5 hónap [IQR; 6,8–22,9 hónap], UC-ben 12,1 hónap [IQR; 5,7–20,4 hónap] volt. Az anti- β 2-GPI státusz időben meglehetősen stabilnak bizonyult mindhárom Ig szubtípus esetén. A CD, illetve UC betegeknek mindössze 1,5%-5,8%-a változtatta meg az anti- β 2-GPI antitest státuszát az első mintavételhez viszonyítva. Ugyanakkor jelentős különbségeket találtunk az ACA Ig szubtípusok tekintetében. Az ACA IgM státusz az anti- β 2-GPI-hez hasonlóan stabilnak bizonyult. Ezzel szemben az ACA IgG, illetve ennél még kifejezettebben az ACA IgA státuszban történt idővel szignifikáns változás, elsősorban a negatív antitest státuszról lett pozitív. Az antitest státuszban történt változások sokkal kifejezettebbek voltak CD-ben az UC-hoz képest (ACA IgA: 49,9% vs. 23,3% és ACA IgG: 21,2% vs. 5,8%). Stabilitásra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre az anti-PS/PT antitestek esetén, mivel itt mérés a betegeknek csak az első elérhető szérum mintájából történt. Az APLA státuszban bekövetkezett változásokat az **17. táblázat** foglalja össze.

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

17. táblázat. APLA marker státusz időbeli stabilitása a betegségfolyás során legalább 2 mintával rendelkező IBD betegekben

APLA marker	CD (N= 198) n (%)	UC (N=103) n (%)
Anti-β2-GPI IgG		
Stabilan negatív	194 (98,0%)	97 (94,2%)
Stabilan pozitív	1 (0,5%)	2 (1,9%)
Neg. → poz.	0 (0,0%)	3 (2,9%)
Poz. → neg.	3 (1,5%)	1 (1,0%)
Anti-β2-GPI IgM		
Stabilan negatív	186 (94,0%)	94 (91,3%)
Stabilan pozitív	4 (2,0%)	3 (2,9%)
Neg. → poz.	6 (3,0%)	5 (4,9%)
Poz. → neg.	2 (1,0%)	1 (0,9%)
Anti-β2-GPI IgA		
Stabilan negatív	190 (96,0%)	93 (90,3%)
Stabilan pozitív	1 (0,5%)	4 (3,9%)
Neg. → poz.	3 (1,5%)	5 (4,9%)
Poz. → neg.	4 (2,0%)	1 (0,9%)
ACA IgG		
Stabilan negatív	139 (70,2%)	95 (92,2%)
Stabilan pozitív	3 (1,5%)	1 (1,0%)
Neg. → poz.	42 (21,2%)	6 (5,8%)
Poz. → neg.	14 (7,1%)	1 (1,0%)
ACA IgM		
Stabilan negatív	173 (87,4%)	95 (92,2%)
Stabilan pozitív	3 (1,5%)	1 (1,0%)
Neg. → poz.	18 (9,1%)	7 (6,8%)
Poz. → neg.	4 (2,0%)	0 (0,0%)
ACA IgA		
Stabilan negatív	73 (36,9%)	78 (75,7%)
Stabilan pozitív	13 (6,6%)	0 (0,0%)
Neg. → poz.	93 (46,9%)	24 (23,3%)
Poz. → neg.	19 (9,6%)	1 (1,0%)

Anti-PS/PT mérések kizárólag a betegek első elérhető szérum mintáiból történtek.

8.2 Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata IBD-ben

8.2.1 PAb gyakorisága IBD-ben

A különféle antitestek gyakoriságát IBD-ben és a kontroll csoportban a **18. táblázat** foglalja össze. Szignifikánsan több CD beteg bizonyult pozitívnak az általunk vizsgált IgA/IgG típusú PAb-okra (anti-GP2 IgA/IgG: 10,2%; anti-MZGP2 IgA/IgG: 12,2%; anti-rPAg2 IgA/IgG: 10,2%; anti-CUZD1 (\approx anti-rPAg1): 20,8%) mind az UC szenvedő, mind az egészséges kontrollcsoporthoz képest ($p < 0,01$ mindkettő esetén). Emellett szignifikáns különbségeket találtunk az IgA és IgG szubtypusok esetén is. Ezzel szemben az UC-s és kontroll csoportok között nem volt szignifikáns különbség az antitestek előfordulási gyakoriságában.

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

8.2.2 PAb képződésének összefüggése a teljes betegség tartammal CD-ben: a PAb stabilitása CD-ben

A mintavétel időpontjában az antitest státusz és a klinikai, illetve endoszkópos aktivitás (aktuális HBI vagy SES-CD) között nem találtunk összefüggést (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra). A CD betegek többségénél ($n=192$) betegenként legalább két szérum minta került levételre a követés során, így lehetőségünk nyílt a betegség lefolyásának különböző időpontjaiban levett minták analízisét elvégezve a PAb státusz (pozitív vagy negatív az adott antitestekre nézve) időbeli stabilitására vonatkozóan következtetések levonására/megítélésére. A mintavételek között eltelt medián idő 30,3 hónap volt [IQR, 15.3-48.7]. Érdekes módon a különféle PAb-ok státusza mind az IgA és IgG szubtypusok esetében meglehetősen stabilnak bizonyult, nevezetesen a CD betegek 5% -ban változott idővel a PAb státusz. A PAb-ok időbeli stabilitására vonatkozó adatokat az **19. táblázat** foglalja össze. Ezzel egybehangzó módon a szövődményes betegségforma kialakulása, illetve a műtéti igény sem érintette a különféle PAb-ok esetében az antitest státuszt (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

18. táblázat. Target specifikus PAb-ok előfordulási gyakorisága Crohn betegségben (CD), colitis ulcerosában (UC), illetve egészséges kontroll csoportban (HCONT)

	CD	UC	HCONT
	Anti-GP2 n=266 Anti-MZGP2 n=266 Anti-rPAg n=264	Anti-GP2 n=183 Anti-MZGP2 n=185 Anti-rPAg n=178	Anti-GP2 n=100 Anti-MZGP2 n=100 Anti-rPAg n=100
Anti-GP2 IgG	27 (10,2%) ^{□, **}	3 (1,6%) [□]	1 (1,0%) ^{**}
Anti-GP2 IgA	9 (3,4%) [†]	0 (0,0%) [†]	1 (1,0%)
Anti-GP2 Egyáltalán	27 (10,2%)^{□, *}	3 (1,6%)[□]	2 (2,0%)[*]
Anti-MZGP2 IgG	26 (9,8%) ^{□, §}	2 (1,1%) [□]	2 (2,0%) [§]
Anti-MZGP2 IgA	22 (8,3%) [□]	0 (0,0%) [□]	4 (4,0%)
Anti-MZGP2 Egyáltalán	33 (12,4%)[□]	2 (1,1%)[□]	6 (6,0%)
Anti-rPAg1 IgG	43 (16,3%) [⊘]	12 (6,7%)	0 (0,0%) [⊘]
Anti-rPAg1 IgA	32 (12,1%) [⊘]	11 (6,2%)	0 (0,0%) [⊘]
Anti-rPAg1 Egyáltalán	55 (20,8%)^{†, ⊘}	16 (9,0%)[†]	0 (0,0%)[⊘]
Anti-rPAg2 IgG	18 (6,8%) ^{†, **}	0 (0,0%) [†]	0 (0,0%) ^{**}
Anti-rPAg2 IgA	19 (6,9%) ^{†, **}	1 (0,6%) [†]	0 (0,0%) ^{**}
Anti-rPAg2 Egyáltalán	27 (10,2%)^{□, □}	1 (0,6%)[□]	0 (0,0%)[□]
Anti-rPAg IgG	55 (20,8%) ^{□, ⊘}	12 (6,7%) [□]	0 (0,0%) [⊘]
Anti-rPAg IgA	46 (17,4%) ^{#, ⊘}	12 (6,7%) [#]	0 (0,0%) [⊘]
Anti-rPAg Egyáltalán	73 (27,7%)^{□, ⊘}	17 (9,6%)[□]	0 (0,0%)[⊘]

A szérumbinták antitest pozitívását ELISA rendszerben az anti-MZGP2 esetében ≥ 25 AU/ml, míg az anti-GP2 esetén ≥ 20 AU/ml kapott értékeknél állapítottuk meg, míg az indirekt immunfluoreszcens módszer (IIF) esetében a különféle anti-rPAg antitestek pozitívítási küszöbértéke 1:10-es titer hígításnál lett meghatározva. Ebben az IIF rendszerben az anti-rPAg1 az anti-CUZD1-nal, míg az anti-rPAg2 pedig az anti-GP2 antitesttel feleltethető meg.

CD vs. kontroll csoport: [§] $p=0,015$; ^{*} $p=0,01$; ^{**} $p<0,01$; [□] $p=0,001$; [⊘] $p<0,001$;

CD vs. UC: [†] $p=0,01$; [#] $p<0,01$; [‡] $p=0,001$; [□] $p<0,001$

χ^2 -teszt Yates korrekcióval.

19. táblázat. Pankreász ellenes antitest (PAb) státusz időbeli stabilitása a betegségfolyás során Crohn-betegekben (CD)

Szerológiai markerek	CD Anti-GP2 n=191 Anti-MZGP2 n=201 Anti-rPAg1 n=203 Anti-rPAg2 n=203
Anti-GP2 IgG Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	163 (85,3%) 16 (8,4%) 9 (4,7%) 3 (1,6%)
Anti-GP2 IgA Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	179 (93,7%) 5 (2,6%) 4 (2,1%) 3 (1,6%)
Anti-MZGP2 IgG Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	179 (89,1%) 11 (5,5%) 5 (2,5%) 6 (3,0%)
Anti-MZGP2 IgA Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	180 (89,6%) 8 (4%) 10 (5,0%) 3 (1,0%)
Anti-rPAg1 IgG Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	163 (80,3%) 27 (13,3%) 3 (1,5%) 10 (4,9%)
Anti-rPAg1 IgA Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	173 (85,2%) 16 (7,9%) 6 (3,0%) 8 (3,9%)
Anti-rPAg2 IgG Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	189 (93,1%) 11 (5,4%) 2 (1,0%) 1 (0,5%)
Anti-rPAg2 IgA Stabilan negatív Stabilan pozitív Neg. → poz. Poz. → neg.	188 (92,6%) 10 (4,9%) 1 (0,5%) 4 (2,0%)

8.2.3 PAb prognosztikai értéke a betegségfolyás előrejelzésében CD-ben

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

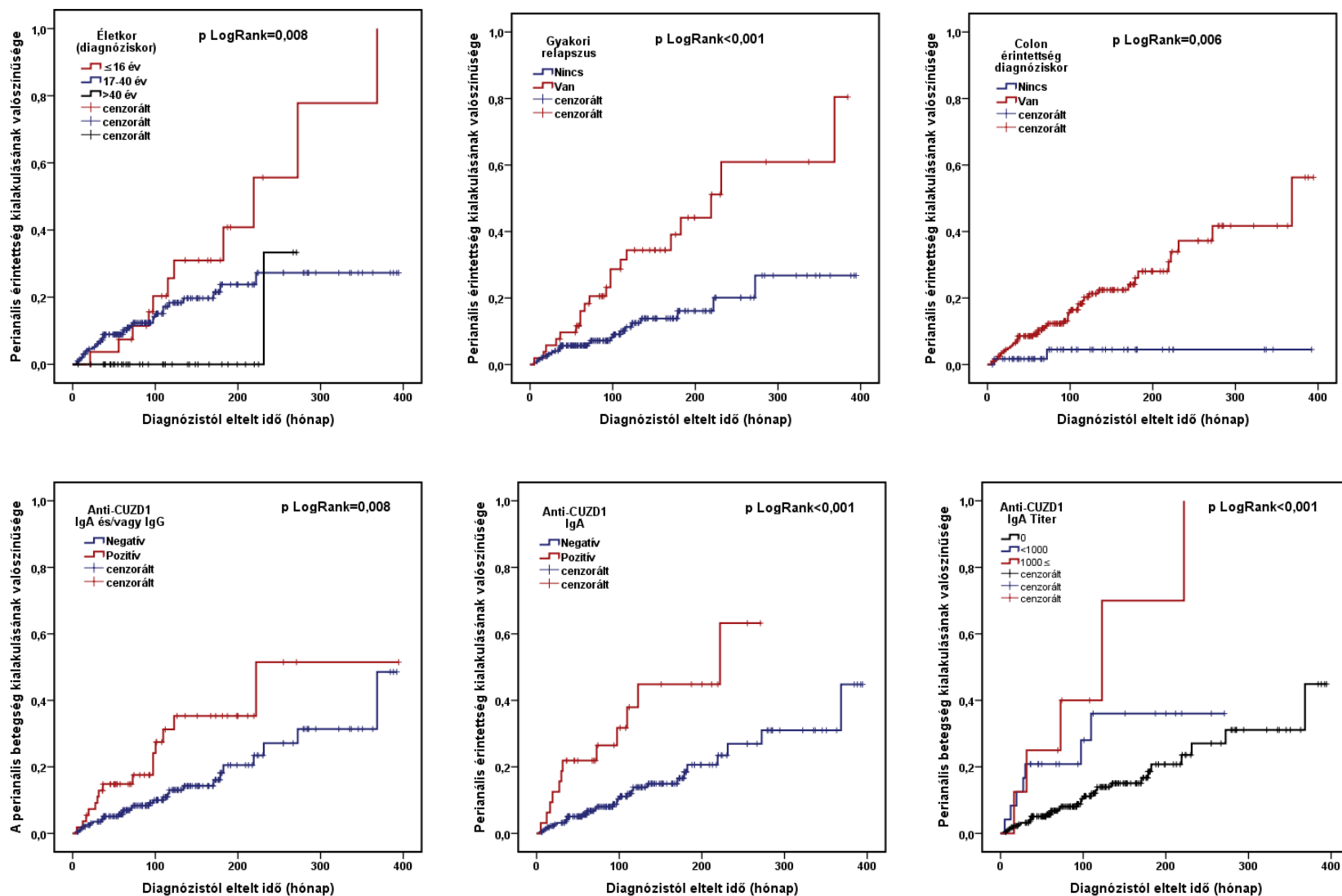
Egyik PAb marker sem bizonyult alkalmasnak a szövődményes betegségforma (belső penetráló és/vagy strikturizáló betegség) kialakulásának előrejelzésére a gyulladással viselkedésbeli fenotípussal (B1) induló betegekben (n=211).

Azon betegek közül, akik korábban nem rendelkeztek perianális érintettséggel (bármely lumenális fenotípussal rendelkező beteg bevonásával) (n=216) az anti-CUZD1 IgA/IgG pozitív betegekben nagyobb valószínűséggel alakult ki perianális komplikáció szemben az ezen antitestekre negatív betegcsoporttal (pLogRank=0,008). Ezen összefüggés erősebbnek bizonyult az IgA antitest szubtípus esetében (pLogRank<0,001), valamint kvantitatív összefüggést találtunk az IgA antitest titerekkel is (pLogRank<0,001) (**10. ábra**).

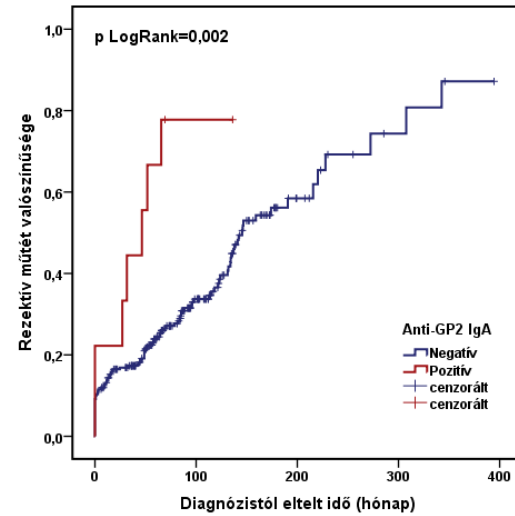
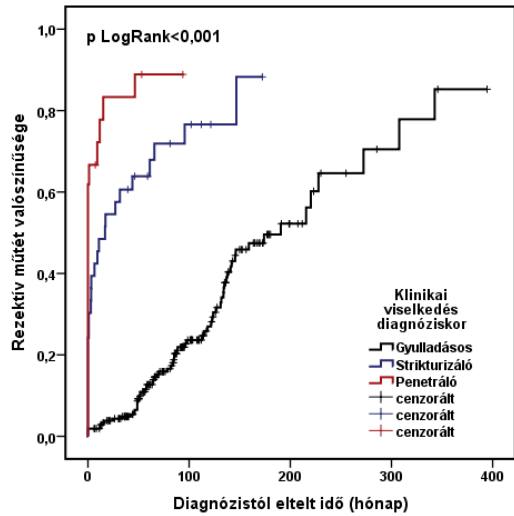
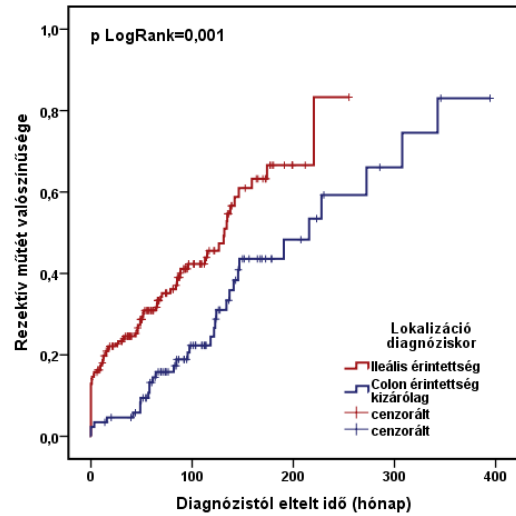
Kizárva a fent vizsgált csoportból azokat a betegeket, akik ugyan perianális érintettséggel nem rendelkeztek a diagnózis időpontjában, viszont valamely szövődményes betegségformával igen (B2/3-p fenotípus) alcsoport analízist végeztünk a perianális érintettséggel kezdetben nem rendelkező gyulladással fenotípusú (B1-p) betegekben (n=169), melynek eredményeként a fentiekben ismertetetthez hasonló eredményeket kaptunk a perianális betegség kialakulását illetően időfüggő univariációs modellekben (pLogRank<0,001 az anti-CUZD1 IgA esetén).

A műtéti szempontból naív, műtéten korábban át nem esett betegcsoportot (n=234) elemezve az első rezektív műtéttig eltelt idő rövidebbnek bizonyult az anti-GP2 IgA antitest pozitív betegcsoportban (pLogRank=0.002) (**11. ábra**). Ugyanakkor a posztoperatív körülményeket vizsgálva a korábban már műtéten átesett betegcsoportban (n=109) az anti-GP2 IgA antitest jelenléte nem bizonyult alkalmasnak egy esetleges következő műtét predikciójára.

10. ábra A perianális érintettség kialakulásának valószínűsége a diagnózistól eltelt idő függvényében Kaplan-Meier túlélési analízis alapján



11. ábra A rezektív műtét valószínűsége a diagnózistól eltelt idő függvényében Kaplan-Meier túlélési analízis alapján



A különféle PAb markerek prediktív értékének további elemzése végett többváltozós Cox regressziós analízist végeztünk, melyekben az univariációs modellekben (Kaplan-Meier és Log-rank analízis) 0,1 alatti *p* értéket adó változókkal (nem, klinikai változók) korrigáltunk. Az anti-CUZD1 IgA és anti-GP2 IgA antitesteket a modellben külön értékeltük. Az anti-CUZD1 IgA független kockázati tényezőnek bizonyult a perianális betegség kialakulására nézve mind az elsőként ismertetett (**20. táblázat**), mind pedig az al csoport vizsgálat szerint (ezen utóbbi adatok nem kerülnek bemutatásra). Ezzel szemben az univariációs modellben talált anti-GP2 és a rezektív műtéti igény közötti összefüggés multivariációs modellben már nem bizonyult szignifikánsnak (**20. táblázat**).

