

A CYTOKIN AKTIVÁCIÓ ÉS GÉN-POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA *HELICOBACTER PYLORI* FERTŐZÉSBEN ÉS CROHN BETEGSÉGBEN



BEVEZETÉS

Mind a *Helicobacter pylori* fertőzésre, mind pedig a gyulladásos bélbetegségekre, mint például a Crohn betegség jellemző, hogy a gyulladásos események a pathogen ágensek (*H. pylori*) ill. a kommenzális mikroflóra virulencia faktorai és a nyálkahártya gyulladásos mediátorai között létrejövő törékeny egyensúly megbomlásának következményei. Így a betegség kialakulásában és lefolyásában legalább olyan fontos a szervezet immun-genetikai háttere, mint a fertőzést kialakító baktériumok virulencia faktorai.

Helicobacter pylori fertőzés

A *H. pylori* baktériumot Marshall és Warren 1983-ban klinikai biopsziás mintákból izolálta. A kutatók kiemelkedő munkáját 2005-ben a Karolinska Intézet Nobel bizottsága orvosi Nobel-díjjal jutalmazta. A baktérium kóroki szerepe a betegségek széles spektrumában bizonyított: akut gastritis, nyombél- és gyomorfekély. A fertőzés szoros összefüggést mutat a MALT lymphoma és gyomorcarcinoma kialakulásával, ami miatt a WHO elsőrendű carcinogén ágensnek nyilvánította. Egyre több extragasztrikus kórképben vetik fel a baktérium és más a genushoz tartozó fajok szerepét. A fertőzés gyakorisága országonként változó, ugyanis számos külső tényező befolyásolja, többek között az ország gazdasági helyzete vagy a szociális körülmények. Hazánkban a fertőzés prevalenciája magasabb mint 50 %, míg az említett betegségek szerencsére jóval ritkábbak. Ez a tény felveti a kérdést: mi határozza meg, hogy a fertőzés tünetmentes marad, vagy kialakul a súlyos betegségek egyike? Többek között a cag-pathogenitási sziget jelenlétére utaló CagA fehérje, a vacuolizáló toxin (VacA), a neutrophil aktiváló fehérje (NAP) és a diagnosztikában jól használható ureáz termelés meghatározó virulencia faktorai a baktériumnak. Azonban a szervezet fertőzésre adott válaszreakcióinak mértéke is befolyásolja a klinikai tüneteket és a terápiás beavatkozások esélyeit. Egyre gyakrabban találunk bizonyítékot arra, hogy a szervezet a mikroorganizmusok eliminálásán túl, a gyulladásos mediátorok, citokinek túlprodukciójával önmagára nézve káros folyamatokat is elindít. A *H. pylori* fertőzés során a betegségek kialakulásában bizonyított egyes citokinek aktiválódása, valamint oxidatív metabolitok lokális hatása. A fertőzést egy Th1 túlsúlyú immunválasz jellemzi. Az egyének genetikai

adottságai nagymértékben meghatározzák a gyulladás kialakulásának mértékét. Példa erre néhány cytokin gén-polimorfizmusa, mely bizonyíthatóan kapcsolatba hozható a fertőzés következményeivel, a betegség lefolyásának súlyosságával (IL-1, TNF- α , INF- γ , IL-10, stb.). A hisztamin a gyomor működésében központi szerepet játszik. A H₂ receptoron keresztül a gyomorsav-szekréciót, a H₁ és H₄ receptoron keresztül a cytokinek termelődését befolyásolja. A *H. pylori* fertőzés jelentős hisztamin felszabaduláshoz is vezet a mucosalis hízósejtek és bazofil granulocyták aktivációján keresztül.

