

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A FŐ HISZTOKOMPATIBILITÁSI RENDSZER (MHC)
POLIMORFIZMUSAINAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ
AUTOIMMUN BETEGSÉGEKBEN**

KAPITÁNY ANIKÓ

Témavezető: Prof. Dr. Sipka Sándor
Programvezető: Prof. Dr. Zeher Margit
Prof. Dr. Szegedi Gyula

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum

2009

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	6
1.1.	Az immunrendszer és a HLA-rendszer	6
1.2.	Humán leukocytá antigén (HLA).....	6
1.2.1.	Az MHC molekulák	6
1.2.2.	Az MHC gének szerveződése	7
1.2.3.	Nevezéktan, polimorfizmus és linkage disequilibrium	9
1.2.4.	Betegség asszociációk	10
1.3.	Coeliakia (CD)	11
1.3.1.	Általános kép.....	11
1.3.2.	Coeliakia és a HLA rendszer kapcsolata.....	12
1.3.3.	Diagnózis.....	13
1.4.	Rheumatoid arthritis (RA).....	16
1.4.1.	Általános kép.....	16
1.4.2.	Rheumatoid arthritis és a HLA-rendszer kapcsolata.....	17
1.5.	Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE.....	19
1.5.1.	Általános jellemzők.....	19
1.5.2.	Különböző MHC gének előfordulása a három betegcsoportban	21
2.	Célkitűzések	23
2.1.	Coeliakia.....	23
2.2.	Rheumatoid arthritis	23
2.3.	Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE.....	24
3.	Betegek és módszerek	25
3.1.	Coeliakia vizsgálatba bevont betegek	25
3.2.	Rheumatoid arthritis vizsgálatokba bevont betegek.....	27
3.3.	SLE vizsgálatokba bevont betegek	28
3.4.	A HLA-DR és HLA-DQ genotípus meghatározása.....	29
3.4.1.	A genomiális DNS kivonása	29
3.4.2.	Polimeráz láncreakció	30
3.4.3.	Agaróz gélelektroforézis, kiértékelés	32
3.5.	Egyéb vizsgálatok	33
3.5.1.	EMA és anti-TG antitest meghatározások coeliakiás betegekben	33
3.5.2.	Szöveti vizsgálat coeliakiás betegek esetében.....	33

3.5.3.	RA laboratóriumi markereinek vizsgálata.....	34
3.5.4.	Statisztikai analízis.....	34
4.	Eredmények.....	36
4.1.	Coeliakia.....	36
4.2.	Rheumatoid arthritis.....	40
4.3.	Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE.....	45
5.	Megbeszélés.....	48
5.1.	Coeliakia.....	48
5.2.	Rheumatoid arthritis.....	50
5.3.	Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE.....	54
6.	Megállapítások, új eredmények, összefoglalás.....	57
7.	Irodalomjegyzék.....	61
8.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	73
9.	Köszönetnyilvánítás.....	78

Rövidítések jegyzéke

aCL	kardiolipin ellenes antitest
ACR	American Collage of Rheumatology
AGA	gliadin-ellenes antitest
AIDS	szerzett immunhiányos betegség
Anti-CCP	anti-ciklikus-citrullinált peptid
APS	antifoszfolipid szindróma
ARA	retikulin ellenes antitest
β 2-GPI	β 2-glikoprotein I
CAH	congenital adrenal hyperplasia
CD	coeliakia
CRP	C reaktív protein
DEOEC	Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügyi Centrum
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
dsDNS	dupla szálú dezoxi-ribonukleinsav
EDTA	etilén diamin tetraacetát
ELISA	enzym linked immunosorbent assay
EMA	endomysium ellenes antitest
ESPGAN*	European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition (A Gyermekgastroenterológia és Táplálkozás Európai Társasága)
HLA	humán leukocita antigén
Ig	immunglobulin
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
PAPS	primer antifoszfolipid szindróma
PCR	polimeráz láncreakció
PVA	részleges boholyatrófia
RF	rheumatoid faktor

RA	rheumatoid arthritis
RIA	radioimmunoassay
SAPS	szekunder antifoszfolipid szindróma
SE	shared (megosztott) epitóp
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SVA	subtotalis boholyatrófia
TBE	Tris-borát-EDTA
TG	Transzglutamináz 2

* időközben a társaság neve ESPGHAN-European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition-ra változott

1. Bevezetés

1.1. Az immunrendszer és a HLA-rendszer

Az immunrendszer feladata védeni a szervezetet az olyan káros betolakodókkal szemben, mint a baktériumok és a paraziták, megtartani a toleranciát a szervezet „saját” elemeivel szemben, valamint elpusztítani a kiöregedett, mutáns vagy virulens sejteket. Az immunrendszer csak részben van kifejlődve születésünkkel, specificitása életünk során egyre nő a különböző antigénekkal történő találkozások eredményeként. A növekvő specificitásért, az úgynevezett adaptív immunitásért felelős sejtek többsége a T és B limfociták közé tartozik.

1.2. Humán leukocita antigén (HLA)

A T-limfociták az antigéneket a fő hisztokompatibilitási molekulákhoz (major histocompatibility complex- MHC) kapcsolva ismerik fel a sejtek felszínén. Emberekben az MHC rendszert humán leukocita antigén (HLA) rendszernek nevezzük (1,2). A HLA molekulákat kódoló gén a 6-os kromoszóma rövid karján helyezkedik el, a HLA régióban (6p21.3).

1.2.1. Az MHC molekulák

Legfontosabb biológiai funkciójuk a szervezetbe bejutó, vagy az ott termelődő fehérjék részleges lebontásakor keletkező peptidok megkötése és bemutatása a T-sejtek számára.

Az MHC molekulákat két nagy csoportra oszthatjuk:

- Az MHC I. osztályú (MHC-I) molekulák elsősorban az endogén eredetű, intracelluláris, citoplazmatikus antigéneket mutatják be. Az MHC-I-endogén peptid komplexet a CD8+ citotoxikus T sejtek ismerik fel.
- Az MHC II. osztályú (MHC-II) molekulák az exogén eredetű antigéneket mutatják be, és ezt az MHC II-exogén peptid komplexet a CD4+ helper sejtek ismerik fel. A különböző eredetű antigének feldolgozásának útja is eltérő.

MHC-I molekulák a legtöbb sejtmaggal rendelkező sejt felszínén megtalálhatók, míg MHC-II molekulák elsősorban dendritikus sejtek, makrofágok és B-limfociták felszínén jelennek meg (3).

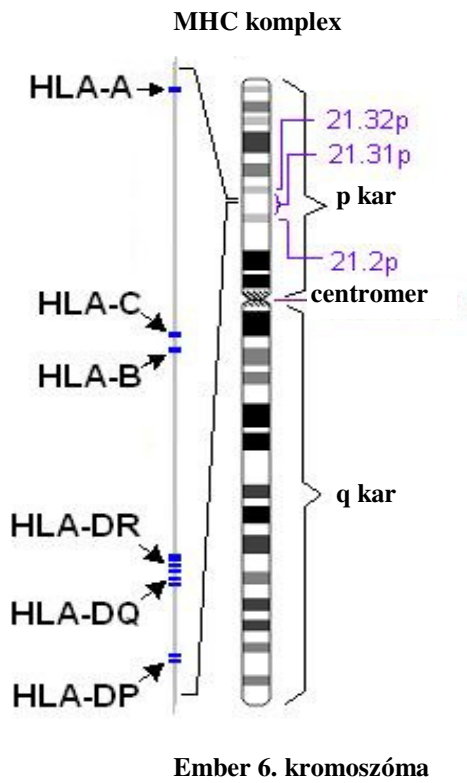
Az MHC gén termékei rendkívül polimorf, genetikailag meghatározott alloantigéneket tartalmazó sejt felszíni fehérjék. Az MHC-I molekulák - emberben HLA-A, -B, -C - egy polimorf α láncból (A, B vagy C) és egy konstans fehérjéből (β 2-mikroglobulin) állnak. Az MHC-II molekulák -emberben HLA-DR, -DP, DQ- két polimorf láncból (α , β) állnak. Mindkét lánc tartalmaz variábilis régiókat. A két láncot eltérő MHC-gének kódolják, a populációs polimorfizmus mértéke eltérő (3).

A peptidkötő régiót az MHC-II molekulák esetében az α - és β -lánc N-terminális régiói együttesen alakítják ki. A nyolc hajlatú β -lemez két α -helikális szakasszal együtt képezi a peptid kötésére alkalmas molekuláris felszínt, amely – szemben az MHC-I molekulákkal – nem zárt, hanem nyitott, így nagyobb méretű peptidok megkötésére alkalmas (3).

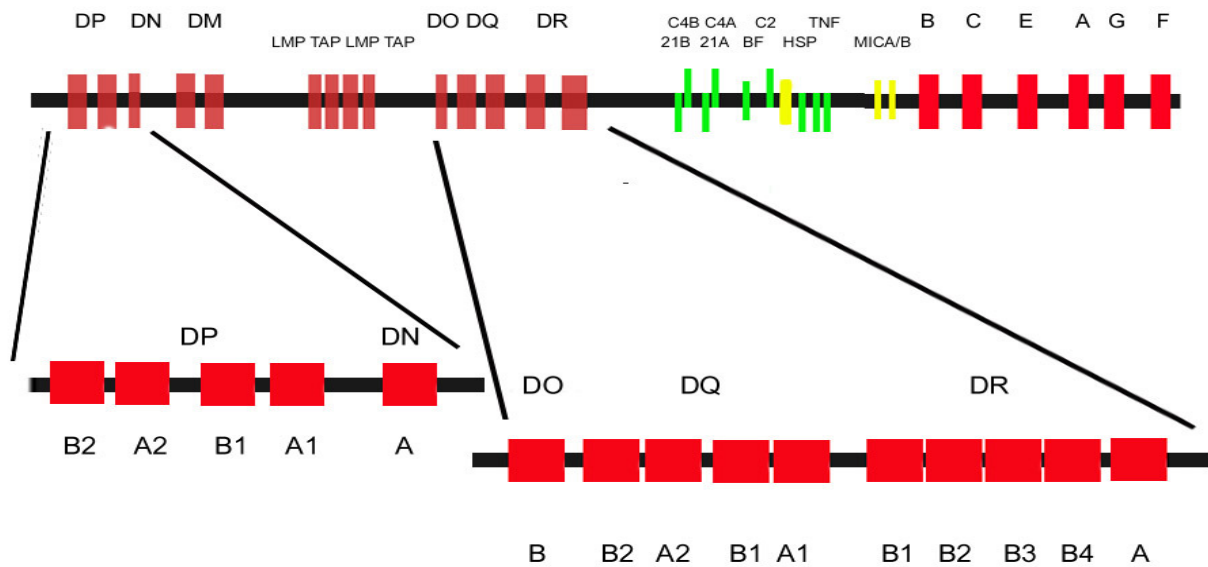
1.2.2. Az MHC gének szerveződése

Emberben a 6. kromoszóma rövid karján található az MHC-I molekula α -, illetve az MHC-II molekulák α - és β - láncának génje. A β 2 mikroglobulint kódoló génszakasz emberben a 15. kromoszómán helyezkedik el. A teljes emberi MHC-génkomplex egészében véve mintegy 50 gént és kb. 4 millió bázispárt magába foglaló, 2cM nagyságú génszakasz, az emberi genom mintegy ezredrésze (3).

Az MHC II komplex (~850 kb) az MHC génrégió azon része, amely legközelebb található a kromoszóma centromerjéhez (1. ábra). Ebben a régióban kódoltak a HLA-DR- α (DR-A), DR- β (DR-B), DQ- α (DQ-A), DQ- β (DQ-B), DP- α (DP-A), DP- β (DP-B) láncok, amelyek génjeinek jelölése a zárójeleken belül található (2. ábra). Az egyes α és β láncoknak számtalan allélvariációja lehetséges.



1. ábra Az MHC II. molekulák α és β láncát kódoló gének a 6. kromoszóma rövid karján helyezkednek el.



2. ábra Az MHC génrégió felépítése

1.2.3. Nevezéktan, polimorfizmus és „linkage disequilibrium”

Kezdetben a különböző allélokat szerológiai tipizálás alapján nevezték el, ma már azonban, mivel a DNS szekvencia adatok is rendelkezésünkre állnak, az allélek elnevezései a szekvenált géneken alapulnak. Az allél neve a régió nevéből (HLA), a lokusz nevéből (A), egy bizonyos allél csoportból (*02) és a specifikus allél nevéből épül fel.

Így például a HLA-A*0201 allélnév a 01 allélt jelenti a HLA-A*02 csoportból. (1.táblázat) A tudományos szövegek az egyszerűség kedvéért gyakran a szerológiai ekvivalenseket használják a molekulát kódoló összes allél megnevezése helyett (pl. a DQA1*0501 és DQB1*0201 helyett DQ2-t írnak, ami az ezen allélek által kódolt molekula neve is egyben).

1. táblázat: A HLA allélek nevezéktana

Nevezéktan	Utalás
HLA	génrégió
HLA-A	lokusz
HLA-A*02	allélok csoportja
HLA-A*0201	specifikus allél
HLA-A*020101	allél szinonim mutációja

A klasszikus HLA géneket a leginkább polimorf gének között tartják számon (4). A polimorfizmust pontmutációk, génkonverziók és rekombinációk eredményezik. A különböző allélek nagy száma növeli a HLA kombinációk sokféleségét. A diverzitást növeli az a tény is, hogy a HLA allélok kodomináns öröklődést mutatnak, tehát mindkét szülőtől kapott allélok expresszálódnak egyazon időben.

A HLA régió speciális jellemzője az igen erős „linkage disequilibrium”, tehát az a jelenség, hogy két allél gyakrabban fordul elő együtt, mint az a véletlenszerű eloszlás alapján várható lenne. Az egy blokkban öröklődő allélok alkotják a haplotípust.

1.2.4. Betegség asszociációk

Két alapvető módon határozhatók meg az autoimmun betegségekben fontos szerepet játszó gének: asszociációs és kapcsoltsági (linkage) tanulmányokkal. A betegséggasszociációs tesztek azt vizsgálják, hogy egy bizonyos allél gyakrabban fordul-e elő betegekben, mint az egészséges kontroll populációban. Az 1970-es években fedezték fel először ezzel a módszerrel, hogy bizonyos HLA allélok kapcsolatban lehetnek autoimmun betegségekkel. (5,6)

Több mint 500 betegség hozható kapcsolatba vagy a klasszikus HLA allélokkal, vagy a HLA régióban található más génekkel, esetleg teljes HLA haplotípusokkal. Sok közülük autoimmun és multifaktoriális betegség. (2. táblázat)

2. táblázat: HLA régióval kapcsolatba hozott főbb betegségek

HLA I.		HLA II.		Egyéb	
B27	Spondylitis ankylopoetica	DR4, DQ8, DQ2*	1-es típusú diabétesz	HFE	Haemochromatosis
B53	Malária	DR2.,DR3	SLE	CYP21B	CAH
B51	Bechet szindróma	DR4	Rheumatoid arthritis	C4A	SLE
A2902	Birdshot retinitis	DR2, DQ6	Szklerózis multiplex		
Cw6	Psoriasis vulgaris	DQ2*,DQ8	Coeliakia		
		DQ6	Narkolepszia		

* [DQA1*05 + DQB1*02]. A rövidítések magyarázatát lásd előbb.

A multifaktoriális betegségek kifejlődéséhez a gének egyes csoportján kívül bizonyos környezeti faktorok jelenléte is szükséges. A környezeti faktorok egyes esetekben ismertek, mint például coeliakia esetében a glutén vagy tüdőrák esetében a dohányzás.

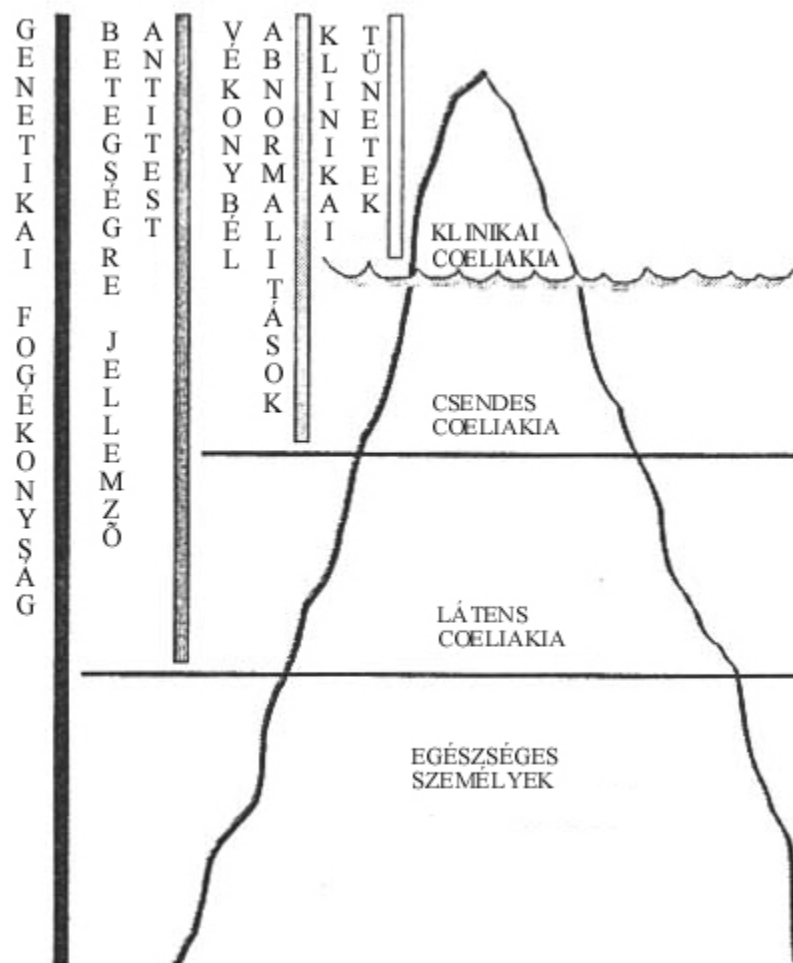
1.3. Coeliakia (CD)

1.3.1. Általános kép

A coeliakia az európai népesség közel 1%-ában előforduló krónikus betegség, melynek lényege a gluténnal (búza, árpa, rozs, zab) szembeni intolerancia (7). Bár a coeliakia nem tartozik a klasszikus autoimmun betegségek közé, de a betegekben a vékonybélnyálkahártya károsodással járó folyamat során betegség specifikus autoantitestek termelődnek a szervezetben előforduló endomysium (endomysium ellenanyag, EMA) és szöveti transzglutamináz (tTG) ellen (8,9). Ezen antitestek kimutatása a szérumban (9,10), vagy a bélben (11) jelentős diagnosztikai értékkel bír.

A coeliakia leggyakoribb tünetei: hasmenés, hasi fájdalom, alultápláltság, felszívódási zavarok és ebből eredően vitamin- és vashiány, anaemia, hypoproteinaemia. A kórképre jellemző malabszorpció a vékonybél nyálkahártya károsodásának következtében alakul ki és különböző súlyosságú lehet. A betegekben a vékonybélbolyhok megrövidülése és a kripták megnyúltsága (villusatrophia) észlelhető. Előfordulhatnak bélrendszeren kívüli manifesztációk is (máj-, bőr-, idegrendszeri károsodások), ezek a klinikai megjelenést igen változatossá, atipikussá tehetik. Bár a gluténnal szembeni intolerancia egész életen át tart, eliminálása az étrendből teljes remisszióhoz vezet, mely a bolyhok regenerációját is magában foglalja (8,10).

A coeliakiának különböző előfordulási formái ismertek, amelyek egy jéghegy formájában is ábrázolhatók (3. ábra). A jéghegy alapját olyan emberek alkotják, akik genetikailag fogékonyak ugyan a betegségre, de többségüknél sohasem fog kialakulni a betegség. A látens esetekhez tartozó betegeknél lehetnek tünetek és gyakran megtalálható a betegségre jellemző antitest mintázat, valamint a megnövekedett intraepitheliális $\gamma\delta$ T sejtszám is, de ekkor még nincs jele egyéb, a betegségre tipikus mucosa lézióknak (12), amely azonban később mégis kialakul. Csendes („silent”) coeliakia esetén a beteg tünetmentes, de a detektálható antitestek mellett már vékonybél abnormalitásokban is manifesztálódik a betegség. A jéghegy csúcsát azok a coeliakiás betegek alkotják, akiknél már a klinikai tünetek is megjelennek (8).