20. táblázat Multivariációs Cox-regressziós modell összefoglalója: (A) a perianális érintettség kialakulásáig (B) a rezektív műtéti eltelt időt befolyásoló faktorok Crohn-betegekben. A pozitív összefüggéseket kövér betűtípussal jeleztük/emeltük ki. *p* érték: szignifikancia szint; 95% CI: 95% konfidencia intervallum

A

	<i>p</i> érték	Hazard Ratio	95% CI
Női nem	0,275	0,70	0,36-1,33
Életkor (diagnóziskor)	0,13		
> 40 év	Referencia		
17-40 év	0,088	5,84	0,77-44,36
≤ 16 év	0,049	8,42	1,01-70,39
Gyakori relapszus	< 0,001	3,50	1,78-6,89
Colon érintettség	0,044	4,41	1,04-18,73
Klinikai viselkedés	0,267		
Gyulladásos	Referencia		
Strukturizáló	0,368	1,58	0,58-4,30
Penetráló	0,137	2,65	0,73-9,59
Anti-CUZD1 IgA pozitivitás	< 0,001	3,67	1,77-7,62

B

	<i>p</i> érték	Hazard Ratio	95% CI
Női nem	0,970	0,99	0,66-1,49
Életkor (diagnóziskor)	0,813		
> 40 év	Referencia		
17-40 év	0,540	0,84	0,47-1,48
≤ 16 év	0,821	0,91	0,40-2,05
Ileális érintettség	0,129	1,44	0,90-2,32
Klinikai viselkedés	< 0,001		
Gyulladásos	Referencia		
Strikturizáló	< 0,001	5,45	3,27-9,10
Penetráló	< 0,001	12,48	6,69-23,28
Anti-GP2 IgA pozitivitás	0,225	1,65	0,73-3,73

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

Fiatal korban kezdődő betegség esetén az anti-MZGP2 IgA/IgG antitestek gyakoribbnak bizonyultak (A1: 28,6%; A2: 11,3%; A3: 5,7%; $p=0,012$). Ileális érintettség esetén pedig az anti-rPAg2 IgA/IgG antitestek prevalenciája volt szignifikánsan magasabb a kizárólag colon érintettséggel rendelkező csoporthoz képest (L1/3 vs. L2; 13,2% vs. 4,5%; $p=0,032$). A követési idő végén penetráló betegség fenotípussal rendelkező betegek körében gyakoribb volt az anti-GP2 IgA/IgG (17,9% vs. 7,3%; $p=0,026$), anti-MZGP2 IgA/IgG (20,2% vs. 8,9%; $p=0,040$) és anti-rPAg2 IgA antitest (13,1% vs. 4,8%; $p=0,040$) pozitivitás. Szintén kimutatható volt összefüggés a teljes követési idő alatt a rezektív műtéti igény és az anti-GP2 IgA/IgG pozitivitás (14,5% vs. 6,6%; $p=0,036$) között. Az extraintesztinális manifesztációk tekintetében pedig az anti-rPAg2 IgA/IgG pozitivitás és a PSC jelenléte között találtunk összefüggést (37,5% vs. 9,4%; $p=0,038$). Ezzel szemben a CUZD1 ellen termelődő PAb pozitivitás (\approx anti-rPAg1) összefüggést mutatott a colon érintettséggel (L2/L3 vs. L1; 23,7% vs. 10,5%; $p=0,041$ az IgA/IgG szubtípus esetén), a teljes követési idő végén a perianális betegséggel (P1 vs. P0, 32,6% vs. 15,0%; $p=0,001$ az IgA/IgG szubtípus esetén) és az IBDs bőr érintettséggel kialakulásával (23,5% vs. 10,4%; $p=0,044$ az IgA szubtípus esetén). **21. táblázat** mutatja be a különféle PAb-ok antitest reaktivitásainak összefüggéseit a CD betegek klinikai jellemzőivel a diagnózis időpontjában és a követési idő végén a különböző Ig szubtípusoknak megfelelő felosztásban. Emellett összefüggést találtunk a különféle IgA típusú PAb-ok jelenléte és az ASCA antitest pozitivitás között. A különböző PAb IgA antitestek szignifikánsan gyakoribbak voltak az ASCA IgA pozitív csoportban az ASCA IgA negatív csoporthoz képest (anti-GP2 IgA: 6,7% vs. 0,0%; anti-MZGP2 IgA: 14,6% vs. 1,7%; anti-rPAg1: 17,5% vs. 4,9% és anti-rPAg2: 11,7% vs. 2,4%; $p<0,01$ minden esetben). A PAb IgG pozitivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget az ASCA IgG jelenlétének, illetve hiányának függvényében (**21. táblázat**). A különféle PAb-ok prevalenciája vizsgálatunkban nem függött össze a főbb NOD2/CARD15 mutációk jelenlétével vagy ezek hiányával (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

21. táblázat. A különböző PAb-okra adott antitest válaszok összefüggései a betegség klinikai fenotípusával, illetve más szerológiai markerekkel CD-ben (A) diagnóziskor és (B) a követési idő végén. A diagnóziskori lokalizációra és perianális betegségekre, a NOD2/CARD15 mutációkra, illetve a követési idő végéig a szisztémás GCS igényre vonatkozó sorokat kitöröltük, mivel az adott paraméterekre vonatkozóan nem kaptunk statisztikailag szignifikáns eltéréseket; a pozitív összefüggéseket félkövér betűtípussal, a negatívakat pedig dőlt betűvel jeleztük (p értékek, esélyhányados - odds ratio - OR és 95%CI). Rövidítések: GCS – szisztémás glükokortikoidok, PSC – primer szklerotizáló cholangitis.

(A)

	Anti-GP2			Anti-MZGP2			Anti-rPAg2 (≈anti-GP2)			Anti-rPAg1 (≈anti-CUZD1)		
	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG
Korai kezdet				0,004 4,96 (1,82–13,51)	0,041 2,97 (1,08-8,18)	0,012 3,41 (1,36-8,54)						
Colon érintettség										0,022 4,66 (1,08–20,14)		0,041 2,64 (1,07–6,52)
Ileal érintettség								0,040 4,30 (0,97-19,15)	0,032 3,16 (1,06-9,44)			
ASCA IgA	0,004 18,25 (1,05–317,2)			<0,001 10,17 (2,32–44,5)								
ASCA IgG		0,007 3,78 (1,38–10,38)										
Anti-OMP PlusTM IgA				0,003 4,68 (1,67–13,13)								

(B)

	Anti-GP2			Anti-MZGP2			Anti-rPAg2 (≈anti-GP2)			Anti-rPAg1 (≈anti-CUZD1)		
	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG	IgA	IgG	IgA és/ vagy IgG
Perianális betegség										0,001 3,59 (1,66–7,74)	0,009 2,45 (1,26–4,76)	0,001 2,75 (1,50–5,05)
Strikturizáló												
Penetráló	0,032 5,55 (1,12–27,40)	0,026 2,78 (1,15–6,69)	0,026 2,78 (1,15–6,69)	0,013 3,60 (1,31–9,90)		0,023 2,61 (1,15–5,90)	0,040 2,96 (1,05–8,36)					
Rezekatív műtéti igény	0,036 5,20 (1,06–25,5)	0,036 2,47 (1,07–5,68)	0,036 2,47 (1,07–5,68)									
Bőr érintettség										0,044 2,64 (1,08–6,48)		
PSC							0,014 9,00 (1,97–41,08)		0,038 5,80 (1,31–25,78)			

8.2.5 Az anti-GP2 antitestek interassay vizsgálata

Összességében a három különböző módszer közötti egyezés 94,0% és 95,6% közé esik az anti-GP2 IgG esetében, míg ez az anti-GP2 IgA-nál 91,6%-tól 96,4%-ig terjed. A vizsgálatunk során alkalmazott különféle módszerek közötti konkordancia (egyezőség) jónak bizonyult a κ együtthatók (koefficiensek) alapján. A konkrét értékeket az **22. táblázat** foglalja össze.

22. táblázat. Laboratóriumi egyezés (konkordancia) a három különböző anti-GP2 teszt között (A) az IgG és (B) IgA antitest szubtypusoknak megfelelően

A rész

Tesztek	Konkordancia ^a az alábbi esszék esetében:		
	INOVA	Generic Assay	Euroimmun
INOVA	1		
Generic Assay	0,686	1	
Euroimmun	0,703	0,685	1

B rész

Tesztek	Konkordancia ^a az alábbi esszék esetében:		
	INOVA	Generic Assay	Euroimmun
INOVA	1		
Generic Assay	0,492	1	
Euroimmun	0,444	0,625	1

^a A laboratóriumi egyezést (konkordancia) a κ együtthatókkal jellemeztük.

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

ANCA előfordulási gyakorisága krónikus májbeteggekben

Az ANCA IgA és IgG prevalenciáját a különböző etiológiájú krónikus májbetegségeken (CLD) a **23. táblázat** szemlélteti. Az egészséges kontroll csoporthoz képest az ANCA szeropozitivitás gyakoriságát tekintetbe véve az ANCA IgA és/vagy IgG pozitívítást szignifikánsan magasabbnak bizonyult minden CLD csoportban. A CLD csoporton belül az ANCA szeropozitivitás szignifikánsan magasabb volt a cirrhosisos csoportban szemben azokkal a krónikus májbeteggekkel, akikben még nem alakult ki cirrhosis ($OR_{ANCA\ Total}$ 1,96; 95% CI: 1,28–3,00; $p < 0,01$ krónikus HCV fertőzés esetén és $OR_{ANCA\ Total}$: 4,37; 95% CI: 2,76–6,90; $p < 0,001$ PBC esetén). Immunglobulin szubtypus tekintetében az IgA típusú ANCA szignifikánsan gyakoribb volt a cirrhosisos betegek körében (52,2%) szemben a krónikus HCV fertőzésben (10,9%), illetve PBC-ben (27,4%) szenvedőkkel ($p < 0,001$ mindkét esetben). Ezzel szemben az IgG típusú ANCA krónikus HCV fertőzött betegcsoportban (52,1%) volt gyakoribb összehasonlítva a cirrhosisban (36,4%; $p < 0,01$), illetve PBC-ben (14,7%; $p < 0,001$) szenvedőkkel. A HCV fertőzött betegek közül egy sem szenvedett ANCA asszociált vasculitisben.

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

alkalmazva, míg PBC-s betegek 50,0%-a és a cirrhotikus betegek 35,0%-a esetén volt azonos a festődés.

23. táblázat. ANCA előfordulási gyakorisága krónikus májbetegekben és egészséges kontrollcsoportban

	N	Össz. ANCA pozitív*	ANCA IgA [#]	ANCA IgG [§]	ANCA IgA kizárólag	ANCA IgG kizárólag	ANCA IgA és IgG
Különböző etiológiájú cirrhosis	385	281 (73,0%)	201 (52,2%)	140 (36,4%)	141 (36,6%)	80 (20,8%)	60 (15,6%)
Krónikus HCV	119	69 (58,0%)	13 (10,9%)	62 (52,1%)	7 (5,9%)	56 (47,1%)	6 (5,0%)
PBC	102	39 (38,2%)	28 (27,4%)	15 (14,7%)	24 (23,5%)	11 (10,8%)	4 (3,9%)
Egészséges kontroll	100	4 (4,0%)	0 (0,0%)	4 (4,0%)	0 (0,0%)	4 (4,0%)	0 (0,0%)

HCV = vírusos hepatitis C, PBC = primer biliáris cirrhosis, HC = egészséges kontroll

* $p < 0,01$ krónikus HCV és cirrhosis között vagy PBC; $p < 0,001$ bármely másik két csoport között az össz. ANCA esetén

[#] $p < 0,01$ krónikus HCV és PBC között; $p < 0,001$ bármely másik két csoport között az ANCA IgA vonatkozásában

[§] $p = 0,014$ PBC és HC között; $p < 0,01$ krónikus HCV és cirrhosis között; $p < 0,001$ bármely másik két csoport között az ANCA IgG esetén

χ^2 -tesztet vagy χ^2 -tesztet használva Yates korrekcióval

Az IgA típusú ANCA karakterizációja májcirrhosisban

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

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

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

Cirrhosisos betegekben az ANCA IgA pozitivitás (ide érte/beleértve az IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ eseteket is) a betegség Child-Pugh stádiummal jellemzett súlyosságával arányosan fokozatosan nőtt (**24. táblázat**). Az ANCA IgA jelenléte (ide számolva az IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ eseteket is) emellett összefüggést mutatott ($OR_{ANCAIgA}$: 3,0; 95% CI: 1,90-4,71) az ascites jelenlétével is (**24. táblázat**). A szeropozitivitás esetén kapott eredményekhez hasonló módon minél súlyosabbnak bizonyult a májcirrhosis/betegség, annál magasabb ANCA IgA titer értékeket figyeltünk meg (**12. ábra A**). Az ANCA IgA titerértékek szignifikánsan magasabbak voltak az asciteses beteg körében szemben azokkal a betegekkel, akiknél nem volt ascites (**12. ábra B**).

Az adatokat az alkoholos és nem alkoholos etiológiájú csoportokban külön-külön újraelemezve, ugyanezeket az összefüggéseket kaptuk (**24. táblázat**), bár észleltünk néhány különbséget etiológiai szempontból az ANCA IgA válasz tekintetében. Alkoholos etiológia esetén fokozottabb ANCA IgA képződést észleltünk a nem alkoholos etiológiájú csoporttal

szemben. Összehasonlítva a két csoportban az azonos súlyossági fokú alcsoportokat az alkoholos etiológiájú betegek körében az ANCA IgA pozitív betegek száma szignifikánsan magasabbnak bizonyult (többnyire 20%-kal). Alkoholos etiológiájú betegekben már kevésbé súlyos betegség esetén (Child A stádium vagy ascites jelenlétének hiánya esetén/fennállásakor) emelkedett ANCA IgA pozitivitást észleltünk (53,4% vagy 55,9%) (**24. táblázat**).

Ezzel szemben nem alkoholos etiológiájú betegekben az ANCA IgG válasz ellenkezőképpen viselkedett az ANCA IgA válasszal hoz viszonyítva. A kizárólag ANCA IgG pozitívitás jelenléte (IgA-/IgG+ esetek) fokozatosan csökkent a Child-Pugh stádiummal jellemzett betegség súlyosságával párhuzamosan (**24. táblázat**), illetve negatív összefüggést tapasztaltunk az ascites jelenlétét illetően ($OR_{ANCAIgGkizárólag}: 0,28; 95\%CI: 0,12-0,66$) (**24. táblázat**). Alkoholos etiológiájú betegekben a kizárólagos ANCA IgG pozitívitás (IgA-/IgG+ esetek) aránya a betegség súlyosságától, illetve az ascites jelenlététől függetlenül alacsonynak bizonyult. Ezekben a betegekben már kevésbé súlyos betegség esetén (Child A stádium vagy ascites jelenlétének hiánya esetén/fennállásakor) is észlelhető volt jelzetten csökkent kizárólagos ANCA IgG pozitívítási arány (15,5% vagy 13,5%). Ezek az arányok szignifikánsan alacsonyabbak voltak a nem alkoholos etiológiájú azonos súlyossági fokú alcsoporthoz viszonyítva (41,9% vagy 43,0%; $p < 0,001$ mindkét esetben). Ezek a különbségek a Child C csoportban megszűntek (**24. táblázat**).

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

24. táblázat.

A. ANCA pozitívítás megoszlása cirrhotikus betegek körében a Child-Pugh stádium szerinti súlyossági besorolás függvényében

	Össz.	Child-Pugh stádium		
		A	B	C
Nem alkoholos	86	144	136	105
Alkoholos	58	86	35	18
		58	101	87
ANCA IgA és/vagy IgG	100 (69,4%)	100 (73,5%)	81 (77,1%)	
nem alkoholos	60 (69,8%)	24 (68,6%)	10 (55,6%)	
alkoholos	40 (68,9%)	76 (75,2%)	71 (81,6%)	
ANCA IgA	55 (38,2%)	78 (57,4%)	68 (64,8%)*	
nem alkoholos	24 (27,9%) [§]	14 (40,0%) ^x	8 (44,4%)*	
alkoholos	31 (53,4%)	64 (63,4%)	60 (69,0%)	
ANCA IgG kizárólag	45 (31,2%)	22 (16,2%)	13 (12,4%)*	
nem alkoholos	36 (41,9%) [∅]	10 (28,6%)	2 (11,1%) [□]	
alkoholos	9 (15,5%)	12 (11,9%)	11 (12,6%)	

ANCA IgA = IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ esetek

ANCA IgG kizárólag = IgA-/IgG+ esetek

* $p < 0,001$ és $\square p = 0,031$ a három különböző Child stadium között

[§] $p < 0,01$, ^x $p = 0,016$, ^{*} $p = 0,047$ és [∅] $p < 0,001$ a nem alkoholos vs. alkoholos csoportokat összevetve, Fisher exakt teszttel vagy χ^2 -tesztet alkalmazva Yates korrekcióval

B. ANCA pozitívítás megoszlása cirrhotikus betegek körében az ascites jelenlétének függvényében

	Össz.	Nem asciteses betegek	Asciteses betegek
		Nem alkoholos	93
Alkoholos	111	135	
ANCA IgA és/vagy IgG	141 (69,1%)	140 (77,3%)	
nem alkoholos	64 (68,8%)	30 (65,2%)	
alkoholos	77 (69,4%)	110 (81,5%)	
ANCA IgA	86 (42,2%)	115 (63,5%)*	
nem alkoholos	24 (25,8%) ^x	22 (47,8%) [§]	
alkoholos	62 (55,9%)	93 (68,9%)	
ANCA IgG kizárólag	55 (27,0%)	25 (13,8%)**	
nem alkoholos	40 (43,0%)*	8 (17,4%)*	
alkoholos	15 (13,5%)	17 (12,6%)	

ANCA IgA = IgA+/IgG- vagy IgA+/IgG+ esetek

ANCA IgG kizárólag = IgA-/IgG+ esetek

* $p < 0,001$ és ** $p < 0,01$ ascitessel nem rendelkező vs. asciteses betegek között

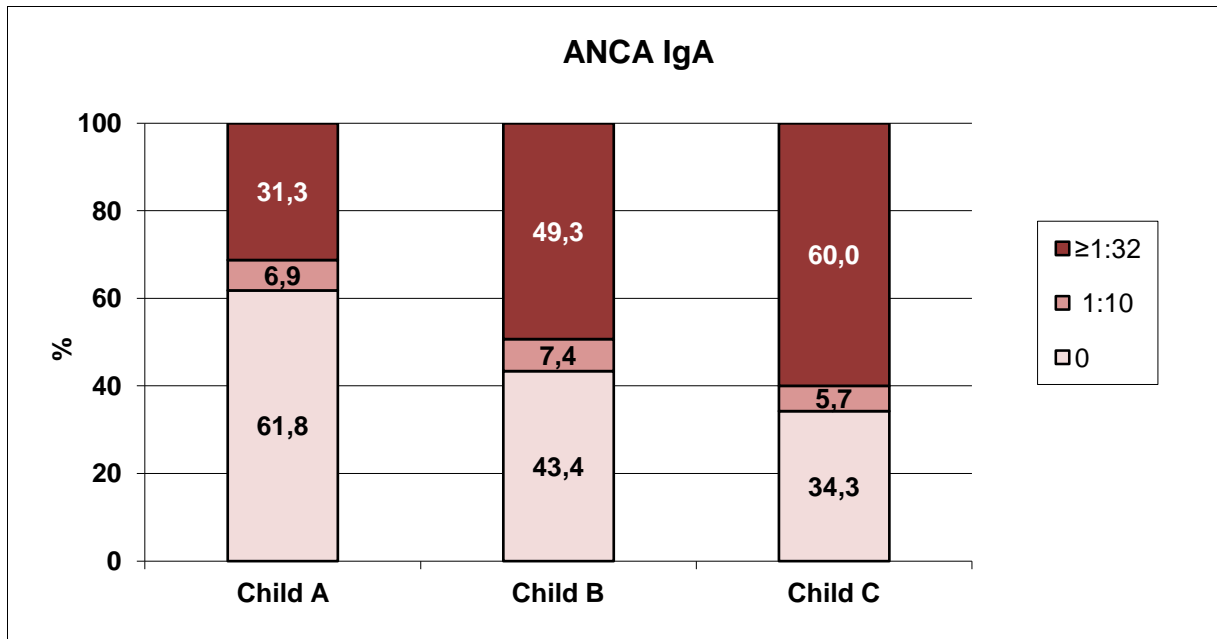
^x $p = 0,035$ és [§] $p < 0,01$ és * $p < 0,001$ alkoholos vs. nem alkoholos ANCA IgA esetén, Fisher exakt teszttel vagy χ^2 -tesztet alkalmazva Yates korrekcióval

12. ábra. ANCA IgA szintek cirrhotikus betegekben a betegség súlyosságának függvényében; (A) Child-Pugh stádium szerint, illetve (B) ascites jelenléte alapján.

