

Válasz dr Lonovics Jánosnak

Köszönöm dr Lonovics Jánosnak, hogy értekezésem bírálatát elvállalta, valamint nagyon köszönöm elismerő szavait és pozitív értékelését.

A feltett 4 kérdésre az alábbiakban válaszolok:

1. *kérdés: A definitív szöveti károsodás (boholyatrófia) létrejöttében a jelölt által is feltárt humoralis vagy a cellularis immunmechanizmus szerepe a döntőbb patogenetikai tényező, ha egyáltalán ilyen distinkció tehető?*

A crypta hyperplasiával járó boholyatrófia a bél olyan általános patológiás reakciója a felszínt károsító noxákra, mely gyulladásos folyamatokra vagy ischaemiás állapotokra jellemző. Ismeretes, hogy a magzati életben a vastagbélben is hasonló bolyhok vannak, és a lapos felszín a bakteriális kolonizáció után alakul ki. A coeliakiához feltűnően hasonló boholyatrófia létrehozható állatokban rotavírus fertőzéssel vagy gyulladásokkeltővel, de önmagában CD4+ aktivált gliadin-specifikus T limfocitákkal nem. Ez arra utal, hogy kialakulásában a gyulladásos komponens fontosabb szerepet játszhat. Mivel a graft versus host reakcióban is megfigyelhető boholyatrófia, kezdetben az a nézet terjedt el, hogy coeliakiában a boholyatrófia kizárólag az adaptív, T-sejtes immunválasz által generált gyulladás következménye. Ezt látszott alátámasztani a magas intraepitheliális limfocita szám és egy olyan esetközlés 1981-ben (Webster AD és mtsai, Gut 1981;22:153-7), mely coeliakiát ír le egy agammaglobulinaemiás betegnél. Erről a betegről azonban később kimutatták, hogy állapota mégsem glutendependens volt. Az intraepitheliális limfocitákat ma már a veleszületett immunitás részének tartják, valamint ugyancsak a veleszületett immunreakcióból származó magas interleukin 15 szint biztosításával lehetett az állatkísérletekben közepes vagy súlyosabb boholykárosodást provokálni gliadin-specifikus immunreakció után.

Ezért úgy tűnik, hogy a sejtes immunválasz önmagában nem hozza létre a boholyatrófiát, viszont a transzglutamináz elleni antitestek kialakulása feltételezi az előzetes helper T-sejtes működést, így az antitestek önálló hatásának in vivo vizsgálata nehéz. Az anyai antitestek passzív transzfere esetén az újszülöttnél hasmenést és májkárosodást észleltünk, de sajnos nem volt lehetőségünk biopsziás mintavételre és a boholyatrófia bizonyítására. Ugyancsak aránylag szerény boholykárosodás alakult ki nude egerekben a coeliakiás antitestek 8 illetve 28 napig történő adása után. Meg kell azonban jegyezni, hogy az újszülöttbe csak az anyai IgG antitestek kerültek át, míg a coeliakiás vékonybélben IgA antitestek, IgA hiányos betegekben pedig IgM antitestek rakódnak le (Borrelli M és mtsai, Clin Exp Immunol. 2010;160:199-206). Az athymikus (nude) egerekkel végzett kísérletek is coeliakiás IgG-vel történtek, mivel a beadott IgA az egerek hiányzó IgA receptora folytán nem került a szisztémás keringésbe.

A coeliakia autoantitestek in vitro csökkentik az endothel sejtek migrációját és az értubulusok képződését. Coeliakiában az autoantitestek az erek mentén rakódnak le és a boholyatrófia fennállása idején a vékonybél nyálkahártya érszerkezete súlyosan átépült és csökevényes, mely vérellátási zavarral járhat. Pancreasfejtéknél, ahol a duodenum vérellátását fél-egy órára lefoglalják, a coeliakiához hasonló boholyatrófia, gyulladás és crypta megnyúlás, ennél hosszabb vérellátási zavar esetén súlyos necrosis alakul ki. Ezek az adatok arra utalnak, hogy coeliakia esetén egy limitált ischaemiás tényező is fennállhat, mely a T-sejtes reakcióhoz csatlakozva

jelentős károsodást okozhat. Az antitestek oki szerepét támogatják azok az újabb megfigyeléseink, hogy 1-2 hetes glutenexpozíció után, amikor az antitest lerakódás még foltos, a több antitestet tartalmazó bolyhok károsodnak és eliminálódnak, és a transzglutaminázban szegény mélyebb terület szélesedik ki. Mindezek alapján úgy gondolom, hogy az antitestek hatása a boholyatrophia kialakulásában legalább annyira jelentős, mint a T-sejtes reakció.

