

Válasz Dr. Molnár Béla, az MTA Doktora opponensi véleményére

Köszönöm Molnár Béla tanár úrnak, hogy vállalta értekezésem bírálatát, köszönöm elismerő szavait a témaválasztást, az egyes témaköröket, a publikációs aktivitást és annak visszhangját illetően. Köszönöm, hogy a bíráló a megközelítést komplexnek, az értekezés megírását színvonalasnak, a kutató munkát és annak diszkusszióját alapos szakmai ismereteken nyugvó szintetizáló munkának tartotta. Köszönöm a formai megjegyzéseket és annak elfogadását is, hogy az általános, a jelenlegi epidemiológiai, patogenetikai, monitorizálási és kezelési stratégiát bemutató bevezetés mellett a diszkusszióban témakörönként került kritikus értékelésre a saját munka eredménye, az elérhető, esetenként a saját munka megjelenését követően publikált adatok tükrében.

Nagyon köszönöm a bíráló gondos, mindenre kiterjedő figyelmét és a helyenként a munka pontosítását is lehetővé tevő kérdéseket.

A feltett kérdésekre az alábbi válaszokat adom:

1. *A mintagyűjtési DNS izolációs eljárások egységes volta nem derül ki ebben a fejezetben. Hiányzik az információ arról, hogy az 500-600 CD-s minta hány centrumból, hogyan került összegyűjtésre, a DNS izolálásokat egy helyen, vagy a vizsgálóknál végezték-e el? Az egyes centrumok között volt-e különbség a géntípusok eloszlásában? Egyenlő arányban kerültek-e minták a végső poolba a donorcentrumokból? Egy-egy domináns centrum eredményei nem torzították-e az összképet?*

Köszönöm a metodikai kérdést. Minden centrumban törekedtünk az egymás utáni betegek bevonására annak érdekében, hogy a szelekciós hiba elkerülhető legyen. A DNS izolálás egy helyen, az I. sz. Belgyógyászati Klinika genetikai laborjában történt kommersziális DNS-szeparációs kit segítségével, míg a genetikai vizsgálatok elvégzése a bécsi egyetemmel (Prof. Dr. Péter Ferenci) és az Országos Vérellátó Intézettel (Dr. Tornai Attila és Dr. Andrikovics Hajnalka) együttműködésben történt. Mivel a betegek mintái több centrumból származtak, a nyugat-, közép- és kelet-magyarországi centrumokból származó mintákat külön is értékeltük. A kontrollok bevonása hasonló arányban történt a területi reprezentációnak megfelelően.

Tekintettel arra, hogy fontosnak tartottuk a centrumok közötti variabilitás kizárását, a NOD2/CARD15, illetve a TLR4 vizsgálat esetén (ebben a tanulmányban 12 centrum vett részt) a területi különbségeket az eredeti közleményben is bemutattuk. A legnagyobb mintaszám a Semmelweis Egyetem Belgyógyászati Klinikáiról, a Szegedi Egyetem I. sz.

Belgyógyászati Klinikájáról és a Veszprémi Csolnoky Ferenc Kórház Belgyógyászati Osztályáról származott. Magyarország területi adottságait figyelembe véve nem számítottunk földrajzi különbségekre, de mivel a Crohn-betegség klinikai megjelenése a NOD2/CARD15 mutációkkal ismertén kapcsolatot mutat (bár a tanulmány időpontjában ez még nem volt egyértelmű), ezért fontos kiemelni, hogy az egyes területekről származó mintákban nem tudtunk lényeges klinikai megjelenésbeli különbséget kimutatni (lásd eredeti közlemény 1. táblázat). A NOD2/CARD15 és TLR4 genotípusok előfordulása az egyes területeken szintén nem különbözött, sem összesítve, sem külön vizsgálva az egyes nukleotid polimorfizmusokat (SNP). Torzító hatást tehát nem tapasztaltunk.

2. „A szerológiai vizsgálatok” fejezet önálló része a nagydoktori dolgozatnak. A 3. fejezetben azonban megint értékel a jelölt immunológiai, de szintén szérumban paramétereket, mint például CRP, LBP, CD14. A bíráló rögtön fel is teszi a kérdést: mi indokolta ezen vérvizsgálatok külön fejezetben történő kezelését?