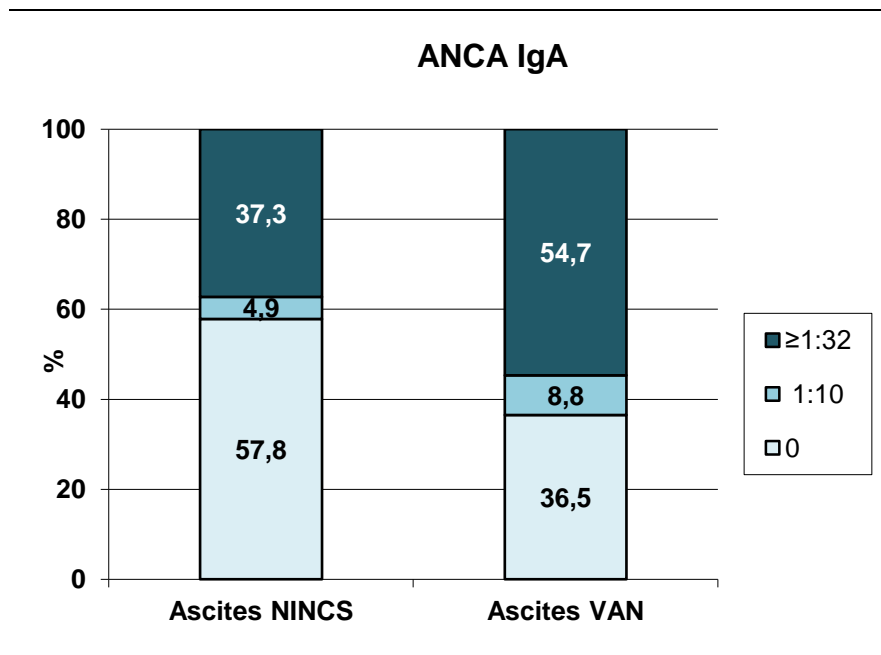
$p < 0,001$ Child csoportok között

$p < 0,001$ ascites jelenlétének függvényében a két csoportot összehasonlítva χ^2 -teszttel.

(A)



(B)



Bakteriális fertőzések: általános jellemzők

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

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

A klinikailag jelentős bakteriális fertőzések klinikai és laboratóriumi prediktorai

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

tényezőnek bizonyult újabb SBP epizód kialakulása szempontjából (OR: 2,87; 95% CI: 1,20–6,89; $p < 0,01$).

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

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

Kaplan-Meier analízisben a Child-Pugh stádium, az ascites jelenléte, a társbetegségek jelenléte (**13. ábra**), hepaticus encephalopathia előfordulása a kórtörténetben ($p < 0,01$) és a varix vérzés ($p = 0,046$) mutatott összefüggést az első CSI-ig eltelt idővel. Továbbá a kórelőzményben előforduló korábbi SBP epizód összefüggést mutatott a következő SBP epizódig eltelt idővel ($p < 0,01$).

A két éves követési idő során rövidebbnek bizonyult az első infekcióig eltelt idő az ANCA IgA pozitív betegek körében szemben az ANCA IgA negatív betegekkel (HR: 1,83 95%CI: 1,26-2,66; $p < 0,01$ – 1:10-es titer, mint pozitívítási küszöb esetén és HR: 2,15 95%CI: 1,46-3,15; $p < 0,001$ – 1:32-es titer, mint pozitívítási küszöb esetén) (**13. ábra**). A különböző ANCA IgA típusok közül a c-ANCA mintázat jelenléte függött össze a legmagasabb CSI kockázattal (HR: 3,04 95%CI: 1,83-5,04; $p < 0,001$).

Multivariációs analízisben Cox-regressziós modellt használva is megvizsgáltuk az ANCA IgA pozitívítás hatását a CSI kialakulására. Nemre, társbetegségekre és a Child-Pugh

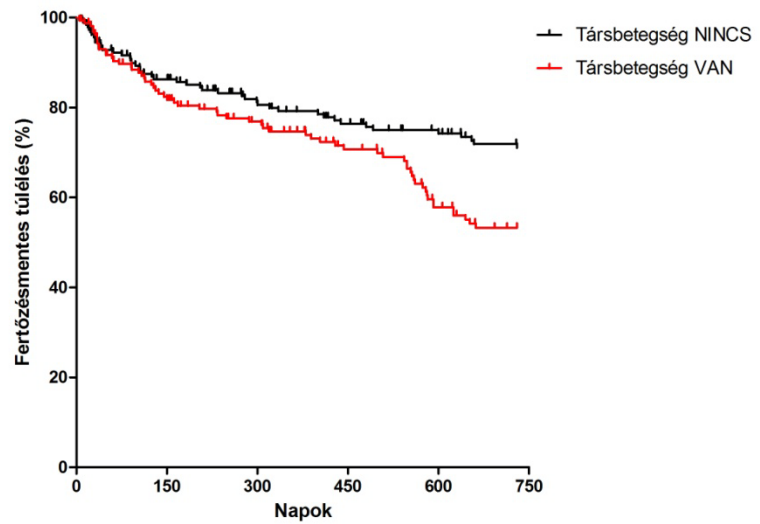
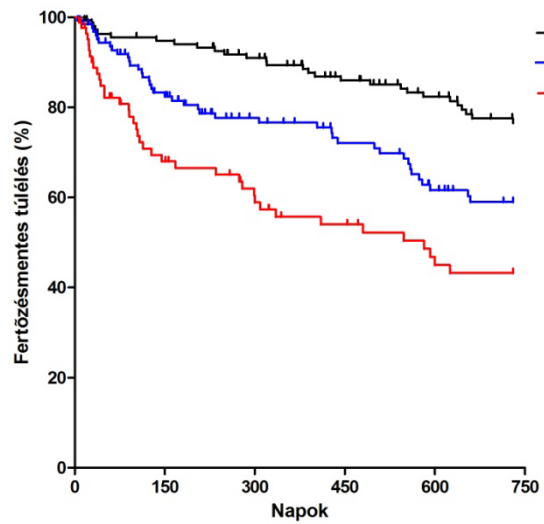
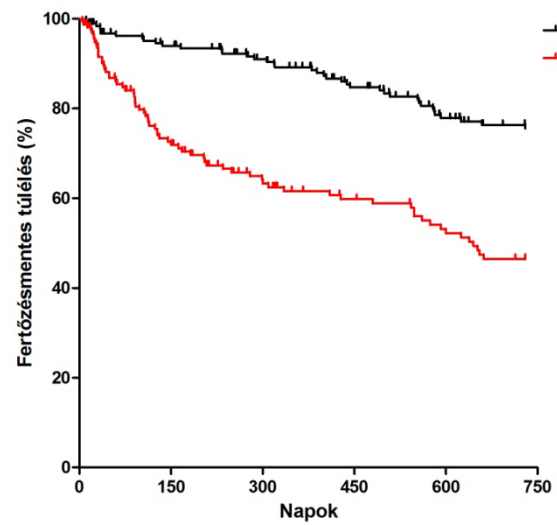
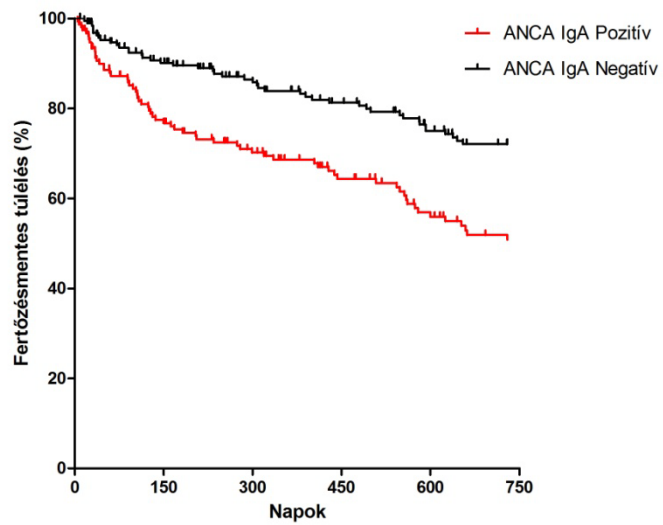
stádiummal jellemzett betegség súlyosságra korrigálva az ANCA IgA pozitivitas (1:32-es titer, mint pozitivitási küszöb esetén) független kockázati tényezőnek bizonyult és összefüggést mutatott az első infekcióig eltelt rövidebb idővel ($p=0,006$) (25. táblázat). Ebben a multivariációs modellben a betegség súlyosságának jellemzésére azért választottuk a Child-Pugh stádium beosztást, mert egyrészt az ismert klinikai változók közül ez az, amelynek a bakteriális fertőzések kialakulása szempontjából májcirrhosisban a legjelentősebb befolyásoló hatása van, másrészt mivel a legösszetettebb módon jellemzi mind a máj parenchymás elégtelenségét, mind pedig a portális hipertenziót. A redundancia elkerülésére a Child-Pugh pontrendszer egyes komponenseit, illetve az ezzel összefüggő faktorokat nem alkalmaztuk párhuzamosan multivariációs modellünkben, még akkor sem, ha azok az univariációs analízisekben szignifikáns összefüggést mutattak a CSI kialakulásával.

Túlélési analízis

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

13. ábra. A Child-Pugh stádium (A), ascites (B), társbetegségek (C), ANCA IgA izotípus összefüggései a klinikailag jelentős bakteriális fertőzések kialakulásával cirrhotikus betegek körében.

A fertőzésmentes túlélés a követési idő alatt egy adott időpontban fertőzésen át nem esett betegek százalékos arányát jelzi a teljes kohorszra vonatkoztatva. (A) Child C stádiumú cirrhotikus betegek nagyobb kockázattal/rizikóval rendelkeznek bakteriális fertőzések kialakulása szempontjából a Child A, vagy Child B stádiumú betegekhez képest/viszonyítva. $p_{Breslow}: <0,001$; $p_{LogRank}: <0,001$. (B) Az asciteses betegek rizikója szintén magasabb fertőzés kialakulása szempontjából mint azon betegek, akiknél még nem alakult ki ascites. $p_{Breslow}: <0,001$; $p_{LogRank}: <0,001$. (C) Azon betegek, akik rendelkeznek más társbetegségekkel is fokozott rizikóval rendelkeznek fertőzések kialakulása szempontjából, mint a társbetegségekkel nem rendelkezők. $p_{Breslow}: <0,01$; $p_{LogRank}: 0,034$. (D) Az ANCA IgA pozitív betegek ($\geq 1:32$ titer) a negative csoporthoz képest magasabb kockázattal rendelkeznek bakteriális fertőzések kialakulásának vonatkozásában. $p_{Breslow}: <0,001$; $p_{LogRank}: <0,001$.



25. táblázat. Cox modell összefoglalója: az első súlyos bakteriális fertőzésig eltelt időt befolyásoló faktorok/tényezők cirrhosis betegekben

	<i>p</i>	Hazard Ratio	95% CI
Nem	0,299	1,22	0,83-1,77
Társbetegségek	0,008	1,68	1,14-2,47
Child-Pugh stádiumok		<0,001	
Child A		referencia	
Child B	0,016	1,81	1,12-2,95
Child C	<0,001	3,42	2,07-5,64
ANCA IgA szeropozitivitás ≥1:32 titer	0,006	1,74	1,18-2,56

p érték: szignifikancia szint; 95% CI: 95% konfidencia intervallum (megbízhatósági tartomány)

9. Megbeszélés

9.1 Anti-foszfolipid antitestek vizsgálata IBD-ben

Jelenleg rendelkezésre álló információink szerint ezidáig ez a legnagyobb tanulmány, mely egyidejűleg vizsgálta több APLA előfordulási gyakoriságát, típusát és klinikai jelentőségét nagy esetszámú, prospektív módon követett IBD betegkohorszban. Három különböző antitestet vizsgáltunk ELISA módszerrel. A hagyományos, rutin laboratóriumi gyakorlattal szemben az APLA-knak nem csak az IgG és IgM altípusait, hanem IgA altípusát is meghatároztuk. Emellett áttekintést nyújtottunk a szakirodalomban jelenleg fellelhető releváns APLA tanulmányokról IBD-ben.

Elsőként igazoltuk, hogy a fokozott ACA IgA képződés a CD jellemzője; az ACA IgA előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabb volt az UC és HC csoportokhoz képest. Korábban csak egy 50 CD beteget érintő tanulmányban (26) vizsgálták az ACA IgA előfordulását, viszont az általuk közölt előfordulási gyakoriság jóval alacsonyabb volt a jelen tanulmányban általunk észlelthez képest (6,0% vs. 19,2%). Ezzel szemben az ACA IgG és IgM szubtypusainak előfordulását IBD-ben sokkal alaposabban vizsgálták, de számos tanulmány kizárólag ezen két ACA szubtypus összprevalencia rátáját illetően szolgáltat információkat. Szakirodalomban közölt adatok szerint az ACA összprevalenciája széles határok között változik mind CD-ben (0,0%-36%) (25, 26, 29), mind UC-ben (1,3%-20,0%) (34, 35), mely jelen tanulmányban 12,6% és 4,3% volt. A két ACA szubtypust külön értékelő tanulmányok az emelkedett ACA prevalenciát elsősorban az IgG szubtypusnak tulajdonították. Egy vizsgálatról eltekintve (34), az ACA IgG gyakorisága dominált az ACA IgM-mel szemben (24, 26, 29), mely egybehangzik a saját CD kohorszunkban kapott eredményekkel (ACA IgG: 10,2 vs. ACA IgM: 3,0%).

Vajon mi lehet az oka a fokozott ACA képződésnek CD-ben? Állatmodellekben lipid A-val és lipoteicholsavval való immunizálás ACA és/vagy lupus antikoaguláns (LA) képződését eredményezte (173). Sőt az ACA antitestek megjelenése a fokozott bakteriális DNS expozíciónak következménye is lehet, mely gazdag nem metilált CpG motívumokban. Ezek a motívumok expresszálnak például az *Escherichia coli* DNS-ében is (174). Ezen szakirodalmi adatok alapján a BT ACA képződés indukciójában betöltött szerepe az anti-mikrobiális antitestekéhez hasonlóan kézenfekvőnek tűnik (4). Ugyanakkor ezzel

ellentmondóan nem találtunk összefüggést az ACA jelenléte és az ASCA között még a különböző izotípusokat értékelve sem. Ezek az eredmények viszont más, a BT-n kívüli mechanizmusok lehetséges szerepére utalnak az ACA képződésben. Ezt támogatja az is, hogy az anti-mikrobiális antitestekkel ellentétben az APLA képződést a NOD2/CARD15 genotípusok jelenléte nem befolyásolta. Az a tény, hogy sem az ACA jelenléte, sem pedig az antitest titerek sem mutattak összefüggést a betegség aktuális laboratóriumi, illetve klinikai aktivitásával, sem pedig a gyakori relapszussal járó CD fenotípussal szintén megkérdőjelezi a BT szerepét az ACA képződés mechanizmusában.

Korábbi tanulmányok (23-30) részletesen vizsgálták a betegség aktivitása (klinikai aktivitás, CRP szintek) és az APLA képződés közötti kapcsolatot, de egyik sem talált közöttük szignifikáns összefüggést. Mivel a klinikai, laboratóriumi és endoszkópos aktivitás tekintetében nem voltak egybehangzóak a kapott eredmények, így jelen tanulmányban komplex módon újravizsgáltuk ezen faktorok kapcsolatát mindhárom aktivitási paraméter szimultán alkalmazásával, de a fentiekhez hasonló következtetésre jutottunk.

A jelen tanulmányunkban kapott anti- β 2-GPI IgG/IgM prevalencia adatok összevethetőek voltak *Koutroubakis és mtsai.* egyik tanulmányában közölt értékekkel (29) (CD: 5,0% vs. 4,4% és UC: 7,5% vs. 10,8%). Az anti-PS/PT antitesteket IBD-ben korábban nem vizsgálták, ugyanakkor tanulmányunkban mi sem találtunk az egészséges kontrollcsoporthoz képest fokozott anti-PS/PT antitest képződést.

Az elérhető keresztmetszeti tanulmányok főként az APLA-k és az IBD klinikai fenotípusa közötti összefüggéseket vizsgálták, melyeket az **1. táblázat** foglal össze. A legtöbb vizsgálatban ezen antitestek jelenléte nem mutatott összefüggést CD betegekben a lokalizációval (23, 25, 26, 29), a betegség viselkedési fenotípusával (29) és a műtéti igényvel (23), illetve UC betegekben a betegség kiterjedésével (23, 25, 28, 29) és a colectomiával (23). Hasonló módon nem találtak összefüggést sem CD-ben (23, 26, 27, 29, 30), sem pedig UC-ben (23, 27-29) a különböző APLA-k és a VTE események között. Ezekben a keresztmetszeti tanulmányokban a szérum minták levételére a betegség lefolyásának különböző időpontjaiban egy alkalommal került sor. Ezzel a módszerrel nyert szérum minták vegyesen tartalmaznak a szövődmények megjelenése előtt, alatt, illetve után levett mintákat, mely csak összefüggések feltárására alkalmas, nem alkalmas predikcióra. Jelen tanulmányunkban, azzal a céllal, hogy ezen markerek lehetséges klinikai értékét emeljük, prospektív módon követtük a betegeket, mely lehetővé tette az APLA-k lehetséges prediktív értékének a vizsgálatát, különös

tekintettel a szövődményes betegségforma kialakulására és a műtéti igényre CD-ben. Mivel a betegségfolyás során különböző időpontokban levett szérumban markerek prediktív értéke ugyan minden esetben hasznos lehet, viszont eltérően teljesíthetnek. Emiatt két csoportot alakítottunk a CD kohorszunkon belül: (1) betegség-specifikus szövődménytől mentes és műtéti szempontból naív (korábban műtéten át nem esett) CD betegekkel álló csoportot, illetve (2) egy olyan betegcsoportot, akik a mintavétel időpontját megelőzően már a szövődményes és/vagy műtéten átesett csoportba tartoztak. Számos megfigyelés azt sugallja, hogy a perianális és a belső penetráló betegség klinikai, szerológiai és genetikai szempontból a CD két, egymástól különálló fenotípusát képviselik (4, 175). Ennek megfelelően a B1p szövődményt a B3 komplikációtól függetlenül értékeltük. Ennek ellenére egyik APLA sem bizonyult a szövődményes betegség prediktív markerének a CD egyik klinikai fennállásában sem. Főbb erőssége jelen tanulmányunknak a propektív követési mód és a jelenleg elérhető APLA-k széles körének alkalmazása a vizsgálat során.

A különféle tromboembóliás szövődmények alacsony gyakorisága miatt ezeknek az eseményeknek az előfordulását a diagnózistól kezdődően vizsgáltuk, mely magába foglalta a mintavétel előtti időszakot is. A VT, AT és spontán vetélés kialakulásában nem találtunk eltérést az APLA státusz függvényében.

Ugyanakkor szignifikáns különbségeket tapasztaltunk időben az ACA IgA és ACA IgG pozitivitásban CD betegekben. Reumatológiai betegségekben TNF-antagonisták (adalimumab, infliximab, és etanercept) alkalmazását követően különböző típusú autoantitestek, többek között APLA-k képződését figyelték meg (176). Erről IBD-ben igen kevés adat áll rendelkezésre. *Atzeni és mtsai* (24) egyik tanulmányában, melyben 63 CD beteget vizsgáltak, öt betegnek (8%) volt a bevonáskor ACA-antitestje (főként IgM) és a követés során két további beteg lett pozitív ezen autoantitestekre az infliximab-terápia során, mely nem járt látszólag bármilyen klinikai hatással ezekben a betegekben. Így mi is megvizsgáltuk a TNF-antagonista-terápia lehetséges szerepét prospektíven követett CD-kohorszunkban. Érdekes módon az anti-TNF-terápiát kapott csoportban lévő betegek, akik kezdetben ACA-negatívak voltak szignifikánsan gyakrabban lettek ACA-IgA vagy ACA-IgG pozitívak, mely egy ok-okozati kapcsolat lehetőségét is felveti. Az anti-TNF-terápiát nem kapott betegcsoportban az ACA-státuszban bekövetkező változások kevésbé jól értelmezhetők ebben a kontextusban, tisztázásukra további vizsgálatokra van szükség. Azok a patogenetikai folyamatok, melyek a humorális válasz megváltozásához és ezáltal

autoimmunitás ezen formájának kialakulásához vezetnek az anti-TNF gátló terápia alkalmazása során még egyelőre nem ismertek, de számos hipotézis látott napvilágot (177). Az egyik elmélet szerint az anti-TNF antagonisták azáltal, hogy a transzmembrán és szolubilis TNF-hez kötődnek, hirtelen csökkentik a TNF szintet és ezáltal fokozzák az apoptotikus sejthalált, mely az autoantitestek képződését triggereli. További vizsgálatokra van szükség annak tisztázására, hogy az újonnan képződött ACA összefüggést mutat-e rosszabb klinikai kimenettel.