3. ábra: A coeliakia különböző előfordulási formái

1.3.2. Coeliakia és a HLA rendszer kapcsolata

A genetikai faktorok szerepét jelzi a betegség kialakulásában, hogy a betegek elsőfokú rokonainak 10%-a ugyancsak coeliakiás, illetve egyetétjű ikrek esetében >70% az előfordulási gyakoriság. (13) Genetikai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a betegek több, mint 90%-a a HLA-DQ2 allélt hordozza, míg a többi coeliakiás betegben általában a HLA-DQ8 molekula expresszálódik (14), néhány nagyon ritka kivételtől eltekintve (15). Azoknál a betegeknél, ahol sem a DQ2, sem a DQ8 molekula nincs jelen, a betegség kialakulásának

esélye elhanyagolható, mivel ezek a molekulák fontos szerepet játszanak a nyálkahártya-károsodás patomechanizmusában: megkötik a gliadin peptideket és bemutatják a T-sejtek számára (14,16). A HLA-DQ2 és DQ8 molekulák a negatív töltéseket preferálják, de a gluténban kevés a negatív töltés. A szervezetben jelen levő szöveti transzglutamináz, melynek szubsztrátja a glutén (17), a glutamin residuumokat glutaminsavvá alakítja, és az így megváltozott, már negatív töltéssel rendelkező molekulák képesek lesznek kötődni a DQ2 és DQ8 molekulákhoz. Így válik lehetővé az antigén prezentáció a T-sejtek felé. A T-sejtes immunválasz eredményeként jön létre az epitheliális sejtek hyperplasiája, valamint a villusatrophia. A HLA-DQ2 és HLA-DQ8 molekulák jelenléte tehát szükséges a betegség kialakulásához, ám nem elégséges, ugyanis ezen allélek az egészséges populáció 20-30%-ában is megtalálhatók. A coeliakia és a DQ2 és DQ8 molekulák közötti erős asszociációt magyar felnőtteken és gyerekeken végzett vizsgálatok is megerősítették (18-21).

1.3.3. Diagnózis

Napjainkban a coeliakia diagnózisa megbízhatóan felállítható a szövettani vizsgálatokkal kimutatott súlyos boholyatrophia fennállására és a coeliakia specifikus autoantitestek (tTG ellenanyag és EMA) pozitivitásra alapozva (9,10,11,22).

Szövettan: Régebben az ESPGAN kritériumok alapján három biopsziát végeztek a coeliakia diagnózisának megerősítéséhez: az elsőt kezelés előtt, a másodikat a gluténmentes diéta folytatása alatt, a harmadikat ismételt gluténfogyasztás után (23). A betegség fennállása esetén a bél-mucosa az első és a harmadik biopszia során mutat abnormalitást. Ma ezt a módszert már csak ritkán alkalmazzák. Az 1990-ben elfogadott módosított ESPGAN kritériumokban a klinikai javulás után végzett gluténterhelés már nem szerepel (24). Felnőtt betegeknél a biztos diagnózishoz két alkalommal végzett biopszia szükséges és elégséges. Bár a coeliákia diagnózis „gold standardjának” ma a vékonybél szövettani vizsgálatát tartják, ennek a módszernek számos buktatója létezik (25,26). Az olyan jelenségek, mint az emelkedett intraepitheliális limfocitaszám, vagy a vékonybélbolyhok megrövidülése nem specifikus elváltozások, más betegségek esetén, például egyes ételallergiáknál és posztinfekciós károsodásoknál is előfordulhatnak (27).

Szerológiai vizsgálat: A lisztérzékeny egyéneknél a glutén fogyasztása alatt a szervezetben tTG-vel reagáló autoantitestek jelennek meg, melyek később a kerítésbe is kikerülnek, ami lehetővé teszi kimutatásukat ELISA vagy RIA módszerrel.

A klinikumban a szerológiai vizsgálatok legfőbb szerepe az atípusos tünetekkel rendelkezők, vagy a coeliákiához nagy gyakorisággal társuló betegségekben szenvedő betegek szűrése, a feleslegesen végzett biopsziák elkerülése, nyomon követés során a diéta hatékonyságának megítélése és a családszűrés.

A lisztérzékenyek vérsavójában a betegség-specifikus IgA autoantitesteket indirekt immunfluoreszcens technikával is ki lehet mutatni (28). A tTG ellenes ellenanyagok körébe tartozik a reticulín (ARA) és endomysium (EMA) ellenes antitest is, melyeknél szintén a szövetszövetekben lévő tTG az antigén, amivel az indirekt immunfluoreszcens eljárás során a betegekből lévő antitestek reagálnak. Ma az egyik leggyakrabban használt módszer – a gliadin-ellenes antitest (AGA) és a reticulín-ellenes antitest (ARA) meghatározást felváltva – az endomysium ellenanyag vizsgálata (EMA). Az EMA vizsgálatához az értékelő nagy jártassága feltétlenül szükséges. Az alapdiagnosztizálás első lépése, a pozitív EMA eredmény után el kell végezni a szövettani vizsgálatot. Csak így lehet bizonyítani a betegség tényét.

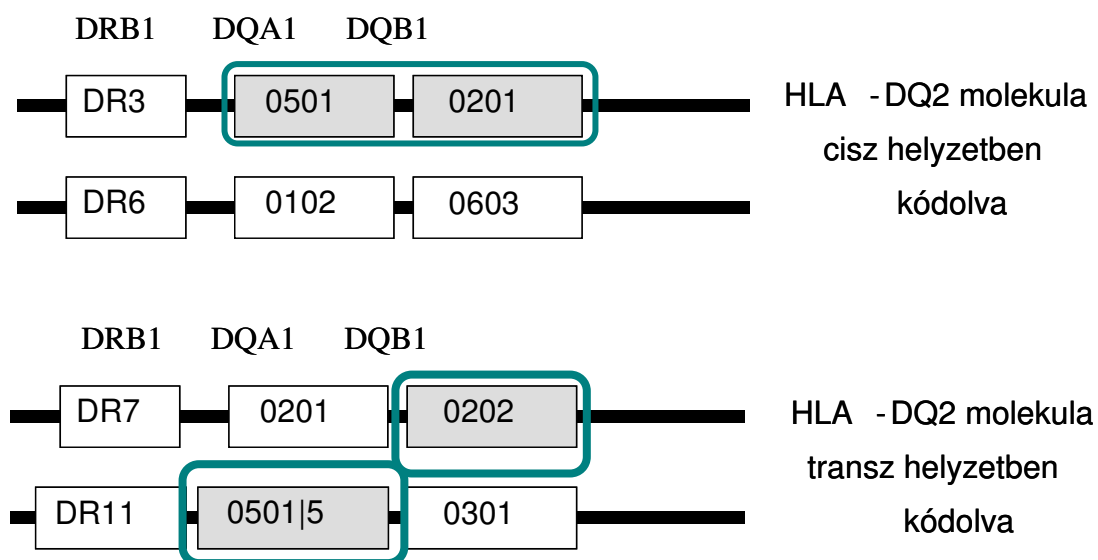
A mai gyakorlatban nem gyakori, hogy a két alapvető diagnosztikus kritérium hiányozzon, de előfordulhatnak olyan esetek, amikor azok eredménye nem egyértelmű. Az autoantitest vizsgálatok eredménye nagyon ritkán ellentmondásos lehet (pl. EMA pozitív, tTG ellenes antitest negatív, vagy fordítva), a szövettani vizsgálatba pedig nem mindig egyeznek bele a betegek. A szövettani vizsgálatot technikai problémák is nehezíthetik, valamint bizonyos esetekben a coeliákiára jellemző immunfolyamatok a vékonybél súlyos boholatrophíája nélkül is fennállhatnak. Ilyen esetekben segítséget nyújthat a HLA-DQ genotípus meghatározása.

Genetikai vizsgálat:

A HLA-DQ genotípus meghatározása nem rutinszerű vizsgálati módszer, mivel ennek alapján önmagában a betegség ténye nem mondható ki. Csak akkor végzik el, ha a differenciál diagnózis felállításánál szükséges (pl. fent említett esetekben), vagy olyan komplikált esetekben, ahol valamilyen okból nem végezhetőek el az egyébként szokásos vizsgálatok pl.: nem kezelhető érzékenység; vagy más betegségek (lymphoma, AIDS, immundefektus) is felmerülnek, illetve megkezdett gluténmentes diéta esetén, mivel ilyenkor a betegség-specifikus antitestek már nem mutathatók ki. A HLA-DQ vizsgálat legnagyobb

előnye az, hogy eredményét - az EMA-val szemben - a gluténmentes diéta nem befolyásolja. A vizsgálat egyik indikációja a betegség biztos és végleges kizárásának a lehetősége is lehet, illetve a családtagok veszélyeztetettségének megítélésére is alkalmazható, 100%-os negatív prediktív értéke miatt. Ajánlott még a betegség rizikójának felmérésére azoknál a családtagoknál, akiknél a kellő idejű és mértékű gluténfogyasztás hiányában szerológiai vizsgálatok alapján nem lehet véleményt mondani (pl. 3 évesnél fiatalabb gyerekek).

A genetikai vizsgálat során a betegség specifikus HLA-DQ markerek (DQ2 és DQ8) jelenlétét mutatjuk ki. A HLA-DQ2 heterodimer α láncát a DQA1*0501 vagy *0505, β láncát a DQB1*0201 vagy DQB1*0202 allél kódolja, a HLA-DQ8 molekula α láncát a DQA1*0301, β láncát pedig a DQB1*0302 allél kódolja. „Linkage disequilibrium” kapcsolat áll fenn a HLA-DQ2 molekula és főként a HLA-DR3- és DR7/DR11-molekulák kapcsolatára, azaz gyakrabban öröklődnek együtt, mint az a véletlenszerű eloszlás alapján várható lenne. A HLA-DQ2 molekula α és β láncát kódoló gének azonos kromoszómán, cisz helyzetben helyezkednek el a HLA-DR3 molekulákkal kapcsolatban, míg a DR7/DR11 heterozigóta személyek esetében a funkcionális DQ2-t létrehozó két lánc különböző kromoszómán, transz helyzetben van kódolva (4. ábra).



4. ábra: A coeliakiára hajlamosító HLA-DQ2 heterodimer

1.4. Rheumatoid arthritis (RA)

1.4.1. Általános kép

A rheumatoid arthritis (RA) elsősorban a kisízületeket szimmetrikusan érintő, krónikus, gyulladós, progresszív, destruktív kórkép, mely megfelelő kezelés hiányában az ízületek tönkremeneteléhez, mozgáskorlátozottsághoz, esetleg tartós rokkantsághoz vezet. Epidemiológiai vizsgálatok szerint a felnőtt lakosság 0,5-1,5%-ában fordul elő, és bármely életkorban elkezdődhet. A betegség gyakrabban fordul elő nőkben, arányuk a férfiakhoz képest 3:1-hez. Bár az RA etiológiája még nem ismert, biztos, hogy mind genetikai, mind környezeti faktorok szerepet játszanak a betegség kialakulásában (29-31). Genetikai faktorok szerepére utal, hogy az egyetűjű ikrek konkordanciája átlagosan ötször-hatszor gyakoribb a kétetűjűekhez képest (32).

A rheumatoid arthritis diagnózisának felállítása a klinikai tünetek és a laboratóriumi vizsgálatok eredményeinek együttes figyelembevételével történik. Több autoantitest is összefüggésbe hozható a betegség aktivitásával és/vagy kimenetelével (33-35). Bár mostanáig a rheumatoid faktor (RF) IgM izotípusa volt az RA egyetlen, napi rutinban használt laboratóriumi markere, ezen autoantitest specificitása igen alacsony RA-s betegek esetében, mivel egyéb autoimmun betegségben, vagy fertőző kórképekben szenvedők valamint egészséges idős emberek szérumában is megtalálható (36). A C reaktív protein (CRP) a gyulladós aktivitás érzékeny markere. Adekvát terápia hatására a szérum CRP szint rendszerint csökken (37), ezért a betegség aktivitásának megállapítására, illetve a terápia hatásosságának követésére nagyon alkalmas.

Az elmúlt években az anti-ciklikus-citrullinált peptid (anti-CCP) került előtérbe, mint az RA potenciális diagnosztikus és prognosztikus markere. Az anti-CCP antitest jelenléte igen specifikus és szenzitív RA-re nézve (38). E kórkép anti-CCP antitest meghatározással könnyebben elkülöníthető más arthropátiáktól, sőt mint prognosztikus marker előre vetítheti perzisztens, erozív vagy agresszívebb szinovitis kialakulását (39). Az anti-CCP antitest vizsgálat értéke felbecsülhetetlen korai RA-ban, mivel az anti-CCP pozitivitás évekkal megelőzheti a klinikai tünetek kialakulását (39,40). Az anti-CCP ELISA specificitása 98% manifeszt RA esetében, míg korai RA-ban 96%, szenzitivitása pedig 68% manifeszt RA-ban

és 48% korai RA-ban (39). Néhány kutató korrelációt talált az anti-CCP antitest és a RF pozitivitása között (41).

1.4.2. Rheumatoid arthritis és a HLA-rendszer kapcsolata

Genetikai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy az MHC-II molekulák közül számos HLA-DR allél kapcsolatba hozható a betegségre való fogékonysággal, és ezek az allélok különbözhetnek az egyes népcsoportokban (42-57). Sőt, egyes HLA-DRB1 allélok a betegség súlyosságával és kimenetelével is összefüggésbe hozhatók (30,46,47) 3.táblázat. A HLA-DRB1 allélok meghatározásának napi klinikai haszna lehet RA-s betegek esetében, mert például DRB1*04 allél jelenléte esetén súlyosabb kezdetű, gyorsabb lefolyású kórkép alakulhat ki, korán jelentkező erosiókkal (30,46,47). Így a HLA-DR allélok ismerete esetleg a therápia megválasztásában is segítséget nyújthat.

3. Táblázat. A rheumatoid arthritis HLA-DR asszociációja különböző etnikai csoportokban

HLA-DRB1	Aminósav szekvencia (70-74 loci)	Etnikai csoportok	Fogékonyság	Prognosztikai érték
<i>*0101</i>	QRRAA	indiaiak, kaukázusiak, japánok	+	-
<i>*0102</i>	QRRAA	askenázi zsidók	+	-
<i>*0401</i>	QKRAA	kaukázusiak, koreaiak	+	+
<i>*0404</i>	QRRAA	kaukázusiak, dél-kínaiak	+	+
<i>*0405</i>	QRRAA	koreaiak, japánok dél-kínaiak, spanyolok	+	+
<i>*0408</i>	QRRAA	kaukázusiak	-	+
<i>*0410</i>	QRRAA	japánok, kínaiak	+	+
<i>*1001</i>	RRRAA	dél-afrikaiak, spanyolok	+	-
<i>*1402</i>	QRRAA	yakiama indiánok (Észak- Amerikában), peruiak	+	-

Számos tanulmány utal arra, hogy a DRB1 génrégió első doménjének harmadik hipervariabilis régiójában található konzervált epitóp képezheti a betegségre való fogékonyság molekuláris alapját (31,51). Ez az RA-s betegek többségében jelen lévő közös nukleotid szekvencia az úgynevezett „shared epitóp” (SE), mely egy HLA-II osztályú polipeptid kulcsfontosságú struktúrelemét kódolja, ezáltal a HLA-molekulák antigén peptidekkel való kölcsönhatásában, és így a T-sejt aktivációban játszik fontos szerepet. A HLA-DRB1 lánc 70-74-es pozíciójában levő, emelkedett kockázatot jelentő szekvencia variánsai : a Gln70-Arg71-Arg72-Ala73-Ala74 QRRAA szekvenciát a DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0408, DRB1*0410, és DRB1*1402 allélokban írták le, a QKRAA motívum a DRB1*0401 és DRB1*0409 allélokban található meg, míg az RRRAA motívum a DRB1*1001 szubtypusra specifikus (30,31,51) (3.táblázat).

Szignifikáns etnikai és földrajzi eltérések tapasztalhatók a HLA-DRB1 allélok tekintetében a különböző RA-s betegpopulációk között. Az észak-európai RA-s betegek esetében például a DRB1*04 allélok (42,5) fordulnak elő nagy gyakorisággal, míg a mediterrán betegpopulációkra inkább a DRB1*01 és DRB1*10 allélok hordozása (52) a jellemző. Ráadásul az észak-amerikai őslakosok esetében a DRB1*14 hozható összefüggésbe az RA-ra való fogékonysággal (53). Egy magyar RA-s beteget vizsgáló tanulmány erős asszociációt mutatott a DRB1*0404 szubtypus és a betegség között (48).

Általánosságban elmondható, hogy a HLA-DR4 allél a kaukázusi RA-s betegek 75%-ában megtalálható, valamint az egészséges populáció 30%-ában is. A DRB1*04 allélok közül a DRB1*0401 és a DRB1*0404 hozható leginkább kapcsolatba a megnövekedett hajlammal a kaukázusi RA-s betegek esetében (30,42,54) míg a japán és a kínai betegek körében a DRB1*0405 allél fordul elő nagy gyakorisággal (55,56). A HLA-DRB1*01 allélok közül a DRB1*0101 szubtypust hozták összefüggésbe a betegséggel az Askenázi zsidó betegek körében (57), valamint számos különböző kaukázusi betegpopulációban is. (26,38,42,44,46,48,49) (3. táblázat).

Összefüggés lehet a SE pozitivitás és az anti-CCP antitest termelődése között. Egy vagy két SE allél jelenléte kapcsolatba hozható anti-CCP antitest pozitivitással, (58,59) ráadásul a betegség kimenetele kedvezőtlenebb lehet anti-CCP antitest termelődése és SE pozitivitás együttes előfordulása esetén (39,60,61). A HLA-DR3 molekula az anti-CCP negatív esetekhez kapcsolható (59). Nagyon kevés információnk van azonban arról, hogy van-e összefüggés a szérum anti-CCP antitest szintje és a HLA-DRB1 expresszió között.

1.5. Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE

1.5.1. Általános jellemzők

A szisztémás lupus erythromatosus (SLE) olyan autoimmun gyulladásoos megbetegedés, mely különböző szervrendszereket érinthet: bőrt, ízületeket, tüdőt, vesét és az agyat. A betegség jellemzője az immun diszreguláció, mely autoantitest termelődéshez (különösen dsDNS ellen), immunkomplex depozícióhoz, majd következményesen gyulladáshoz és szövetkárosodáshoz vezethet. Az SLE elsősorban a 20-50 év körüli nőket érinthet, a férfi:nő arány mintegy 1:9-hez, de ez a női dominancia a gyerekkorban és az időskorban manifesztálódó esetekben nem ennyire kifejezett (62).

A betegség etiológiája és patogenezise még nem ismert, de mind környezeti, mind genetikai faktorok szerepet játszanak kialakulásában. A genetikai faktorok szerepét alátámasztják azok az ikervizsgálatok, melyek tízszer nagyobb konkordancia arányt mutattak ki egypetéjű ikrek esetében kétpetéjű ikrekkel összehasonlítva. A konkordancia arány egypetéjű ikrek esetében 24-56%, kétpetéjű ikreknél és testvéreknél 2-5% (63,64). A családi prevalencia kb. 2,5-4% (SLE-s betegek elsőfokú rokonai esetén). Számos tanulmány született, melyek szerint bizonyos gének kapcsolatba hozhatók e szisztémás autoimmun betegség kialakulásával (65-71).

Az antifoszfolipid szindróma (APS) olyan autoimmun megbetegedés, mely során foszfolipid ellenes antitestek jelennek meg a beteg szérumban olyan klinikai tünetek mellett, mint a trombózis (artériás és vénás is), ismétlődő vetélés, haemolitikus anaemia és trombocytopenia (62). Az APS előfordulhat primer módon (PAPS), önálló betegségként, de gyakran társul más betegséghez is, leggyakrabban SLE-hez. Ilyen esetekben az APS általában évekkkel az SLE diagnózisa után jelentkezik, szekunder módon (SAPS), de olyan betegek is ismertek, akiknél a PAPS jelentkezett először, majd később alakult ki az SLE. (65) A lupus önmagában is egy heterogén fenotípusú betegség, de a klinikai kép még bonyolultabb, mikor a lupus és az APS egyszerre jelentkezik.