Crohn betegség

1932-ben Burrill B. Crohn egy rejtélyes vékonybél betegséget írt le. A róla elnevezett gyulladásos bélbetegség elsősorban a terminális ileumot, coecumot, peri-anális területet és a colont érinti. A súlyos gasztrointesztinális szövődményeken kívül extraintesztinális gyulladásos folyamatok is megfigyelhetők az ízületekben, bőrben, szemben, szájban és a májban is. A kezdetben fertőzőes eredetűnek gondolt betegségben máig sem sikerült egy adott pathogen ágens kóroki szerepét igazolni. A multifaktoriális betegségre jellemző a normális mikroflóra által kiváltott inadekvát, fokozott mucosalis immunválasz, amit környezeti és genetikai tényezők is befolyásolnak. A Crohn betegség állatmodelljei és klinikai megfigyelései mutattak rá a bélnyálkahártya Th1 irányba eltolódott immunválaszára. Ma már a terápiában is hatékonyan kihasználható a TNF- α szintjének csökkentése (anti-TNF- α terápia). A vizsgálatok kimutatták azt, hogy a Th1 polarizált immunválasz hátterében genetikai tényezők is állhatnak, mint a betegek nagy csoportjában kimutatható NOD2 és más gén-polimorfizmusok.

CÉLKITÚZÉSEK ÉS MÓDSZEREK

A *H. pylori* fertőzésben és Crohn betegségben Th1 domináns immunválasz figyelhető meg. Így kísérleteink célja ezen betegségekben a gyulladásos faktorok és a betegség hátterében álló genetikai okok vizsgálata volt.

***Helicobacter pylori* pozitív nyombélfekélyes betegek vizsgálata**

► *H. pylori* pozitív nyombélfekélyes betegek és kontrollok lokális cytokin szintjeinek meghatározása (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) biopsziás mintákból /ELISA/.

A peroxynitrit keletkezését bizonyító nitrotyrosin kimutatása a betegek biopsziáiban /Western blot/.

- ▶ CagA pozitív, virulens *H. pylori* fertőzés gyakoriságának meghatározása **/Western blot/**.
- ▶ *H. pylori* pozitív nyombélfekélyes betegek és kontrollok perifériás vérének cytokin szint mérése és *H. pylori* indukciót követő cytokin termelőkéesség mérése (TNF- α , IL-6, IL-8) **/ELISA/**.
- ▶ *H. pylori* pozitív nyombélfekélyes betegeknél és kontrolloknál a cytokin indukció individuális különbségei és a cytokin gének funkcionális SNP-i (single nucleotide polymorphism) közti kapcsolat vizsgálata **/PCR alapú módszerek/**. (IL-8 -251 T→A: **ARMS módszer**; TNF- α -308 G→A: **RFLP módszer** ; CD14 -159 C→T: **Melting point analízis**)

A hisztamin *in vivo* szerepének vizsgálata *H. pylori* fertőzés során HDC KO (hisztidin-dekarboxiláz knock out) egereken.

- ▶ A HDC KO és vad (WT) egerek lokális gyulladás mértékének jellemzése lokális cytokin vizsgálattal (TNF- α , IL-6, IL-10) **/ELISA/**, valamint **kórszövettani vizsgálattal**.
- ▶ A HDC KO és WT egerek immunválaszának vizsgálata *H. pylori* fertőzést követően a szérum anti-*H. pylori* IgG titerének jellemzésével **/ELISA/**.
- ▶ A HDC KO és WT egerekből származó gyomornyálkahártya *H. pylori* kolonizációjának vizsgálata **/PCR/**.

Crohn betegek vizsgálata

- ▶ Crohn betegek és kontrollok SNP vizsgálata (CD14 -159 C→T: **Melting point analízis**; IL-10 -1082 G→A: **RFLP módszer**; HSP 70-2 1267 A→G: **RFLP módszer**).

EREDMÉNYEK

***Helicobacter pylori* pozitív nyombélfekélyes betegek vizsgálata**

- ▶ *H. pylori* pozitív nyombélfekélyes betegek vizsgált lokális cytokin szintjei szignifikánsan magasabb értéket mutatnak, mint a *H. pylori* negatív esetek (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10). Negatív korreláció tapasztalható a lokális TNF- α és IL-10 koncentrációk között. A perifériás cytokin szintek nem mutatnak különbséget a betegek és kontrollok között (TNF- α , IL-6 és IL-8). A peroxynitrit keletkezését bizonyító nitrotyrosin kimutatható a *H. pylori* pozitív betegek biopsziáiban míg a *H. pylori* negatív betegeknél ez nem mutatható ki.
- ▶ A *H. pylori* pozitív nyombélfekélyes betegek 97,5%-a CagA pozitív baktériummal fertőződött.