Az egerekkel végzett kísérletek összességében elégtelen modellt jelentő eredményei felvetik azt a lehetőséget is, hogy a coeliakiára predisponáló genetikai adottságok is elősegíthetik a tipikus boholykárosodás kialakulását. A coeliakiás betegek köldökzsínójából izolált endotél sejtek ugyanis sérülékenyebbek és nehezebben tenyészthetők, mint a normál egyedekből származó sejtek.

Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a T-sejtes reakció inkább trigger szerepet tölt be, mely a veleszületett immunitással generált gyulladás és az antitestek effektor működésével erősítve hozza létre a boholyatrófiát egy feltehetően genetikailag is predisponált személyben.

2. kérdés: *Ha a kalcium in vivo körülmények között is kulcsszerepet játszik az enzimaktivitásért felelős konformációváltozásban, van-e adat arra, hogy a szignalizációhoz szükséges kalcium forrása az extracellularis térből vagy az intracellularis raktárakból származik?*

A TG2 antigén *in vitro* már alacsony koncentrációjú kalcium (3-4 μM) jelenlétében felveheti a transzamidáló enzimműködéshez szükséges konformációt és vizsgálatainkból úgy tűnik, hogy ezt követően a megkötött kalcium már később sem távolítható el róla (Király és mtsai FEBS J. 2009; 276:7083-96). Az extracelluláris térben a kalcium koncentráció elegendően magas ahhoz, hogy az enzim kalcium-kötött formában legyen jelen. Az adatok azonban ellentmondók, hogy ilyenkor tényleg automatikusan felveszi-e az ún. nyitott alakzatot is, vagy az csak a szubsztrát megkötése folytán időlegesen alakul ki. Egyes *in vivo* vizsgálatokkal azt találták, hogy az extracelluláris térben nyitott konformációjú enzim csak gyulladás hatására képződik (Siegel PLoS One. 2008;3(3):e1861). Az intracelluláris térben G proteinként működő transzglutamináz magnéziumot használ kofaktorként, és főleg a szívben zajló adrenerg folyamatok mediálása során játszik szerepet. A GTP/GDP megkötése negatívan befolyásolja az enzim kalcium kötését is. A transzglutamináz keresztkötő enzimműködése a hagyományos elképzelés szerint az intracelluláris térben, legalábbis a citoplazmában, normál körülmények között gátolt állapotban van a magas GDP és alacsony kalcium koncentráció miatt (Smethurst és Griffin, Biochem J. 1996;313,803-808). Celluláris stressz folyamatok (hypoxia, glukóz hiány, UV besugárzás) és apoptózis során az intracelluláris kalcium koncentráció megemelkedhet a mitochondriumokban és az endosplasmás reticulumban sequestrált kalcium beáramlása folytán, e folyamatok során emelkedett transzglutamináz keresztkötő aktivitást mutattak ki.

Elképzeltető azonban, hogy bizonyos intracelluláris kompartmentekben időlegesen, lokalizáltan és szabályozott formában a transzglutamináz kalciumhoz jusson és aktiválódhasson, főként a mitochondriumokban vagy a sejtadhézió során, esetleg a kalcium pumpák közvetlen közelében. A sejt differenciálódás során, idegrendszeri folyamatokban vagy a béta sejtekben az inzulin termelés kapcsán fiziológiás módon is aktiválódhat az enzim, legalábbis a transzglutamináz keresztkötő működésének végtermékei kimutathatók. Feltételezik, hogy egyes sejtfehérjékkel való kapcsolódás szenzitizálhatja az enzimet, hogy alacsony kalcium koncentráció esetén is működjön. Ilyen lehet például a calreticulin kalcium kötő fehérje, mely a G-protein működés

során a transzglutamináz egyik szabályozó alegysége és az enzim számára ellenőrzött formában kalciumot adagolhat.