Tarr és mtsai (65) a klinikánk speciális szakrendelésén kezelt 3 SLE-s betegcsoport klinikai jellemzőit hasonlította össze. Az első csoportban tartozó betegeknél először APS-t diagnosztizáltak, majd évekkkel később alakult ki az SLE (PAPS+SLE), a második csoportba olyan SLE-s betegek tartoztak, akiknél APS nem alakult ki, a harmadik csoportba sorolt

betegeknél a betegség SLE-vel kezdődött, majd ehhez szövődött másodlagosan az APS (SLE+SAPS). Megállapításukat a 4. táblázat szemlélteti. (65)

4. táblázat Klinikai jellemzők a PAPS+SLE, az APS nélküli SLE és az SLE+SAPS csoportokban (Tarr és mtsai: PAPS as the forerunner of SLE. *Lupus*. 2007;16:324-8)

	PAPS+SLE 1.csoport (n = 26)	tisztán SLE 2.csoport (n = 26)	SLE+SAPS 3.csoport (n = 26)
Trombotikus tünetek			
Mélyvénás trombózis (n) (esetek száma)	15 a (20)	1 a,b (2)	14 b (15)
Pulmonális embólia (n)	3	0 c	5 c
Stroke (n)	6 d	0 d	3
Tranziens ischémias attack (TIA) (n)	10 e	3 e	8
APS kritérium tünetek			
Angina pectoris (n)	9 f	1 f,g	14 g
Miokardiális infarktus (n)	1	1	2
Szülészeti szövődmények száma (n) (összes szülészeti esemény)	12 h,i (33/25)	1 h (1/24)	4 i (17/25)
Lupus nephritis			
WHO III + IV (n)	2 j,k	11 j	7 k
Aktív gyulladásos periódusok*			
Összesen (n)	36	75	68
Terápia			
Cyclophosphamide (n)	71	141	10
Methylprednisolone (mg/n)	6.84±3.54 m,n	9.85±4.31 m	9.23±3.45 n

A kis betűk (a-n) azt az adott két értéket jelölik meg, melyek között szignifikáns különbség volt kintatható. $p < 0.05$ c,e,i,l,m,n; $p < 0.005$ a,b,d,f,g,h,j,k

A szerzők munkájuk során eltérést találtak a három betegcsoport fenotípusában: a primer és szekunder APS-s betegekben gyakoribbak voltak a trombotikus események, mint a csak lupusos betegekben, bár a trombotikus tünetek és szülészeti szövődmények gyakoribb előfordulása az APS-val szövődött betegekben nem meglepő. A PAPS+SLE és SLE+SAPS csoportokban azonos gyakorisággal fordultak elő a trombotikus komplikációk, viszont a PAPS+SLE-s csoportban szignifikánsabb magasabb volt a szülészeti szövődmények jelenléte az SLE+SAPS csoporthoz viszonyítva. A SLE+SAPS csoportban az alkalmazott antikoaguláns és trombocita aggregáció gátló kezelés ellenére magasabb volt a trombotikus

események és szülészeti szövődmények gyakorisága az APS-sel nem szövődött SLE-s csoporthoz képest. Az ISN/RPS III-IV típusú glomerulonefritisz gyakorisága, és az aktív gyulladásos periódusok száma a tisztán SLE-s csoportban volt a legnagyobb, valamint nagyobb dózisú kortikoszteroidot igényeltek, és gyakrabban volt szükségük ciklofoszfamid kezelésre, míg a szekunder APS-ben szenvedő betegek átmenetet képeznek ezen paraméterek tekintetében a tisztán SLE-s és a PAPS+SLE-s betegek között.

1.5.2. Különböző MHC gének előfordulása a három betegcsoportban

Mind a lupus, mind az APS olyan multifaktoriális eredetű betegség, mely genetikailag meghatározott személyekben alakul ki. Az MHC-II osztály tagjai közül számos HLA-DR és HLA-DQ molekulát összefüggésbe hoztak ezen betegségekkel (66-73).

Először a HLA-B8 lókuszt (78) szerepét mutatták ki az SLE kialakulásában, majd később megállapították, hogy a HLA-DR2 és HLA-DR3 molekulákat kódoló DRB1*15 és DRB1*03 allélok hozhatók leginkább kapcsolatba az SLE kialakulásával, ezen allélok jelenléte növelheti leginkább a betegség kialakulásának esélyét bizonyos populációkban. (68-73). Egy körülbelül háromszáz családot vizsgáló tanulmány három MHC-II osztályba tartozó haplotípust hozott az SLE-vel összefüggésbe: a DRB1*1501(DR2)/DQB1*0602, DRB1*0301(DR3)/DQB1*0201 és a DRB1*0801(DR8)/DQB1*0402 haplotípusokat, és ez utóbbi volt a legkevésbé gyakori a három nagy kockázatot jelentő allélcsoport közül (64). Az első két haplotípusról számos kaukázusi populációban (65-67) kimutatták, hogy növeli az SLE kialakulásának kockázatát. Gyakori előfordulásukat magyar SLE-s betegek esetében is megerősítették (70).

Számos tanulmány utal az APS és az antifoszfolipid (aPL) antitestek esetében is genetikai faktorok, különösen az MHC komplex szerepére. Ellentmondásosak az irodalmi adatok a tekintetben, hogy maga a betegség, vagy az aPL antitestek állnak-e kapcsolatban bizonyos HLA allélok eltérő gyakoriságával. Az APS a DRB1*04(DR4), DRB1*07(DR7), DRw53 valamint DQ allélok közül a DQB1*0301(DQ7) és DQB1*0302(DQ8) allélekkel hozható leginkább kapcsolatba (összefoglalva a 73. cikkben), valamint ezen allélok gyakori előfordulását figyelték meg bizonyos aPL antitestek előfordulása esetén is (75-77). Az anti-kardiolipin antitest (aCL) jelenléte leginkább a DRB1*04, DRB1*07, DRw53, DQA1*0201,

DQA1*0301 és DQB1*0302 allélokkal hozható összefüggésbe (75-77), míg a β 2-glikoprotein I. ellenes antitest (β 2-GPI) esetében a DRB1*04/DQB1*0302 valamint a DRB1*13/DQB1*0604/5/6/7/9 haplotípusokkal mutattak ki pozitív asszociációt mind kaukázusi, mind afro-amerikai betegek esetében (71, 74,75).

2. Célkitűzések

2.1.Coeliakia

Mivel azoknál a személyeknél, akiknél sem a HLA-DQ2 sem a HLA-DQ8 molekula nincs jelen, a betegség kialakulásának esélye elhanyagolható, a HLA-DQ tipizálásnak klinikai relevanciája lehet a betegek családtagjainak kockázatának megítélésében, valamint differenciáldiagnosztikai jelentősége lehet bizonytalan diagnózisú betegek esetében más betegség által okozott boholykárosodás fennállásakor. Habár a coeliakia diagnózisának „gold standardja” ma is a vékonybél biopszia, ennek a módszernek számos buktatója létezik. Az olyan jelenségek, mint az intraepitheliális limfocitaszám emelkedés, vagy a villusok megrövidülése nem coeliakia specifikus elváltozások, más betegségekben, például egyes táplálékallergiákban, valamint posztinfekciós károsodások esetében is tapasztalhatók. Mindezek ismeretében célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a HLA-tipizálás jelentőségét olyan esetekben, ahol a betegség diagnózisát korábban kizárólag szövettani eredmények alapján állították fel, EMA vagy transzglutamináz ellenes antitest jelenlétének ismerete nélkül.

2.2.Rheumatoid arthritis

I. vizsgálat:

Az RA kialakulására való hajlam, valamint a betegség kimenetele bizonyos HLA-DR allélokkal összefüggésbe hozható, de ezek az allélok eltérőek a különböző etnikai csoportok és földrajzi területek esetében. A kaukázusi RA-s betegcsoportokban a HLA-DRB1*0101, DRB1*0102 allélok, valamint a HLA-DRB1*0401 és DRB1*0404 allélok hozhatók leginkább összefüggésbe a betegség kialakulásával. Célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a különböző HLA-DR1 és HLA-DR4 szubtípusok gyakoriságát a DEOEC Reumatológiai Tanszék szakrendelésén kezelt RA-s betegekben egészséges kontroll személyekhez hasonlítva, és megvizsgáljuk, hogy ezen allélok jelenléte az RA diagnosztikus markere lehet-e.

II. vizsgálat:

Mivel tudjuk, hogy egy vagy két „shared epitóp” jelenléte és az anti-CCP antitest pozitivitás között összefüggést lehet találni, azonban kevés információnk van arról, hogy az adott HLA-DRB1 allélok expressziója és az anti-CCP antitest szintje között van-e valamilyen kapcsolat, célul tűztük ki ezen összefüggések megfigyelését. Ez az első tanulmány, mely magyar betegeken vizsgálja a shared epitópok és anti-CCP antitest közötti lehetséges összefüggéseket.

2.3. Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE

Munkám során a Tarr és mtsai által a klinikánk szakrendelésén kezelt 3 lupusos betegcsoportot (PAPS+SLE, SLE+SAPS és „tisztán” SLE) vizsgáltam tovább. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a klinikai jellemzőkben talált eltérések, miszerint a primer- és szekunder APS-s betegekben gyakoriak voltak a thromboticus események és kisebb volt a gyulladási aktivitás, mint a csak lupusos betegekben, valamint vetélés leggyakrabban a primer APS-ként induló esetekben fordult elő, magyarázhatók-e genetikai különbségekkel? Vajon a betegségek MHC-II profiljában talált különbségek megerősítik-e azt a hipotézist, hogy a PAPS az SLE két önálló betegségként társul, vagy a PAPS a lupus egyik manifesztációja?

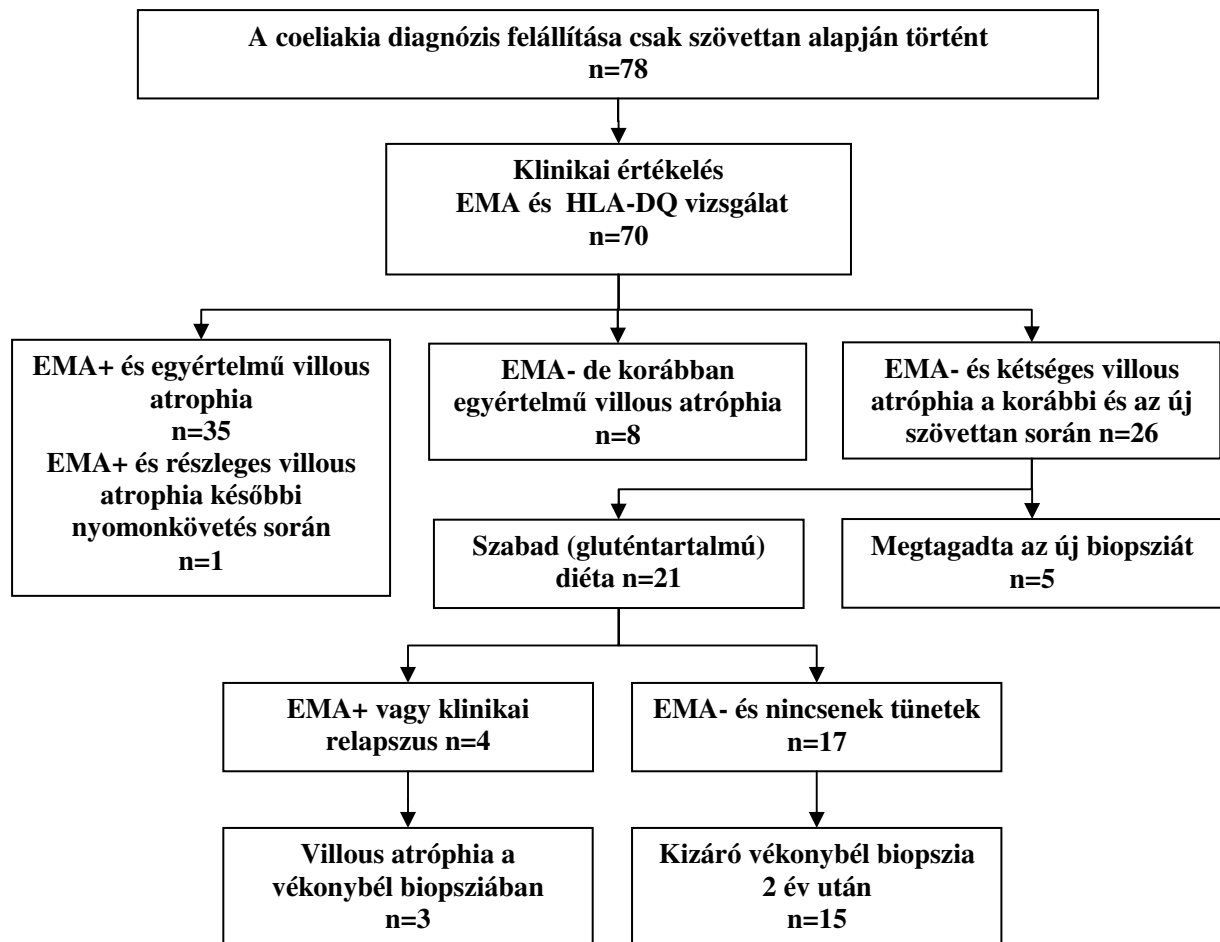
3. Betegek és módszerek

3.1. Coeliakia vizsgálatba bevont betegek

A Debreceni Egyetem Gyermekklinikájának betegnyilvántartásából olyan 2002 előtt coeliákiásként diagnosztizált betegeket választottunk ki, akik esetében a diagnózis felállításakor csak szövettani vizsgálat történt, EMA vagy szöveti transzglutamináz-ellenes antitest meghatározást nem. Összesen 78 beteg felelt meg a kritériumoknak, közülük 70-en (3-31 év közöttiek, átlagéletkor: 13 év) egyeztek bele a klinikai vizsgálatba. A betegek diagnózisa átlagosan 3 éves koruk körül lett felállítva (tartomány: 1-28 év), valamint 2-25 éve gluténmentes diétát folytattak. Az eredeti (kezdeti) patológiás leleteket, vagy ahol hozzáférhető volt, az eredeti biopszia metszeteket egy pathológus kolléga újra áttekintette, és véleményezte. A szérum EMA és tTG ellenes antitestek meghatározása, valamint a HLA-típusozás vérből történt.

A diagnózis felállítása után bevezetett diéta hosszát és szigorúságát, valamint a jelenlegi gluténbevitelt rögzítettük. A jelenleg fenntartott diétákat az alábbiak szerint csoportosítottuk: szigorú gluténmentes diéta, nem szigorú gluténmentes diéta és szabad gluténfogyasztás. A résztvevőket saját illetve szüleik elmondása alapján soroltuk be a csoportokba, valamint jelenlegi EMA/anti-tTG eredményeik alapján.

A tünetekkel vagy pozitív szerológiai eredménnyel rendelkezőket, valamint akiknek a régi szövettani biopsziás metszetük elégtelen, vagy nem a diagnózisnak megfelelő volt, újabb vékonybél szövettani vizsgálatnak vetettük alá. Azoknak, akiknél aktív coeliákiának megfelelő szövettani képet kaptunk, szigorú gluténmentes diétát javasoltunk, és nyomon követtük klinikai állapotuk, valamint EMA és tTG ellenes ellenanyag szintjük alakulását. Azokban az esetekben, ha a kezdeti diagnózis bizonytalan volt, vagy a vékonybél biopszia eredménye nem támasztotta alá a coeliakia meglétét, szabad gluténbevitelt javasoltunk a pácienseknek. Szérum EMA és anti-tTG ellenanyag vizsgálatokat 3-6 havonta végeztünk esetükben. Ha az antitest eredményük pozitívvá vált, vagy tünetek megjelenését észleltük, új biopsziát végeztünk. Ha sem antitestek, sem tünetek nem jelentek meg, a biopsziát a szabad gluténfogyasztás megkezdése után 2 évvel végeztük el, a betegség kizárásának céljából párhuzamosan az ESPGAN (European Society of Paediatric Gastroenterology) 1969-ben Interlakenben megfogalmazott eredeti diagnosztikus kritériumaival (23), melyek a coeliakia diagnózisát szövettani eredményekre alapozták. A vizsgálat folyamatát az 5. ábra mutatja.



5. ábra A 70 lisztérzékeny betegen elvégzett klinikai értékelés, EMA és HLA-DQ vizsgálat folyamatábrája. Az endomysium ellenes antitest (EMA) pozitív betegek transzglutamináz ellenes antitestre nézve is pozitívak voltak.

A tanulmány során 40 (34 nő, 6 férfi), a betegekkel azonos etnikai eredetű egészséges kontroll személy HLA-DQ vizsgálatát is elvégeztük. Ők a kórház dolgozói, valamint a betegekkel nem rokon látogatók közül kerültek ki.

3.2. Rheumatoid arthritis vizsgálatokba bevont betegek

I. vizsgálat:

A DEOEC Belgyógyászati Intézet Reumatológiai Tanszékén kezelt 83 RA-ben szenvedő magyar beteget (70 nő, 13 férfi) vontuk be a vizsgálatba. A betegek mindegyike megfelelt az RA 1987-es, módosított klasszifikációs kritériumainak (American College of Rheumatology, ACR) (79). A betegek átlagéletkora 50 ± 15 (SD) év volt (17-82 év között). A betegség átlagos fennállási ideje a vizsgálat idején 6 ± 4 év volt (0,5-től 22 évig). Emellett 55 egészséges kontroll személytől (47 nő, 8 férfi) szintén vérmintát vettünk, akik klinikai dolgozók, vagy a betegekkel nem rokon látogatók közül kikerült egészséges önkéntesek voltak. Beleegyezési nyilatkozatot tett az összes RA-s beteg, és a helyi etikai bizottság hozzájárulását is megkaptuk a vizsgálatokhoz. A vizsgálatba bevont betegek és kontroll személyek adatait az 5. táblázatban tüntettem fel.

5. táblázat: A vizsgálatban résztvevő RA-s betegek és egészséges kontroll személyek adatai

I. vizsgálat	83 RA-s beteg	55 egészséges kontroll
nő:férfi	70 :13	47: 8
Átlagéletkor a vizsgálat idején:	50 ± 15 (17-82 év között)	42 ± 12 (23-62 év között)
A betegség átlagos fennállási ideje a vizsgálat idején:	6 ± 4 év (tartomány: 0,5-22)	nem értelmezhető

A vizsgált két csoportból HLA-DRB1*01 szubtypusok meghatározását 27 RA-s beteg és 10 kontroll személy esetében tudtuk elvégezni, mivel ők hordozták a DRB1*01 allélt. A DRB1*04 allél szubtypusainak meghatározása 26 DRB1*04 pozitív RA-s betegen, és 6 DRB1*04 pozitív kontroll személyen történt.

II. vizsgálat:

Ebbe a tanulmányba 53 RA-s beteget (44 nő és 9 férfi, mind kaukázusi) vontunk be, akik közül mindenki megfelelt az ACR klasszifikációs kritériumainak. A betegek átlagéletkora 50 ± 15 év volt (17-82 év közöttiek). A betegség fennállásának ideje átlagosan 6 ± 4 év volt a vizsgálat idején (tartomány: 0,5-22). Beleegyezési nyilatkozatot tett az összes RA-s beteg, és

a helyi etikai bizottság hozzájárulását is megkaptuk a vizsgálatokhoz. A vizsgálatba bevont betegek adatait a 6. táblázatban tüntettem fel.

6. táblázat: A vizsgálatban résztvevő RA-s betegek adatai

II. vizsgálat	53 RA-s beteg
nő:férfi	44 : 9
Átlagéletkor a vizsgálat idején:	50±15 év (17-82 év között)
A betegség átlagos fennállási ideje a vizsgálat idején:	6±4 év (tartomány: 0,5-22)

3.3. SLE vizsgálatokba bevont betegek

A DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinika SLE-s betegeit gondozó munkacsoport (Tarr és mtsai) által vizsgált 3, SLE-ben szenvedő betegcsoportját vontuk bele a vizsgálatainkba. Összesen 362 SLE-vel kezelt betegük közül 110 esetben definitív APS diagnózis is felállítható volt mind a saporoi, mind a Sydney-i kritériumok alapján. Közülük 26 esetben primer antifoszfolipid szindrómával indult a klinikai kórlefolyás, és csak évekkel később (átlagosan 5,5 év; tartomány: 1-29 év) volt igazolható SLE (PAPS+SLE csoport), míg 84 betegnél SLE-vel kezdődött a betegség, és szekunder módon szövődött APS. Ez utóbbi csoportból random módon kiválasztottak 26, az első csoporttal korban, nemben, betegség fennállási időben egyező beteget. (SLE+SAPS csoport).

Az APS-ban nem szenvedő SLE-s betegekből hasonló módon kiválasztottak korban, nemben és betegség fennállási időben, az előző csoportokhoz illesztett 26 beteget („tisztán” SLE). Esetükben definitív antifoszfolipid szindróma diagnózis nem volt felállítható a saporoi kritériumok alapján, tehát kórtörténetükben sem az SLE diagnózisuk felállítása óta (legalább 5 év), sem korábban nem szerepelt trombótikus történet és antifoszfolipid antitest pozitívitás együttes jelenléte. A vizsgált betegcsoportok jellemzőit a 7. táblázatban foglaltam össze.

A fenti betegcsoportokból a HLA genotípusok meghatározását a PAPS+SLE csoportból 15 (15 nő), a SAPS+SLE csoportból 22 (20 nő, 2 férfi), a tisztán SLE-s csoportból pedig 26 (26 nő) személyen sikerült elvégezni.

7. táblázat: A három vizsgált betegcsoport demográfiai jellemzői

	PAPS+SLE n=15	SLE n=26	SLE+SAPS n=22
nő:férfi	15:0	25:1	20:2
követési idő évben (medián, min-max)	9,5 (3-29)	10 (5-27)	33 (15-63)
életkor az SLE dg-kor (medián, min-max)	33 (15-58)	23,5 (11-48)	33(15-63)
életkor az APS dg-kor (medián, min-max)	24,5(10-58)	nem értelmezhető	41(17-71)
a dg-k közt eltelt idő	5,5 (1-29)	nem értelmezhető	3 (0-20)

Munkám során a már korábban említett, kissé kibővített (57 fő, 47 nő, 10 férfi átlagéletkor: 34 (27-63)) kontroll csoportunk HLA-DR és HLA-DQ vizsgálatának eredményét is felhasználtam.

3.4. A HLA-DR és HLA-DQ genotípus meghatározása

A CD diagnózissal kezelt betegek esetében a HLA-DQ, RA-s betegek esetében a HLA-DR, SLE-s betegeknél pedig mind a HLA-DR mind a HLA-DQ genotípusok meghatározását elvégeztem.