Jelen tanulmányunk eredményeit összefoglalva elmondhatjuk, hogy fokozott APLA képződést észleltünk CD betegek körében, viszont ezen APLA-k jelenléte nem mutatott összefüggést a klinikai fenotípussal, a betegségfolyással, illetve a vénás trombotikus események kialakulásának kockázatával a prospektív követés során.

9.2 Pankreász ellenes antitestek (PAb) vizsgálata IBD-ben

Jelen tanulmányunkban felnőtt CD betegekben vizsgáltuk a különböző target specifikus PAb-ok klinikai jelentőségét a szövődményes betegségforma és a műtéti igény predikciójában. Tudomásunk szerint ez az első prospektív tanulmány az új target specifikus PAb-ok vonatkozásában. Emellett bizonyítottuk a PAb státusz hosszútávú időbeli stabilitását, valamint jó laboratóriumi egyezést tapasztaltunk az anti-GP2 antitestek kimutatására elérhető új diagnosztikai eszközök között.

Szignifikánsan több CD beteg bizonyult pozitívnak a különféle PAb-okra az UC, illetve egészséges kontroll csoporthoz képest. A GP2 és CUZD1 glikoproteinek ellen képződő autoantitestek képződése tükrözheti a bél barriert érő fokozott mikrobiális terhelésre adott immunválaszt. Az anti-GP2 antitest titerek is szignifikánsan magasabbak voltak CD-ben az UC csoporthoz képest. Az antitest válasz nagysága (titer értékek) eszerint korrelálhat a BT mértékével, mely kifejezettebb CD-ben az UC-hez viszonyítva. Az egyik lehetséges magyarázata ennek, hogy UC-ben a gyulladás nyálkahártyára lokalizált, míg CD-ben az egész bélfal érintett (transzmurális). Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a két betegségben eltér a mucosális immunitás zavara. Ezt az elméletet támogatja, hogy CD betegekben kimutatták a GP2 jelenlétét a gyulladt bélnyálkahártyában (76).

Korábbi klinikai tanulmányokban az anti-GP2 antitestek jelenléte összefüggést mutatott a CD olyan megjelenési formáival, mint a korai betegség kezdet, ileális érintettség és strikturizáló viselkedési fenotípus, bár a kapott eredmények a különböző tanulmányokban eltértek. Egyetlen tanulmány vizsgálta az anti-CUZD1 antitestet, mint különálló PAb típust, de a klinikai fenotípussal, illetve a betegségfolyással valós összefüggéseit nem vizsgálták CD-ben (65). Érdekes módon vizsgálatunk tárgyát képező jelen kohorszunkban az anti-GP2 és anti-CUZD1 esetében eltérő klinika összefüggéseket találtunk. Ennek részben az lehet az oka, hogy ezeknek az antitesteknek a target fehérjei különböző, a veleszületett immunitásban szerepet játszó fehérje családokhoz tartoznak, így funkciójuk is eltérő lehet. Az anti-GP2 antitestek előfordulási gyakorisága magasabb volt a gyermekkori betegségkezdés esetében, mely egybehangzik számos korábbi tanulmány eredményével (69, 70). A betegség lokalizációját illetően megerősítettük, hogy az anti-GP2 antitestek jelenléte összefüggést mutat az ileális érintettséggel járó kiterjedt betegséggel (10, 69, 70). Meg kell említeni azt is,

hogy voltak tanulmányok, melyek nem tudtak kimutatni összefüggést az anti-GP2 antitestek és a betegség lokalizáció között (178), vagy kizárólag a felső gasztrointesztinális traktusra lokalizált betegséggel kapcsolatosan találtak összefüggést (72). Az anti-CUZD1 antitestek pedig colon érintettség esetében bizonyultak szignifikánsan gyakoribbnak. Jelen CD kohorszunkban a penetráló betegség függött össze az anti-GP2 pozitivitással. *Bogdanos és mtsai.* tanulmányában (70) az anti-GP2 IgG prevalenciája szignifikánsan magasabb volt strikturizáló viselkedési fenotípus és perianális betegség esetén, illetve kevésbé volt gyakori penetráló viselkedési fenotípus esetében. Ezzel szemben más tanulmányoknak nem sikerült szignifikáns összefüggéseket kimutatni az anti-GP2 antitestek jelenléte és a szövődményes betegségforma között (69, 72). Ezidáig egyik vizsgálatban sem elemezték a target specifikus PAb-ok összefüggéseit az extraintesztinális manifesztációkkal. Jelen tanulmányunkban az anti-GP2 jelenléte a PSC-vel, míg az anti-CUZD1 antitesteké pedig a bőrérzettséggel függött össze. A klinikai fenotípusokban észlelt különbségek ellenére a három esszé között jó volt a laboratóriumi egyezés. Minden teszt egy további betegpopulációt ismert fel, mely a másik(ak) által nem lett felismerve, mely részben át nem fedő epitópok jelenlétét valószínűsíti.

Eredményeink szerint a PAb-ok alkalmazása hozzájárulhat a CD betegek jobb stratifikációjához (al csoportokba való besorolásához). A PAb-ok prevalenciája és klinikai jelentősége haszna/alkalmazhatósága a diagnózis felállításában viszonylag alacsony és a betegségfolyás előrejelzésében CD-ben az ASCA-hoz képest némileg alulmarad, mely ezidáig a CD legpontosabb markerének tekinthető (4). Habár az anti-GP2 antitest specifikusabbnak bizonyult CD szempontjából az ASCA-hoz képest, illetve a kettősen pozitív CD betegek specificitása 100% (69). Ki kell emelni, hogy CD betegeink körében az anti-GP2 IgA/IgG prevalencia rátája alacsonyabb volt a korábbi tanulmányokban közölt adatokhoz képest (10,2-12,4% vs. 21,0-45,0%) (179). A szerológiai markerek előfordulási gyakoriságában észlelt különbségek a tanulmányok között, illetve különböző etnikai populációkban jól ismert jelenség (4). Mindemellett módszertani eltérések is hozzájárulhatnak ezen különbségek kialakulásához. Érdekességként megemlíthető, hogy a GP2 különböző izoformái szintetizálódnak a hasnyálmirigyben (180). A GP2 hosszabb és rövidebb izoformáit azonosították, melyeket alfa (GP2a) és béta (GP2b) néven neveztek el (181). Az anti-GP2 IgA-ra és IgG-re vonatkozó korábbi prevalencia adatok, egy kivételével (69), elsősorban a GA Generic Assay által gyártott nagyobb izoformájú GP2-specifikus autoantitestek

meghatározására alkalmas esszék segítségével történt (68). Az általunk jelen tanulmányban alkalmazott ELISA-k mindegyike rekombináns humán GP2 4-es izoformáját tartalmazzák, mint szolid fázis antigént, mely a GP2 rövidebb izoformájának feleltethető meg (GP2b) és a CD betegek jobb elkülöníthetőségét biztosítja az UC betegekkel szemben (180).

A szerológiai markerek hosszútávú predikcióra való alkalmazhatóságának megítéléséhez nélkülözhetetlen az antitest státusz időbeli stabilitásának vizsgálata. Az anti-GP2 antitest stabilitásról csak korlátozott és ellentmondó adat áll rendelkezésre (71). Jelen tanulmányban a különféle PAb-ok hosszútávú stabilitását részletesen elemeztük. A PAb státusz nem függött össze az aktuális betegségaktivitással és a pozitívítási ráta is időben stabilnak bizonyult IBD betegekben. Ennek ellentmond az az adat, hogy az anti-GP2 antitest szintek coeliákiában gluténmentes diéta hatására szignifikánsan csökkentek (59).

Ezidáig csak keresztmetszeti asszociatív analízisek álltak rendelkezésre CD betegekben. Jelen tanulmányunkban a betegség-specifikus szövődmények és a műtéti igény vonatkozásában a PAb-ok prediktív értékéről szolgáltatunk longitudinális prospektív adatokat. Betegkohorszunkban a PAb pozitívítás képes volt előrejelezni a gyorsabb progressziót a szövődményes betegségforma irányába. Az anti-GP2 pozitívítás összefüggött a műtéti igénnyel, míg az anti-CUZD1 a perianális komplikáció kialakulását volt képes előrejelezni. Az anti-GP2 vonatkozásában korábban két keresztmetszeti vizsgálat vizsgálta a műtéti kimenettel kapcsolatos összefüggéseket ellentmondó eredményekre jutva (10, 72). Fontos kiemelni, hogy a kezelési stratégia országonként, IBD centrumokként és még kezelőorvosonként változik, mely nyilvánvalóan minden tanulmányban zavaró tényezőként szerepel. Emiatt az általunk ezen tanulmányban ismertetett szerológiai és műtéti eredményeket természetesen fenntartásokkal kell kezelni ebben a vonatkozásban. Egyik főbb erőssége jelen tanulmánynak, hogy a különböző kimenetek analízise prospektív követési periódust követően történt. A betegek többségénél a betegek követésére 3-6 havonta került sor. *Silverberg és mtsai.* (148) szerint a hosszútávú szövődmények és kimenetek vizsgálatát ideálisan legalább 5 éves követés során ajánlott vizsgálni. Kohorszunkban a CD betegek 79,2%-a legalább 5 éves követési idővel rendelkezett. Emellett a betegség fenotípusok széles körének köszönhetően lehetővé vált számos lehetséges zavaró tényezővel való korrekció is. A végső Cox-regressziós multivariációs modellben az anti-CUZD1 pozitívítás a perianális szövődmény erős független prediktorának bizonyult a diagnóziskori életkorral, nemmel,

betegség lokalizációval, viselkedési fenotípussal és gyakori relapszussal, mint lehetséges torzító/zavaró tényezőkkel korrigálva. Eredményeink megerősítésre várnak más független betegkohorszokon, mely akár centrumokban, akár populáció alapú kohorszokban történhet.

Érdekes módon tanulmányunkban az IgA és nem az IgG PAb típusok esetén találtunk összefüggéseket a szövődményes betegségfolyással CD-ben. A bél mucosális immunrendszere központi szerepet játszik az IgA antitestképződésben, mely legalább részben tükrözheti a fokozott mikrobiális terhelésre adott immunválaszt. Emellett az IgA típusú autoantitesteket az enterális antigénekre adott immunválasz jelének tekintik, mely más betegségekben a fokozott bakteriális transzlokációval függött össze. Mi több az IgA típusú antitestek sarkalatos szerepéről számoltak be a betegség-specifikus szövődmények kialakulásában az IgG antitest szubtypusokkal szemben (9). Az általunk talált eredmények ugyanabba az irányba mutatnak, mint *Roggenbuck és mtsai* korábbi hipotézise (11, 71). Eszerint a hipotézis szerint a GP2-vel szembeni tolerancia elvesztését követően a plazma sejtek képesek anti-GP2 IgA-t szintetizálni, mely ez epithelium által aktívan transzportálódik a béllumenbe. Anti-GP2 IgA antitesteket találtak azoknak a pouchitises betegeknek a székletében, akiknek CD-szerű tünetei vannak (182). A szekretált anti-GP2 IgA képes hidat képezni a pankreásból származó GP2 által opsonizált FimH pozitív baktériumok között egyetemben a membrán kötött GP2-vel, mely az M-sejtek felszínén található. Összességében ezen folyamatok CD-ben a fokozott transzcitózisnak köszönhetően a mucosa mikrobiális túlterheléséhez vezet, mely fokozza/felgyorsítja a bélben zajló gyulladási folyamatokat.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált prospektív kohorszban talált eredmények alapján a target specifikus PAb-ok hasznos markerei lehetnek a CD betegek stratifikációjának és összefüggést mutattak a szövődményes betegség fenotípus kialakulásával, illetve a perianális szövődmény kialakulásának kockázatával. Ezek alapján hasznos kiegészítő eszközként szolgálhatnak a szerológiai panelek tagjaiként a betegség predikciójában.

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

Tudomásunk szerint ezidáig ez a legnagyobb tanulmány, mely az ANCA-k előfordulási gyakoriságát, típusát és klinikai jelentőségét vizsgálta különböző etiológiájú májcirrhosisos betegcsoportban. Az ANCA jelenlétét IIF technika segítségével vizsgáltuk etanol- és formalin fixált humán neutrofil szubsztrátokon. A rutin laboratóriumi eljárásokkal szemben az ANCA meghatározását nemcsak anti-IgG, hanem anti-IgA szekunder antitestekkel is elvégeztük. Ezt követően az ANCA IgA szubtypusok is meghatározásra kerültek. Krónikus májbetegségekben (CLD) az IgG típusú ANCA előfordulási gyakorisága és jellegzetességei viszonylag részletesebben lettek tanulmányozva, ezzel szemben az ANCA IgA-ról korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre.

Jelen tanulmányban először sikerült igazolni az ANCA IgA fokozott képződését májcirrhosisban, mely függetlennek bizonyult a cirrhosis etiológiájától, valamint összefüggést mutatott a betegség súlyosságával. Az ANCA IgA szignifikánsan magasabb arányban fordult elő májcirrhosisban (az alkoholos és nem alkoholos etiológia esetén egyaránt) szemben krónikus HCV fertőzöttekkel, illetve egészséges kontroll egyénekhez képest, valamint a betegség előrehaladásával párhuzamosan emelkedett. A krónikus májbetegségek közül PBC-ben volt a legmagasabb az ANCA IgA prevalenciája, bár ez szignifikánsan alacsonyabb volt a cirrhosisos csoporthoz képest. A szérum IgA koncentráció jelzett emelkedése alkoholos cirrhosisban már régóta ismert (107). Ezzel egybehangzó módon a cirrhosisos csoporton belül az alkoholos etiológiájú alcsoportban magasabb volt az ANCA IgA pozitívítási gyakoriság és magasabbak voltak a titerértékek is szemben a nem alkoholos etiológiájú alcsoporttal.

A fokozott szérum IgA képződés oka cirrhosisban jelenleg nem teljesen tisztázott. A gasztrointesztinális traktus részvétele a folyamatban azonban igen valószínűnek tűnik (107). A bél barrier integritásának megbomlása mind mechanikus, mind immunológiai szinten jól ismert jellemzője a cirrhosisnak és a betegség előrehaladásával egyre kifejezettebbé válik (145). A kapszulás endoszkópián átesett cirrhosisos betegek két harmadában észleltek nyálkahártyagyulladásra jellemző eltéréseket a vékonybélben, melyekkel egybehangzóak voltak az észlelt szövettani elváltozások is (183, 184). Az alkoholnak direkt toxikus hatása is van az intesztinális epithel sejtekre (107). A bél barrier integritásának zavara a vékonybél bakteriális túlnövekedésével együtt (185) lehetővé teszi a bakteriális alkotórészeknek a

béllumenből való fokozott lokális felvételét (BT), mely stimulálja a szekretoros immunrendszert és részt vesz a betegség-specifikus szövődmények kialakulásának patogenetikai folyamataiban cirrhosisban (145). Cirrhosisban a bélrendszer részvételét támasztja alá az IgA képződésben a bélben megtalálható bakteriális fehérjék ellen termelődő különféle szérumban emelkedett koncentrációja (111-114), a szervezet fehérjéinek bakteriális alkotórészekkel keresztreakciót adó epitópjai (107, 115) és a szekretoros IgA (sIgA) emelkedett szintje a szérumban, melyet korábbi tanulmányokban publikáltak (186). Munkacsoportunk korábbi tanulmánya szerint az IgA típusú anti-mikrobiális antitestek gyakoribbnak bizonyultak cirrhosisban (143).

Az IgA régóta jelentős tényezőnek számít a mucosális immunitásban, melyet az alapkutatásokról származó adatok is alátámasztanak. Állatkísérletek alapján az intesztinális IgA képződése és a bakteriális kolonizáció szoros összefüggést mutat: (1) amennyiben csíramentes környezetben lévő egérbe *per os* kommenzális baktériumokat viszünk be, sIgA képződést figyelhetünk meg, mely ismételt dózisokat követően a baktériumok csökkent penetrációját eredményezi a mezenteriális nyirokcsomókba; (2) immundeficiens egérben a szerzett immunitás génjeinek a kommenzális baktériumok általi indukciója csökkent IgA-t szekretáló hybridoma sejtek injekcióját/befecskendezését követően; (3) polimer Ig receptor deficiens állatokban az intesztinális lumenbe való IgA transzport hiányzik, mely alacsony fokú intesztinális gyulladást eredményez; és (4) aktiváció-indukált cytidindeamináz (AID) deficiens egérben, ahol hiányzik a megfelelő IgA képződés, bakteriális túlnövekedés van jelen a vékonybélben. Ezek a kísérletek azt is megmutatták, hogy nagy mennyiségű baktériumra van szükség a mukozális IgA válasz stimulációjához, melynek mértékét az öszbaktérium mennyiség határozza meg; emellett a specifikus IgA válasz elég hosszú ideig tartott, kivéve ha más baktérium is bemutatásra került a bélben (187-190).

Számos módja lehetséges az IgA és a kommenzális baktériumok interakciónak. Az IgA molekulák képesek ezeket a mikroorganizmusokat fedve meggátolni ezek penetrációját a bél epithel sejtein keresztül. A szekretoros IgA elősegítheti bizonyos bakteriális antigének felvételét és prezentációját az immunrendszernek, és ez által a jelátvitelt megváltoztatva (pl. CD89-en keresztül/révén) elősegítheti a lokális adaptív immunrendszer egy tolerogénebb állapotba kerülését. Így az sIgA képes részt venni a bél lumen bakteriális flórájának szabályozásában. Másrészt a bél mikroba flórája szintén fontos szerepet játszik a lokális IgA képződés szabályozásában. A B-sejtek IgA szekréciója a Peyer plakkok centrum germinatívumaiban, izolált lymphoid folliculusokban és a bél lamina propriájának elszórt

lymphoid (alkotó)elemeiben zajlik és ehhez a mikrobiális antigének jelenlétére is szükség van. A dendritikus sejtek folyamatosan bemutatják a bélbaktériumokat az immunrendszernek. Ez a folyamat a Peyer-plakkokat fedő M-sejtek segítségével megy végbe vagy pedig az epithel sejtek közötti kapcsolódási pontok/junctiók távolodásának révén, melyek egy speciális citokin mikroölyezetet teremtenek speciális T-sejtek segítségével, mely stimulálja az IgA izotípus váltást („switch-rekombinációt”). A T-sejtektől független aktiváció a B-sejt aktiváló faktor (BAFF), a proliferációt indukáló ligand (APRIL), a transzformáló növekedési faktor (TGF) β , Interleukin (IL) 6 és a dendritikus, stromális és epitheliális sejtek retinoid sav expressziója/szekrécója révén valósul meg, melyet a target B-sejt receptorok dendritikus sejtek általi keresztötése kísér (187-193). Ezen felül a baktériumok konzervált molekuláris struktúrái, mint a CpG oligonukleotidok, képesek közvetlenül aktiválni a B-sejtek IgA produkcióját/képzését toll-like receptor (TLR) 9 közvetítésével (194). Az aktivált és IgA izotípus váltáson átesett B-sejtek a nyirokvezető utakon a mezenteriális nyirokcsomókba vándorolnak/migrálnak, majd a mellkasi fő nyirokvezetéken (ductus thoracicus) bejutnak a szisztémás keringésbe, ezt követően pedig speciális „homing” receptorok közvetítésével/köreműködés révén visszajutnak a nyálkahártya felszínre. Ezek az IgA termelő B- és plazmasejtek fenotípusa ún. „monocitaszerű”: tumor nekrozis faktor (TNF) α -t, indukálható nitrogén oxid szintetáz (iNOS) és néhány myeloid felszíni markert expresszálnak, sőt rendelkeznek nem konvencionális myeloid/dendritikus sejt funkciókkal is (195). Mivel ezek az aktivált mukozális eredetű B-sejtek bejutnak a szisztémás keringésbe, így a fokozott BT következtében kialakuló fokozott lokális IgA képződés észlelhető a perifériás vérben is.