Az enzim nyitott konformációjára specifikus antitestekkel saját vizsgálatainkban a citoskeletonhoz asszociált és az adhézis komplexekben jelen lévő transzglutamináz jelölődött. Más kutatócsoportok újabb vizsgálatok során lehetővé vált FRET módszerrel és különféle kalcium szenzorokkal is az *in vivo* kalcium változások és a transzglutamináz funkció monitorizálása. Ennek alapján az intracelluláris transzglutamináz döntően a csukott konformációban van, míg celluláris stressz alatt megjelenik a nyitott forma is (Caron és mtsai, PLoS One 2012;7:e44159). Kimutatták azt is, hogy Caco2 sejtkultúrában anti-transzglutamináz antitestek hozzáadása után az intracelluláris kalcium koncentráció megemelkedik, mely részben az endoplazmatikus reticulumból, részben a mitochondriumokból származik (Caputo és mtsai Amino Acids. 2013;44:251-60). Ugyanezek a szerzők azt is leírták, hogy a 31-43. aminosavakat tartalmazó gliadin peptid hatására mind a mitochondriumokból, mint az endoplazmás reticulumból, míg az 57-68. aminosavakat tartalmazó gliadin peptid hatására csak a mitochondriumokból mobilizálódik kalcium (Caputo és mtsai PLoS ONE 7: e45209).

3. *kérdés: Refluxos tünetek, gastritis és colitis miatt vizsgált coeliakiás betegek nyelőcsővéből, gyomrából és vastagbéléből vett biopsziás mintákban is kimutatható volt a TG2 elleni antitestek lerakódása. A kérdés, hogy a fenti, aránylag jól definiált etiológiájú kórképekben a TG2 ellenes antitesteknek van-e egyáltalán patogenetikai szerepe, vagy egyszerűen arról van szó, hogy ezen coeliakia antitestek kötődnek minden olyan szervhez, amelyben a TG2 jelen van?*

Valószínűleg igaz az, hogy a coeliakia autoantitestek kötődnek minden extracellulárisan hozzáférhető TG2 antigénhez, bármely szervben is van. Az antitestek kötődése a bazálmembrán alatt gyulladásos folyamatokat, vérellátási zavarokat, az izomrostok körüli endomysium antitest lerakódás pedig motilitási problémákat okozhat, annak ellenére, hogy az emésztőtraktus egyéb részein olyan súlyos szerkezeti átépülés nem jön létre, mint a vékonybélben. Ezekben a szervekben, strukturális adottságaiknál fogva, a felszín csökkenése helyett inkább ulceráció alakulhat ki ugyanazokra a károsító hatásokra. Cucchiara és mtsai 1995-ben manometriás vizsgálatokkal igazolták coeliakiás betegekben a felső emésztőtraktus dysmotilitását és azt is, hogy a glutenmentes diéta mellett ez reverzibilis volt (Cucchiara és mtsai J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1995;21:435-42). Mások azt is kimutatták, hogy coeliakiás betegekben gyakoribb volt a gastritis és az ulceráció is (Eltumi és mtsai, Gut. 1996;39:613– 614, Nenna és mtsai, J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012;55:728-32.), bár ezekben a vizsgálatokban az érintett szervekben nem vizsgálták az antitestek jelenlétét. Az emésztőtraktus egyéb részein kialakuló károsodások éppúgy lehetnek hosszú ideig tünetmentesek, mint a nyilvánvaló kórjelnek tartható boholyatrófia, de pl. refluxos tünetek megjelenését provokálja a puffadás, fokozott gázképződés vagy az enteropathia miatt csökkent enterohormon termelés által okozott gyomorürülési zavar is. A klinikai tapasztalat szerint az egyéb emésztőszervi tünetek a betegek egy részében enyhülhetnek a coeliakia kezelése után. Saját colitis miatt vizsgált coeliakiás betegeinknél a vezető tünet véres széklet volt, de a gyulladásos aktivitási jelek párhuzamot mutattak a glutenfogyasztással és antitest lerakódással: glutenmentes diéta után eltűntek szteroid kezelés nélkül is, majd glutenterhelésre ismét kialakultak. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a coeliakia maga is okozhat gasztro-oesophagealis refluxot, gastritist és colitist. Véleményem szerint a

lerakódott antitestek hozzájárulhatnak ezeknek a tüneteknek a kialakulásához, bár ennek egyértelmű bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

4. *A nem humán monoklonális anti-TG2 kompetitor antitest feleslegben képes volt a coeliakia antitesteket a szöveti kötőhelyekről leszorítani és ezen antitestek káros biológiai hatásait gátolni in vitro körülmények között. Ennek valóban lehet-e reális terápiás konzekvenciája, vagy inkább a coeliakia antitestek patogenetikai szerepének további tisztázásában van jelentősége?*

Egyetértek a tisztelt bírálóval abban, hogy a coeliakia kezelésében a glutenmentes diéta feltétlenül prioritást kell hogy élvezzen, hiszen messzemenően hatásos és ártalmatlan eljárásról van szó, amely a lényegi kóroki tényezőt, a glutent eliminálja. A betegek azonban egyértelműen sürgetik alternatív és könnyebb kezelési eljárások kidolgozását, mivel a diétát a kellő hatás érdekében az egész élet folyamán és nap mint nap pontosan tartani kell, és ez az életvezetést jelentős mértékben negatívan befolyásolja, számos korlátozással, egyes országokban szociális megkülönböztetéssel is jár.