3.4.1. A genomiális DNS kivonása

A betegektől és kontroll személyektől származó etil-diamin-tetraacetát (EDTA) alvadásgátlóval kezelt vérből centrifugálás után a fehérvérsejt frakciót eltávolítjuk (buffy coat), és ezt használjuk genomiális DNS kinyerésére QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) felhasználásával, követve a használati utasítás instrukcióit. A 4000x g fordulatszámom 10 percig centrifugált vérből 200 µl buffy coatot szívunk le. Ezután 20 µl proteázt és 200 µl Lízis puffert (AL) adunk hozzá, 15s-ig vortexeljük, majd 10 percig

56 °C-on inkubáljuk. A mintához ezután 400 µl 96%-os ethanolt adunk, majd 15s-ig vortexszel kevertetjük. A mintát a kitben biztosított szűrőre öntjük, majd 12000x g-fordulatszámon 3 percig centrifugáljuk. A szűrőn átfolyó terméket eldobjuk. A mintát mosópufferrel kétszer mossuk (400 - 400 µl), centrifugáljuk. A szűrőt steril Eppendorf csőbe helyezzük, felületére 100 µl eluáló puffert (AE) teszünk, 10 percig állni hagyjuk, majd lecentrifugáljuk (2 perc, 12000x g). Az átfolyó tartalmazza a kivont DNS-t. A mintából 20x-os hígítást készítünk (5µl DNS+ 95µl desztillált víz), majd spektrofotométer segítségével megmérjük a koncentrációt és tisztaságot. GeneQuant Pro RNS/DNS fotométeren desztillált vizes vakkal szemben, 260 nm-en mért abszorbanciából meghatározhatjuk a DNS koncentrációját (µg/µl), valamint a A_{260}/A_{280} arányból a DNS tisztaságát. A DNS tisztasága 1,7-1,9 A_{260}/A_{280} arány esetén elfogadható. A kinyert DNS-t tartalmazó Eppendorf csőre rávezetjük a minta génbanki kódszámát.

3.4.2. Polimeráz láncreakció

A HLA-DR és HLA-DQ haplotípusok DNS szintű meghatározását szekvencia-specifikus primerek segítségével (Olerup-SSP (78)) alacsony felbontású kittel (DR Low resolution, DQ Low resolution, Genovision, Oslo, Norway), PCR technikával végeztük. Azokban az esetekben, ahol a pontos szubtipusok ismeretére is szükség volt, a mintát szubtipizálásnak vetettük alá (DRB1*01, DRB1*04, DQB1*02, DQB1*03 szubtipizálások). A kitekben található adott számú PCR csövekből álló tesztek liofilizált formában tartalmazzák az allél vagy allélcsoport specifikus primerpárokat, valamint 1-1 belső pozitív kontroll primerpárt. Az alacsony felbontású tesztek utolsó csövében negatív kontroll található. A kit biztosítja még a reakcióhoz szükséges további összetevőket tartalmazó PCR Master Mixet (nukleotidok, PCR puffer, glicerin, krezolvörös), Taq polimerázt viszont nem tartalmaz. Minden vizsgálatot a gyártó által mellékelte használati utasítás szerint végeztünk külön rekombináns Taq DNS polimeráz enzim (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil, 5u/µl) felhasználásával. A DNS amplifikációt Hybaid „PCR express thermal cycler” típusú berendezéssel végeztük.

A következő PCR protokollokat használtuk:

Alacsony felbontású HLA-DQ vizsgálat (HLA-DQ Low resolution): A genotipizálás a GenoVision cég 8 primerpárt tartalmazó Olerup SSP DQ low resolution kitjével történt. Egy eppendorf csőbe összemérjük a következő reakcióelegyet: 20 µl DNS, 49,2 µl desztillált víz, 30 µl PCR Master Mix, 0,8 µl Taq polimeráz. A jól összerázott keverékből 10-10 µl-t kimérünk az erre a célra előkészített, addig fagyasztva tárolt 8 db csőből álló lezárt PCR csősorba, melyek már tartalmazzák a liofilizált primereket. A csöveket jól lezárjuk az erre a célra alkalmas kupakkal, majd a PCR készülékbe helyezzük.

DQB1*02 szubtipizálás: A genotipizálás a GenoVision cég 6 primerpárt tartalmazó Olerup SSP DQB1*02 szubtipizáló kitjével történt. Eppendorf csőbe összemérjük a következő reakcióelegyet: 12 µl DNS, 18 µl PCR Master Mix, 29.5 µl desztillált víz, 0,5 µl Taq polimeráz. A jól összerázott keverékből 10-10 µl-t kimérünk az erre a célra előkészített, addig fagyasztva tárolt 8 db csőből álló lezárt PCR csősor 1-6 csővébe, melyek már tartalmazzák a liofilizált primereket. A 7.-8. cső üres. A csöveket jól lezárjuk az erre a célra alkalmas kupakkal, majd a PCR készülékbe helyezzük.

DQB1*03 szubtipizálás: A genotipizálás a GenoVision cég 16 primerpárt tartalmazó Olerup SSP DQB1*03 szubtipizáló kitjével történt. Eppendorf csőbe összemérjük a következő reakcióelegyet: 38 µl DNS, 57 µl PCR Master Mix, 93.5 µl desztillált víz, 1.5 µl Taq polimeráz. A jól összerázott keverékből 10-10 µl-t kimérünk az erre a célra előkészített, addig fagyasztva tárolt 16 db csőből álló lezárt PCR csősor minden részébe. Ezekben vannak a gyárilag előre kimért, liofilizált primerek. A csöveket jól lezárjuk az erre a célra alkalmas kupakkal, majd a PCR készülékbe helyezzük.

HLA-DR alacsony felbontású vizsgálat (HLA-DR Low resolution): A genotipizálás a GenoVision cég 24 primerpárt tartalmazó Olerup SSP DR Low resolution kitjével történt. Eppendorf csőbe összemérjük a következő reakcióelegyet: 54 µl DNS, 132,8 µl desztillált víz, 84 µl PCR Master Mix, 2,2 µl Taq polimeráz. A jól összerázott keverékből 10-10 µl-t kimérünk az erre a célra előkészített, addig fagyasztva tárolt 24 db csőből álló lezárt PCR csősor minden részébe. Ezekben vannak a gyárilag előre kimért, liofilizált primerek. A csöveket jól lezárjuk az erre a célra alkalmas kupakkal, majd a PCR készülékbe helyezzük.

HLA-DR1 szubtipizálás: A genotipizálás a GenoVision cég 8 primerpárt tartalmazó Olerup SSP DRB1*01 szubtipizáló kitjével történt. Eppendorf csőbe összemérjük a következő reakcióelegyet: 20 µl DNS, 49,2 µl desztillált víz, 30 µl PCR Master Mix, 0,8 µl Taq polimeráz). A jól összerázott keverékből 10-10 µl-t kimérünk az erre a célra előkészített, addig fagyasztva tárolt 8 db csőből álló lezárt PCR csősor minden részébe. Ezekben vannak a gyárilag előre kimért, liofilizált primerek. A csöveket jól lezárjuk az erre a célra alkalmas kupakokkal, majd a PCR készülékbe helyezzük.

HLA-DR4 szubtipizálás: A genotipizálás a GenoVision cég 32 primerpárt tartalmazó Olerup SSP DRB1*04 szubtipizáló kitjével történt. Eppendorf csőbe összemérjük a következő reakcióelegyet: 76 µl DNS, 187 µl desztillált víz, 114 µl PCR Master Mix, 3 µl Taq polimeráz. A jól összerázott keverékből 10-10 µl-t kimérünk az erre a célra előkészített, addig fagyasztva tárolt 8 db csőből álló lezárt PCR csősor minden részébe. Ezekben vannak a gyárilag előre kimért, liofilizált primerek. A csöveket jól lezárjuk az erre a célra alkalmas kupakokkal, majd a PCR készülékbe helyezzük.

A DNS koncentrációt mind a 6 protokoll esetében úgy állítottuk be, hogy az 10-30 ng/µl közé essen. A PCR Master Mix összetétele a végső koncentrációkkal: nukleotidok (dNTP; 200 µM), PCR puffer (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.001% W/v zselatin), 5% glicerol (glicerin), krezolvörös (100 µl/ml).

A PCR reakció ciklusainak paraméterei minden esetben:

1. 1 ciklus	94 °C	2 perc	denaturáció
2. 10 ciklus	94 °C	10 másodperc	denaturáció
	65 °C	60 másodperc	primer kötődés és polimerizáció
3. 20 ciklus	94 °C	10 másodperc	denaturáció
	61 °C	50 másodperc	primer kötődés
	72 °C	30 másodperc	polimerizáció

3.4.3. Agaróz gélelektroforézis, kiértékelés

A HLA genotípusok meghatározása a 2%-os agaróz gélelektroforézis során kapott PCR mintázat alapján történt. A DNS sávok detektálása SYBR Green I. DNS festékkel (Fluka)

jelölve, Alpha Imager MultiImage Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leonardo, CA 94577) UV transzilluminátor segítségével történt.

A 2 % (w/v)-os agaróz gél elkészítése: 1,8 g agarózt (SIGMA) feloldunk 90 ml 0,5 x TBE pufferben fűthető mágneses keverőn, vagy mikrohullámú sütőben. Miután feloldódott, 60°C-ra hűtve 6,7 ul SYBR Green I. festéket adunk a gélhez, elkeverjük, majd a futtató tálcába kiöntjük. A kihűlt gél a futtatókádba helyezük, felöntjük 0,5 x TBE pufferrel, majd a minták felvitele után indítjuk a futtatást.

Az elektroforézist 180 V feszültségen 35 percig végezzük. A megfuttatott gél UV fényben lefotózzuk az Alpha Imager MultiImage Light Cabinet készülék segítségével, majd a kapott gélképet a gyártó által mellékelte táblázat alapján kiértékeljük.

Ha az alacsony felbontású vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy a beteg valamelyik DQB1*02 vagy DQB1*03 allélt hordozza coeliákiás vagy SLE-s betegek esetében, vagy DRB1*01 vagy DRB1*04 allélt RA-ban szenvedő betegeknél, akkor mintáját szubtipizálásnak vetettük alá.

3.5. Egyéb vizsgálatok

3.5.1. EMA és anti-TG antitest meghatározások coeliákiás betegekben

A vizsgálatok a III. sz. Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumában rutin jelleggel történtek.

Az EMA IgA és IgG alosztályok kimutatása szérumból indirekt immunfluoreszcens módszerrel történt humán köldökzsínort használva szubsztrátként. (82) A szérum kezdő hígítása 1: 10 volt foszfáttal pufferelt sóoldatban. Az EMA-t majom nyelőcsövön is ellenőrizték 1:2,5 szérumhígításban (28).

Az anti-tTG antitest mérések E. coliban expresszált (83) humán rekombináns antigén felhasználásával, ELISA módszerrel történtek a 3. referenciában leírt protokollt követve.

3.5.2. Szöveti vizsgálat coeliákiás betegek esetében

A szövettani metszetek jól orientált részeiben egy patológus kolléga megvizsgálta a boholy magasság /kripta mélység arányát, valamint meghatározta az intraepitheliális

limfociták számát. A szövettani értékelésnél coeliakiával kompatibilisnek tekintettük azokat a mintákat, ahol a boholy/crypta arány <1 volt (parciális II, III, szubtotális és totális boholyatrophia)(20,22,24,25). Csak a gluténfogyasztás mellett végzett szövettani vizsgálatok eredményeit vettük értékelhetőnek.

3.5.3. RA laboratóriumi markereinek vizsgálata

A szérum IgM RF meghatározás quantitív nephelometriával történt (Cobas Mira Plus, Roche, Basel, Svájc), RF reagenseket használva (Dialab, Budapest, Magyarország). A RF szint > 50 U/ml értéknél számított magasnak. Az anti-CCP antitestet második generációs Immunoscan-RA CCP2 ELISA teszttel mutattuk ki a szérumokból (Euro Diagnostica, Arnhem, Hollandia). A vizsgálat a gyártó utasításai szerint történt. A 25 U/ml feletti koncentrációt vettük pozitívnak.

3.5.4. Statisztikai analízis

RA I. vizsgálat:

Az RA-s betegekben a különböző HLA-DR allélok előfordulását az egészséges személyekben találtakhoz viszonyítottuk. A genotípusok Hardy-Weinberg equilibriumát χ^2 goodness-of-fit teszt segítségével vizsgáltuk. Az allélgyakoriságok összehasonlítását χ^2 próba segítségével, Yates Korreláció vagy Fischer féle egzakt teszt használatával végeztük, SPSS 10,0 szoftverrel (SPSS, Chicago, IL, USA). Két adatcsoport között akkor tekintettük szignifikánsnak a különbséget, ha a p érték 0,05-nél kisebb volt.

RA II. vizsgálat:

A statisztikai analízist szintén SPSS10.0 szoftver segítségével végeztük. Két betegcsoport közötti különbség detektálásához χ^2 próbát használtunk. Mediánt és 0,25/0,75 quartilist alkalmaztunk, mikor szükséges volt. A klinikai adatok vizsgálatához Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Két adatcsoport között akkor tekintettük szignifikánsnak a különbséget, ha a p érték 0,05-nél kisebb volt.

Anti-foszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE-s betegek vizsgálata:

A HLA-DR és HLA-DQ allélok gyakoriságának összehasonlítását a 4 vizsgált csoportban Fischer exact teszttel végeztük, SPSS 11.0.0. statisztikai szoftver felhasználásával. Bármely két adatcsoport között akkor tekintettük szignifikánsnak az eltérést, ha a p-érték kisebb volt, mint 0,05.

4. Eredmények

4.1.Coeliakia

A vizsgálat idején a 70 betegből mindössze 31 (44,3%) tartotta a szigorú gluténmentes diétát. Ezen betegek szérumában EMA és TG ellenes antitestet nem lehetett kimutatni, és a szérum total IgA szintjük is normális volt. A maradék 39 személyből 29 részben, 10 pedig egyáltalán nem tartotta a diétát. A 39 betegből 27 (69,2%) szérumában mind az EMA, mind az TG ellenes antitest detektálható volt, de egyiküknél sem jelentek meg klinikai tünetek. A kezdeti diagnózis felállításakor regisztrált klinikai tünetek nem különböztek az EMA/anti-TG pozitív és negatív betegek esetében (8. táblázat).

8. táblázat: Klinikai tünetek a diagnózis felállításakor

Tünetek	EMA vagy anti-TG pozitív betegek (n=40*), n (%)	EMA vagy anti-TG pozitív lelettel nem rendelkező betegek (n=30), n (%)
Felszívódási zavar	27 (67,5)	24 (80)
Puffadás	20 (50,0)	11 (36,7)
Hasmenés	17 (42,5)	15 (50,0)
Növekedésbeni elmaradás	15(37,5)	14 (46,7)
Anaemia	11 (27,5)	7 (23,3)
Diabetes mellitus	1 (2,5)	0 (0)

* 27 beteg endomysium ellenes antitest (EMA) és transzglutamináz ellenes antitest (anti-TG) pozitívnak mutatkozott felülvizsgálatkor, 9 betegnek volt EMA pozitívítás a kórtörténetében, míg 4 betegnél EMA és TG ellenes antitest pozitívítás a követés során alakult ki.

Mind a 27 EMA pozitív páciens hordozta a DQ2 vagy DQ8 heterodimert, valamint 9 további beteg is, akik jelenleg ugyan EMA negatívak voltak, de a diagnózis felállítása után EMA eredményük valamikor pozitívnak adódott. (9. táblázat) Mivel a transzglutamináz-

ellenes antitest vizsgálatot csak 2000 után vezették be a klinikai gyakorlatba, nem minden EMA + beteg rendelkezett TG ellenes antitest eredménnyel. Természetesen azok közül, akik rendelkeztek pozitív TG ellenes antitest eredménnyel, mindenki esetében detektálható volt az EMA is.

Az EMA vagy TG ellenes antitest pozitív lelettel nem rendelkező betegek 56%-a szintén hordozta a DQ2 vagy a DQ8 heterodimert. A betegek közül 15 sem a DQ2, sem a DQ8 allélt nem hordozta. Az egészséges kontroll csoport tagjainak 23%-ában fordult elő a DQ2 vagy a DQ8 allél, igazolva, hogy ezen allélok jelenléte önmagában nem bizonyítja a betegség fennállását (nincs a táblázatban jelölve).

9. táblázat. HLA-DQ2/DQ8 pozitivitás a felülvizsgálat idején endomysium-ellenes antitest (EMA) vagy szöveti-transzglutamináz ellenes antitest (antiTG) pozitivitást mutató illetve negatív lelettel rendelkező betegek esetében

	EMA vagy anti TG + n=36 (%)	EMA és antiTG- n=34 (%)	Összesen n=70 (%)
DQ2 vagy DQ8 +	36 (100)	19 (55,8)	55 (78,6)
DQ2 és DQ8 -	0	15 (44,2)	15 (21,4)

A 65 személytől származó összesen 79 szövettani minta, továbbá 15 minta nélküli részletes patológiai leírás állt rendelkezésünkre az újravéleményezéshez (10. táblázat). A minták jelentős része (kb. 30%) technikai problémák miatt (nem megfelelő orientáció vagy az anyag mechanikai károsodottsága) nem volt felhasználható. A HLA-DQ vizsgálatokkal egy időben így 32 új biopszia vizsgálat is elvégzésre került. Súlyos boholyatrophia, megnövekedett intraepitéliális limfocita szám és crypta hiperplasia a 36 EMA+ lelettel rendelkező, DQ2 vagy DQ8 pozitív betegből 35-nél (97%) fordult elő különböző mértékben, míg a 19 személyből, aki DQ2/DQ8 pozitív volt, de EMA státusza ismeretlen volt a diéta megkezdése előtt, csak 8-nál (42%). (Bár a szigorú diéta alatt végzett szövettani vizsgálat negatív eredménye nem használható a betegség kizárására.) A 15 DQ2 és DQ8 negatív páciens esetében csak enyhe szövettani eltéréseket tapasztaltunk, súlyos boholyatróphia nélkül.

Eredeti patológiai leírás	Eredeti patológiai megállapítás	Eredeti klinikai értékelés	Második szakvélemény a revízió után	Végző diagnózis a követés után ¹	Mintaszám	HLA-DQ2 vagy DQ8+
súlyos boholyatrophia	coeliakia	coeliakia	súlyos boholy atrophia krupta hiperplasiával jól orientált mintán (Marsh IIIb-III.c)	coeliakia	41	41
súlyos vagy részleges boholyatrophia	coeliakia	coeliakia	részleges villous atrophia krupta hiperplasiával (Marsh IIIa)	coeliakia	6	6
súlyos vagy részleges boholyatrophia	coeliakia	coeliakia	szegényes orientáció	coeliakia	4	4
súlyos vagy részleges boholyatrophia	coeliakia	coeliakia	szegényes orientáció ²	nem coeliakia	10	5
kisebb elváltozások a villusokban vagy az epitheliumon	coeliakia	coeliakia	normál	nem coeliakia	7	1
normál villous szerkezet	normál	sztereomikroszkópos vizsgálat alapján coeliakia	normál	nem coeliakia	4	3
gyomor	gyomor	sztereomikroszkópos vizsgálat alapján coeliakia	gyomor	nem coeliakia	3	0
elégtelen minta	diagnózis felállítására alkalmatlan	sztereomikroszkópos vizsgálat vagy tünetek alapján coeliakia	diagnózis felállítására alkalmatlan	nem coeliakia	3	0
elégtelen minta	diagnózis felállítására alkalmatlan	klinikai leletek alapján coeliakia	diagnózis felállítására alkalmatlan	valószínűleg coeliakia ³	1	1

összes

79⁴

61⁴

10. táblázat. Az eredeti és a felülvizsgálat során kapott szövettani adatok összehasonlítása. 65 coeliakia diagnózissal kezelt betegről összesen 79 vékonybél biopsziás minta állt rendelkezésünkre. A betegek diagnózisát 2-25 évvel a vizsgálat előtt állították fel. 1-Klinikai, szerológiai és az új szövettani eredmények alapján, gluténfogyasztás alatt felállítva. 2-Normális villous struktúra más szekciókban 5 mintában 3- A betegben EMA pozitivitás jelent meg gluténfogyasztás alatt, de megtagadta az új biopsziát. 4- betegenként több mint egy minta lett megvizsgálva

Az EMA pozitív eredménnyel nem rendelkezők közül senkinél nem volt a diagnózis eredetileg az ESPGHAN 1969-es kritériuma alapján glutén újratehereléssel megerősítve. A bizonytalan esetekben klinikai követéssel egybekötött szabad gluténfogyasztást javasoltunk 11 HLA-DQ2/DQ8 pozitív betegnek, akiknek még korábban sohasem volt EMA pozitív eredményük, valamint mind a 15 DQ2/DQ8 negatív betegnek is. Közülük 21-en beleegyeztek az ESPGHAN protokoll szerinti követéses biopsziákba. A DQ2 pozitív betegekből négyenél jelentek meg klinikai tünetek és EMA pozitivitás 6 hónapon belül, valamint közülük 3 betegnél lett kimutatható subtotális boholyatrophia a gluténterhelés után végzett biopsziás mintában. Egy beteg megtagadta a relapsus utáni kontroll biopsziás vizsgálatot. Az összes többi beteg tünetmentes maradt, és egyikőjük esetében sem jelent meg EMA vagy TG ellenes antitest, illetve szövettani eltérés sem tapasztaltak 2 évvel a gluténterhelés megkezdése után végzett biopszia eredményeiben. (5. ábra) Mind a 15 DQ2/DQ8 negatív páciens jól tolerálta a glutént a követéses terhelés 2,3-7 éve alatt, így a HLA-DQ tipizálás negatív prediktív értéke 100%.