Az antibakteriális, mikotikus autoantitestek alkalmazását a differenciáldiagnosztikában látja a jelölt, a hsCRP-t, az LBP-t és a CD14-t pedig az aktivitás jelzésben. Átfedő alkalmazások nem lehetségesek, vagyis az antibakteriális antitesteket nem lehet aktivitás jelzésre használni?

A „konvencionális” szerológiai markerek vizsgálatával szerzett saját tapasztalataink (ASCA, pANCA, glikánok, stb.) és az ezzel párhuzamosan bővülő irodalmi ismeretek (pl. Rieder et al. Plos One 2011;6:e18172) egyértelművé tették, hogy ezek a markerek az aktuális aktivitással nem mutatnak kapcsolatot, szintjük viszonylag állandó. A markerek klinikai jelentősége sokkal inkább a betegség lefolyásának hosszútávú előrejelzésében várható.

Ezzel szemben a vizsgálat tervezésekor ismert volt, hogy a CRP, a szolúbilis CD14 (ez utóbbinak azóta a szepszis mortalitási markereként és kezelési célpontként is felmerült a szerepe – Huber-Lang et al. J Immunol 2014;192:5324, Masson et al. Crit Care 2014;18:R6, Ulla et al. Crit Care 2013;17:R168) és az LBP (Pastor Rojo et al. Inflamm Bowel Dis 2007;13:269) szintek változása sokkal gyorsabb, így használatuk a klinikumban az aktivitás objektív megítélésében és előrejelzésében várható. A CRP a gyulladásos bélbetegekben általánosan elfogadott gyulladásos marker (Solem et al. Inflamm Bowel Dis 2005;11:707), ami pontosabb Crohn-betegségben, mint colitis ulcerosában. Egy a tanulmányunkat megelőző francia vizsgálat adatai arra utaltak, hogy a CRP a minta levételét követő két hónapra nyújt előrejelzést a várható klinikai fellángolás vonatkozásában (Cosigny et al. Inflamm Bowel Dis 2006;12:551). A használt cut-off (>20mg/L) és a süllyedéssel való kombináció ugyanakkor a gyakorlattól lényegesen eltért, ezért vizsgáltunk tárgya részben a megfelelő cut-off érték

meghatározása volt (Kiss et al. Inflamm Bowel Dis 2012;18:1647). Ez indokolta a fenti markerek elkülönítését a hagyományos mikrobiális markerektől. A prediktív jelentőséget ebben a vizsgálatban középtávon vizsgáltuk, de már az eredeti közlemény 5. ábrájából látható, hogy rövidebb távú előrejelzésre is alkalmasak (Lakatos et al. Inflamm Bowel Dis 2011;17:767). Ezért a következő tanulmányunkban a CRP szerepét az aktivitás és középtávú előrejelzés mellett a betegség lefolyásának rövidtávú előrejelzésében is vizsgáltuk (3 hónap, Kiss et al. Inflamm Bowel Dis 2012;18:1647).

3. *A bírálóban felmerül a kérdés, hogy a makroszkópos vastagbél gyulladás kiterjedése is hasonló korrelációt mutathat a szerológiai válasz mértékével? Azaz a makroszkópos fekélyesedés mértéke lehetséges, hogy a beáramló, az immunrendszer számára direkt terhelést jelentő mikrobákkal arányos lehet?*

A kérdés logikus. Azonban irodalmi és saját adatok alapján az antimikrobiális (ASCA, glikán) markerek elsősorban Crohn-betegségben a szövődményes betegségformával és az vékonybél-, ileum-lokalizációval mutattak kapcsolatot (Lakatos et al. Am J GE 2011;106:406, Papp et al. Am J GE 2008;103:665, Ferrante et al. Gut 2007;56:1394). Gyakoriságuk colitis ulcerosában és Crohn-colitisben, függetlenül annak kiterjedésétől, ritkább volt. Crohn-colitis esetén is szignifikánsan ritkább volt az ileális érintettséggel rendelkező betegekhez képest (Papp et al. Inflamm Bowel Dis 2007;13:984), míg colitis ulcerosa-szerű makroszkópos Crohn-betegség megjelenés esetén a gyakoriság nem különbözött az egészséges kontrollhoz képest. Ebből az következik, hogy elsősorban a vékonybél és nem a vastagbél fekélyek megjelenése/permeabilitás-változása mutat kapcsolatot a szerológiai markerek megjelenésével. Ezt támasztja alá továbbá, hogy a fenti markerek gyakorisága kezeletlen coeliakiában (Ashorn et al. J Clin Immunol 2008;28:486, Papp et al. WJG 2009;15:3891) és előrehaladott májbetegségben (Papp et al. Plos One 2010;5:e12957) csaknem megegyezik a Crohn-betegségben tapasztalt értékkel.