Mivel a bél bakteriális flórájának az összetétele, illetve a bakteriális terheltség mértéke egyértelműen hatással van az IgA képződésre, valamint mivel a fokozott bakteriális transzlokáció (BT) a májcirrhosis jól ismert jellemzője, így feltételeztük, hogy mukozális kompartmentekből származó bakteriális antigének és ezek keresztreakciója a granulocyták citoszolban lévő vagy granuláris fehérjéivel központi szerepet játszanak az IgA típusú ANCA fokozott képződésében májcirrhosisban. Jelen munkánkban részletesen tanulmányoztuk az IgA típusú ANCA jellemzőit. Az IgA1 és IgA2 szubtípusok arányának meghatározása, illetve a szekretoros komponens (SC) jelenlétének kimutatása IgA molekulákon a szérumban támpontot adhat azok képződési helyének megállapításához (csontvelő vagy mukozális kompartment eredetű). Korábbi tanulmányokban az IgA2 szubtípus arányának megnövekedését és a SC párhuzamos jelenlétét az IgA szekréción mukozális eredetére nézve

bizonyító erejűnek tekintették (196, 197). Az IgA2 aránya a humán szérumban az összes IgA szintjének 10%-át teszi ki, míg az IgA1 pedig a 90%-át, melynek nagyrésze monomér (m) formában van jelen. A szekretoros komponens (SC) tartalmazó IgA antitestek részesevé az összes IgA „pool”-ból kevesebb, mint 1%, mely könnyen érthetővé válik keletkezésének mechanizmusa alapján. Ugyanis az SC a mukozális/nyálkahártya felszínre történő transzport során kapcsolódik a di- és polimer IgA-hoz (pIgA) és gyakorlatilag nem más, mint a transzportban résztvevő polimer Ig receptor (pIgR) kb. 80 kDa méretű extracelluláris proteolitikus fragmentuma, mely polipeptid a nyálkahártya felszínre eljutva hasítódik le a receptorról IgA kapcsolt formában (198). Ez a transzport a bél lumen irányába az epithelsejtek közvetítésével valósul meg transzcitózissal. Az általunk vizsgált ANCA IgA pozitív cirrhotikus betegcsoport mintáiban az IIF ANCA mintázattól függetlenül az ANCA IgA2 szubtypus aránya jelentősen emelkedett volt (46%) és az SC jelenlétét is nagy arányban sikerült kimutatni (87%). Az ANCA IgA szerkezetét ugyan nem állt módunkban vizsgálni, ugyanakkor nagyon valószínűnek tűnik az a feltételezés, hogy ezeknek az antitesteknek a nagyrésze az SC jelenlétéből fakadóan di- vagy polimer formában vannak jelen. Egyik hiányossága ugyan jelen tanulmánynak, hogy az ANCA IgA antitestek jelenlétét nem vizsgáltuk direkt módon/közvetlenül a különböző mukozális kompartmentekben, illetve azokban a szervekben, kompartmentekben, ahová baktériumok transzlokációja feltételezhető (pl. a májban vagy az ascitesben). Ennek ellenére az ANCA szubtypizáció során nyert szerológiai eredményeink alátámasztani látszanak az ANCA IgA képződésről alkotott fentebb leírt elméletünket. Korábbi tanulmányokban hasonló módon különböző IgA szubtypizáló esszék segítségével sikerült egyes betegség-specifikus autoantitestek bélnyálkahártya eredetét igazolni (coeliákiában (199, 200)), vagy éppen kizárni (Guillain-Barre szindrómában (201)). Újabb adatok arra utalnak (202), hogy cirrhotikus betegekben az emelkedett IgA/sIgA szinteket részben magyarázhatja a monociták felszínén expresszálandó humán myeloid IgA Fc receptor – CD89 (Fc α RI) –, illetve ennek szolubilis/oldott formájának (sCD89) megváltozott expressziója/koncentrációja, glikozilációja és funkciója. Sőt az sCD89 molekulák nagyobb affinitással kötődnek a pIgA-hoz szemben a monomér formával (mIgA). Így az sCD89 fokozott kötődése az IgA-hoz indirekt bizonyítékul szolgálhat a molekula polimer formájának nagyobb arányú jelenlétére. Sajnálatos módon az általunk alkalmazott biochip technika, mely etanol fixált neutrofil szubsztrátot használ, nem alkalmas annak az eldöntésére, hogy a szolubilis CD89 komplexet képez-e az ANCA IgA-val. A CD89 ugyanis konstitutív módon expresszálandó a neutrofileken (203), így ebben a vizsgálati rendszerben interferál az ANCA

IgA molekulákhoz potenciálisan kötődő CD89 meghatározásával. Történetesen a neutrofil szubsztrátok inkubációja ANCA IgA-pozitív vagy negatív szérummal, akár pufferrel ugyanazt a hasonló intenzív CD89 expresszióra utaló festődést mutatta mindhárom esetben IIF módszerrel (ezen adatok nem kerülnek bemutatásra).

Szükségszerűen nem minden korábbi tanulmány támasztja alá az általunk és más korábbi munkákban felvetett elméletet az IgA bélnyálkahártya eredetét illetően. Szignifikánsan emelkedett szérum mIgA és pIgA szintek ellenére *Colombel és mtsai.* (204) normál mIgA, pIgA és SC szekréciós rátát detektáltak alkoholos cirrhosisban szenvedő betegek jejunalis folyadékában. Szabad dimér IgA sem volt kimutatható a jejunalis folyadékból. A szerzők feltételezése szerint a jejunalis szinten észlelt abnormális szintézis és transzport nem játszik szerepet abban a folyamatban, mely alkoholos cirrhosisban szenvedők körében a keringő pIgA emelkedett szintjéhez vezet. Érdeemes megjegyezni ezzel kapcsolatban, hogy *Colombel és mtsai.* által közölt tanulmányban az intesztinális traktus más részei a jejunumon kívül nem lettek vizsgálva, és feltételezhető, hogy ezek a nyálkahártya régiók másként viselkedhetnek ebben a tekintetben. Egy másik szempont, hogy kizárólag az össz mIgA és pIgA szinteket mérték, mely nem zárja ki, hogy az össz IgA egyes kisebb, antigénspecifikus szubfrakciói (pl. ANCA IgA) máshogy viselkednek, mint a teljes IgA tömeg.

A bakteriális antigének szerepe az ANCA képződés kiváltásában néhány betegségben és állatkísérletes modellben jól ismert (130), mely bizonyos bakteriális alkotórészek és a szervezet fehérjéi közötti szekvenciális vagy szerkezeti hasonlóságon alapuló keresztreakción nyugszik (205). Felmerült továbbá az is, hogy gyulladáshoz vezető bélbetegségekben és autoimmun májbetegségben a klasszikus és atípusos p-ANCA jelenléte tükrözhet egyfajta az intesztinális mikroorganizmusokra adott rendellenes immunválaszt (8, 140, 141). Ezen kívül az ANCA-t kimutatták más krónikus gyulladással járó szisztémás fertőzésekben is (206) (130). A *Staphylococcus aureus* genetikai szekvenciája komplementer a c-ANCA egyik fő target antigénjének, a PR-3-nak kritikus szekvenciáival (207). Kísérleti körülmények között patkányok immunizációja *Escherichia coli* és *Staphylococcus* eredetű pasztörizált fehérjékkel keringő ANCA megjelenését eredményezte (208). B-sejtek stimulációja bakteriális nem metilált CpG oligodeoxinukleotidokkal TLR-9 receptorokon keresztül szintén ANCA képződést váltott ki (209). Jelen tanulmányunk klinikai részének eredményei szintén alátámasztják az összefüggést a bakteriális fertőzések és az ANCA képződés indukciója között. Az ANCA IgA pozitivitás szignifikánsan gyakoribb volt azon betegek körében,

akiknek a kórelőzményében szerepelt CSI, szemben azokkal akik nem estek át CSI-n a tanulmányba való bevonást megelőzően (45,8% vs. 30,4%; $p < 0,01$). Ezeket az adatokat retrospektív módon gyűjtöttük össze. Emellett a két éves követési idő során az IgA típusú ANCA jelenléte független kockázati tényezőnek bizonyult egy következő CSI epizód kialakulásának szempontjából. Az ANCA patogenetikai szerepe a vasculitisektől különböző betegségekben elég ellentmondásos. Betegkohorszunkban az IgA típusú ANCA jelenléte nem mutatott összefüggést sem a teljes, sem pedig az infekcióhoz társuló halálozással. Hasonló módon *Reiberger T* egy frissebb tanulmányában (210) az emelkedett szérumszintek – mint a BT indirekt markerei – nem mutattak összefüggést cirrhosisban magasabb halálozási rátával. Eredményeink azt sugallják, hogy az ANCA IgA-nak nincs patogenetikai szerepe a cirrhosis progressziójában (károsodás, fibrogenézis), illetve a bakteriális szövődmények kimenetele szempontjából. Ennek ellenére a fokozott IgA típusú ANCA képződése valószínűleg nem csak a krónikus gyulladás epifenomenonja/másodlagos jelensége csupán, hanem olyan a háttérben zajló (alap)folyamatok indikátora, melyek végső soron CSI-hez vezetnek. További hosszútávú követés/prospektív vizsgálatokra volna szükség ahhoz, hogy eldönthető legyen, hogy az IgA típusú ANCA-nak, mint a BT indirekt markerének, van-e a jelenleg használt faktorok mellett (a betegség súlyossági foka, ascites jelenléte) kiegészítő haszna a fertőzések predikciójában cirrhosisos betegek körében.

Az ANCA IgA antitestek antigén specificitásának meghatározása cirrhosisban igen fontos volna, ugyanakkor túlmutat jelen tanulmány keretein. Az IgA típusú ANCA antigénjei feltehetőleg nem a klasszikus citoszol/granuláris neutrofil fehérjék, melyek vasculitisekben az IgG típusú ANCA-k antigénjei. Ezt támasztja alá, hogy betegkohorszunkban az anti-PR3 és anti-MPO pozitivitás igen alacsonynak bizonyult. Hasonló módon *Schwarze C. és mtsai.* (211) szintén nem észlelték az IgA típusú ANCA reaktivitását egyik ismert citoszol és granuláris neutrofil fehérje esetében sem ELISA módszert használva autoimmun májbetegségekben. Sőt, Western blot analízist alkalmazva neutrofilek teljes sejt lizátumaival az IgA típusú ANCA-val reaktív fehérjék heterogén mintázatát kapták. Saját eredményeink alapján, mivel az IgA típusú ANCA esetében mindhárom klasszikus ANCA mintázat előfordult, ez is inkább arra utalhat, hogy a képződés háttérében számos különböző antigén jelenléte állhat.

Csak néhány korábbi tanulmányban (128, 132, 212) figyeltek meg lehetséges összefüggést az ANCA IgG jelenléte és a cirrhosis jelenléte, illetve súlyossága között, mely eredmények meglehetősen vitatott. Jelen tanulmányban az ANCA IgG válasz és ennek

változása nem mutatott párhuzamot az ANCA IgA válasszal. Alkoholos etiológiájú betegek körében az ANCA IgG előfordulása alacsonyabb volt, nagyjából az IgA típus fele, még a legkevésbé súlyos stádiumok esetében is. Nem alkoholos etiológia esetén az ANCA IgG pozitivitás gyakorisága fokozatosan csökkent a betegség súlyosságával párhuzamosan és jelentősen csökkent szintet ért el, mely az előrehaladott betegségben jelenlévő kizárólag ANCA IgA pozitív betegekével volt összevethető. Ezek az eltérések az ANCA IgA és IgG válaszban nagyon hasonló tendenciát mutatnak, mint a vakcinációs vizsgálatok eredményei ebben a betegcsoportban. Ezek (a tendenciák) feltételezhetően egyrészt az adaptív immunrendszer zavarát tükrözik cirrhosisban, mely elsősorban az előrehaladott betegségben kifejezett, másrészt az alkohol direkt gátló hatását is reflektálják a T-sejt mediált immunitásra (213). Pneumococcus vakcinációt követően az anti-PPS (*pneumococcal polyszacharid*) IgA antitest szintek szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoporthoz képest, míg az IgG szintek csökkentek voltak (214). Jelentősen csökkent immunogenitást és a specifikus, protektív IgG válasz gyors hanyatlását észlelték cirrhosisos egyének körében – különösképpen az alkohol által indukált formák esetén – hepatitis B vakcinációt követően CLD-hez viszonyítva (215). Kompenzált cirrhosisos betegek ötször nagyobb valószínűséggel reagálnak a hepatitis A vakcinációra, mint a dekompenzált stádiumú cirrhosisos betegtársaik (216).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az IgA típusú ANCA jelenléte gyakori volt cirrhosisos betegek körében és összefüggést mutatott az előrehaladott betegséggel és a portális hipertenzióval. Továbbá az ANCA IgA jelenléte független módon összefüggést mutatott a klinikailag jelentős bakteriális fertőzések kialakulásával a két éves követési idő alatt. Az IgA2 szubtípusú ANCA arányának jelzett megemelkedése a szekretoros komponens jelenlétével együtt alátámasztja a bél mukozális immunrendszerének részvételét és a bakteriális alkotórészek fokozott expozíciójának trigger szerepét az ANCA képződésben májcirrhosisban.

10. Főbb új tudományos eredmények

- 1.1 Jelenleg rendelkezésre álló információink szerint ezidáig ez a legnagyobb tanulmány, mely szimultán vizsgálta több APLA prevalenciáját, típusát és klinikai jelentőségét nagy esetszámú, prospektív módon követett IBD betegkohorszabban.
- 1.2 Három különböző antitestet vizsgáltunk ELISA módszerrel. A hagyományos, rutin laboratóriumi gyakorlattal szemben az APLA-knak nem csak az IgG és IgM altípusait, hanem IgA altípusát is meghatároztuk.
- 1.3 Emellett áttekintést nyújtottunk a szakirodalomban jelenleg fellelhető releváns APLA tanulmányokról IBD-ben.
- 1.4 Főbb erőssége jelen tanulmányunknak a prospektív követési mód és a jelenleg elérhető APLA-k széles körének alkalmazása a vizsgálat során.
- 1.5 Elsőként igazoltuk, hogy a fokozott ACA IgA képződés a CD jellemzője; az ACA IgA előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabb volt az UC és HC csoportokhoz képest.
- 1.6 Nem találtunk összefüggést az APLA-k jelenléte és más jól ismert prognosztikai szempontból jelentős szerológiai (a betegek ASCA IgA és IgG státusza), illetve genetikai markerek (NOD2/CARD15 genetikai mutációk/polimorfizmusok) között.
- 1.7 Jelen tanulmányban komplex módon vizsgáltuk a betegség aktivitása (klinikai, laboratóriumi és endoszkópos) és az APLA képződés közötti kapcsolatot, de nem találtunk közöttük szignifikáns összefüggést.
- 1.8 Az ACA jelenléte szubtípusok szerinti bontásban sem mutatott összefüggést CD-ben a gyakori relapszusokkal. Az ACA esetén nem találtunk továbbá összefüggést a betegségtartam és a szerológiai válasz mértéke között.
- 1.9 Bár a szakirodalmi adatok alapján a bakteriális transzlokációnak (BT) az ACA képződés indukciójában betöltött szerepe az anti-mikrobiális antitestekéhez hasonlóan kézenfekvőnek tűnik, ezek az általunk kapott eredmények megkérdőjelezzik a BT szerepét az ACA képződés mechanizmusában és más, a BT-n kívüli mechanizmusok lehetséges szerepére utalnak az ACA képződésben.
- 1.10 Jelen tanulmányunkban alkalmazott prospektív követési módszer lehetővé tette az APLA-k lehetséges prediktív értékének a vizsgálatát, melynek révén ezen markerek klinikai értéke is jobban karakterizálható. Egyik APLA sem bizonyult a szövődményes betegségforma (stenotizáló, belső penetráló, illetve perianális betegségforma), valamint a CD-asszociált műtéti igény prediktív markerének a CD egyik klinikai fennállásban sem.

- 1.11 A különféle tromboembóliás szövődmények alacsony gyakorisága miatt ezeknek az eseményeknek az előfordulását a diagnózistól kezdődően vizsgáltuk, mely magába foglalta a mintavétel előtti időszakot is. Egyik APLA jelenléte sem mutatott összefüggést IBD-s betegekben a tromboembóliás események (VT, AT), illetve a spontán vetélés kialakulásával. A klinikai és laboratóriumi markerek közül CD-ben a korábbi vénás tromboembóliás esemény (VT) és a faktor V. Leiden mutáció, UC-ben a gyakori relapszus függött össze a VT fokozott kockázatával.
- 1.12 Az APLA-k közül az anti- β 2-GPI státusz mindhárom Ig szubtípus esetén, illetve az ACA IgM időben stabilnak bizonyult. Ezek szemben az ACA IgG, illetve ennél még kifejezettebben az ACA IgA státuszban történt idővel szignifikáns változás, elsősorban a negatív antitest státuszról lett pozitív. Az antitest státuszban történt változások sokkal kifejezettebbek voltak CD-ben az UC-hoz képest. Megvizsgáltuk a TNF antagonistá terápia lehetséges szerepét prospektíven követett CD kohorszunkban. Az anti-TNF terápiát kapott csoportban lévő betegek, akik kezdetben ACA negatívak voltak szignifikánsan gyakrabban lettek ACA IgA vagy ACA IgG pozitívak, mely egy ok-okozati kapcsolat lehetőségét is felveti.
- 1.13 Összefoglalásként tehát elmondhatjuk, hogy annak ellenére, hogy az APLA-k előfordulása IBD-ben gyakoribbnak bizonyult, használatuk a mindennapi gyakorlatban IBD-ben a fenti eredményeinket tekintetbe véve a jelenleg rendelkezésre álló információink birtokában nem javasolható. További vizsgálatokra IBD vonatkozásában újabb nézőpontok látótérbe kerüléséig egyelőre nincs szükség.

- 2.1 Jelen tanulmányunkban felnőtt CD betegekben vizsgáltuk a különböző target specifikus PAb-ok klinikai jelentőségét a szövődényes betegségforma és a műtéti igény predikciójában. Tudomásunk szerint ez az első prospektív tanulmány az új PAb-ok vonatkozásában.
- 2.2 A szerológiai markerek hosszútávú predikcióra való alkalmazhatóságának megítéléséhez nélkülözhetetlen az antitest státusz időbeli stabilitásának vizsgálata. Az anti-GP2 antitest stabilitásról csak limitált és egymással ellentmondó adat állt eddig rendelkezésre. Jelen tanulmányban a különféle PAb-ok hosszútávú stabilitását részletesen kielemeztük. A PAb státusz nem függött össze az aktuális betegség aktivitással és a pozitivitási ráta is időben stabilnak bizonyult IBD betegekben.
- 2.3 Jó laboratóriumi egyezést tapasztaltunk az anti-GP2 antitestek kimutatására alkalmazott új diagnosztikai eszközök között. A klinikai fenotípusokban észlelt különbségeket az is magyarázhatja, hogy minden teszt egy további betegpopulációt ismert fel, mely a másik(ak) által nem lett felismerve, mely részben át nem fedő epitópok jelenlétét valószínűsíti.
- 2.4 Szignifikánsan több CD beteg bizonyult pozitívnak a különféle PAb-okra az UC, illetve egészséges kontroll csoporthoz képest. A GP2 és CUZD1 glikoproteinek ellen képződő autoantitestek képződése tükrözheti a bél barriert érő fokozott mikrobiális terhelésre adott immunválaszt. Az anti-GP2 antitest titerek is szignifikánsan magasabbak voltak CD-ben az UC csoporthoz képest. Az antitest válasz nagysága eszerint korrelálhat a bakteriális transzlokáció (BT) mértékével, mely kifejezettebb CD-ben az UC-hez viszonyítva.
- 2.5 Jelen kohorszunkban az anti-GP2 és anti-CUZD1 esetében eltérő klinika összefüggéseket találtunk. Az anti-GP2 antitestek prevalenciája magasabb volt korai betegségkezdet, ileális érintettséggel járó kiterjedt betegség, penetráló betegségforma esetében. A betegség lokalizációját illetően az anti-CUZD1 antitestek pedig colon érintettség esetében bizonyultak szignifikánsan gyakoribbnak. Ezidáig egyik vizsgálatban sem elemezték a target specifikus PAb-ok összefüggéseit az extraintesztinális manifesztációkkal: az anti-GP2 jelenléte a PSC-vel, míg az anti-CUZD1 antitesteké pedig a bőrérítettséggel függött össze.
- 2.6 Eredményeink szerint a PAb-ok alkalmazása hozzájárulhat a CD betegek jobb stratifikációjához. A PAb-ok prevalenciája és klinikai alkalmazhatósága a diagnózisban viszonylag alacsony és a betegségfolyás predikciójában CD-ben az ASCA-hoz képest némileg alulmarad. Habár az anti-GP2 antitest specifikusabbnak bizonyult CD

szempontjából az ASCA-hoz képest, illetve a kettősen pozitív CD betegek specificitása 100%.