11. táblázat. Szövettani bizonyítékok a coeliakia diagnózisa mellett vagy a diagnózis ellen olyan betegekben, akiknél az eredeti diagnózis felállítása kizárólag szövettani vizsgálat alapján történt. Az eredmények a bizonytalan esetekben a kiterjesztett követésen és a glutént tartalmazó étrend mellett végzett új biopsziás eredményeken alapul.

Szövettan	EMA vagy anti-TG + HLA-DQ2 vagy DQ8 +	EMA és anti-TG- HLA-DQ2 vagy DQ8+	EMA és anti-TG- HLA-DQ2 és DQ8-
SVA	35	7	0
PVA	4	1	0
Enyhe eltérések	0	0	0
Normál	0	5	14
Diagnózissal nem egyező	1*	2*	1*
Összes	40	15	15
CD diagnózist alátámasztó	39 (97,5%)	8 (53,3%)	0 (0%)

*megtagadták a gluténterhelést, vagy az új biopsziát

Rövidítések: SVA=szubtotális boholyatrophia, PVA=partialis boholyatrophia, CD=coeliakia

Az összegyűjtött szövettani bizonyítékokat, melyek a coeliakia diagnózisa mellett illetve ellen szólnak, a HLA-DQ eredményekkel összevetve a 11. táblázat mutatja be. A régi és az új szövettani eredményeket összegezve az adatok azt mutatják, hogy a coeliakia diagnózisa a 70 betegből 39-nél megerősíthető, valamint további 9 személynél nagyon valószínűsíthető (összesen 68.6%), teljesen kizárható 14 betegnél, valamint igen valószínűtlen 8 személy esetében. A HLA-DQ2 illetve DQ8 jelenlétének szenzitivitása 100% coeliakiára nézve, míg specificitása csak 85%. Bár a kezdeti patológias vizsgálatok specificitása még kisebb (75%) volt.

4.2.Rheumatoid arthritis

I. vizsgálat:

Korábbi vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az irodalmi adatokhoz hasonlóan a HLA-DRB1*01 (HLA-DR1) és DRB1*04 (HLA-DR4) allélok nagyobb gyakorisággal fordultak elő a betegek között, mint a kontroll csoportban.

Jelen munkám során elvégeztük a HLA-DRB1*01 allélok szubtypusainak meghatározását a DR1 pozitív betegek (n=27) és kontroll személyek (n=10) esetében. Az eredményeket a 12. táblázatban tüntettem fel. Az RA-s DR1 pozitív betegek 92,6%-a a expresszáta a DRB1*0101 allélt, 3,7%-a a DRB1*0102 allélt, és 3,7%-a a DRB1*0105 allélt. Ezen szubtypusok megoszlása a kontroll csoportban statisztikailag hasonlóan alakult (sorban 90%, 10% és 0%).

12. táblázat HLA-DR1 szubtypusok megoszlása a DR1 pozitív betegek és kontroll személyek között

HLA-DR1 szubtypus	RA-s betegek n(%) n=27	Kontrollok n(%) n=10	Szignifikancia
DRB1*0101	25 (92,6)	9 (90%)	NS
DRB1*0102	1 (3,7)	1 (10%)	NS
DRB1*0105	1 (3,7)	0 (0%)	NS

Rövidítések: n=vizsgált személyek száma, S=szignifikáns, NS=nem szignifikáns

A HLA-DR4 pozitív betegek (n=26) és kontroll személyek (n=6) mintáit is szubtipizálásnak vetettük alá. A vizsgálat eredményeit a 13. táblázatban tüntettem fel. A HLA-DRB1*0401 allél fordult elő leggyakrabban mind az RA-s betegekben (61%), mind a kontroll személyekben (66%). Érdekes, hogy a kaukázusi RA-s betegekre oly jellemzőnek tartott DRB1*0404 allél hasonló gyakorisággal fordult elő a DR4 pozitív RA-s (19,2%) és a DR4 pozitív kontroll személyek (16,7%) között. Statisztikailag szignifikáns eltérés nem találtunk tehát a DR4 pozitív RA-s és a kontroll személyek között sem a DRB1*0401, sem a DRB1*0404 allél tekintetében.

13. táblázat. HLA-DR4 szubtipusok megoszlása a DR4 pozitív RA-s betegek és kontrollok között

HLA-DR4 szubtipusok	RA-s betegek n (%) n=26	Kontrollok n(%) n=6	Szignifikancia
DRB1*0401	16 (61,5)	4 (66,7)	NS
DRB1*0402	0 (0)	1 (16,7)	NS
DRB1*0404	5 (19,2)	1 (16,7)	NS
DRB1*0405	3 (11,5)	0 (0)	S (p<0,05)
DRB1*0406	1 (3,8)	0 (0)	NS
DRB1*0407	1 (3,8)	0 (0)	NS
DRB1*0408	2 (7,7)	0 (0)	S (p<0,05)

Rövidítések: n=vizsgált személyek száma, S=szignifikáns, NS= nem szignifikáns

Ezzel ellentétben kicsi, de szignifikáns eltérést találtunk az RA-s és a kontroll csoport között DRB1*0405 (11,5% vs. 0%) és DRB1*0408 (7,7% vs. 0%) allélok tekintetében (p<0,05). Az egyéb allélokat: DRB1*0402, DRB1*0406, DRB1*0407 csak 1-1 betegben detektáltuk.

A HLA-DR4 pozitív RA-s betegek közül három volt DRB1*0401 homozigóta, kettő DRB1*0401/*0404 heterozigóta, és egy DRB1*0401/*0407 heterozigóta. 20 beteg hordozta egy példányban valamelyik a DRB1*04 allélt (nem szerepel az ábrán).

II. vizsgálat:

A munkám során vizsgált 53 RA-s beteg szérumból 39 (73,6%) volt RF pozitív míg anti-CCP antitest 33 (62,2%) mintában volt kimutatható. Az 53 betegből 17 (32,1%) hordozta a HLA-DRB1*04 allélt egy vagy két példányban.

Szoros kapcsolatot találtunk az anti-CCP antitest és a RF pozitivitás között. Az 53 betegből 30 (56,6%) bizonyult egyszerre RF és anti-CCP antitest pozitívnek, míg 9 (17%) beteg mindkét markerre nézve negatívnak mutatkozott ($\chi^2=6,717$, $p<0,01$). Ráadásul szignifikáns összefüggést kaptunk az anti-CCP antitest pozitivitás és a HLA-DRB1*04 allél jelenléte között ($\chi^2=5,829$, $p<0,01$). Ezzel ellentétben semmilyen összefüggést nem találtunk a RF pozitivitás és a HLA-DRB1*04 allél jelenléte között (táblázatban nem szerepel).

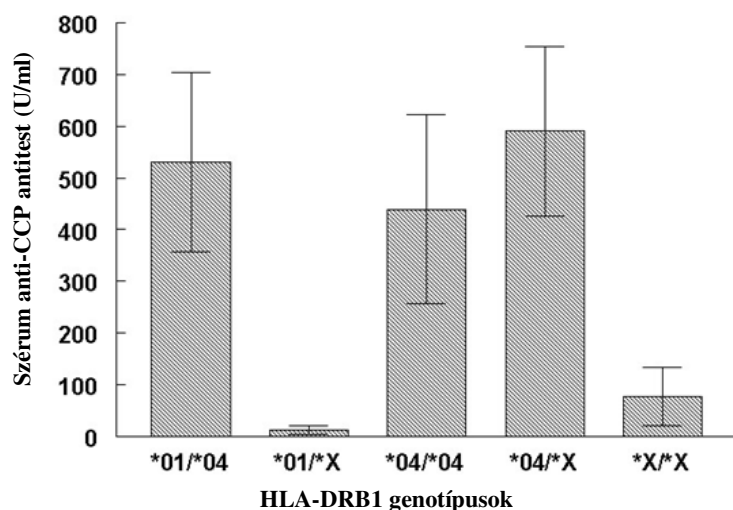
Tovább vizsgálva a laboratóriumi markereket a betegeket két csoportra osztottuk: egyik csoportba azok a betegek tartoztak, akik egy vagy két példányban hordozták a SE alléleket (SE-pozitív betegek), a másikba pedig azok, akik nem (SE negatív betegek). Összesen 16 beteg volt DRB1*01 pozitív, 17 DRB1*04 pozitív, és 23-an nem hordozták egyik allélt sem (14. táblázat). Azokat a betegeket, akik egyik kérdéses allélt sem expresszáltak, „X,X” genotípussal jelöltem. Nem találtunk semmilyen különbséget a szérumban RF szint tekintetében az SE-pozitív és SE-negatív betegek között (14. táblázat). Ezzel ellentétben anti-CCP antitest vonatkozásában az egy vagy két DRB1*04 allélt hordozó betegeknél emelkedettebb értékeket találtunk (DRB1*01/*04: $530,5\pm 174,2$ U/ml; *04/*04: $439,5\pm 182,8$ U/ml; *04/*X: $591,0\pm 164,2$ U/ml; az összes DRB1*04 pozitívnek: $530,0\pm 182,6$ U/ml), mint a HLA-DRB1*04 negatív betegekben (DRB1*01/*X: $12,0\pm 8,6$ U/ml; *X/*X: $6,8\pm 56,2$ U/ml; összes DRB1*04 negatívnál: $56,8\pm 27,4$ U/ml). Ezeket az eredményeket a 14. táblázatban és a 6. ábrán tüntettem fel. A DRB1*04 allélt hordozók körében számos betegnél talákoztunk a cut-off értéket magasán meghaladó, 1000-2000 U/ml közötti, vagy ennél is magasabb anti-CCP antitest értékkel. A shared epitópot nem hordozók körében ez ritkábban fordult elő. Ha csak az anti-CCP antitest pozitív betegek szérumban anti-CCP értékeit hasonlítjuk össze, akkor is találunk eltérést, bár ez az eltérés kevésbé markáns: a HLA-DRB1*04 allélt hordozók anti-CCP antitest szintje mintegy duplája a HLA-DRB1*04 allélt nem hordozóknak (az összes DRB1*04 pozitív beteg: $696,3\pm 103,2$ U/ml, DRB1*X/*X: $363,2\pm 95,4$).

14. táblázat A szérumban anti-CCP és RF koncentrációjának összefüggése a “shared epitópok” jelenlétével RA-s betegek esetében

	DRB1*01/04 (n=3)	DRB1*01/X (n=13)	DRB1*04/04 (n=3)	DRB1*04 /X (n=11)	DRB1*X/X (n=23)	Az összes DRB1*04 pozitív (n=17)	Az összes DRB1*04 negatív (n=36)	P^{1*}
Anti-CCP (U/ml)	530.5± 174.2	12.0 ± 8.6	439.5± 182.8	591.0± 164.2	76.8 ± 56.2	530.0± 182.6	56.8± 27.4	< 0.01
RF (U/ml)	16.5 ± 6.2	29.5 ± 9.8	85.5 ± 34.6	70.0 ± 46.2	71.0 ± 38.4	63.5 ± 28.4	57.5± 22.6	NS

A p érték az összes DRB1*04 pozitív és összes DRB1*04 negatív beteg értékei közötti különbséget jelzi. NS = nem szignifikáns

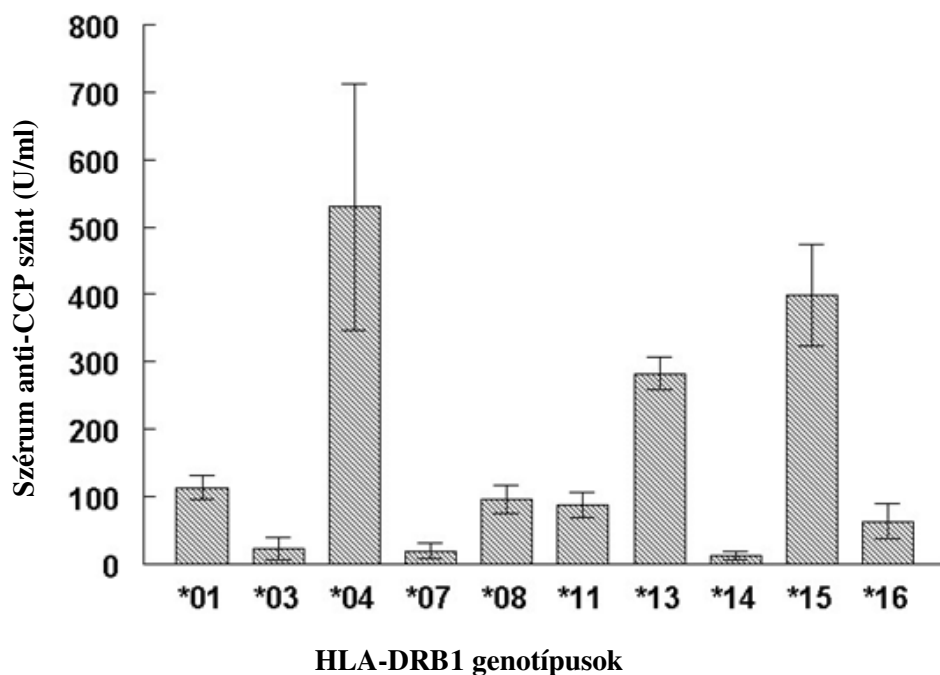
Nem találtam különbséget szérumban anti-CCP antitest koncentráció tekintetében a DRB1*01 allélt hordozó, de DRB1*04 allélt nem hordozó betegek (DRB1*01/*X: 12.0± 8,6 U/ml) és a shared epitóp allélt egyáltalán nem expresszáló betegek (DRB1*X/X: 76,8±56,2 U/ml) között (9. táblázat, 6. ábra). Mindezek alapján elmondhatjuk tehát, hogy a DRB1*04 allélt legalább egy példányban expresszáló betegek esetében a szérumban anti-CCP szint többszöröse lehet a DRB1*04 negatív betegek anti-CCP antitest szintjének (14. táblázat).



6. ábra. Szérumban anti-CCP antitest koncentrációk a különböző HLA-DR1 és HLA-DR4 genotípusokkal összefüggésben

Nem találtunk jelentős különbséget anti-CCP antitest koncentráció tekintetében, ha a DRB1*04 allélt egy példányban valamint két példányban hordozó betegeket hasonlítottuk össze (6. ábra).

Más HLA-DRB1 genotípusokat (HLA-DRB1*03,*07,*08,*11,*13,*14,*15 és *16) is megvizsgáltam, hogy állnak-e valamilyen összefüggésben a szérumban RF és anti-CCP antitest koncentrációjával. (Bár az egyes csoportokba sorolható betegek száma elég alacsony volt a statisztikai analízishez.) Nem találtam említésre méltó összefüggést a szérumban RF szintek valamint a vizsgált HLA-DRB1 allélok között. Viszont mind a hat beteg (100%), aki a DRB1*15 allélt hordozta, és 6 a 7 DRB1*13 allélt expresszáló beteg közül (85%) anti-CCP antitest pozitív volt. Mitöbb, a fent említett DRB1*04 allélt hordozó betegek mellett a DRB1*13 ($282,5 \pm 23,8$ U/ml) és DRB1*15 ($398,7 \pm 76,2$ U/ml) allélokot hordozó betegek szérumban anti-CCP antitest szintje szignifikánsan magasabb, mint a többi HLA-DR genotípusba tartozóknak ($p < 0,01$) (7. ábra). Ezzel szemben a DRB1*03,*07,*08,*11,*14 vagy *16 allélokot hordozóknak csak 45-55%-ának volt emelkedett anti-CCP antitest szintje.



7. ábra Szérumban anti-CCP antitest szintek alakulása a különböző HLA-DRB1 allélok expresszálásának függvényében

4.3. Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE

A HLA-DRB1 és DQB1 allélok előfordulását a három különböző SLE-s betegcsoportban (PAPS+SLE, SLE+SAPS, „tisztán” SLE), valamint az egészséges kontroll populációban a 15. táblázat szemlélteti.

Az APS-sel nem társuló SLE-ben szenvedő betegekben - az irodalmi adatokhoz hasonlóan - a DRB1*03 allél, és a sokszor vele kapcsolatos öröklődő DQB1*0201 allél gyakrabban fordult elő, mint az egészséges kontroll személyekben (46% vs. 26%, $p=0.08$ nem szignifikáns), viszont ezen allélok előfordulása a PAPS+SLE csoportban igen ritkának adódott (13% vs. 46% a tisztán SLE-s csoporthoz viszonyítva, $p=0.04$). Az SLE-s csoporthoz hasonlóan előfordulásuk az SLE+SAPS csoportban is valamelyest gyakoribbnak bizonyult a kontroll és a PAPS+SLE csoporthoz képest (32% vs. 26% és 13%). Az SLE-re szintén jellemző, és egy másik magyar kutatócsoport SLE-s betegcsoportjában gyakorinak talált DRB1*15 allél tekintetében mi nem találtunk jelentős különbséget az APS-sel társuló (PAPS+SLE, SLE+SAPS) és nem társuló „tisztán” SLE-s csoport, valamint az egészséges kontroll csoport között (27%, 27%, 26% és 16% sorban). Az APS-re jellemző DRB1*04 allél gyakrabban fordul elő a két APS-sel társuló SLE-s csoportban, mint a „tisztán” SLE-s, vagy a kontroll személyekben, de ez a különbség nem szignifikáns (27% és 23% vs. 15% és 18%). Az APS-re szintén jellemző DRB1*07 allél tekintetében nem találtunk jelentős eltérést a négy csoport között.

Az irodalmi adatoktól eltérően a PAPS+SLE csoportban igen gyakorinak mutatkozott a DRB1*13 allél a másik három csoporthoz képest (33% vs. 7%, 13%, és 16% a „tisztán” SLE-s, az SLE+SAPS és a kontroll csoportokkal szemben, az eltérés nem szignifikáns).

A HLA-DQB1 allélok közül a DQB1*0301 allél néhány irodalmi eredménynek ellentmondóan az általunk vizsgált PAPS+SLE betegcsoportban igen ritkán fordult elő a „tisztán” SLE-s, az SLE+SAPS és a kontroll csoporthoz képest: 13% -ban szemben a többi csoportban tapasztalt 27%, 27% és 44%-os előfordulási arányával. A DQB1*0302 és DQB1*06 allél viszont gyakrabban jelent meg a PAPS+SLE csoportban. A DQB1*0302 allél a PAPS+SLE-s betegek 27%-ában volt megtalálható, míg a „tisztán” SLE-s betegek 7%-ában, az SLE+SAPS-s betegek 18%-ában és a kontroll személyek 14%-ában. A DQB1*06 allél pedig a PAPS+SLE-s betegek 47%-ában volt jelen szemben a többi csoport 23%, 36% és 26%-os pozitivitásával („tisztán” SLE, SLE+SAPS és kontroll csoportokban).

15. táblázat. A HLA-DRB1 és -DQB1 allélek előfordulása PAPS+SLE-s, SLE+SAPS-s, APS nélküli SLE-s és egészséges kontroll személyekben.

Allélok	PAPS+SLE (n=15) n (%)	SLE+SAPS (n=22) n (%)	SLE (n=26) n (%)	Kontroll (n=57) n (%)
DRB1				
*01	2 (13)	1 (4)	6 (23)	7 (12)
*15	4 (27)	6 (27)	7 (26)	9 (16)
*16	2 (13)	3 (13)	5 (19)	9 (16)
*03	2 (13)	7 (32)	12 (46)	15 (26)
*04	4 (27)	5 (23)	4 (15)	10 (18)
*11	2 (13)	5 (23)	5 (19)	17 (30)
*12	1 (7)	2 (9)	0 (0)	7 (12)
*13	5 (33)	3 (13)	2 (7)	9 (16)
*14	2 (13)	1 (4)	0 (0)	4 (7)
*07	4 (27)	8 (36)	6 (23)	15 (26)
*08	0	1	1 (4)	4 (7)
*09	0	0	0	1 (2)
*10	0	0	0	2 (3)
DRB3 (52)	8 (53)	17 (77)	18 (69)	38 (66)
DRB4 (53)	8 (53)	12 (54)	10 (38)	23 (40)
DRB5 (51)	4 (26)	9 (40)	11 (42)	15 (26)
DQB1				
*0201	2 (13)	7 (32)	12 (46)	15 (26)
*0202	4 (26)	6 (27)	4 (15)	11(19)
*0301	2 (13)	6 (27)	7 (27)	25 (44)
*0302	4 (26)	4 (18)	2 (7)	8 (14)
*0303	0	1 (4)	2 (7)	5 (9)
*0305	0	0	0	1 (2)
*04	0	1 (4)	2 (7)	4 (7)
*05	6 (40)	5 (23)	12 (46)	19 (33)
*06	7 (47)	8 (36)	6 (23)	15 (26)

Az SLE-vel olykor összefüggésbe hozott DRB3(52) allél csekély mértékben volt gyakoribb a „tisztán” SLE-s, valamint az SLE+SAPS csoportban a kontrollokhoz képest (69% és 77% szemben a kontroll csoport 66%-os előfordulási arányával). A DRB4(53) allél, amely az APS-re jellemző, ugyan valamivel gyakoribb volt a két APS-sel társuló SLE-s csoportban (PAPS+SLE és SLE+SAPS 53% és 54%) mint a „tisztán” SLE-s és a kontroll csoportban (38% és 40%), de a különbségek nem voltak szignifikánsak. A többi allél tekintetében nem találtunk említésre méltó eltérést a négy vizsgált csoport között.