4. *A NOD2/CARD15 mutáción kívül a többi vizsgált genetikai eltéréssel mutattak összefüggést a vizsgált szerológiai markerek?*

Az irodalomban elérhető adatok ebben a vonatkozásban nem egységesek. A leuveni centrum adatai (Henckaerts et al. Gut 2007;56:1536 és Manolakis et al. Dig Dis Sci 2013;58:371) alapján a NOD1/CARD4 GG-indel hordozás esetén gyakoribb volt a gASCA pozitivitás, míg a TLR4 D299G és TLR2 P631H variánsok esetén ritkábban fordultak elő egyes glikán markerek (ACCA) és az Omp. Ezzel ellentétesen a TLR1, TLR6 és CARD8 variánsok nem mutattak kapcsolatot a szerológiai markerekkel. Saját adataink alapján (Papp et al. Inflamm

Bowel Dis 2007;13:984, Papp et al. Am J GE 2008;103:665 és Lakatos et al. Tissue Antigens 2008;71:552) nem találtunk kapcsolatot a TLR4 gén fenti variánsa, illetve egy gyakori DLG5 variáns allél előfordulása és a szerológiai markerek gyakorisága között, míg a lokalizációtól és viselkedéstől is független fordított összefüggést mutattunk ki egy beta-defenzin 1 gén variáns és a glükán markerek előfordulása között.

5. *Az elmúlt 3 évben a Crohn-betegség természetes lefolyása megváltozott. A klinikai kép enyhébb a betegség diagnózisának felállításakor, a kórlefolyás során. A jelölt vizsgálatait ezt 30 éves vizsgált időszakban igazolták. A betegség lefolyásának ilyen pozitív változását minek tulajdonítja? Jobb, korábbi diagnosztika, jobb terápiák? Környezeti, életmódbeli változások? Befolyásolhatja-e az IBD megjelenésének ilyen irányú változását a gyakoribb, szélesebb körű antibiotikus terápiák alkalmazása?*

A kérdés megválaszolása összetett, függ attól is, hogy mit választunk kimenetelt mérő változónak. Az okok szintén összetettek. Egy 2010-ben megjelent összefoglaló közlemény még azt állapította meg, hogy a populációs alapú vizsgálatokban kevés a bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a Crohn-betegség természetes lefolyása megváltozott volna (Peyrin-Biroulet et al. Am J GE 2010;105:289). Nem sokkal e közleményt követően jelent meg a walesi munkacsoport anyaga (Ramadas et al. Gut 2010;59:1200) és a saját tanulmányunk (Lakatos et al. Am J GE 2012;107:579), mely felhívta a figyelmet arra, hogy a sebészeti igény Crohn-betegségben csökkent. Ennek egyik markere/oka lehet a megváltozott kezelési stratégia - így pl. a korai azathioprin kezelés bevezetése -, ami azonban bizonyosan nem az egyetlen tényező. A sebészeti igény csökkenése az 1950-es évektől kimutatható volt a nemzetközi IBD társaság tagjaival együtt készített szisztematikus összefoglaló közleményben (Bernstein et al. Gut 2012;61:622), továbbá egy másik, független szisztematikus összefoglaló tanulmány és metaanalízis adatai alapján is (Frolkis et al. Gastroenterology 2013;145:996).

Más változás is történt. Az elmúlt 3 évtizedben megváltoztak a diagnosztikus eszközeink (pl. vékonybél röntgen helyett CT-MR enteroklízis), rutinszerűen és gyorsabban elérhetőek lettek a laboratóriumi vizsgálatok (pl. CRP). Másrészt az 1990-es évek végétől egyre szélesebb körben elérhetővé váltak a biológiai kezelések (pl. anti-TNF, Hanauer et al. Lancet 2002;359:1541, Sands NEJM 2004;350:876). Ezekből a gyógyszervizsgálatokból az is egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a korai-kombinált kezelés, a szoros betegkövetés, a biokémiai paraméterek korai normalizálódása (Schnitzler et al. Gut 2009;58:492) és a korai nyálkahártya gyulladás (Baert et al. Gastroenterology 2010;138:463), azaz a gyulladásos kép korai objektív kontrollja javítja a hosszútávú kimenetelt.