- 2.7 Ki kell emelni, hogy CD betegeink körében az anti-GP2 IgA/IgG prevalencia rátája alacsonyabb volt a korábbi tanulmányokban közölt adatokhoz képest (10,2-12,4% vs. 21,0-45,0%). A szerológiai markerek előfordulási gyakoriságában észlelt különbségek a tanulmányok között, illetve különböző etnikai populációkban jól ismert jelenség. Mindemellett metodikai eltérések is hozzájárulhatnak ezen különbségek kialakulásához.
- 2.8 Az általunk jelen tanulmányban alkalmazott ELISA-k mindegyike rekombináns humán GP2 4-es izoformáját tartalmazzák, mint szolid fázis antigént, mely a GP2 rövidebb izoformájának feleltethető meg (GP2b) és a CD betegek jobb elkülöníthetőségét biztosítja az UC betegekkal szemben.
- 2.9 Ezidáig csak keresztmetszeti asszociatív analízisek álltak rendelkezésre CD betegeknél. Jelen tanulmányunkban a betegség-specifikus szövődmények és a műtėti igény vonatkozásában a PAb-ok prediktív értékéről szolgáltatunk longitudinális prospektív adatokat. Betegkohorszunkban a PAb pozitivitás képes volt előrejelezni a gyorsabb progressziót a szövődményes betegségforma irányába. Az anti-GP2 pozitivitás összefüggött a műtėti igénnyel, míg az anti-CUZD1 a perianális komplikáció kialakulását volt képes előrejelezni. Egyik főbb erőssége jelen tanulmánynak, hogy a különböző kimenetek analízise prospektív követési periódust követően történt. A végső Cox-regressziós multivariációs modellben az anti-CUZD1 pozitivitás a perianális szövődmény erős független prediktorának bizonyult a diagnóziskori életkorral, nemmel, betegség lokalizációval, viselkedési fenotípussal és gyakori relapszussal, mint lehetséges torzító tényezőkkel korrigálva.
- 2.10 Érdekes módon tanulmányunkban az IgA és nem az IgG PAb típusok esetén találtunk összefüggéseket a szövődményes betegségfolyással CD-ben. A bél mucosális immunrendszere központi szerepet játszik az IgA antitestképződésben, mely legalább részben tükrözheti a fokozott mikrobiális terhelésre adott immunválaszt. Emellett az IgA típusú autoantitesteket az enterális antigénekre adott immunválasz jelének tekintik, mely más betegségekben a fokozott bakteriális transzlokációval függött össze. A bélnyálkahártya mikrobiális túlterhelése pedig fokozhatja/felgyorsíthatja a bélben zajló gyulladási folyamatokat.
- 2.11 Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált prospektív kohorszban talált eredmények alapján a target specifikus PAb-ok hasznos markerei a CD betegek

stratifikációjának és összefüggést mutattak a szövődmenyes betegség fenotípus kialakulásával, illetve a perianális szövődmeny kialakulásának kockázatával. Ezek alapján hasznos kiegészítő eszközként szolgálhatnak a szerológiai panelek tagjaiként a betegség predikciójában.

- 3.1 Tudomásunk szerint ezidáig ez a legnagyobb tanulmány, mely az ANCA-k előfordulási gyakoriságát, típusát és klinikai jelentőségét vizsgálta különböző etiológiájú májcirrhotikus betegcsoportban.
- 3.2 Krónikus májbetegségekben (CLD) az ANCA IgA-ról korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre. Az ANCA jelenlétét IIF technika segítségével vizsgáltuk etanol- és formalin fixált humán neutrofil szubsztrátokon. A rutin laboratóriumi eljárásokkal szemben az ANCA meghatározását nemcsak anti-IgG, hanem anti-IgA szekunder antitestekkel is elvégeztük. Ezt követően az ANCA IgA szubtypusok is meghatározásra kerültek.
- 3.3 Jelen tanulmányban először sikerült igazolni az ANCA IgA fokozott képződését májcirrhotikusban, mely függetlennek bizonyult a cirrhosis etiológiájától, valamint összefüggést mutatott a betegség súlyosságával és a portális hipertenzióval. A cirrhotikus csoporton belül az alkoholos etiológiájú alcsoportban magasabb volt az ANCA IgA pozitivitás gyakorisága és magasabbak voltak a titerértékek is.
- 3.4 A fokozott szérum IgA képződés oka cirrhotikusban jelenleg nem teljesen tisztázott. A gasztrointesztinális traktus részvétele a folyamatban azonban igen valószínűnek tűnik. A bél barrier integritásának megromlása mind mechanikus, mind immunológiai szinten jól ismert jellemzője a cirrhosisnak és a betegség előrehaladásával egyre kifejezettebbé válik. A bél barrier integritásának zavara a vékonybél bakteriális túlnövekedésével együtt lehetővé teszi a bakteriális alkotórészeknek a béllumenből való fokozott lokális felvételét (BT), mely stimulálja a szekretoros immunrendszert és részt vesz a betegség-specifikus szövődmények kialakulásának patogenetikai folyamataiban cirrhotikusban. Az IgA régóta jelentős tényezőnek számít a mucosális immunitásban, melyet az alapkutatásokból származó adatok is alátámasztanak.
- 3.5 Mivel a bél bakteriális flórájának az összetétele, illetve a bakteriális terheltség mértéke egyértelműen hatással van az IgA képződésre, valamint mivel a fokozott bakteriális transzlokáció (BT) a májcirrhosis jól ismert jellemzője, így feltételeztük, hogy mukozális kompartmentekből származó bakteriális antigének és ezek keresztreakciója a granulocyták citoszolban lévő vagy granuláris fehérjéivel központi szerepet játszanak az IgA típusú ANCA fokozott képződésében májcirrhotikusban.
- 3.6 Korábbi tanulmányokban az IgA2 szubtypus arányának megnövekedését és a SC párhuzamos jelenlétét az IgA szekréció mukozális eredetére nézve bizonyító erejűnek tekintették. Az általunk vizsgált ANCA IgA pozitív cirrhotikus betegcsoport mintáiban az

IIF ANCA mintázattól függetlenül az ANCA IgA2 szubtypus aránya jelentősen emelkedett volt (46%) és az SC jelenlétét is nagy arányban sikerült kimutatni (87%).

- 3.7 Egyik hiányossága ugyan jelen tanulmánynak, hogy az ANCA IgA antitestek jelenlétét nem vizsgáltuk közvetlenül a különböző mukozális kompartmentekben, illetve azokban a szervekben, kompartmentekben, ahová baktériumok transzlokációja feltételezhető (pl. a májban vagy az ascitesben).
- 3.8 Jelen tanulmányunk klinikai részének eredményei szintén megerősítik/alátámasztják a kapcsolatot/összefüggést a bakteriális fertőzések és az ANCA képződés indukciója között. Az ANCA IgA pozitivitás szignifikánsan gyakoribb volt azon betegek körében, akiknek a kórelőzményében szerepelt klinikailag jelentős bakteriális fertőzés (CSI). Emellett a két éves követési idő során az IgA típusú ANCA jelenléte független kockázati tényezőnek bizonyult egy következő CSI epizód kialakulásának szempontjából.
- 3.9 Betegkohorszunkban az IgA típusú ANCA jelenléte nem mutatott összefüggést sem a teljes, sem pedig az infekcióhoz társuló halálozással. Eredményeink azt sugallják, hogy az ANCA IgA-nak nincs patogenetikai szerepe a cirrhosis progressziójában (károsodás, fibrogenézis), illetve a bakteriális szövődmények kimenetele szempontjából. Ennek ellenére a fokozott IgA típusú ANCA képződése valószínűleg nem csak a krónikus gyulladás epifenomenonja/másodlagos jelensége csupán, hanem olyan a háttérben zajló (alap)folyamatok indikátora, melyek végső soron CSI-hez vezetnek.
- 3.10 Az IgA típusú ANCA antigénjei feltehetőleg nem a klasszikus citoszol/granuláris neutrofil fehérjék, melyek vasculitisekben az IgG típusú ANCA-k antigénjei. Ezt támasztja alá, hogy betegkohorszunkban az anti-PR3 és anti-MPO pozitivitás igen alacsonynak bizonyult. Saját eredményeink alapján, mivel az IgA típusú ANCA esetében mindhárom klasszikus ANCA mintázat előfordult, ez is inkább arra utalhat, hogy a képződés háttérében számos különböző antigén jelenléte állhat.
- 3.11 Jelen tanulmányban az ANCA IgG válasz és ennek változása nem mutatott párhuzamot az ANCA IgA válasszal. Alkoholos etiológiájú betegek körében az ANCA IgG előfordulása alacsonyabb volt, nagyjából az IgA típus fele, még a legkevésbé súlyos stádiumok esetében is. Nem alkoholos etiológia esetén az ANCA IgG pozitivitás gyakorisága fokozatosan csökkent a betegség súlyosságával párhuzamosan és jelentősen csökkent szintet ért el. Ezek az eltérések az ANCA IgA és IgG válaszban nagyon hasonló tendenciát mutatnak, mint a vakcinációs vizsgálatok eredményei ebben a betegcsoportban. Ezek (a tendenciák) feltehetőleg egyrészt az adaptív immunrendszer zavarát tükrözik

cirrhosisban, mely főként az előrehaladott stádiumokban kifejezett, másrészt az alkohol direkt gátló hatását is reflektálják a T-sejt közvetített immunitásra.

11. Irodalomjegyzék

11.1 Felhasznált irodalom

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
2. Gersemann M, Wehkamp J, Fellermann K, et al. Crohn's disease--defect in innate defence. *World J Gastroenterol* 2008;14:5499-503.
3. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, et al. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:100-13.
4. Papp M, Lakatos PL. Serological studies in inflammatory bowel disease: how important are they? *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:359-64.
5. Laass MW, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev* 2014;13:467-71.
6. Lakatos PL, Papp M, Rieder F. Serologic antiglycan antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2011;106:406-12.
7. Rieder F, Kugathasan S. Circulating antibodies against bacterial wall products: are there arguments for early immunosuppression? *Dig Dis* 2012;30 Suppl 3:55-66.
8. Terjung B, Sohne J, Lechtenberg B, et al. p-ANCA in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut* 2010;59:808-16.
9. Papp M, Sipeki N, Vitalis Z, et al. High prevalence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is associated with increased risk of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013;59:457-66.
10. Pavlidis P, Romanidou O, Roggenbuck D, et al. Ileal inflammation may trigger the development of GP2-specific pancreatic autoantibodies in patients with Crohn's disease. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:640835.
11. Roggenbuck D, Reinhold D, Werner L, et al. Glycoprotein 2 antibodies in Crohn's disease. *Adv Clin Chem* 2013;60:187-208.
12. Ortel TL. Antiphospholipid syndrome: laboratory testing and diagnostic strategies. *Am J Hematol* 2012;87 Suppl 1:S75-81.
13. Staub HL, Franck M, Ranzolin A, et al. IgA antibodies to beta2-glycoprotein I and atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2006;6:104-6.
14. Gabeta S, Norman GL, Gatselis N, et al. IgA anti-b2GPI antibodies in patients with autoimmune liver diseases. *J Clin Immunol* 2008;28:501-11.
15. Ramirez E, Serrano A, Garcia F, et al. Prospective study on autoantibodies against apolipoprotein H (beta2GPI) in several clinical parameters from patients with terminal renal failure and functioning renal transplants. *Transplant Proc* 2009;41:2370-2.
16. Mankai A, Achour A, Thabet Y, et al. Anti-cardiolipin and anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in celiac disease. *Pathol Biol (Paris)* 2012;60:291-5.
17. Sene D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev* 2008;7:272-7.
18. Garcia-Carrasco M, Galarza-Maldonado C, Mendoza-Pinto C, et al. Infections and the antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36:104-8.
19. Frauenknecht K, Lackner K, von Landenberg P. Antiphospholipid antibodies in pediatric patients with prolonged activated partial thromboplastin time during infection. *Immunobiology* 2005;210:799-805.

20. Shin JI, Lee JS, Kim HS. Lupus anticoagulant and IgM anti-phospholipid antibodies in Korean children with Henoch-Schonlein purpura. *Scand J Rheumatol* 2009;38:73-4; author reply 74-5.
21. Horstman LL, Jy W, Bidot CJ, et al. Antiphospholipid antibodies: paradigm in transition. *J Neuroinflammation* 2009;6:3.
22. Serrano A, Garcia F, Serrano M, et al. IgA antibodies against beta2 glycoprotein I in hemodialysis patients are an independent risk factor for mortality. *Kidney Int* 2012;81:1239-44.
23. Aichbichler BW, Petritsch W, Reicht GA, et al. Anti-cardiolipin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1999;44:852-6.
24. Atzeni F, Ardizzone S, Sarzi-Puttini P, et al. Autoantibody profile during short-term infliximab treatment for Crohn's disease: a prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:453-61.
25. Caccavo D, Greco B, Caradonna L, et al. Antiphospholipid antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Medical Science Research* 1996;24:711-713.
26. Chamouard P, Grunebaum L, Wiesel ML, et al. Prevalence and significance of anticardiolipin antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1994;39:1501-4.
27. Chiarantini E, Valanzano R, Liotta AA, et al. Hemostatic abnormalities in inflammatory bowel disease. *Thromb Res* 1996;82:137-46.
28. Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, et al. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993;34:658-64.
29. Koutroubakis IE, Petinaki E, Anagnostopoulou E, et al. Anti-cardiolipin and anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1998;43:2507-2512.
30. Lonjon I, Beaugerie L, Deschamps A, et al. Prevalence of anticardiolipin antibodies in Crohn's disease. *Gastroenterologie clinique et biologique* 1996;20:633-637.
31. Maher MM, Soloma SH. Assessment of thrombophilic abnormalities during the active state of inflammatory bowel disease. *Saudi J Gastroenterol* 2008;14:192-7.
32. Martinovic Z, Perisic K, Pejnovic N, et al. Antiphospholipid antibodies in inflammatory bowel diseases. *Vojnosanit Pregl* 1998;55:47-9.
33. Oldenburg B, Van Tuyl BA, van der Griend R, et al. Risk factors for thromboembolic complications in inflammatory bowel disease: the role of hyperhomocysteinaemia. *Dig Dis Sci* 2005;50:235-40.
34. Saibeni S, Vecchi M, Valsecchi C, et al. Reduced free protein S levels in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical relevance, and role of anti-protein S antibodies. *Dig Dis Sci* 2001;46:637-43.
35. Souto J, Borrell M, Fontcuberta J, et al. Antiphospholipid antibodies in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1995;40:1524-1525.
36. Vecchi M, Cattaneo M, de Franchis R, et al. Risk of thromboembolic complications in patients with inflammatory bowel disease. Study of hemostasis measurements. *Int J Clin Lab Res* 1991;21:165-70.
37. Yurekli BP, Aksoy DY, Aybar M, et al. The search for a common thrombophilic state during the active state of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:809-13.
38. Aichbichler BW, Petritsch W, Reicht A, et al. Anti-cardiolipin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1999;44:852-856.
39. Atzeni F, Ardizzone S, Sarzi-Puttini P, et al. Autoantibody profile during short-term infliximab treatment for Crohn's disease: a prospective cohort study. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2005;22:453-61.

40. Chamouard P, Grunebaum L, Wiesel ML, et al. Prevalence and significance of anticardiolipin antibodies in Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1994;39:1501-1504.
41. Chiarantini E, Valanzano R, Liotta AA, et al. Hemostatic abnormalities in inflammatory bowel disease. *Thrombosis research* 1996;82:137-146.
42. Oldenburg B, Van Tuyl BAC, van der Griend R, et al. Risk factors for thromboembolic complications in inflammatory bowel disease: The role of hyperhomocysteinaemia. *Digestive Diseases and Sciences* 2005;50:235-240.
43. Saibeni S, Vecchi M, Valsecchi C, et al. Reduced free protein S levels in patients with inflammatory bowel disease - Prevalence, clinical relevance, and role of anti-protein S antibodies. *Digestive Diseases and Sciences* 2001;46:637-643.
44. Vecchi M, Cattaneo M, Defranchis R, et al. Risk of thromboembolic complications in patients with inflammatory bowel disease. Study of hemostasis measurements. *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 1991;21:165-170.
45. Yurekli BPS, Aksoy DY, Aybar M, et al. The search for a common thrombophilic state during the active state of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2006;40:809-813.
46. Caronti B, Calderaro C, Alessandri C, et al. Beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) mRNA is expressed by several cell types involved in anti-phospholipid syndrome-related tissue damage. *Clin Exp Immunol* 1999;115:214-9.
47. de Groot PG, Meijers JC. beta(2) -Glycoprotein I: evolution, structure and function. *J Thromb Haemost* 2011;9:1275-84.
48. Agar C, de Groot PG, Morgelin M, et al. beta(2)-glycoprotein I: a novel component of innate immunity. *Blood* 2011;117:6939-47.
49. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, et al. Significance of valine/leucine247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies to the valine247 beta2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 2005;52:212-8.
50. Prieto GA, Cabral AR, Zapata-Zuniga M, et al. Valine/valine genotype at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:471-4.
51. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, et al. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:330-9.
52. Hulstein JJ, Lenting PJ, de Laat B, et al. beta2-Glycoprotein I inhibits von Willebrand factor dependent platelet adhesion and aggregation. *Blood* 2007;110:1483-91.
53. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, et al. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005;105:1540-5.
54. Zitomersky NL, Verhave M, Trenor CC, 3rd. Thrombosis and inflammatory bowel disease: a call for improved awareness and prevention. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:458-70.
55. Krause I, Blank M, Cervera R, et al. Cross-reactive epitopes on beta2-glycoprotein-I and *Saccharomyces cerevisiae* in patients with the antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1108:481-8.
56. Papp M, Koromi Z, Davida L. Formation of antiphospholipid antibodies (APLA) is associated to the presence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in inflammatory bowel disease. *JCC* 2011;5:S165.
57. Deban L, Correale C, Vetrano S, et al. Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades. *Am J Pathol* 2008;172:1457-66.

58. Laplante P, Amireault P, Subang R, et al. Interaction of beta2-glycoprotein I with lipopolysaccharide leads to Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent activation of macrophages. *J Biol Chem* 2011;286:42494-503.
59. Roggenbuck D, Reinhold D, Schierack P, et al. Crohn's disease specific pancreatic antibodies: clinical and pathophysiological challenges. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:483-94.
60. Stocker W, Otte M, Ulrich S, et al. Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1987;139:41-52.
61. Lakatos PL, Altorjay I, Szamosi T, et al. Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behavior, perianal disease, and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:365-74.
62. Bogdanos DP, Rigopoulou EI, Smyk DS, et al. Diagnostic value, clinical utility and pathogenic significance of reactivity to the molecular targets of Crohn's disease specific-pancreatic autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2011;11:143-8.
63. Conrad K HG, Feist E, Reinhold D, Jungblut P, Porstmann T, et al. . Identification of GP2 as the major autoantigen of pancreatic autoantibodies. In. Porto; Portugal; 2008. p. A1356.
64. Stöcker W GM, Probst C, Teegen B, Friedrich A, Sokolowski S, et al. Identification of two different proeoglycans from exocrine pancreas as the long sought after autoantigens in Crohn's disease: CUZD1 and GP2. In. Porto; Portugal. p. A1177.
65. Komorowski L, Teegen B, Probst C, et al. Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: the glycoproteins CUZD1 and GP2. *J Crohns Colitis* 2013;7:780-90.
66. Ohno H, Hase K. Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes* 2010;1:407-10.
67. Schierack P, Rodiger S, Kolenda R, et al. Species-specific and pathotype-specific binding of bacteria to zymogen granule membrane glycoprotein 2 (GP2). *Gut* 2015;64:517-9.
68. Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, et al. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin Chim Acta* 2011;412:718-24.
69. Pavlidis P, Shums Z, Koutsoumpas AL, et al. Diagnostic and clinical significance of Crohn's disease-specific anti-MZGP2 pancreatic antibodies by a novel ELISA. *Clin Chim Acta* 2015;441:176-81.
70. Bogdanos DP, Roggenbuck D, Reinhold D, et al. Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2012;12:102.
71. Somma V, Ababneh H, Ababneh A, et al. The Novel Crohn's Disease Marker Anti-GP2 Antibody Is Associated with Ileocolonic Location of Disease. *Gastroenterol Res Pract* 2013;2013:683824.
72. Op De Beeck K, Vermeire S, Rutgeerts P, et al. Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2012;61:162-4; author reply 164-5.
73. Hase K, Kawano K, Nochi T, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 2009;462:226-30.
74. Yu S, Lowe AW. The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds *Escherichia coli* Type 1 fimbriae. *BMC Gastroenterol* 2009;9:58.
75. Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, et al. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2008;180:7840-6.

76. Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, et al. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut* 2009;58:1620-8.
77. Sipeki N, Antal-Szalmás P, Lakatos PL, et al. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014;20:2564-2577.
78. Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:727-38.
79. Christou L, Pappas G, Falagas ME. Bacterial infection-related morbidity and mortality in cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1510-7.
80. Jalan R, Gines P, Olson JC, et al. Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol* 2012;57:1336-48.
81. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2013.
82. Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, et al. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005;54:556-63.
83. Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008;28:26-42.
84. Duddempudi AT. Immunology in alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2012;16:687-98.
85. Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;4:459-72.
86. Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2013;33:31-9.
87. Oetl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol* 2013;59:978-83.
88. Galbois A, Thabut D, Tazi KA, et al. Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology* 2009;49:175-84.
89. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007;13:1324-32.
90. Yang L, Seki E. Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Front Physiol* 2012;3:138.
91. Broering R, Lu M, Schlaak JF. Role of Toll-like receptors in liver health and disease. *Clin Sci (Lond)* 2011;121:415-26.
92. Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:943-54.
93. Li L, Chen L, Hu L, et al. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of Toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 2011;54:1620-30.
94. Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Jr., Dinis-Ribeiro M, et al. Role of Toll-like receptor impairment in cirrhosis infection risk: are we making progress? *Liver Int* 2011;31:140-1.
95. Uhrig A, Banafsche R, Kremer M, et al. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol* 2005;77:626-33.
96. Antoniadou CG, Wendon J, Vergani D. Paralyzed monocytes in acute on chronic liver disease. *J Hepatol* 2005;42:163-5.
97. Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, et al. Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. *J Hepatol* 2005;42:195-201.

98. Lin CY, Tsai IF, Ho YP, et al. Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2007;46:816-26.
99. Xing T, Li L, Cao H, et al. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. *Clin Exp Immunol* 2007;147:184-8.
100. Berry PA, Antoniadis CG, Carey I, et al. Severity of the compensatory anti-inflammatory response determined by monocyte HLA-DR expression may assist outcome prediction in cirrhosis. *Intensive Care Med* 2011;37:453-60.
101. Nouri-Aria KT, Alexander GJ, Portmann BC, et al. T and B cell function in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 1986;2:195-207.
102. Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-17.
103. Hiki N, Berger D, Prigl C, et al. Endotoxin binding and elimination by monocytes: secretion of soluble CD14 represents an inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients with sepsis and in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Infect Immun* 1998;66:1135-41.
104. Such J, Frances R, Munoz C, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002;36:135-41.
105. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol* 2013;10:103-6.
106. Browne EP. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* 2012;136:370-9.
107. van de Wiel A, Schuurman HJ, Kater L. Alcoholic liver disease: an IgA-associated disorder. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1025-30.
108. Silvain C, Patry C, Launay P, et al. Altered expression of monocyte IgA Fc receptors is associated with defective endocytosis in patients with alcoholic cirrhosis. Potential role for IFN-gamma. *J Immunol* 1995;155:1606-18.
109. Massonnet B, Delwail A, Ayrault JM, et al. Increased immunoglobulin A in alcoholic liver cirrhosis: exploring the response of B cells to Toll-like receptor 9 activation. *Clin Exp Immunol* 2009;158:115-24.
110. Poeck H, Wagner M, Battiany J, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004;103:3058-64.
111. Staun-Olsen P, Bjerneboe M, Prytz H, et al. Escherichia coli antibodies in alcoholic liver disease. Correlation to alcohol consumption, alcoholic hepatitis, and serum IgA. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:889-96.
112. Bjerneboe M, Prytz H, Orskov F. Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1972;1:58-60.
113. Protell RL, Soloway RD, Martin WJ, et al. Anti-Salmonella agglutinins in chronic active liver disease. *Lancet* 1971;2:330-2.
114. Nolan JP, DeLissio MG, Camara DS, et al. IgA antibody to lipid A in alcoholic liver disease. *Lancet* 1986;1:176-9.
115. Kreisel W, Siegel A, Bahler A, et al. High prevalence of antibodies to calreticulin of the IgA class in primary biliary cirrhosis: a possible role of gut-derived bacterial antigens in its aetiology? *Scand J Gastroenterol* 1999;34:623-8.
116. Kallenberg CG, Mulder AH, Tervaert JW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am J Med* 1992;93:675-82.
117. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity* 2005;38:93-103.

118. Lochman I, Kral V, Lochmanova A, et al. ANCA in the diagnosis of neutrophil-mediated inflammation. *Autoimmun Rev* 2011;10:295-8.
119. Lindgren S, Nilsson S, Nassberger L, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic liver diseases: prevalence, antigen specificity and predictive value for diagnosis of autoimmune liver disease. *Swedish Internal Medicine Liver Club (SILK). J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:437-42.
120. Terjung B, Worman HJ, Herzog V, et al. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol* 2001;126:37-46.
121. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:463-73.
122. Csernok E, Moosig F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:494-501.
123. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-7.
124. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, et al. The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. A literature review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995;123:925-32.
125. Khan I, Watts RA. Classification of ANCA-associated vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:383.
126. Papp M, Altorjay I, Norman GL, et al. Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:984-92.
127. Mulder AH, Horst G, van Leeuwen MA, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. Characterization and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1993;36:1054-60.
128. Mulder AH, Horst G, Haagsma EB, et al. Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993;17:411-7.
129. Bansi D, Chapman R, Fleming K. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in chronic liver diseases: prevalence, titre, specificity and IgG subclass. *J Hepatol* 1996;24:581-6.
130. Csernok E, Lamprecht P, Gross WL. Clinical and immunological features of drug-induced and infection-induced proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies and myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies and vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:43-8.
131. Papp M, Altorjay I, Norman GL, et al. Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflammatory bowel diseases* 2007;13:984-92.
132. Roozendaal C, de Jong MA, van den Berg AP, et al. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 2000;32:734-41.
133. Fulcher DA. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in hepatobiliary disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:344-5.
134. Konstantinov KN, Ulf-Moller CJ, Tzamaloukas AH. Infections and antineutrophil cytoplasmic antibodies: triggering mechanisms. *Autoimmun Rev* 2015;14:201-3.
135. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.

136. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009;15:623-5.
137. Xu PC, Cui Z, Chen M, et al. Comparison of characteristics of natural autoantibodies against myeloperoxidase and anti-myeloperoxidase autoantibodies from patients with microscopic polyangiitis. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:1236-43.
138. Roth AJ, Ooi JD, Hess JJ, et al. Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *J Clin Invest* 2013;123:1773-83.
139. Falk RJ, Jennette JC. ANCA disease: where is this field heading? *J Am Soc Nephrol* 2010;21:745-52.
140. Yang P, Danielsson D, Jarnerot G. *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* inhibit the perinuclear but not the circulating antineutrophil cytoplasmic antibody reaction. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:529-34.
141. Seibold F, Brandwein S, Simpson S, et al. pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *J Clin Immunol* 1998;18:153-60.
142. Selmi C, Gershwin ME. Autoantibodies in autoimmune liver disease: biomarkers versus epiphenomena. *Gut* 2010;59:712-3.
143. Papp M, Norman GL, Vitalis Z, et al. Presence of anti-microbial antibodies in liver cirrhosis--a tell-tale sign of compromised immunity? *PLoS One* 2010;5:e12957.
144. Borzio M, Salerno F, Piantoni L, et al. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001;33:41-8.
145. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-33.
146. Saab S, Hernandez JC, Chi AC, et al. Oral antibiotic prophylaxis reduces spontaneous bacterial peritonitis occurrence and improves short-term survival in cirrhosis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2009;104:993-1001; quiz 1002.
147. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:2-6; discussion 16-9.
148. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 Suppl A:5A-36A.
149. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55 Suppl 1:i1-15.
150. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, et al. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:357-63.
151. Lewis JD, Chuai S, Nessel L, et al. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1660-6.
152. Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2010;4:7-27.
153. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;60:505-12.
154. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;317:1625-9.
155. Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut* 2006;55 Suppl 1:i36-58.

156. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010;4:28-62.
157. Esser D, Cornillie F, Diamond RH, et al. On the updated ECCO consensus guidelines for medical management of Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2011;5:165-6.
158. Travis SP, Stange EF, Lemann M, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006;55 Suppl 1:i16-35.
159. Carey E, Carey WD. Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete? *Cleve Clin J Med* 2010;77:519-27.
160. Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol* 2005;42 Suppl:S100-7.
161. Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, et al. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology* 2007;46:922-38.
162. Wong F, Bernardi M, Balk R, et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut* 2005;54:718-25.
163. Lodato F, Azzaroli F, Di Girolamo M, et al. Proton pump inhibitors in cirrhosis: tradition or evidence based practice? *World J Gastroenterol* 2008;14:2980-5.
164. Papp M, Vitalis Z, Altorjay I, et al. Acute phase proteins in the diagnosis and prediction of cirrhosis associated bacterial infections. *Liver Int* 2012;32:603-11.
165. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-93.
166. Poupon R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update. *J Hepatol* 2010;52:745-58.
167. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007;47:598-607.
168. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261-73.
169. Papp M, Norman GL, Altorjay I, et al. Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? *World J Gastroenterol* 2007;13:2028-36.
170. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111:507-13.
171. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 2007;43:25-30.
172. Papp M, Lakatos PL, Harsfalvi J, et al. Mannose-binding lectin level and deficiency is not associated with inflammatory bowel diseases, disease phenotype, serology profile, and NOD2/CARD15 genotype in a large Hungarian cohort. *Hum Immunol* 2010;71:407-13.
173. Gotoh M, Matsuda J. Induction of anticardiolipin antibody and/or lupus anticoagulant in rabbits by immunization with lipoteichoic acid, lipopolysaccharide and lipid A. *Lupus* 1996;5:593-7.
174. Bauer M, Heeg K, Wagner H, et al. DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* 1999;97:699-705.
175. Tang LY, Rawsthorne P, Bernstein CN. Are perineal and luminal fistulas associated in Crohn's disease? A population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1130-4.
176. Atzeni F, Talotta R, Salaffi F, et al. Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* 2013;12:703-8.
177. Kolarz B, Majdan M, Darmochwal-Kolarz DA, et al. Antiphospholipid antibodies during 6-month treatment with infliximab: a preliminary report. *Med Sci Monit* 2014;20:1227-31.
178. Gross S, Bakker SF, van Bodegraven AA, et al. Increased IgA glycoprotein-2 specific antibody titres in refractory celiac disease. *J Gastrointest Liver Dis* 2014;23:127-33.

179. Bonneau J, Dumestre-Perard C, Rinaudo-Gaujous M, et al. Systematic review: new serological markers (anti-glycan, anti-GP2, anti-GM-CSF Ab) in the prediction of IBD patient outcomes. *Autoimmun Rev* 2015;14:231-45.
180. Roggenbuck D, Rober N, Bogdanos DP, et al. Autoreactivity to isoforms of glycoprotein 2 in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 2015;442:82-3.
181. Fukuoka S. Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding alpha (large) and beta (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. *Biochim Biophys Acta* 2000;1491:376-80.
182. Werner L, Sturm A, Roggenbuck D, et al. Antibodies against glycoprotein 2 are novel markers of intestinal inflammation in patients with an ileal pouch. *J Crohns Colitis* 2013;7:e522-32.
183. De Palma GD, Rega M, Masone S, et al. Mucosal abnormalities of the small bowel in patients with cirrhosis and portal hypertension: a capsule endoscopy study. *Gastrointest Endosc* 2005;62:529-34.
184. Bhonchal S, Nain CK, Prasad KK, et al. Functional and morphological alterations in small intestine mucosa of chronic alcoholics. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:e43-8.
185. Bauer TM, Steinbruckner B, Brinkmann FE, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2962-7.
186. Pelletier G, Briantais MJ, Buffet C, et al. Serum and intestinal secretory IgA in alcoholic cirrhosis of the liver. *Gut* 1982;23:475-80.
187. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol* 2012;33:160-7.
188. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010;10:159-69.
189. Slack E, Balmer ML, Fritz JH, et al. Functional flexibility of intestinal IgA - broadening the fine line. *Front Immunol* 2012;3:100.
190. Macpherson AJ, Geuking MB, Slack E, et al. The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. *Immunol Rev* 2012;245:132-46.
191. Suzuki K, Fagarasan S. How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol* 2008;29:523-31.
192. Corthesy B. Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009;31:174-9.
193. Fagarasan S. Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Curr Opin Immunol* 2008;20:170-7.
194. Blaas SH, Stieber-Gunckel M, Falk W, et al. CpG-oligodeoxynucleotides stimulate immunoglobulin A secretion in intestinal mucosal B cells. *Clin Exp Immunol* 2009;155:534-40.
195. Fritz JH, Rojas OL, Simard N, et al. Acquisition of a multifunctional IgA+ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 2012;481:199-203.
196. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 2012;12:821-32.
197. Brandtzaeg P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:554-63.
198. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 2006;208:270-82.
199. Osman AA, Richter T, Stern M, et al. The IgA subclass distributions of endomysium and gliadin antibodies in human sera are different. *Clin Chim Acta* 1996;255:145-52.
200. Colombel JF, Mascart-Lemone F, Nemeth J, et al. Jejunal immunoglobulin and antigliadin antibody secretion in adult coeliac disease. *Gut* 1990;31:1345-9.

201. Koga M, Yuki N, Hirata K. Subclass distribution and the secretory component of serum IgA anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neuroimmunol* 1999;96:245-50.
202. Tissandie E, Morelle W, Berthelot L, et al. Both IgA nephropathy and alcoholic cirrhosis feature abnormally glycosylated IgA1 and soluble CD89-IgA and IgG-IgA complexes: common mechanisms for distinct diseases. *Kidney Int* 2011;80:1352-63.
203. Hamre R, Farstad IN, Brandtzaeg P, et al. Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR gamma chain on myeloid cells in blood and tissue. *Scand J Immunol* 2003;57:506-16.
204. Colombel JF, Vaerman JP, Mesnard B, et al. Jejunal immunoglobulin secretion in alcoholic patients with and without cirrhosis. *J Hepatol* 1991;12:145-9.
205. Willcocks LC, Lyons PA, Rees AJ, et al. The contribution of genetic variation and infection to the pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:202.
206. Bonaci-Nikolic B, Andrejevic S, Pavlovic M, et al. Prolonged infections associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies specific to proteinase 3 and myeloperoxidase: diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Rheumatol* 2010;29:893-904.
207. Pendergraft WF, 3rd, Preston GA, Shah RR, et al. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* 2004;10:72-9.
208. Savige J, Nassis L, Cooper T, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis after immunisation with bacterial proteins. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:783-9.
209. Hurtado PR, Jeffs L, Nitschke J, et al. CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. *BMC Immunol* 2008;9:34.
210. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, et al. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2012.
211. Schwarze C, Terjung B, Lilienweiss P, et al. IgA class antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2003;133:283-9.
212. De Riva V, Celadin M, Pittoni M, et al. What is behind the presence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in chronic liver disease? *Liver Int* 2009;29:865-70.
213. Leber B, Mayrhauser U, Rybczynski M, et al. Innate immune dysfunction in acute and chronic liver disease. *Wien Klin Wochenschr* 2009;121:732-44.
214. McCashland TM, Preheim LC, Gentry MJ. Pneumococcal vaccine response in cirrhosis and liver transplantation. *J Infect Dis* 2000;181:757-60.
215. De Maria N, Idilman R, Colantoni A, et al. Increased effective immunogenicity to high-dose and short-interval hepatitis B virus vaccination in individuals with chronic hepatitis without cirrhosis. *J Viral Hepat* 2001;8:372-6.
216. Arguedas MR, Johnson A, Eloubeidi MA, et al. Immunogenicity of hepatitis A vaccination in decompensated cirrhotic patients. *Hepatology* 2001;34:28-31.

11.2 Saját közlemények jegyzéke



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sipeki, N.**, Dávida, L., Pályu, E., Altorjay, I., Hársfalvi, J., Antal-Szalmás, P., Szabó, Z., Veres, G., Shums, Z., Norman, G. L., Lakatos, P. L., Papp, M.: Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn's disease.
World J. Gastroenterol. 21 (22), 6952-6964, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i22.6952>.
IF: 2.787
2. Papp, M.*, **Sipeki, N.***, Tornai, T., Altorjay, I., Norman, G. L., Shums, Z., Roggenbuck, D., Fechner, K., Stocker, W., Antal-Szalmás, P., Veres, G., Lakatos, P. L.: Rediscovery of the anti-pancreatic antibodies and evaluation of their prognostic value in a prospective clinical cohort of Crohn's patients: the importance of specific target antigens (GP2 and CUZD1).
J. Crohns Colitis. 9 (8), 659-668, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv087>

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



További közlemények

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

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

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

IF: 4.47 (2015)

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

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

IF: 6.585

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33,197

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

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

Debrecen, 2016.09.07.