A diéta csak konzekvens betartás, jó compliance esetén ad kellő eredményt, és a klinikai gyakorlatban gyakori, hogy tartósan kimutathatók maradnak immunológiai aktivitási jelek, szeropozitivitás, vagy más betegségi jelek (pl. vashiány, elégtelen növekedés, osteoporosis), főként diétahibák miatt. Jellemző, hogy ezeknek a betegeknek a többsége már nem érez kellemetlen tüneteket, ezért - a jelentős klinikai tünetek elmúlása után - nem is motivált arra, hogy pontosabban tartsa a diétát, viszont orvosi indikáció lenne effektívebb kezelésre. Az egyes európai országok gyakorlatában 50% (Olaszország, Franciaország) és 90% (Finnország, Skandinávia) között változik a valóban jó diétát folytató coeliakiás betegek aránya, az Amerikai Egyesült Államokban általában alacsonyabb, mint Európában.

A coeliakia kezelésére az utóbbi években többféle módszert is javasoltak, pl. a gluten hasítását microbiális enzimekkel, a gluten hámsejteken való átjutásának gátlását a zonulin gátlásával, a HLA-DQ molekulák blokkolását vagy a velünk született immunitás egyes tényezőinek, pl. az interleukin 15-nek a gátlását. Ezek hatásosságáról még nincs kellő klinikai bizonyítékunk. Mivel a vizsgálataink során talált nem-humán antitest a minden betegben kimutatható fő transzglutamináz epitóphoz kötődve képes interferálni az antitestek biológiai hatásával, míg eddig káros saját hatását nem észleltük, a coeliakiás antitestek leszorítása a szövetekről terápiás hatást jelenthet. Ez a hatás potenciálisan olyan analógokkal is elérhető, melyek az antitest kötőhelyének mimotópjai; ezek orálisan ható kis molekulák is lehetnek. Ma már számos, a gyulladás effektor molekuláit vagy citokineket befolyásoló monoklonális antitesttel, biológiai kezeléssel érték el terápiás hatást. Így a disztális működési mechanizmus még nem zárja ki, hogy a coeliakia autoantitestek kötődésének gátlása értelmetlen lenne, hiszen az in vitro sejtbiológiai vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy az antitestek résztvesznek a bélrendszeri patológiai történésekben, extraintesztinális manifesztációk kialakításában. Ez a hatásmechanizmus azonban nem gátolná meg a T-sejtes reakció további fennállását és esetleges citotoxicitását. Azt sem lehet jelenleg tudni, hogy a le nem kötődött antitestek milyen egyéb kedvezőtlen hatást okoznának, pl. immunkomplex képződést vagy vesekárosodást. Azonban ha figyelembe vesszük azt, hogy a fő transzglutamináz epitóp ellen irányított mechanizmussal keletkeznek az autoantitestek és a gliadin peptidek bizonyos körülmények között fixált helyzetben hasonlíthatnak erre a fő epitópra, akkor a gliadin peptidek közvetlenül is kötődhetnek a B sejtek

felszíni immunglobulin receptorába és táplálhatják a T-sejteknek történő antigén bemutatást. Ha a nem-humán antitest vagy analógjai ezen a receptoron is kifejtene gátló hatást, akkor kötődésük a haptén-carrier elmélet szerinti gliadin-transzglutamináz komplexek bekebelezését vagy a gliadin közvetlen hatását is gátolhatná és ezzel magát a T-sejt aktivációt is megakadályozhatná.

A coeliakia prevenciót vizsgáló prospektív tanulmányban (PreventCD) az egészséges csecsemők jelentős része 6 hónapos korban átmenetileg antitestekkel reagált a gluten peptidekre, ami helper T sejt működést jelez, de ezek a gyermekek nem termeltek transzglutamináz antitesteket. Ez arra utal, hogy ha a gliadin bemutatása nem a transzglutamináz-specifikus B sejteken keresztül történik, akkor az nem vezet a coeliakia pathomechanizmus beindulásához.

A közvetlen jövőben a nem humán blokkoló antitest főként a coeliakiás antitestek hatásmechanizmusának pontosabb tanulmányozására használható, és ennek eredményei fogják eldönteni, hogy a fent vázolt immunológiai mechanizmus szóba jöhet-e.

Budapest, 2013.05.23.



Dr Korponay-Szabó Ilma