Mindez a gyakorlatban együtt járt a gyorsabb és részletesebb diagnosztikával és egy szorosabb betegkövetési stratégiával (klinikai kontroll, vérvizsgálatok és endoszkópos/képpalkotó ellenőrzés), ami szintén a kedvezőbb hosszútávú kimenetel irányába mutathat. Saját vizsgálatunkban is kimutatható, hogy az újabban diagnosztizált betegekben a diagnóziskor ritkább a szövődményes betegségforma és lassabb a betegség progressziója is (Lovasz et al. WJG 2013;19:2217). A magyar adatokat is tartalmazó legújabb közös európai populációs alapú tanulmányban (Burisch et al. Gut 2014;63:588, Burisch et al. Inflamm Bowel Dis 2014;20:36) már a stratégiai biológiai kezelés hatása is tetten érhető. A tanulmányban a 2010-ben diagnosztizált Crohn-betegek 5-21%-ában került bevezetésre a biológiai kezelés már a diagnózis évében. A gyógyszer korai alkalmazása részben függött a betegség viselkedésétől. A betegek 44-57%-a részesült ugyanakkor korai immunszuppresszív kezelésben. A kimenetel rövidtávon kedvező volt. Az egy éves követés végén a betegek 77%-a volt remisszióban, míg további 13%-ában csak enyhe aktivitás volt mérhető. A betegek követése folyamatban van. A 3 éves kimenetelek idén kerülnek feldolgozásra.

Végezetül a korai antibiotikum kezelés és az IBD incidenciája között több tanulmányban mutattak ki összefüggést. Az azonban nem teljesen egyértelmű, hogy a korai antibiotikum kezelés a kiváltója ennek a folyamatnak, vagy csupán egy markere a már fennálló fokozott bélgyulladásnak (Shaw et al. Am J GE 2011;106:2133, Virta et al. Am J Epidemiol 2012;175:775). Az antibiotikum kezelés szövődményes Crohn-betegségben (pl. perianalis fistula) a napi gyakorlat része (Khan et al. Am J GE 2011;106:661). Egyes újabb adatok szerint enyhe Crohn-betegségben a rövid távú klinikai remisszió elérését is segíthetik (Prantera et al. Gastroenterology 2012;142:473), azonban arra vonatkozó adat, hogy a betegség lefolyását a gyakori antibiotikum adás megváltoztatná, nem ismert.

6. *A magyar IBD-s betegekben a vastagbélbetegségek megjelenése ritkább, mint ahogy arról a nemzetközi irodalomban olvashatunk, túlélésük kedvezőbb, mint a sporadikus vastagbélrákban szenvedőké. Magyarországon ezeknél a betegeknél gyakoribb a kolonoszkópiás vizsgálat, mint a nemzetközi gyakorlatban? Lehet összefüggés a Crohn-betegekben ritkábban előforduló vastagbélrák és a jelölt által leírt magyarországi komplex terápiák alkalmazása között?*

Az ellentmondás a nemzetközi és a magyar adatok között csak látszólagos. A gyakran idézett Eaden (Eaden et al. Gut 2001;48:526) metaanalízisben közölt érték jelentős mértékben centrum adatokon alapul, azaz felülértékeli a rákrisikót, ez magyarázza a tankönyvekben a mai napig szereplő magas, 10, 20 és 30 éves colorectális rákrisikót. Saját populációs alapú tanulmányunkban a relatív rákrisikó (SIR: 1,74) érdemben megegyezett egy az értekezés

benyújtását követően megjelent újabb, csak a populációs alapú tanulmányokon alapuló metaanalízis adataival (Jess et al. Clin Gastroenterol Hepatol 2012;10:639). Ebben a tanulmányban a relatív kockázat összességében 2,4-szeres volt.