Mivel egyes tanulmányok szerint nem maga a betegség, hanem egyes antifoszfolipid antitestek jelenléte hozható összefüggésbe a HLA-DR és –DQ allélokkal, megvizsgáltuk, hogy az általunk genotipizált betegekben milyen arányban jelentek meg a jellemző antitestek. Az aPL antitestek jelenléte a kontroll személyek körében 5% alattinak mutatkozott. Az anti-kardiolipin antitest (aCL) és β 2-GPI ellenes antitestek jelenlétét a három betegcsoportban a 16. táblázatban tüntettem fel.

16. táblázat aCL és β 2-GPI ellenes antitestek előfordulása a három SLE-s betegcsoportban

aPL antitestek	PAPS+SLE n=15	SLE+SAPS n=22	SLE n=26
anti-kardiolipin antitest (aCL)	13	21	3
anti- β 2-GPI antitest	9	8	2

Az aCL antitest az olyan SLE-s betegek közül, akiknél az SLE-hez APS is társult, nagyon kevés kivétellel mindenkiben kimutatható volt, míg a 26 „tisztán” SLE-ben szenvedő beteg közül csak háromnál volt jelen. Így ezen antitestek jelenlétét nem tudtuk összefüggésbe hozni bizonyos HLA allélek hordozásával.

Az anti- β 2-GPI-t a 15 betegből álló PAPS+SLE csoportban 9 személynél sikerült kimutatni, közülük 5 a DRB1*13/DQB1*06 allélokot hordozta. Azt is elmondhatjuk, hogy ezen 5 beteg esetében mindenképpen kimutatható volt az anti- β 2-GPI. A 4 további beteg közül 2 a DRB1*07/DQB1*0202 allélt hordozta.

Nem jelenthetjük ki azonban, hogy a DRB1*13/DQB1*06 allél szoros asszociációban van az anti- β 2-GPI-vel, mivel ez az összefüggés a SAPS+SLE és a „tisztán” SLE csoportban nem volt fellelhető. Az SLE+SAPS csoportba tartozó 8 anti- β 2-GPI pozitív betegből 4 a DRB1*07/DQB1/0202 allélt hordozta.

5. Megbeszélés

5.1.Coeliakia

A coeliákia diagnózisa ma a súlyos boholyatrophia és coeliákia specifikus autoantitestek (tTG, EMA) kimutatásán alapul (8,24). A mi munkánk is alátámasztja ezen eljárásnak a megbízhatóságát azokban az esetekben, melyekben a betegnél mindkét kritérium teljesül, mivel ezek a betegek mind hordozzák a betegség létrejöttéhez szükséges megfelelő HLA-DQ alléleket is. Mitöbb, a villusatrófia és a szeropozitivitás kombinációjának akkor is hasonlóan nagy jelentősége van, ha nem egy időben regisztrálják őket, vagy ha a kezdeti diagnózis után, később sikerül kimutatni. Egyik betegünk sem rendelkezett EMA eredménnyel a kezdeti diagnózis felállításakor, de diétahibák miatt a betegek 50%-ában sikerült később EMA pozitivitást detektálni. A tTG ellenes antitest kimutatására irányuló vizsgálat az EMA meghatározással azonos eredményt adott. Az tTG ellenes antitest prediktív értékét a későbbiekben magyar populációsűrési vizsgálattal is bizonyítottuk (84).

Azokban az esetekben, melyekben nincs dokumentált EMA (vagy tTG) pozitivitás, a coeliákia diagnózisa kevésbé biztos. A szövettani eltérések nem specifikusak a betegségre (22,27), valamint a patológiai kiértékelésnek számos buktatója is lehet, mint például a minta rossz minősége vagy rossz orientációja (26). Munkánk során nagy gyakorisággal találtunk félrevezető mikroszkópos eredményeket, melyeket így az orvosok később tévesen a villusatrófia bizonyítékaként interpretáltak. Ezeket a nehézségeket már 1969-ben is felismerték, mikor az ESPGAN megfogalmazta a coeliákia diagnózisának alapelveit, amit azóta interlakeni kritériumok néven ismerünk (23). Az interlakeni kritériumrendszer a betegség glutén-dependenciáján alapul, és legalább három biopsziát ír elő, mely azt mutatja, hogy a szövettani eltérések megszűnnek a gluténmentes diéta hatására, majd visszatérnek-e, ha a beteg elkezd újra glutént fogyasztani. Bár ezek a kritériumok ma már elavultnak tűnnek, egy új és kontrolált gluténterhelésnek igen nagy klinikai jelentősége lehet a kérdéses esetekben (85,86). Mi a munkánk során egy olyan betegcsoporttal dolgoztunk, akik a vizsgálatunk idején EMA negatívak voltak, diéta előtti EMA státuszuk ismeretlen, és akik esetében a HLA-DQ2-DQ8 alléleknek alacsony a prevalenciája.

Különösen nagy kihívást jelent azon fiatal felnőttek csoportja, akiknél a coeliakiát még gyerekkorukban, az EMA és tTG ellenes antitest vizsgálatok bevezetése előtt diagnosztizálták, és azóta gluténmentes diétát folytattak. Az ő diagnózisuk nem a jelenleg elfogadott diagnosztikai standardon alapul, a kezdeti klinikai tüneteik aspecifikusak is

lehetnek, mivel néhány, korai gyerekkorból származó szövettani eltérést más is okozhat, például tehéntejfehérje enteropátia, vagy vírusinfekció okozta átmeneti károsodás (87). Ilyen körülmények között a HLA-DQ tipizálás lehet a legértékesebb vizsgálat a coeliakia kizárására.

A HLA-DQ2/DQ8 negatív betegek közül senkinél nem tapasztaltunk klinikai relapszust, és egyik esetben sem jelent meg coeliákia specifikus autoantitest a hosszan tartó gluténexpozíció hatására. Bár néhány DQ2/DQ8 negatív coeliákiás beteg ismert az irodalomból, egy nagyszabású európai tanulmány 1000 coeliákiás betegből mindössze négy ilyen talált, ráadásul egyikőjük diagnózisa sem volt gluténterheléssel megerősítve (15). Az ilyen különleges esetek valószínűleg egy ritka mutációt hordozhatnak azokban a DQ allélokban, melyek általában nem játszanak szerepet a betegségre való fogékonyság kialakításában, de amely képessé teszi őket a gliadin bemutatására a T-sejtek számára. Hasonló jelenséget már I. típusú diabetes mellitusban már leírtak (88).

Általában a HLA-DQ2/DQ8 negatív eredmény a coeliákia lehetőségének kizárására használható. A DQ2 és DQ8 allélok jelenléte igen gyakori az egészséges populációban is, így ezen allélok jelenléte nem jelenti feltétlenül a betegség fennállását is. Volt néhány olyan DQ2/DQ8 pozitív betegünk is, akiknek nem volt EMA/tTG pozitív eredménye, meggyőző szövettani lelete sem, és jól tolerálta a glutént a hosszú követési idő alatt. Ez azt mutatja, hogy a kezdeti EMA negatív státusznak nagy negatív prediktív értéke van még villousatrófia fennállása esetén is (28,86). Bár a mi betegeinknek a kezdeti EMA státusza nem volt ismert, EMA negatívak maradtak és villusatrófia jeleit sem mutatta ki a biopszia 2 évnél hosszabb gluténterhelés után sem. Az irodalomból ismert néhány esetben szövettani relapszus lett megfigyelhető 14 év után (89). Ennél fogva az interlakeni kritériumrendszer azon szabálya, mely szerint 2 év után kizárható a coeliákia (23), napjainkban talán már nem érvényes. Ennek ellenére a több mint két évig megfigyelt betegcsoportra nagy valószínűséggel kimondhatjuk, hogy nem coeliákiás.

A gluténmentes diéta hatásos gyógymódja a betegségnek, de főleg gyerekek és fiatal felnőttek esetében nem könnyű követni. Folyamatos támogatás nélkül sokan bizonyos idő elteltével szüneteltetik a diétájukat (90). Az általunk vizsgált csoportban sokan nem teljesítették megfelelően a diétát. Ezek a betegek klinikailag tünetmentesek (silent coeliákia) voltak ugyan, de az EMA/tTG ellenes antitest pozitívaknál boholykárosodás alakult ki. Valójában 27 betegből 21-nél, akik diétavétség miatt lettek EMA pozitívak, miután felvilágosítást kaptak a megfelelő diétáról, a megerősítő új biopszia után már szeronegatívak eredményt kaptunk.

A HLA-DQ molekulák α és β láncának PCR módszerrel történő vizsgálata igen egyszerű és költséghatékony. Még mindig kérdéses, hogy érdemes-e a HLA-A,-B,-C,-DR,-DP alléleket is vizsgálni. A cisz DQ2 egy konzervált HLA-A1,Cw7,B8,DR3 haplotípusban öröklődik az európai betegekben (14), míg ettől eltérő HLA-A és HLA-B allélokat figyeltek meg indiai coeliákiás betegekben (91). Megint más tanulmányok szerint csak a HLA-DQ alléleknek van additív szerepe a betegség öröklődésében (92). Ezért a HLA-DQ allélek tipizálása klinikai célokra elégségesnek tűnik. Korábbi tudományos eredményekhez (87) hasonlóan úgy találtuk, hogy minden EMA pozitív beteg hordozta a DQ2 vagy DQ8 molekulát- ezt az eredményt egy másik coeliákiás betegcsoporton is megerősítettük (93)- így elmondható, hogy EMA pozitív betegek esetében a HLA-DQ tipizálás nem szükséges. Vizsgálatunk során minden tTG ellenes antitest pozitív beteg EMA pozitívnek és DQ2 vagy DQ8 pozitívnek is bizonyult. Valójában a tTG ellenes antitest és az EMA vizsgálatok ugyanazt az antitestet mutatják ki (94), és az eltérés megfelelő módszerek használata esetén igen ritka. Így tTG ellenes antitest pozitivitás esetében is nagy valószínűséggel szükségtelen a HLA-DQ genotípus meghatározása.

Összefoglalva, az eredményeink alátámasztják a HLA-DQ tipizálás klinikai hasznát olyan esetekben, amikor a coeliákia diagnózisa bizonytalan.

5.2.Rheumatoid arthritis

Az RA és bizonyos HLA-DR allélek kapcsolatát már számos etnikai csoportban kimutatták. (42-57) (3. táblázat). A HLA-DRB1 gének (SE) a betegség súlyosságával és kimenetelével is összefüggésbe hozhatók (30,46,47) (3. táblázat). Az RA-ra való hajlam valószínűleg a DRB1 lánc harmadik hipervariabilis régiójában található specifikus epitóppal, az úgynevezett „shared” epitóppal hozható összefüggésbe (31,51). Ezek a specifikus szekvenciák bizonyos DR1 (DRB1*0101), és DR4 (DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0408, DRB1*0410) szubtipusokban, valamint a DRB1*1001 és DRB1*1402 allélokban fordulnak elő. Kaukázusi betegekben a HLA-DRB1*0101 és DRB1*0401 valamint DRB1*0404 és DRB1*0408 allélek hozhatók leginkább összefüggésbe a betegségre való hajlammal és a betegség súlyosságával (30,31). A közelmúltban megjelent egyetlen magyar tanulmány a DRB1*0404 allélt hozta leginkább összefüggésbe az RA-val (48).

Munkánk során megállapítottuk a HLA-DRB1*01 és HLA-DRB1*04 allélek szubtipusainak gyakoriságát a DEOEC Reumatológiai Tanszékén kezelt RA-s betegek körében, és összevetettük a kontroll csoportban tapasztalt eredményekkel. Mint azt korábban

kimutattuk, a HLA-DR4 genotípus szignifikánsan gyakoribb volt az RA-s betegekben, és a HLA-DR1 molekulák is gyakrabban fordultak elő a kontroll személyekhez viszonyítva. Jelen munkám során, a HLA-DR1 (DRB1*01) szubtypusokat tekintve azt találtam, hogy a DRB1*0101, DRB1*0102 és a DRB1*0105 allélek expresszázódtak leggyakrabban a DRB1*01 pozitív RA-s betegekben, valamint a kontroll populációban is. Mindhárom allél egyformán gyakori volt a betegek és az egészséges populáció körében is. Ráadásul mivel eredményeink csak enyhe emelkedést mutattak a DR1 allélek gyakoriságában a kontroll csoportban találtakhoz képest, adataink arra engednek következtetni, hogy az általunk vizsgált betegek esetében a HLA-DR1 és szubtypusai nem játszanak nagy szerepet az RA kialakulásában. Eredményeinkkel ellentétben a HLA-DR1 szubtypusok RA pathogenezisében betöltött szerepét Askenázi zsidókban (57) és számos kaukázusi népcsoport esetében (30,42,44,46,50,5,52) is kimutatták. Az egyetlen ide kapcsolódó magyar publikáció szerzői a DR1 szubtypusokat nem vizsgálták (48).

A DR4 szubtypusok közül a DRB1*0401 és DRB1*0404 allélek fordultak elő leggyakrabban mind az RA-s betegek, mind az egészséges kontroll személyek között. Nem találtunk viszont különbséget egyik szubtypus tekintetében sem a vizsgált két populációt összehasonlítva. Más kaukázusi populációkban is a DRB1*0401 és DRB1*0404 allélokot hozták összefüggésbe a betegségre való fogékonysággal (30,54).

A DRB1*0405 és DRB1*0408 allélek bár kevésbé voltak összességében gyakoriak, de szignifikánsan nagyobb gyakorisággal fordultak elő az RA-s betegekben, mint a kontroll személyekben. A DRB1*0405 allélok gyakori előfordulása inkább az ázsiai népcsoportokra jellemző, a koreaiakra (43,51), japánokra (55) és kínaiakra (56). A DRB1*0408 allélt pedig a finn RA-s betegek esetében hozták összefüggésbe a betegségre való hajlammal (42). Ezek szerint eredményeink támogatják a DRB1*0405 és DRB1*0408 allélek RA pathogenezisében betöltött szerepét az általunk vizsgált RA-s betegek tekintetében. Ráadásul, a HLA-DR4 szubtypusok tekintetében a mi magyar szubpopulációnk a Finnországban és Ázsiában tapasztalt genetikai mintázatot is tükrözi.

Második munkánkban megvizsgáltuk a „shared epitópok” expressziója és a RF, anti-CCP antitestek jelenléte valamint szérumkoncentrációja közötti lehetséges összefüggéseket. Megerősítettük azon eredményeket (41), melyek szerint kapcsolat lehet az anti-CCP antitest és a RF pozitivitás között. Eredményeink szerint a betegek 56%-a volt egyszerre RF és anti-CCP antitest pozitív, míg a betegek 17%-ában sem RF-t, sem anti-CCP antitestet nem lehetett detektálni. Nem találtunk korrelációt a RF termelődése és a SE pozitivitás között. Nem szabad

azonban elfeledkezni arról, hogy a szérumban RF szintek változhatnak a kezelés alatt, tehát a megnövekedett RF termelés és a HLA-DRB1 genotípusok közötti kapcsolatot az antireumatikus gyógyszeres kezelés is befolyásolhatja.

Összefüggést találtunk az általunk vizsgált RA-s betegcsoportban az anti-CCP antitest pozitivitása és a HLA-DRB1*04 allélek expressziója között. Ezen az összefüggésen túl, melyet már más kutatócsoportok is leírtak korábban (58,59), munkánk során azt találtuk, hogy nem csak az anti-CCP antitest megjelenése, hanem annak szérumban szintje is kapcsolatban áll a HLA-DRB1*04 alléll egy vagy két kópiájának hordozásával. Ezen összefüggéseket HLA-DRB1*01 allélok vonatkozásában, az irodalmi adatoktól eltérően, mi nem tapasztaltuk. Ennek magyarázatát valószínűleg etnikai különbségekben kell keresni, mivel az irodalmi adatok is eltérőek ebben a kérdésben. Egy svéd kutatócsoport szintén csak a DRB1*04 allélt hozta összefüggésbe az anti-CCP antitest jelenlétével (95), míg spanyol betegekben egyik SE allél sem mutatott asszociációt az említett antitest előfordulásával (96). A DRB1*04 allél és az anti-CCP antitest közötti összefüggések ismeretében felmerül, hogy bár a RF továbbra is az RA diagnosztikájának fontos markere marad, azonban a nagy specificitású anti-CCP antitest szintje és a HLA-DRB1*04 allélok között talált asszociáció egy igen értékes betegség marker kombinációt nyújthatna számunkra a betegség progressziójának megítéléséhez.

Sajnos a betegség súlyosságának, eroziók jelenlétének vizsgálatát az anti-CCP antitest jelenlétének illetve szérumban szintjének függvényében nem volt lehetőségünk elvégezni, de léteznek irodalmi adatok arra vonatkozóan, hogy a DRB1*04 allélok jelenléte és az anti-CCP antitest pozitívitás együttes fennállása esetén az ízületi destrukciók mértéke általában megnövekedett az SE- és anti-CCP+, SE+ és anti-CCP-, valamint az SE- és anti-CCP- betegekben megfigyeltekhez képest (58).

Egy korábbi tanulmány szerint a DRB1*0401 allél domináns allélként működik a betegségre való hajlam kialakításában, míg a többi SE allél, mint a DRB1*0404 vagy a DRB1*10 recesszív géneként viselkedik, és két kópia kell belőlük a hajlam növeléséhez (97). Mi munkánk során nem találtunk jelentős eltérést anti-CCP antitest szint tekintetében az egy vagy két HLA-DRB1*04 allélt hordozó betegek között. Ez egyrészt talán a kis esetszámnak köszönhető, de esetleg magyarázható etnikai különbségekkel is. Léteznek olyan tanulmányok, melyek szerint az SE homozigóta genotípus nagyobb arányban jár anti-CCP antitest pozitívással, de fellelhetők ezzel ellentétes álláspontot képviselő publikációk is. Charpin és munkatársai például nem találtak jelentős különbséget anti-CCP pozitívitás tekintetében sem az SE-t egy vagy két példányban hordozók között, sem az SE-t hordozók és nem hordozók között. Eredményeik szerint viszont a DRB1*0404 allél jelenléte egy kópiában is

összefüggésbe hozható az anti-CCP antitest pozitivitással, tehát domináns allélként működik, hasonlóképpen, mint a DRB1*0401 allél a hajlam kialakításában (98).

Legújabb kutatások szerint a dohányzás is összefüggésbe hozható az anti-CCP antitest jelenlétével (99), sőt az olyan SE pozitív és anti-CCP antitest pozitív betegeknel, akik dohányoztak, magasabb anti-CCP antitest szint detektálható (100). Hasonló vizsgálatok laboratóriumunkban is folyamatban vannak.

Munkánk során azt is megvizsgáltuk, hogy a szérumban RF, és anti-CCP antitest szintje más, nem a „shared epitópok” közé tartozó HLA-DRB1 allélokkal kapcsolatba hozható-e. Bár az egyes csoportokba tartozó betegek száma kevés volt a statisztikai analízishez, nem találtunk semmilyen kapcsolatot a szérumban RF szintek és a különböző HLA-DRB1 (nem SE) genotípusok között. A DRB1*13 valamint a DRB1*15 allélt hordozók többsége viszont anti-CCP antitest pozitívnak bizonyult. Ráadásul a DRB1*13 vagy DRB1*15 allélt hordozók anti-CCP antitest szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a HLA-DRB1*03,*07,*08,*11,*14 vagy *16 allélt expresszálóké. Ez az eredmény igen érdekes, mivel korábban a HLA-DRB1*13 és HLA-DRB1*15 allélok még nem hozták összefüggésbe az RA-val. A közelmúltban azonban jelentek meg olyan közlemények, melyek a HLA-DRB1 allélok újon felállított csoportokba sorolták. Ebben a felosztásban a DRB1*13 allél például már egy olyan csoportban szerepel (S2) a DRB1*0401 alléllal együtt, melyről kimutatták, hogy összefüggésbe hozható RF és az anti-CCP antitest pozitivitással (101). Egy most elfogadás alatt levő közleményünkben, amiben már szintén ezen új besorolásban szerepelnek a HLA-DRB1 allélok, mind a DRB1*13, mind a DRB1*15 allél összefüggését az anti-CCP antitesttel megerősítettük.

Összefoglalva, munkánk megerősíti más kutatók azon eredményeit, amelyek szerint az anti-CCP antitestek és a HLA-DRB1*04 allélek szimultán lehetnek jelen RA-s betegekben. Korábbi tanulmányok összefüggésbe hozták az anti-CCP antitest pozitivitást és a SE pozitivitást RA-ban. Mi új eredményként rávilágítottunk arra, hogy nem csak az anti-CCP pozitívitás, hanem az anti-CCP antitestek szintje is összefüggésbe hozható a SE-ekkel RA-s betegekben. A HLA-DRB1 allélek és az autoantitest termelés közötti szoros kapcsolat befolyásolhatja a betegség későbbi továbbfejlődését és kimenetelét. Rávilágítottunk arra, hogy az anti-CCP antitest termelése más HLA-DRB1 allélokkal, név szerint a HLA-DRB1*13 és HLA-DRB1*15 allélekkel is kapcsolatban lehet.