Előadások

- 2013.06.15 **Sipeki N.** Az IgA típusú anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) előfordulása májcirrrosisban gyakori és jelenlétük összefüggést mutat a bakteriális infekciók kialakulásával. (Laki Kálmán Doktori Iskola hallgatóinak PhD Konferenciája; Debrecen, 2013.06.15)
- 2013.11.15 **Sipeki N.**, Tornai T, Vitális Zs, Altorjay I, Tornai I, Antal-Szalmás P, Papp M. Az IgA típusú anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) előfordulása májcirrrosisban gyakori és jelenlétük összefüggést mutat a bakteriális infekciók kialakulásával. (Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Kongresszusa, Nyíregyháza, 2013.11.15, **E-28.**)
- 2014.03.08 **Sipeki N.**, Norman GL, Lakatos PL, Papp M. Antifoszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata gyulladós bélbetegségekben (IBD). (Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekciójának Tudományos Ülése, Balatonalmádi, 2014.03.07-08.)
- 2014.06.06 **Sipeki N.** Anti-foszfolipid antitestek (APLA) vizsgálata gyulladós bélbetegségekben (IBD) (Laki Kálmán Doktori Iskola hallgatóinak PhD Konferenciája; Debrecen, 2014.06.06)
- 2014.08.27-30 P. Antal-Szalmás¹, T. Tornai, **N. Sipeki**, D. Tornai, Zs. Vitalis, I. Tornai, Z. Szabo, R. Foldesi, A. Sumegi, P.L. Lakatos, M. Papp. Presepsin: a new biomarker in the diagnosis and prognosis of bacterial infection in cirrhosis (Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 57. Nagygyűlése, Nyíregyháza, 2014. augusztus 27-30. **SE 1.5**)
- 2015.02.19-21 M. Papp[#], **N. Sipeki**[#], T. Tornai, I. Földi, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmás, G. Veres, P.L. Lakatos. Presence of anti-MZGP2 IgG and IgA antibodies assessed by 2 different ELISA assays is associated with younger age at onset, stricturing disease behaviour, need for surgery and ASCA/anti-OMP PlusTM positivity in Crohn's Disease. (Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) 10. Kongresszusa; Barcelona, Spanyolország, 2015.02.19-21. **DOP044**) ^{#These authors contributed equally to the work and both should be considered as first authors.}
- 2015.05.31 Kurti Z., Rutka M., Farkas K., **Sipeki N.**, Golovics P.A., Lovasz B., Vegh Z., Gecse K., Kiss L., Altorjay I., Papp M., Molnar T., Lakatos P. Accelerated treatment strategy in Inflammatory Bowel Diseases: Is it associated with a change

- in the disease course? (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 57. Nagygyűlése; Siófok, 2015.05.30-06.02 E102)
- 2015.05.31 Papp M., **Sipeki N.**, Altorjay I., Norman G.L., Roggenbuck D., Fechner K., Antal-Szalmas P., Veres G., Lakatos P.L.. Pankreász ellenes antitestek (PAb) újrafelfedezése és prognosztikai szerepük egy prospektíven követett Crohn-beteg (CD) kohorszban: specifikus target antigének jelentősége (GP2 és CUZD1). (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 57. Nagygyűlése; Siófok, 2015.05.30-06.02, E138)
- 2015.05.31 Lakatos P.L., **Sipeki N.**, Altorjay I., Norman G.L., Shums Z., Antal-Szalmas P., Veres G., Papp M. Rizikó mátrix modell a betegség progresszió előrejelzésére IBD centrumban gondozott Crohn-beteg csoportban. (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 57. Nagygyűlése; Siófok, 2015.05.30-06.02, E104)
- 2015.06.05 **Sipeki N.** Pankreász ellenes antitestek (PAb) újrafelfedezése és prognosztikai szerepük egy prospektíven követett Crohn-beteg (CD) kohorszban: specifikus target antigének jelentősége (GP2 és CUZD1). (Laki Kálmán Doktori Iskola hallgatóinak PhD Konferenciája; Debrecen, 2015.06.05)
- 2016.06.04-7 G. Kovacs, **N. Sipeki**, K. Palatka, I. Altorjay, K. Fechner, G. Norman, Z. Shums, G. Veres, P.L. Lakatos, M. Papp. Szerológiai markerek jelentősége a colitis ulcerosa kórlefolyásában. (Magyar Gasztroenterológiai Társaság 58. Nagygyűlése; Siófok, 2016.06.04-06.07, **Bélbetegségek A/9**)
- 2016.10.16-19 M. Papp, T. Tornai, Gy. Kovacs, **N. Sipeki**, Zs. Vitalis, I. Tornai, K. Fechner, D. Roggenbuck, D. Tornai, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Orosz, B. Lombay Jr., J. Gervain, G. Par, A. Par, P. L. Lakatos, F. Szalay, P. Antal-Szalmas. Target-specific anti-pancreatic antibodies are frequent in patients with primary sclerosing cholangitis and associated with poor disease outcome. (United European Gastroenterology Week (UEG Week), 2015. 10.16-19, Bécs, **OP032**) (Session Title: 215 - Mechanisms of Primary Sclerosing Cholangitis, Session Type: Free Paper, Session Date: October 17, 2016)
- 2016.10.16-19 T. Tornai, Gy. Kovacs, **N. Sipeki**, Zs. Vitalis, I. Tornai, K. Fechner, D. Roggenbuck, D. Tornai, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Orosz, B. Lombay Jr., J. Gervain, G. Par, A. Par, P. L. Lakatos, F. Szalay, P. Antal-Szalmas, M. Papp. Gut barrier failure biomarkers are associated with poor disease outcome in patients with primary sclerosing cholangitis. (United European Gastroenterology Week

(UEG Week), 2015. 10.16-19, Bécs, **OP033**) (Session Title: 215 - Mechanisms of Primary Sclerosing Cholangitis, Session Type: Free Paper Session, Session October 17, 2016)

Poszterek

1: M Papp, **N Sipeki**, Zs Vitalis, T Tornai, I Altorjay, I Tornai, M Udvardy, K Fechner, S Jacobsen, B Teegen, A Sumegi, G Veres, PL Lakatos, J Kappelmayer, P Antal-Szalmas. Presence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in cirrhosis – possible hint towards the involvement of gut mucosal immune system? **Falk Symposia** 191, 2013 október 3-5 (P62).

2: P Antal-Szalmas, **N Sipeki**, Zs Vitalis, T Tornai, I Altorjay, I Tornai, M Udvardy, K Fechner, S Jacobsen, B Teegen, A Sumegi, G Veres, PL Lakatos, J Kappelmayer, M Papp. Presence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in cirrhosis – possible hint towards the involvement of gut mucosal immune system? **Magyar Immunológiai Társaság 42. Kongresszusa**, 2013. október 16-18., Pécs

3: P.L. Lakatos, **N. Sipeki**, T. Tornai, I. Földi, I. Altorjay, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Antal-Szalmas, M. Papp. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's Disease. **Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) 10. Kongresszusa**; Barcelona, Spanyolország, 2015.02.19-21. (P117)

4: L. Kiss, K. Farkas, **N. Sipeki**, Z. Kurti, P.A. Golovics, M. Rutka, B. Lovasz, Z. Vegh, K. Gecse, I. Altorjay, M. Papp, T. Molnar, P. Lakatos. Accelerated treatment strategy in Inflammatory Bowel Diseases: Is it associated with a change in the disease course? **Európai Crohn Colitis Társaság (ECCO) 10. Kongresszusa**; Barcelona, Spanyolország, 2015.02.19-21. (P469)

5: M. Papp, **N. Sipeki**, T. Tornai, I. Földi, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmas, G. Veres, P.L. Lakatos. Presence of anti-MZGP2 IgG and IgA antibodies assessed by 2 different ELISA assays is associated with younger age at onset, stricturing disease behaviour, need for surgery and ASCA/anti-OMP Plus™ positivity in Crohn's Disease. **Falk Symposium 196**; Frankfurt, Németország, 2015.03.05-08. (P72)

- 6: P.L. Lakatos, **N. Sipeki**, T. Tornai, I. Földi, G.L. Norman, Z. Shums, P. Antal-Szalmas, G. Veres, M. Papp. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's Disease. **Falk Symposium 196**; Frankfurt, Németország, 2015.03.05-08. (P52)
- 7: T. Tornai, D. Tornai, **N. Sipeki**, I. Foldi, T. Dinya, Z. Vitalis, P. Antal-Szalmas, I. Tornai, M. Papp. Soluble CD163 (sCD163) is a marker of infection in patients with cirrhosis and acute decompensation and an independent predictor of the short-term mortality. **Európai Májkutató Társaság (EASL) 50. Kongresszusa** (50th International Liver Congress); Bécs, Ausztria, 2015.04.22-26. (P0174) – Poster of distinction
- 8: T. Tornai, D. Tornai, **N. Sipeki**, I. Foldi, T. Dinya, Z. Vitalis, P. Antal-Szalmas, I. Tornai, M. Papp. Soluble CD163 (sCD163) is a marker of infection in patients with cirrhosis and acute decompensation and an independent predictor of the short-term mortality. **Falk Symposium 197**; Lisbon, Portugal, 2015.05.08-09. (P77) – Poster of distinction
- 9: P.L. Lakatos, **N. Sipeki**, I. Altorjay, G.L. Norman, Z. Shums, G. Veres, P. Antal-Szalmas, M. Papp. Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's Disease. **Digestive Disease Week 2015**; Washington, DC, USA, 2015.05.16-19. (Su1271 – Session – IBD: Disease Complications)
- 10: P.A. Golovics, K. Farkas, **N. Sipeki**, Z. Kurti, M. Rutka, L. Kiss, B. Lovasz, Z. Vegh, K. Gecse, I. Altorjay, M. Papp, T. Molnar, P. Lakatos. Accelerated treatment strategy in Inflammatory Bowel Diseases: Is it associated with a change in the disease course? **Digestive Disease Week 2015**; Washington, DC, USA, 2015.05.16-19. (Sa1156 – Session – IBD: Clinical Outcomes)
- 11: M. Papp, **N. Sipeki**, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmas, G. Veres, P.L. Lakatos. Presence of anti-MZGP2 IgG and IgA antibodies assessed by 2 different ELISA assays is associated with younger age at onset, stricturing disease behaviour, need for surgery and ASCA/anti-OMP PlusTM positivity in Crohn's Disease. **Digestive Disease Week 2015**; Washington, DC, USA, 2015.05.16-19. (Su1272 – Session – IBD: Disease Complications)

12: M. Papp, **N. Sipeki**, G.L. Norman, Z. Shums, D. Roggenbuck, P. Antal-Szalmas, G. Veres, P.L. Lakatos. Rediscovery of the anti-pancreatic antibodies and evaluation of their prognostic value in a prospective clinical cohort of Crohn's patients: the importance of specific target antigens (GP2 and CUZD1). **United European Gastroenterology Week (UEG Week)**, Barcelona, 2015. 10.24-28. (P0956) (IBD II: Diagnosis and monitoring, Session Date: October 27, 2015)

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

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

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

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

12. Tárgyszavak

Crohn-betegség, colitis ulcerosa, cirrhosis, betegség progresszió, betegségsspecifikus szövődmények, trombózis, klinikailag jelentős bakteriális fertőzések, immunzavar, szerológiai antitestek, anti-foszfolipid antitestek, anti- β 2-glikoprotein I antitestek, anti-kardiolipin antitestek, anti-foszfatidilszerin/protrombin komplex ellenes antitestek, pankreász ellenes antitestek, CUZD1 glikoprotein, glikoprotein 2, anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek, immunglobulin A.

Crohn's disease, ulcerative colitis, cirrhosis, disease progression, disease specific complications, thrombosis, clinically significant bacterial infection, immune dysfunction, serologic antibodies, antiphospholipid antibodies, anti- β 2-Glycoprotein-I antibodies, anti-phosphatidylserine/prothrombin, anti-cardiolipin antibodies, anti-pancreatic antibodies, glycoprotein CUZD1, glycoprotein 2, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, immunoglobulin A.

13. Köszönetnyilvánítás

Nem hiszek a hagyományos köszönetnyilvánításokban, mert nem hiszem, hogy egy-egy Ember igazi értékét, az Életemben betöltött szerepét, illetve hozzájárulását a szellemi és lelki fejlődéséhez bele tudnám szorítani pár rövidke mondatba. Nincsenek elhanyagolható szerepek, és igazándiból nem hiszek a címkékben sem. Így rendhagyó módon szeretnék egy kicsit kreatívan köszönetet mondani azoknak az embereknek, akik végig kísérték eddigi utamon a PhD felé félúton, illetve azoknak, akik majd a továbbiakban is részei lesznek az életemnek. Összegyűjtöttem azokat az idézeteket, amik többünkben tartották a lelket, illetve irányt mutattak azokban az időkben, amikor a legnehezebb volt látni a sötétben, kitartani és tudni az irányt, amerre haladni szeretnénk a szellemi és lelki fejlődés ösvényein. Hálám jeléül szeretettel:



„Tételezzük fel, például, hogy roppant szél fúj odakint, és a honfitársaimnak el akarom magyarázni, milyen a viharos amerikai szél vagy hurrikán. Befogom tehát egy szivarosdobozba, hazaviszem, és azt mondom: "Ezt nézd meg!" Nincs benne semmiféle szél, ugye? Minthogy befogtuk. Vagy ha arra az érzésre vagy kíváncsi, milyen egy folyó sodrása, én pedig hozok egy vödörrel belőle. Megszűnt az áramlás abban a pillanatban, hogy vödörbe tettem. Abban a pillanatban, hogy a dolgokat koncepcióba zárod, megszűnik az áramlásuk; statikussá, halottá válnak. Egy megfagyott hullám nem hullám. Egy hullám alapvetően mozgás, akció; nem hullám, amikor megfagyaszod. A koncepciók fagyottak. A valóság cseppfolyós.” (Anthony de Mello - jezsuita atya)

„Practice makes perfect.” (Van Gogh) avagy „Sebaj, legalább ezt is jól begyakoroltátok” (Apa)

„A legfontosabb dolog egy nőnél, hogy szedje össze magát! Szóval szedd össze magad kislányom!” **(Apa)**

„Az akarat megteremti az utat.”

„Az egész olyan bonyolult. Ha rossz szálat húz az ember vagy túl erősen húzza, az egész mindenség csak még jobban összegubancolódik. Vagy megoldhatatlanul kemény lesz a csomó, hogy neki sem érdemes állni és ott kell hagyni. Nem maradhat az élet egy öklömnyi kemény gubanc.....” **(Anna Gavalda: Szerettem őt (j l'amais))**

„Az él jól és bölcsen, aki tudja, hogy a küzdelem az élet értelme. És élvezzi. Minél nehezebb, annál inkább. És küzd vidáman, játékosan, hittel és önbizalommal.” **(Müller Péter)**

„Minden embernek kell, legyen egy feladata ebben az életben - kötelességen belül, vagy azon felül is talán -, mert különben nem lenne értelme annak, hogy él. Az emberi világ több kell, legyen, mint egy bonyolult szerkezetű gép, melyben minden ember egy fogaskerék szerepét tölti be... Minden embernek kell, legyen egy feladata, egy titkos küldetése, mely Istentől való.”

(Wass Albert)

„Uram, nem csodákért és látomásokért fohászokodom, csak erőt kérek a hétköznaphoz. Taníts meg a kis lépések művészetére!” Antoine de Saint-Exupery: Fohász

„Egyáltalán ne álmodj kicsiket, mivel a kis álmoknak egyáltalán nincs erejük ahhoz, hogy megmozgassák az emberek szívét.” **(Goethe)**

„Ha szárnyak nélkül születél, hagyd, hogy kinőjenek!” **(Coco Chanel)**

„A kaleidoszkópeffektus azt ígéri: ha egy kicsit elmozdítasz valamit a kedvező irányban az életedben, akkor a nagy egész életmintázat változik meg. Ez pedig nagy esély! Változtass, és élvezd a pozitív hozományokat!” **(Prof. Dr. Bagdy Emőke)**

„When your legs are tired, walk with your heart.” **(Coelho)**

„Ha biciklivel indulsz valahová, nem nyomhatod le mindkét pedált egyszerre, mert felborulsz. Haladni csak úgy lehet, ha az egyik pedált nyomod, a másikat elengeded. Nyomás és elengedés együtt: ez a haladás titka” **(Bruce Lee)**.

„A legmerészebb álmaidat is megépítheted - de lassan. Téglánként. Minden téglalrakásához türelem kell, kitartó szorgalom, s főleg hit, hogy ebből végül ház lesz. Minden egyes téglánál látni kell a házat! Ez a hit. **(Müller Péter)**

„Te nem hiszel a csodában, tagadod? Nézd csak, nem győzhetlek meg, mert a csoda legfőbb ismertetőjele, hogy csodálatos - nem lehet bizonyítani, mint egy élettani tényt, nem lehet fényképezni, sem előre, mennyiségtani törvények szerint megjósolni és kiszámítani. A csoda megnyilatkozási formáit sem könnyű mindig érzékelni: nem jár mindig két lábon, nem lehet fényképezni, nincsenek telekkönyvi, sem anyakönyvi adatai. A csoda, egészen egyszerűen, megnyilatkozik - s néha csak sokkal később értjük meg, mi volt a csoda, hogyan avatkozott életünkbe, s mi volt e beavatkozásban a természetfölötti és csodálatos. A csoda lényegét nem tudom megmutatni, sem bizonyítani. De gondoldj talán arra, milyen felfoghatatlan és

csodálatos igazi valójában mindaz, amit mindennapinak és természetesnek érzel: már a létezés ténye milyen csodaszzerű! Az, hogy megszületted, élsz, s egy napon meghalsz! Mindezt "természetes"-nek érzed? Akkor vakki vagy és botfűlű. Már a valóság is csoda, felfoghatatlan, s minden természetes kellékével és anyagával természetfölötti is! Miért is lenne e valószínűtlenül bonyolult valóságnál értelmetlenebb a csoda? A világlélek a csoda, mely mindenben megnyilatkozik. Ezért vagyok hívő: mert a világ lelke bennem is, hétköznapjaimban, szomorú és esendő sorsomban is megnyilatkozik." **(Márai Sándor)**

"Ha nem merészkedsz a hullámokba, sosem tanulsz meg úszni örvénylő vizekben." **(R.Livingstone)**

"A hegycsúcsra sokféle út vezet. Vannak meredekebbek és kényelmesebbek. S a táj is különböző, ami a szemedbe tűnik, de azért ugyanazt a hegyet látod különböző oldalairól. Ezért hát légy türelmes önmagaddal szemben. Találd meg a neked legmegfelelőbb utat. De légy türelmes másokkal szemben is, akik másik ösvényt választottak. Se a te utad, se a másoké nem az egyedül üdvözítő út. Aki felfelé kapaszkodik, sokszor meghorzsolja magát, időnként elesik. Ilyenkor fel kell állni, ne maradj fekvé. Amíg úton vagy, nincs veled semmi baj. A belső halál akkor kezdődik, amikor véglegesen letáboroztál a hegyoldalon." **(Popper Péter)**

"We often miss opportunity because it's dressed in overalls and looks like work" **(Thomas A. Edison)**

„Csak az tud megmászni egy hegyet, aki megadja a testének azt a figyelmet, amit megérdemel. Annyi idő áll rendelkezésedre, amit az élet megenged, menj hát, és ne követeld azt, amit nem kaphatsz meg. Ha túl gyorsan mész, elfáradsz és félúton feladod. Ha túl lassan mész, rád esteledhet és eltévedsz. Élvezd a tájat, a források vizét és a gyümölcsöket, mert a természet nagylelkű, de haladj tovább.” **(Paulo Coelho)**

"Mindenkinek egy zseni. De, ha egy halat az alapján ítélsz meg, hogy milyenek a képességei a fára mászáshoz, abban a hitben élheti le az egész életét, hogy hülye." **(Albert Einstein)**

"Ha nem állítunk magunk elé korlátokat, akkor azok nem is biztos, hogy ott vannak."

"Nothing is impossible, the word itself says I AM POSSIBLE" **(Audrey Hepburn)**

"Csak kétféleképpen élheted az életet. Vagy abban hiszel, a világon semmi sem varázslat. Vagy pedig abban, hogy a világon minden varázslat." **(Albert Einstein)**

"Only one thing makes a dream impossible: the fear of failure..." **(Coelho)**

"Only those who see the invisible can do the impossible" **(Dr. Bernard Lown)**

"Az élet nem arról szól hogy várjuk a vihar elvonulását, hanem arról, hogy megtanuljuk hogyan kell táncolni az esőben."

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

"Az élet igazi, nagy vállalkozásai legtöbbször nem hőstettek, hanem türelemjátékok." **(Márai Sándor)**

“Egyikünk élete sem könnyű. És akkor? Legyen bennünk kitartás, és mindenekelőtt bízzunk önmagunkban. Hinnünk kell benne, hogy tehetségesek vagyunk valamiben, és ezt a valamit - kerül, amibe kerül- meg tudjuk valósítani.” (**Marie Curie**)

“Bármire, amit megtehetsz vagy megálmodsz fogj hozzá! A merészségben zsenialitás, erő és varázslat rejlik.” (**Goethe**)

“Általában az az ember jut a legmesszebb, aki hajlandó merni és csinálni. Egy óvatos hajó soha nem jut messze a parttól.” (**Dale Carnegie**)

“Adassék nékem annyi lelki erő, hogy mindazt elfogadjam, amin változtatni nem tudok, és bátorság ahhoz, hogy mindazt megváltoztassam, amire képes vagyok, és bölcsesség ahhoz, hogy el ne tévedjek közöttük.” (**Friedrich Oetinger**)

"I can't think about that right now. If I do, I'll go crazy. I'll think about that tomorrow."
(**Scarlett O'Hara - Gone with the wind**)

Mindennek van határa, de megkerüljük. (**Rejtő Jenő**)

"A célt tudom, még százszor el nem érem.
Mit sem tesz. A cél voltaképp mi is?
A cél, megszűnte a dicső csatának,
A cél halál, az élet küzdelem,
S az ember célja a küzdelem maga." (**Madách Imre: Az ember tragédiája**)

10 Lessons from Einstein by Paulo Coelho

1. **Follow Your Curiosity** “I have no special talent. I am only passionately curious.”
2. **Perseverance is Priceless** “It’s not that I’m so smart; it’s just that I stay with problems longer.”
3. **Focus on the Present** “Any man who can drive safely while kissing a pretty girl is simply not giving the kiss the attention it deserves.”
4. **The Imagination is Powerful** “Imagination is everything. It is the preview of life’s coming attractions. Imagination is more important than knowledge.”
5. **Make Mistakes** “A person who never made a mistake never tried anything new.”
6. **Live in the Moment** “I never think of the future – it comes soon enough.”
7. **Create Value** “Strive not to be a success, but rather to be of value.”
8. **Don’t be repetitive** “Insanity: doing the same thing over and over again and expecting different results.”

9. **Knowledge Comes From Experience** “Information is not knowledge. The only source of knowledge is experience.”

10. **Learn the Rules and Then Play Better** “You have to learn the rules of the game. And then you have to play better than anyone else.”

14. Függetlenség