A túlélés valóban kedvezőnek volt mondható, aminek oka részben az, hogy a daganatok nagyobb arányban kerültek felismerésre korai(bb) stádiumban (Dukes A-B) a magyar sporadikus colorectális rákos betegekhez képest (Fuszek et al. Anticancer Res 2006;26:527). Az ellenőrző colonoscopiák száma az átlag populációban tapasztaltnál nagyobb volt (10 éves betegségfennállást követően legalább 2 ellenőrző colonoscopy 5 év alatt), azonban a saját definíciónk szigorúsága elmarad a nemzetközi ajánlásoktól (Dignass et al. JCC 2012;6:965). Az egyes terápiák direkt rákrizikót befolyásoló hatására kevés a bizonyíték, az adatok ellentmondásosak még az aminoszalicilátok vonatkozásában is (Bernstein et al. Am J GE 2011;106:731, Rubin et al. CGH 2006;4:1346, van Staa et al. Gut 2005;54:1573, Velayos et al. Am J GE 2005;100:1345). A gyakorlat számára praktikus megközelítés, hogy krónikus gyulladás nélkül nincs fokozott daganat rizikó. Azaz valószínűleg nem az egyes gyógyszerek specifikus hatásában keresendő a válasz, hanem a gyulladás megfelelő, hosszútávú kontrollja az elsődleges (Rutter et al. Gastroenterology 2004;126:451). Ilyen értelemben a komplex, hosszútávú, teljes nyálkahártya gyógyulásra törekvő kezelés elméletileg csökkentheti a rákrizikót. Más tényezők hatása is fontos lehet, így pl. nem hagyható figyelmen kívül a colectomiák aránya sem, ami jelentős földrajzi variabilitást mutat (Bernstein et al. Inflamm Bowel Dis 2013;19:2001). Megjegyzést érdemel továbbá, hogy saját anyagunkban is kedvezőbb volt a dohányzó betegek hosszútávú kórlefolyása, kevesebb beteg igényelt colectomiát az uralhatatlan betegség aktivitás miatt (Lakatos et al. Inflamm Bowel Dis 2013;19:1010).

7. Van-e a jelöltnek adata arról, hogy a 30 éves megfigyelés alatt változott-e az azathioprin terápia elleni intolerancia mértéke? A mellékhatás profil változott?

A saját populációs alapú vizsgálatunkban összesen a betegek 14,9%-ában észleltünk intoleranciát. Irodalmi adatok alapján a kezelést a betegek 9-25%-ában kell mellékhatás miatt leállítani (Lakatos et al. WJG 2011;17:4372). A gyakoriság nem függött a diagnózis évétől (pl. a 2000 előtt és 2000 után diagnosztizált Crohn-betegekben az intolerancia gyakorisága 15,2% és 12,3% volt) és a mellékhatások megoszlása érdemben megegyezett az ismert tankönyvi adatokkal.

8. *A bírálóban a dolgozat átolvasása után felmerül a kérdés a genetikai faktorok elváltozásai, a polimorfizmus, a szerológiai paraméterek eltérései nem adnak segítséget a biológiai kezelés hatásossága tekintetben?*

Az általunk vizsgált genetikai és szerológiai markerek nem jelezték előre a biológiai kezelés hatékonyságát. Egy szintén korábbi tanulmányban belga szerzők a Fas ligand egy polimorfizmusa (-843C/T) és az infliximab kezelés klinikai eredménye között írtak le kapcsolatot (Hlavaty et al. APT 2005;22:613). A gyakorlati jelentőséget azonban megkérdőjelezi, hogy együttes azathioprin kezelés esetén a fenti összefüggés nem volt megfigyelhető.

A dinamikus modellek biztatóbbaknak tűnnek. Irodalmi adatok alapján az anti-TNF kezelés hatására bekövetkező korai apoptózis fokozódás (pl. 99Tc-annexin felvétel) mind állatkísérletben, mind emberben kimutatható, ami kapcsolatba hozható a későbbi terápiás hatékonysággal (van den Brande et al. Gut 2007;56:509). Továbbá, egy leuveni tanulmány szerint a nyálkahártya génexpressziós profilja (top 5 gén: TNFAIP6, S100A8, IL11, G0S2 és S100A9) segítséget nyújtott a későbbi terápiás válasz előrejelzésében, legalábbis vastagbél érintettség esetén (Arijs et al. Inflamm Bowel Dis 2010;16:2090). A vizsgált esetszám az egyes tanulmányokban azonban meglehetősen kicsi, és jelenleg nem lehet megbecsülni a vizsgálatok additív értékét a klinikai/labor/képalkotó paraméterek korai változásához képest.

Még egyszer köszönöm Molnár Béla tanár úrnak részletes, alapos bírálatát, megjegyzéseit, kérdéseit és elismerő szavait a témaválasztást, a komplex megközelítést, az eredmények gyakorlati jelentőségét, a publikációs aktivitást és annak visszhangját illetően. Köszönöm továbbá, hogy az értekezést és a téziseket elfogadásra méltónak találta.

Budapest, 2014. június 25.

Dr. Lakatos Péter László