5.3. Antifoszfolipid szindrómával társuló és nem társuló SLE

Az SLE és az APS is olyan több szervet érintő autoimmun betegség, melyekre bizonyos autoantitestek jelenléte jellemző. Ezek az autoantitestek gyakran hozhatók kapcsolatba különböző szervi manifesztációkkal, például az anti-C1q és a ds DNS elleni antitestek a lupus nefritisszel, vagy az anti-SS-A a fényérzékenységgel, vagy az újszülöttkori lupussal. Az aPL antitestek mind az APS, mind az SLE klasszifikációs kritériumai között szerepelnek. Jelenlétük összefüggésbe hozható trombotikus események és ismétlődő vetélések gyakori előfordulásával is.

Mindkét kórkép genetikailag fogékony személyekben jelenik meg. Ezt a fogékonyságot MHC és nem MHC allélek határozzák meg. Számos egyéb gén mellett a komplementeket és receptoraikat (102), az Fc γ receptort, valamint az apoptózis folyamatában, és az apoptotikus termékek eltakarításában szerepet játszó molekulákat kódoló génekről is kimutatták, hogy növelhetik az SLE kialakulásának esélyét (103).

MHC allélek tekintetében bizonyos HLA-DR és HLA-DQ alléleket hoztak összefüggésbe az SLE és az APS kialakulásával. Az SLE kialakulásával a HLA-DR2 és HLA-DR3 molekulákat kódoló DRB1*15 és DRB1*03 allélok hozhatók leginkább kapcsolatba, ezen allélok jelenléte növelheti leginkább a betegség kialakulásának esélyét bizonyos populációkban (68-73). Az APS a DRB1*04(DR4), DRB1*07(DR7), DRw53 valamint DQ allélek közül a DQB1*0301(DQ7) és DQB1*0302(DQ8) allélekkel hozható leginkább kapcsolatba (összefoglalva a 73. cikkben) Ezen allélek gyakori előfordulását figyelték meg bizonyos aPL antitestek előfordulása esetén is (75-77). Az MHC allélok meghatározhatják bizonyos betegségek autoantitest profilját, és ezáltal a betegségek klinikai képét, megjelenését.

A klinikánk SLE munkacsoportja sok tekintetben eltérő klinikai jellemzőket talált a később általam is vizsgált három SLE-s betegcsoportban: a tisztán SLE-s, valamint a primer APS-es és a szekunder APS-sel szövődött SLE-s csoportokban. Nem meglepő, hogy a primer és szekunder APS-ben szenvedő betegeknél nagyobb számban fordulnak elő trombotikus események, mint például a mélyvénás trombózis, tüdőembólia vagy stroke. Az APS-sel nem szövődött, tisztán lupusos betegek körében szignifikánsan gyakoribb volt az ISN/RPS III-IV típusú glomerulonefritisz gyakorisága. Hasonlóan ebben a csoportban gyakoribb volt az aktív periódusok száma, magasabb adagú szteroidot kaptak és a PAPS+SLE-s csoporthoz képest

szignifikánsan gyakoribb volt a ciklofoszfamid alkalmazása is. Szignifikáns különbséget találtak a PAPS és SAPS betegek között szülészeti szövődmények tekintetében. A PAPS-ban szenvedő betegcsoportban több nőnél fordult elő vetélés, valamint az egy adott beteg által elszenvedett vetélések száma is nagyobb volt ebben a csoportban a SAPS-es betegekkel szemben. A PAPS+SLE csoportban 24 nő összesen 33 vetélésen esett át, míg a SAPS+SLE csoportban 24 nőre 7 vetélés esett.

A három SLE-s betegcsoport klinikai jellemzőiben megfigyelt szignifikáns eltérések felvetették a kérdést, hogy ezen eltérő fenotípusok magyarázhatók-e eltérő MHC II profillal, továbbá hogy az APS - ha csak néhány esetben is - jelentkezhethet-e pusztán a lupus manifesztációjaként, vagy pedig független autoimmun betegséggént társul az SLE-hez. Hogy megválaszoljuk a kérdéseket, elvégeztem a három betegcsoportba tartozó betegek HLA-DR és HLA-DQ genotípusának meghatározását, különös tekintettel azokra az allélokra, melyek irodalmi adatok szerint összefüggésbe hozható a betegségekkel. Az SLE kialakulásával a DRB1*03 (DR3) és vele gyakran együtt öröklődő DQB1*0201 allélt, valamint a DRB1*15 (DR2) allélt hozták leginkább összefüggésbe. A DRB1*03/DQB1*0201 haplotípus esetében nekünk is sikerült megerősíteni az asszociációt: SLE-s betegek esetében gyakrabban fordult elő a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az SLE-re szintén jellemző DRB1*15 allél tekintetében nem találtunk jelentős eltérést. A négy vizsgált betegcsoportban előforduló HLA-DRB1 és DQB1 allélok összehasonlítása során a legérdekesebb betegcsoportra, a PAPS+SLE csoportra fókuszálva azt találtuk, hogy a DRB1*03 és DQB1*0201 allélok előfordulása (mindkettő jellemző a lupusra) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll és az APS nélküli, tisztán SLE-s csoportban (13% vs. 26% és 46%) valamint a SAPS-el szövődött lupusos betegekkel összehasonlítva is ritkábbnak találtuk (13% vs. 32%). Az APS-re jellemző HLA-DRB1*04, DRB1*13, DQB1*0302 és DQB1*06 allélek gyakrabban fordultak elő a PAPS-es lupusos betegekben, mint a másik három vizsgált betegcsoportban, bár ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak, ami valószínűleg az egyes alcsoportokba tartozó betegek alacsony számának is tulajdonítható.

Ellentmondásosak az irodalmi adatok a tekintetben, hogy maga az antifoszfolipid szindróma, mint betegség, vagy az egyes aPL antitestek állnak-e kapcsolatban bizonyos HLA allélok eltérő gyakoriságával (75-77). Anti-kardiolipin antitest jelenlétét mi nem tudtuk összefüggésbe hozni bizonyos HLA allélok hordozásával, mivel az olyan SLE-s betegek közül, akiknél az SLE-hez antifoszfolipid szindróma is társult, egy-két kivétellel mindenki esetében kimutatható volt ezen antitest jelenléte. A β 2-glikoprotein I. ellenes antitest (β 2-GPI) esetében a DRB1*13/DQB1*06 haplotípusokkal mutattak ki pozitív asszociációt mind

kaukázusi, mind afro-amerikai betegek esetében (71,74,75) Esetünkben az anti- β 2-GPI-t a 15 betegből álló PAPS+SLE csoportban 9 személynél sikerült kimutatni, közülük 5 a DRB1*13/DQB1*06 allélokot hordozta. Nem jelenthetjük ki azonban, hogy a DRB1*13/DQB1*06 allél szoros asszociációban van az anti- β 2-GPI-vel, mivel ez az összefüggés a SAPS+SLE és a „tisztán” SLE csoportban nem volt fellelhető.

Vizsgálataink mind a négy vizsgált csoportban az összes HLA-DRB1 és DQB1 allél meghatározására irányultak. Az egy időben végzett vizsgálatok az azonos fenotípust mutató (APS-es) betegeknél jelentős különbséget az SLE specifikus allélok vonatkozásában mutattak. Elmondhatjuk, hogy mivel a PAPS-ben és SAPS-ben szenvedő betegek esetében alapvetően különböző gyakorisággal fordultak elő a kérdéses HLA-DR és HLA-DQ allélok, így valószínűleg ezek nem tehetők felelőssé a részben hasonló klinikai kép (pl. trombotikus események) kialakításáért. Az eltérő genotípusok viszont részben felelősek lehetnek a különböző klinikai manifesztációk jelentkezéséért (pl. szülészeti szövődmények száma).

Arra vonatkozóan, hogy az SLE kialakulása előtt vagy után jelentkező antifosfolipid szindróma megjelenésének időzítése mitől függ, nem rendelkezünk adatokkal. Elképzelhető, hogy egy adott HLA genotípus arra predisponál, hogy az APS előbb jelenjen meg, míg egy másik pedig arra, hogy később. Ezen összefüggésekről nem rendelkezünk információval.

Mivel a DRB1 és DQB1 allélok eltérő gyakorisággal expresszálódnak a tisztán SLE-s és a PAPS-es lupusos betegekben, arra következtethetünk, hogy ez utóbbi csoportban az APS független betegségként kapcsolódik az SLE-hez. Egyes MHC II allélok (pl. DRB1*15 és DRB1*07) tekintetében mi nem találtunk említésre méltó eltérést a négy vizsgált csoport között, szemben néhány irodalmi adattal. (66,70). Ez valószínűleg etnikai különbségeknek, vagy az eltérő aPL antitest profiloknak köszönhető.

6. Megállapítások, új eredmények, összefoglalás

A coeliakiával kapcsolatos vizsgálataink megerősítették azokat az eredményeket, melyek szerint a betegek többsége hordozza vagy a HLA-DQ2 vagy a -DQ8 allélt, mivel EMA pozitivitás esetünkben is csak az ezen allélokot hordozó pácienseknél fordult elő. A csak szövettani vizsgálat alapján coeliáciának tartott betegek 35%-ának nem volt sem HLA-DQ2 sem HLA-DQ8 allélja, náluk gluténterhelés hatására sem jelent meg szeropozitivitás, és nem történt klinikai relapszus sem. Ezáltal rávilágítottunk arra, hogy a coeliakia diagnózisának „gold standardjaként” számon tartott szövettani vizsgálatnak sok a buktatója, így a csak szövettani vizsgálat alapján felállított coeliakia diagnózis sokszor nem helytálló. Ilyen esetekben a HLA-DQ genotípus meghatározása igen fontos szerepet játszik a DQ2-DQ8 negatív betegek megtalálásában, akiknél a diagnózis revíziója indokolt gluténfogyasztás mellett. EMA pozitivitás és a szövettani vizsgálatigazolt egyértelmű boholyathrophia esetén azonban a HLA-DQ meghatározás nem szolgál extra információval.

Korábban a DEOEC Reumatológiai Tanszékén kezelt RA-s betegek HLA-DRB1 genotípusát vizsgálva azt találtuk, hogy a HLA-DRB1*04 allélek szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő a betegekben, valamint a HLA-DRB1*01 allélok előfordulása is gyakoribb a kontroll személyekhez viszonyítva, hasonlóan más kaukázusi népcsoportokhoz. Jelen munkám során a HLA-DRB1*01 szubtypusokat vizsgálva azt találtam, hogy a DRB1*01 allélek közül a DRB1*0101, DRB1*0102 és DRB1*0105 allélek fordultak elő legnagyobb számban, de gyakoriságuk a beteg és a kontroll populációban hasonló volt, azt valószínűsítve, hogy a HLA-DR1 és szubtypusai nem játszanak nagy szerepet a betegség pathogenesisében az általunk vizsgált RA-s betegek esetében. A HLA-DR4 szubtypusok tekintetében a leggyakoribb allélként számon tartott HLA-DRB1*0401 és DRB1*0404 allélok frekvenciájában nem találtunk szignifikáns különbséget a beteg és a kontroll csoport között. Ezzel ellentétben az főként ázsiai RA-s betegekre jellemző DRB1*0405, és a finn RA-s betegpopulációkra jellemző DRB1*0408 allélek előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt ezen allélek az RA pathogenesisében betöltött szerepét alátámasztva, hasonlóan a Finnországban és Ázsiában talált genetikai mintázatokhoz.

A szintén RA-s betegeket vizsgáló második munkámban megerősítettük azon eredményeket, melyek szerint kapcsolat lehet az anti-CCP antitest és a RF pozitivitás között. Új eredményként rávilágítottunk arra, hogy nem csak az anti-CCP pozitivitás, hanem az anti-

CCP antitestek szintje is összefüggésbe hozható a „shared epitópokkal” RA-s betegekben. A HLA-DRB1 allélek és az autoantitest termelés közötti szoros kapcsolat befolyásolhatja a betegség későbbi továbbfejlődését és kimenetelét. Rávilágítottunk arra, hogy az anti-CCP antitest termelése más HLA-DRB1 allélekkel, név szerint a HLA-DRB1*13 és HLA-DRB1*15 allélekkel is kapcsolatban lehet.

Az APS-val társuló és nem társuló SLE-s betegek klinikai adatainak összevetésekor intézetünk SLE munkacsoportja eltéréseket talált a három betegcsoport fenotípusában: a PAPS vagy SAPS-s betegekben gyakoriak voltak a thromboticus események és kisebb volt a gyulladási aktivitás, mint a csak lupusos betegekben, valamint vetélés leggyakrabban a primer APS-ként induló esetekben fordult elő. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy ezen eltérések hátterében állhatnak-e genetikai különbségek. Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy az SLE-re jellemző DRB1*03/DQB1*02 allélek az általunk vizsgált SLE-s betegekben is gyakoriak voltak, valamint SAPS-el szövődött betegekben is. Azokban az esetekben, ahol a betegség PAPS-el kezdődött, és ehhez társul később az SLE, teljesen eltérő allélek fordultak elő nagy gyakorisággal. Amikor a betegség SLE-vel kezdődött, és ehhez társult az APS, a betegek az SLE-re jellemző allélokot hordozták nagy számban, míg ha az APS jelentkezett először, és utána az SLE, akkor a betegek HLA-DRB1 és DQB1 genotípusa inkább az APS-re jellemző allélokot tartalmazza. Elmondhatjuk, hogy a PAPS és SAPS HLA-DRB1 és DQB1 profilja igen eltérő, így csekély szerepet játszhat a két betegség részben hasonló fenotípusának kialakításában.

Summary

Coeliac disease (CD) is strongly associated with HLA-DQ2 or DQ8 genotypes. The diagnosis of CD nowadays is based on demonstrating crypt hyperplastic villous atrophy, endomysial (EMA) or transglutaminase antibodies (anti-TG) and correlation of disease activity with gluten intake. Our aim was to evaluate the clinical utility of HLA-DQ typing when coeliac disease diagnosis had previously been established solely by histology. HLA-DQ alleles, EMA and anti-TG were investigated and histology slides reviewed in 70 patients diagnosed 2-25 years earlier by small-intestinal biopsy but without measuring EMA or anti-TG. Patients without DQ2 or DQ8 or without unequivocal villous atrophy were followed up on free diet by using serology and biopsies. We have found that all EMA/anti-TG positive patients carried DQ2 or DQ8, and had severe villous atrophy. Only 56% of patients without EMA or anti-TG positivity had DQ2 or DQ8 ($p < 0.001$). Seropositivity and relapse developed in 4 of 11 DQ2 positive but in none of 15 DQ2 and DQ8 negative patients on long-term gluten exposure. As a conclusion we can say that coeliac disease diagnosis based solely on histology is not always reliable. HLA-DQ testing is important in identifying DQ2 and DQ8 negative subjects who need revision of their diagnosis, but it does not have additive diagnostic value if EMA positivity is already known.

Certain HLA-DR1 (DRB1*01) and HLA-DR4 (HLA-DRB1*04) alleles, also known as "shared epitope"(SE), are associated with increased susceptibility to rheumatoid arthritis (RA), and may also have relevance for disease outcome. Anti-CCP antibody positivity is thought to associate with the presence of HLA-DR4 alleles in patients with RA. However, there is little information available regarding any relationship between serum anti-CCP concentrations and the SE. Therefore our aim was to determine the frequency of HLA-DR1 and -DR4 subtypes in our patients with RA in comparison to healthy control subjects, and to determine the association between anti-CCP antibody production and various HLA-DRB1 alleles. We have found, that among the HLA-DR4 subtypes, DRB1*0401 and DRB1*0404, among DR1 subtypes DRB1*0101 were the most common alleles in both groups, but there were no significant differences in their frequencies between the two examined groups. In contrast, HLA-DRB1*0405 and DRB1*0408 were significantly more common among RA patients in comparison to control subjects. Our data suggest, that in our patients, HLA-DR4, as well as its subtypes DRB1*0405 and DRB1*0408, may be involved in the susceptibility to RA, but HLA-DR1 may not. Furthermore we have found that not only the presence, but the serum concentration of anti-CCP antibody is in association with HLA-DRB1*04 alleles.

I also investigated the HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in patients with systemic lupus erythematosus (SLE only), SLE with secondary antiphospholipid syndrome (SLE+SAPS) and in those, whose clinical course began as primary APS and subsequently progressed to SLE (PAPS+SLE), searching explanation behind phenotypical differences: patients with primary or secondary APS present more thrombotic and less inflammatory activity, while fetal wastage was the highest in the PAPS+SLE group. Our results confirmed that the HLA-DRB1 and DQB1 profile of PAPS and SAPS is different, therefore it is unlikely that they are responsible for the partly similar phenotype of the two groups.

7. Irodalomjegyzék

1. Trowsdale J.: "Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* 1995; 41: 1-17.
2. Rhodes DA & Trowsdale J: Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenetics* 1999; 1:21-31.
3. Erdei A. Az immunrendszer felépítése. *Immunbiológia*. Szerk. Gergely J, Erdei A. Medicina, 1998.
4. Huges AL & Hughes MK: Natural selection on the peptide binding regions of the major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 1995; 42:233-243.
5. Stastny, P. 1978. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298: 869-871.
6. Brautbar C, Porat S, Nelken D, Gabriel KR, Cohen T. HLA B27 and ankylosing spondylitis in the Israeli population. *J Rheumatol Suppl.* 1977; 3:24-32.
7. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet.* 2003; 362:383-91.
- 8 Maki M. & Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997; 349:1755-1759.
9. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, *et al.* Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology.* 1998; 115:1322-8.
10. Burgin-Wolff A, Dahlbom I, Hadziselimovic F, Petersson CJ. Antibodies against human tissue transglutaminase and endomysium in diagnosing and monitoring coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2002; 37:685-91.
11. Korponay-Szabo IR, Halttunen T, Szalai Z, *et al.* In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut.* 2004; 53:641-8.
12. Ferguson A., Arranz E & O'Mahony S.: Clinical and pathological spectrum of coeliac disease- active, silent, latent, potential; *Gut* 1993; 34:150-151.

13. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA: The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002; 50:624-8.
14. Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:53-81.
Review
15. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003;64:469-77.
16. Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4175-9.
17. Szabolcs M, Sipka S, Csorba S. In vitro cross-linking of gluten into high-molecular-weight polymers with transglutaminase. *Acta Paediatrica Hungarica* 1987; 28 (3-4):215-227.
18. Kósnai I, Simon Z, Kárpáti S, Gyódi E, Bucsky P, Török E. [HLA antigens and morphology of the small intestinal mucosa in Dühring's juvenile dermatitis herpetiformis] *Orv Hetil* 1985;126:1649-51.
19. Karell K, Korponay-Szabó I, Szalai Zs, et al. Genetic dissection between coeliac disease and dermatitis herpetiformis in sib pairs. *Ann Hum Genet*. 2002; 66:387-92.
20. Kilián K, Miklós K, Rajczy K, et al. [Methods for screening of coeliac disease in patients attending immunological outpatient care service] *Orv Hetil*. 2003; 144:1069-76.
21. Varkonyi A, Boda M, Endreffy E, Nemeth I. Coeliac disease: always something to discover. *Scand J Gastroenterol* 1998. Suppl. 228,122-129.
22. Korponay-Szabó, I., Mäki, M.: A coeliakia-kutatás új iránya: a szöveti transzglutamináz. *Gyermekgyógyászat* 1999; 50:183-191

23. Meeuwisse, G.W.: Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand.*1970; 59:461-3.
24. Walker-Smith, J.A.,Guandalini, s., Schmitz, J.és mtsai: Reversed criteria for the diagnosis of coeliac disease. Report from a working group. *Arch.Dis.Child.* 1990; 65,909-911.
25. Kuitunen P, Kosnai I, Savilahti E. Morphometric study of the jejunal mucosa in various childhood enteropathies with special reference to intraepithelial lymphocytes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1982;1:525-31.
26. Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, et al. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17:85-91.
27. Fontaine JL, Navarro J. Small intestinal biopsy in cows milk protein allergy in infancy. *Arch Dis Child.* 1975;50: 357-62.
28. Korponay-Szabó, I., Kovács, J.B., Lőrincz, M., Gorócz, Gy., Szabados, K., Balogh, M.: Prospective significance of antiendomysium antibody positivity in subsequently verified coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*1997; 25: 56-63
29. Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 332: 1277-87.
30. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ, The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 801-6.
31. Gregersen PK, Silver J, Winchester RF. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-13.
32. Bálint G., Ifj. Gergely P., Rheumatoid arthritis. *Klinikai immunológia.* Szerk. Petrányi Gy. *Medicina*, 2000; 441.