► A vizsgált nyombélfekélyes betegek perifériás vérének *H. pylori* indukciót követő IL-8 cytokin termelőképesége szignifikánsan magasabb mind a *H. pylori* pozitív, mind pedig negatív egészséges kontrollok IL-8 termelőképeségénél. Ez a cytokin termelőképeség független attól, hogy CagA pozitív vagy negatív volt-e az indukáló baktérium törzs.

► Megvizsgálva az IL-8 -251 T→A SNP-t az tapasztalható, hogy a *H. pylori* pozitív nyombélfekélyes betegek között szignifikánsan többen hordozzák a magasabb IL-8 termelést eredményező A allélt. A betegek között szignifikánsan magasabb az SNP-re vonatkoztatott heterozigóta egyének aránya, mint a *H. pylori* pozitív kontrollok között.

A hisztamin *in vivo* szerepének vizsgálata *H. pylori* fertőzés során HDC KO egereken

► Nyolc héttel az egerek fertőzését követően mindhárom vizsgált cytokin (TNF- α , IL-6, IL-10) lokális szintje szignifikánsan magasabb mind a WT mind a HDC KO egerekben. Azonban a WT egerek a HDC KO egerekhez képest magasabb értékeket mutatnak a TNF- α és IL-6 esetében, míg az IL-10 azonos szintje mérhető az állatok mindkét csoportjában. A szövettani kép enyhébb gyulladást mutat a HDC KO egereknél.

► A HDC KO egerek fertőzést követő anti-*H. pylori* IgG szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint a WT egerek titere. Az anti-*H. pylori* IgG1/IgG2a arány viszont nagyobb a HDC KO egerek esetében.

► Az egerek gyomor mintáiban PCR-rel igazolható a *H. pylori* jelenléte, azonban a fertőzést követő 4. héttől már nem mutatható ki a *H. pylori* DNS.

Crohn betegek vizsgálata

► Az általunk vizsgált CD14 és IL-10 SNP-k valamint a Crohn betegség jelenléte illetve súlyossága között szignifikáns összefüggés nem tapasztalható. A HSP 70-2 gén 1267 lokuszán A allélt legalább hordozó (heterozigóta) vagy A-ra nézve homozigóta betegeknek szignifikánsan alacsonyabb az esélyük arra, hogy betegségük során operációra kerüljön sor.

ÖSSZEFOGLALÁS

A *H. pylori* által kiváltott betegségek és a Crohn betegség pathomechanizmusával kapcsolatban általánosan elfogadott hipotézis központi jelentőséget tulajdonít a cytokinek és más gyulladásos faktorok fokozott termelődésének és az ehhez társuló káros hatásoknak. A mi eredményeink is alátámasztják ezt az elméletet.

A lokális TNF- α , IL-6 és IL-8 emelkedett szintjét figyeltük meg duodenális ulcus esetében, valamint a biopsziás anyagokban jelentős nitrotyrosin termelést is igazoltunk. A hisztamin az egyik gyulladásos faktor, amely több cytokin emelkedett expressziójához vezet. Állatkísérleteinkben megfigyelhető, hogy hisztamin hiányában –HDC KO egerek– enyhébb gyulladás és szöveti károsodás tapasztalható *H. pylori* fertőzés során.

H. pylori indukált gyulladásban és a Crohn betegségben domináns Th1 polarizáció észlelhető. Továbbá, etiológiai faktorként több gén mutációja is szerepet játszik a betegségek kialakulásában, súlyosságukban. A genetikai meghatározottság jelentőségét alátámasztják megfigyeléseink: a.) a fokozott IL-8 termeléssel járó IL-8 -251 T/A genotípus szignifikánsan gyakrabban fordul elő *H. pylori*-pozitív nyombélfekélyes betegekben, mint *H. pylori*-pozitív kontrollokban, b.) a Hsp70-2 gén 1267 pozíciójában lévő A allélje a Crohn betegség enyhébb formájával hozható kapcsolatba, így ezek a genotípusok (AA, AG) a betegség lefolyásában mint védőfaktorok játszhatnak szerepet. Ezek az eredmények kihangsúlyozzák a genetikai vizsgálatok klinikai jelentőségét Crohn betegségben, és utalnak arra a lehetőségre, hogy a műtéti beavatkozás tekintetében a Hsp70-2 (1267 A→G) SNP prognosztikai értékű lehet.