33. Hassfeld W, Steiner G, Graninger W, Witzmann G, Schweitzer H, Smolen JS. Autoantibody to the nuclear antigen RA33; a marker for early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1993;32:199–203.
34. Deprés N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Ménard HA. The SA system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994;21: 1027–33.
35. Nienhuis RLF, Mandema EA. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: the antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964;23:302–5.
36. Visser H, Gelinck LB, Kampfraath AH, Beedveld FC, Hazes JM. Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assay in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:157–61.
37. Pepys MB. C-reactive protein: the role of an ancient protein in modern rheumatology. *Clin Exp Rheumatol* 1983; 1:3–7.
38. Schellenkens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ., van de Putte LBA, van Verooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognised by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101:273–81.
39. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000;43:155–63
40. Nielen MM, Van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50:380–6.
41. Forslind K., Ahlmén M., Eberhardt K., Hafström I., Svensson B; for the BARFOT Study Group. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in a clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1090–5.

42. Laivoranta-Nyman, S., Mottonen, T., Hermann, R., Tuokko, J., Luukkainen, R., Hakala, M., Hannonen, P., Korpela, M., Yli-Kerttula, U., Toivanen, A. & Ilonen, J. HLA-DR-DQ haplotypes and genotypes in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2004; 63: 1406-1412.
43. Lee, H.S., Lee, K.W., Song, G.G., Kim, H.A., Kim, S.Y. & Bae, S.C. Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3468-3475.
44. Gorman, J.D., David-Vaudey, E., Pai, M., Lum, R.F. & Criswell, L.A. Particular HLA-DRB1 shared epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3476-3484.
45. Agrawal, S., Aggarwal, A., Dabadghao, S., Naik, S. & Misra, R. Compound heterozygosity of HLA-DR4 and DR1 antigens in Asian Indians increases the risk of extra-articular features in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1995; 34: 41-44.
46. Seidl, C., Koch, U., Buhleier, T., Frank, R., Möller, B., Markert, E., Koller-Wagner, G., Seifried, E. & Kaltwasser, J.P. HLA-DRB1*04 subtypes are associated with increased inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1997; 36: 941-944.
47. Citera, G., Padulo, L.A., Fernandez, G., Lazaro, M.A., Rosemffet, M.G. & Cocco A.M. Influence of HLA-DR alleles on rheumatoid arthritis: susceptibility and severity in Argentine patients. *J. Rheumatol.* 2001; 28: 1486-1491.
48. Varga, É., Palkonyai, É., Temesvári, P., Tóth, F. & Petri, I.B. The role of HLA-DRB1*04 alleles and their association with HLA-DQB genes in genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Acta Microbiol. Immunol.* 2003; Hung. 50: 33-41.
49. Hameed, K., Bowman, S., Kondeatis, E., Vaughan, R., & Gibson, T. The association of HLA-DRB genes and the shared epitope with rheumatoid arthritis in Pakistan. *Br. J. Rheumatol.* 1997; 36: 1184-1188.

50. Van Jaarsveld, C.H.M., Otten, H.G., Jacobs, J.W.G., Kruize, A.A., Brus, H.L.M. & Bijlsma, J.W.J. Association of HLA-DR with susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis: re-evaluation by means of genomic tissue typing. *Br. J. Rheumatol.* 1998; 37: 411-416.
51. Hong, G.H., Park, M.H., Takeuchi, F., Oh, M.D., Song, Y.W., Nabeta, H., Nakano, K., Ito, K. & Park, K.S. Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value. *J. Rheumatol.* 1996; 23: 1699-1703.
52. Boki, K.A., Panayi, G.S., Vaughan, R.W., Drosos, A.A., Moutsopoulos, H.M., Lanchbury, J.S. HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks: the HLA-DR β shared-epitope hypothesis accounts for the disease in only a minority of Greek patients. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 749-755.
53. Willkens, R.F., Nepom, G.T., Marks, C.R., Nettles, J.W., Nepom, B.S. Association of HLA-Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the "shared epitope" hypothesis. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 43-47.
54. Wordsworth, B.P., Lanchbury, J.S., Sakkas, L.I., Welsh, K.I., Panayi, G.S., Bell, J.I. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989; 86: 10049-10053.
55. Watanabe, Y., Tokunaga, K., Matsuki, K., Takeuchi, F., Matsuta, K., Maeda, H., Omoto, K., Juji, T. 1989. Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis susceptibility. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 2263-2268.
56. Molkenin, J., Gregersen, P.K., Lin, X., Zhu, N., Wang, Y., Chen, S., Baxter-Lowe, L.A., Silver, J. Molecular analysis of HLA-DR beta and DQ beta polymorphism in Chinese with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1993; 52: 610-612.

57. de Vries, N., Ronningen, K.S., Tilanus, M.G., Bouwens-Rombouts, A., Segal, R., Egeland, T., Thorsby, E., van de Putte, L.B., Brautbar, C. HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype. *Tissue Antigens*.1993; 41: 26-30.
58. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2113–21.
59. Irigoyen P, Lee AT, Wener MH, et al. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 2005;52:3813–8.
60. van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, et al. Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:822–30.
61. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JMW. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:357–65.
62. Gergely P. SLE és rokon kórképek. *Klinikai Immunológia*. Szerk. Petrányi Gy. Medicina, 2000.:429-439.
63. Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Weksler ME, Fotino M, Christian CL. Proceedings: Twin studies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum*. 1975 May-Jun; 18(3):285.
64. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy Burman P, Walker A, Mack TM. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1992. Mar; 35(3):311-8.

65. Tarr,T., Shoenfeld, Y., Kiss, E., et al. Primary antiphospholipid syndrome as the forerunner of systemic lupus erythematosus. *Lupus*.2007; 16:324-328.
66. Graham, R.R. et al. Visualising human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71:543-553.
67. Arnett, FC. The genetics of human lupus. In Dubois' *Lupus Erythematosus*, 5th ed. Edited by Wallace DJ, Hahn BH. Baltimore: Wilkins and Wilkins 1997: 77-117.
68. Galeazzi, M., Sebastiani, GD., Morozzi, G., et al. HLA class II DNA typing in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 169-78.
69. Skarsvåg, S., Hansen, KE., Holst A., Moen, T. Distribution of HLA class II allels among Scandinavian patients with systemic lupus erythematosus (SLE): an increased risk of SLE among non (DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201) class II homozygotes? *Tissue Antigens*, 1992; 40 (3): 128-33.
70. Endreffy, E., Kovács, A., Kovács, L., Pokorny, G., HLA class II allele polymorphism in Hungarian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:1017-1018.
71. Castano-Rodríguez, N., Diaz-Gallo, LM., Pineda-Tamayo, R. et al. Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus.*Autoimmun* 2008. Rev. 7 (4):322-30.
72. Rezaieyazdi, Z., Tavakkol-Afshari, J., Esmaili, E. et al. Association of HLA-DQB1 allelic sequence variation with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008;. 7 (2):91-5.
73. Sebastiani, GD., Minisola G., Galeazzi, M., 2003. HLA class II alleles and genetic predisposition to the antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews*. 2003; 2:387-394.

74. Grumet FC, Conkell A, Bodmer JC, Bodmer WF, McDevitt HO: Histocompatibility (HLA) antigens associated with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1971, 285:193-196.
75. Galeazzi, M., Sebastiani, GD., Tincani, A., et al. HLA class II alleles associations of anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*,2000; 9(1):47-55
76. Sebastiani, GD., Galeazzi, M., Morozzi, G., Marcolongo, R., The immunogenetics of the antiphospholipid syndrome, anticardiolipin antibodies, and lupus anticoagulant. *Semin Arthritis Rheum.* 1996; 25 (6): 414-20.
77. Hartung, K., Coldewey, R., Corvetta, A., et al. MHC gene products and anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus results of a multicenter study. SLE Study Group.1992; *Autoimmunity.* 13(2):95-9.
78. Arnett, FC., Thiagarajan, P., Ahn, C., Reveille, JD., Association of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies with HLA class II alleles in three ethnic groups. *Arthritis Rheum.*1999; 42 (2):268-74.
79. Caliz, R., Atsumi, T., Kondeatis, E., et al. HLA class gene polymorphisms in antiphospholipid syndrome: haplotype analysis in 83 Caucasoid patients. *Rheumatology.* 2001; 40:31-6.
80. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
81. Olerup, O. & H. Zetterquist. HLA typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-235.

82. Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K, Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut* 1994; 35:776-8.
83. Ambrus A, Banyai I, Weiss MS, et al. Calcium binding of transglutaminases: a ⁴³Ca NMR study combined with surface polarity analysis. *J Biomol Struct Dyn*. 2001;19:59-74.
84. Korponay-Szabó IR, Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmány E, Nemes E, Kaukinen K, Kapitány A, Koskinen L, Sipka S, Imre A, Mäki M.: Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. *BMJ*. 2007 Dec 15;335(7632):1244-7.
85. Kaukinen K, Peraaho M, Collin P, et al. Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40:564-72.
86. Kwiecien J, Karczewska K, Lukasik M, et al. Negative results of antiendomysial antibodies: long term follow up. *Arch Dis Child*. 2005;90:41-2.
87. Kaukinen K, Partanen J, Maki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:695-9.
88. Moustakas AK, Papadopoulos GK: Molecular properties of HLA-DQ alleles conferring susceptibility to or protection from insulin-dependent diabetes mellitus: keys to the fate of islet beta-cells. *Am J Med Genet*. 2002;115:37-47.
89. Hogberg L, Stenhammar L, Wagermark J. Very late mucosal relapse in a girl with coeliac disease. *Acta Paediatr* 1993.;82: 887-9.
90. McCrae WM, Eastwood MA, Martin MR, Sircus W. Neglected coeliac disease. *Lancet*. 1975;1 (7900):187-90.
91. Kaur G, Sarkar N, Bhatnagar S, Kumar S, Rappaport CC, Bhan MK, Mehra NK: Pediatric celiac disease in India is associated with multiple DR3-DQ2 haplotypes. *Hum Immunol*. 2002;63:677-82.

92. van Belzen MJ, Koeleman BP, Crusius JB, et al. Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes Immun.* 2004 May;5(3):215-20.
93. Dezsofi A, Szebeni B, Hermann Cs, Kapitany A, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó IR, Rajczy K, Arató A: Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA-DQ genotypes in children with celiac disease, type 1 diabetes mellitus, or both *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008 Sep;47(3):283-7.
94. Korponay-Szabo IR, Laurila K, Szondy Z. et al. Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. *Gut* 2003; 52:199-204.
95. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engström A, Venables PJ, Lundeberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmström V. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis.* 2009 May;68(5):736-43.
96. Sanmartí R, Gómez-Centeno A, Ercilla G, Larrosa M, Viñas O, Vazquez I, Gómez-Puerta JA, Gratacós J, Salvador G, Cañete JD. Prognostic factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a two year prospective study after a structured therapeutic strategy using DMARDs and very low doses of glucocorticoids. *Clin Rheumatol.* 2007 Jul;26(7):1111-8.
97. Fries JF, Wolfe F, Apple R, et al. HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 2002;46:2320–9.
98. Charpin C, Balandraud N, Guis S, Roudier C, Toussiroit E, Rak J, Lambert N, Martin M, Reviron D, Roudier J, Auger I. HLA-DRB1*0404 is strongly associated with high titers of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008 Jul-Aug;26(4):627-31.

99. Lee HS, Irigoyen P, Kern M, Lee A et al. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in the three large North American rheumatoid arthritis cohort. *Arthritis Rheum* 2007; 56(6):1745-53.
100. van der Helm-van Mil AH, Verpoort Kn, le Cessie S et al. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2007; 56(2):425-32.
101. Mewar D, Marinou I, Coote AL, Moore DJ, Akil M, Smillie D, Dickson MC, Binks MH, Montgomery DS, Wilson AG. Association between radiographic severity of rheumatoid arthritis and shared epitope alleles: differing mechanisms of susceptibility and protection. *Ann Rheum Dis*. 2008 Jul;67(7):980-3.
102. Kiss, E., Csípő, I., Cohen, JH., et al. CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 1996; 25(1):53-8.
103. Illei, GG., Tackey, E., Lapteva, L., Lipsky, PE., Biomarkers in systemic lupus erythematosus I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthritis Rheum* 2004; 50(6):1709-20.

8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kapitány A.**, Korponay-Szabó I., Tóth L., Tumpek J., Csípő I., Niina W., Jukka P., Szegedi Gy., Sipka S.: HLA-DQ allélek diagnosztikus jelentősége szuboptimális módon felállított coeliakia diagnózis esetén
Gyermekgyógyászat 55(4) 443-447. 2004 **IF:0**

2. **Kapitány A**, Tóth L, Tumpek J, Csípo I, Sipos E, Wooley N, Partanen J, Szegedi Gy, Oláh É, Sipka S, Korponay-Szabó IR: Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone
Alimentary Pharmacology and Therapeutics Nov. 2006. Vol. 24. Issue 9. Page 1395-1402.

IF:3,287

3 **Kapitány A**, Szabó Z, Lakos G, Aleksza M, Végvári A, Soós L, Karányi Z, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z.: Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis.
Isr Med Assoc J. 2008 Jan;10(1):32-6. **IF: 0,51**

4. **Kapitány A**, Tarr T, Szodoray P, Gyetvai Á, Poór Gy, Szegedi Gy, Sipka S, Kiss E.
Human Leukocyte Antigen-DRB1 and -DQB1 genotyping in lupus patients with and without antiphospholipid syndrome
Ann N Y Acad Sci; 2009 közlésre elfogadva **IF:1,73**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 5,527

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

5. **Kapitány A**, Zilahi E, Szanto S, Szucs G, Szabo Z, Vegvari A, Rass P, Sipka S, Szegedi Gy, Szekanecz Z.: Association of Rheumatoid Arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary.

Ann N Y Acad Sci; 2005 jun 1051:263-70.

IF:1,93

6. Korponay-Szabó IR, Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmány E, Nemes E, Kaukinen K, **Kapitány A**, Koskinen L, Sipka S, Imre A, Mäki M.: Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study.

BMJ. 2007 Dec 15;335(7632):1244-7.

IF: 9,245

7. Dezsofi A, Szebeni B, Hermann Cs, **Kapitány A**, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó IR, Rajczy K, Arató A: Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA-DQ genotypes in children with celiac disease, type 1 diabetes mellitus, or both J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008 Sep;47(3):283-7.

IF: 2,067

Egyéb közlemények:

8. Zsilak S, Gal J, Hodinka L, Rajczy K, Balog A, Sipka S, Barath S, **Kapitány A**, Zilahi E, Szekanecz Z: HLA-DR genotypes in familial rheumatoid arthritis: increased frequency of protective and neutral alleles in a multicase family

J Rheumatol. 2005 Dec;32(12):2299-302.

IF:2,217

9. Szanto A, Szodoray P, Kiss E, **Kapitány A**, Szegedi Gy, Zeher M

Clinical, Serologic, and Genetic Profiles of Patients With Associated Sjögren's Syndrome and Systemic Lupus Erythematosus

Hum Immunol. 2006 Nov;67(11):924-30.

IF: 2,66

10. Szücs G, Szekanecz Z, Zilahi E, **Kapitány A**, Baráth S, Szamosi S, Végvári A, Szabó Z, Szántó S, Czirják L, György Kiss C.: Systemic sclerosis-rheumatoid arthritis overlap syndrome: a unique combination of features suggests a distinct genetic, serological and clinical entity.

Rheumatology (Oxford). 2007 Jun;46(6):989-93.

IF: 4,052

11. Soós L, Szekanecz Z, Szabó Z, Fekete A, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, **Kapitány A**, Végvári A, Sipka S, Szegedi G, Lakos G.: Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis.

J Rheumatol. 2007 Aug;34(8):1658-63.

IF: 2,94

12. Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, **Kapitány A**, Végvári A, Sipka S, Szücs G, Szántó S, Lakos G.: Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: As Good as it Gets?

Clin Rev Allergy Immunol. 2008 Feb;34(1):26-31.

IF: 1,677

13. Papp M, Foldi I, Nemes E, Udvardy M, Harsfalvi J, Altorjay I, Mate I, Dinya T, Varvolgyi C, Barta Z, Veres G, Lakatos PL, Tumpek J, Toth L, Szathmari E, **Kapitány A**, Gyetvai A, Korponay-Szabo IR.: Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations.

Clin Chem. 2008 Apr;54(4):697-704.

IF: 5,454

14. Nemes É, Lefler É, Szegedi L, **Kapitány A**, B. Kovács J., Balogh M, Szabados K, Tumpek J, Sipka S, Korponay-Szabó IR.: Gluten intake interferencies with the humoral immune response to recombinant hepatitis B vaccine in patients with celiac disease

Pediatrics 2008 Jun;121(6):e1570-6.

IF:5,012

15. Lakos G., Soós L, Fekete A, Szabó Z, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, **Kapitány A**, Gyetvai A, Szegedi G, Szekanecz Z: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope

Clin Exp Rheumatol 2008 Jun;26:253-260.

IF:2,189

16. Szodoray P, Szabó Z, **Kapitány A**, Gyetvai Á, Lakos G, Szántó S, Szűcs G, Szekanecz Z: Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. (2009) *Autoimmun Rev.* Epub. 2009. May 6. **IF:3,706**

Kumulatív impakt faktor: 48,763

Lektorált folyóiratban megjelenő, idézhető absztraktok:

Kapitány A., Zilahi E., Baráth S., Rass P., Sipka S., Szekanecz Z.: HLA-DR gének szerepe rheumatoid arthritisben 2003. *AKI*, VI/ 3. 110

Kapitány A., Korponay-Szabó I., Sipka S.: A HLA-DQ-tipizálás jelentősége a coeliakia diagnózisában. *Magyar Immunológia* 2003/3

G. Szűcs, Z. Szekanecz, E. Zilahi, A. Kapitány, S. Szántó, C. Kiss, Z. Nagy, L. Czirják
Scleroderma -rheumatoid arthritis overlap syndrome: association of genetic and clinical characteristics *Tissue Antigens* 2004; 64:403.

S. Sipka, A. Kapitány, J. Tumpek, I. Csípő, L. Tóth, G. Szegedi, I. Korponay-Szabó
Diagnostic significance of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 testing in patients with coeliac disease *Tissue Antigens* 2004; 64:406.

A. Kapitány, E. Zilahi, P. Rass, S. Baráth, L. Gáspár, S. Sipka, G. Szegedi, Z. Szekanecz
Association of rheumatoid arthritis with HLA-DRB genotypes in north-eastern Hungary *Tissue Antigens* 2004; 64:429.

Szűcs G, Czirják I., Zilahi E, Kapitány A, et al. Scleroderma-rheumatoid overlap syndrome: A distinct genetic and clinical entity? *Arthritis and Rheumatism* 2005; 52(9):431.

Ponyi A, Constantin T, Kapitány A, Aleksza M, Lakos G, Varga Z, Moldovanyi I, Garami M, Németh I, Dankó K: Evaluation of myositis-associated autoantibodies and HLA class II association in adult onset idiopathic inflammatory myopathies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006; 65:257.

Lakos G, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Zeher M, Horváth I, Dankó K, Kapitány A, Szegedi G, Sipka S, Szekanecz Z: Antibodies directed against mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) are more sensitive serological markers of rheumatoid arthritis than anti-CCP.

Annals of the Rheumatic Diseases 2006; 65:151.

Constantin T, Toldi-Nagy A, Kapitany A, Gyetvai Á, Nemeth J, Dajnoki A, Ponyi A, Danko K: Immunogenetic investigations in patients with adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies, preliminary results. Pediatric blood & Cancer 2007; 49(3):384.

Constantin T, Ponyi A, Toldi-Nagy A, Kapitany A, Gyetvai Á, Dankó K: Immunogenetic studies in hungarian patients with idiopathic inflammatory myopathies.

Annals of the Rheumatic Diseases 2007; 66:244-245.

9. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom Prof. Dr. Zeher Margitnak, a III.sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának és Prof. Dr. Szegedi Gyula akadémikus úrnak, hogy munkalehetőséget biztosítottak számomra, és ezáltal lehetővé tették, hogy a Ph.D. dolgozatomat a III.sz. Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumában megírjam.

Köszönöm Prof. Dr. Sipka Sándornak, a Regionális Immunológiai Laboratórium, szűkebb munkahelyem vezetőjének és egyben témavezetőmnek a molekuláris biológiai módszerek bevezetéséhez nyújtott támogatását, a kollaborációs tervek elkészítésében, az eredmények feldolgozásában, valamint a dolgozatom koncepciójának, szerkezetének kialakításában nyújtott szakmai és emberi segítségét, támogatását, biztatását.

Köszönöm Dr. Korponay-Szabó Ilmának, Prof. Dr. Szekanecz Zoltánnak és Dr. Kiss Emesének a több éves kollaborációt, valamint a dolgozat alapjait alkotó közleményekhez nyújtott maximális szakmai segítséget, útmutatást.

Köszönettel tartozom a Regionális Immunológiai Laboratórium minden tagjának a sok-sok segítségért és támogatásért, melyet az évek során kaptam. Külön szeretném megköszönni a molekuláris biológiai részleg volt és jelenlegi aszisztenseinek a segítségét, név szerint Deák Györgynének, Bíróné Barna Krisztinának, Nagy Andreának.

Köszönöm Dr. Tumpek Juditnak és Dr. Baráth Sándornak.

Köszönöm szüleimnek, férjemnek és kislányomnak a szeretetet, biztatást és türelmet.