

OTKA Nyilvántartási szám: T 038303

ZÁRÓJELENTÉS

2006. ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve: Dr. Pokorny Gyula

A téma címe: Acetilcholin-receptor elleni autoantitestek vizsgálata és pathogenetikai szerepük meghatározása Sjögren syndromában

A kutatás időtartama: 2002-2005

Amint azt részjelentéseinkben korábban ismertettük, több m³ muscarinszerű acetylcholin-receptor (m³AChR) specificitású peptid-szekvencia közül a KRTVPPGECFIQFLSE (KRSE²¹³⁻²²⁸) 16 aminosavból álló peptid bizonyult legjobb antigenitásúnak az m³AChR autoantitestek kimutatására pSS betegek esetében. 2004-ben tovább pontosítottuk a szintetikus peptid formában (KRSE), illetve glutathion-S-transferase-zal (GST) fúziós formában előállított rekombináns fehérje (GST-KRSE) felhasználásával kifejlesztett ELISA módszerünket (ELISA tálca típusa, blokkoló oldat összetétele, megfelelő antigénkoncentrációk), másrészt nagyobb vizsgálati anyagon teszteltük az antigén klinikai vonatkozásait.

Az ELISA teszt optimalizálását követően 40 primaer Sjögren syndromás (pSS) és 40 egészséges kontroll személy savóit használtuk szintetikus (KRSE) és rekombináns fúziós (GST-KRSE) peptidek, mint antigének felhasználásával a receptor-ellenes ellenanyagok kimutatására. Az ELISA vizsgálatok során 31 (KRSE) illetve 39 (GST-KRSE) pSS-s beteg bizonyult pozitívnak. A kontrollokkal szemben az immunológiai felismerés nagymértékben szignifikáns volt ($p < 0.0001$). A KRSE ELISA szenzitivitása 77,5%-nak, a GST-KRSE ELISA vizsgálaté 97%-nak adódott. A GST-KRSE fúziós rekombináns peptid immunológiai felismerése a szintetikus peptiddel összehasonlítva,

szignifikánsan jobb volt ($p = 0.0068$). Az immunreakció specificitását inhibíciós ELISA valamint Western blot vizsgálattal ellenőriztük.

Az eredményeinkről a J. Autoimmunity 24 (2005) 47-54. folyóiratbóban számoltunk be. Az alábbi ábra az immunológiai felismerés eredményeit foglalja össze.

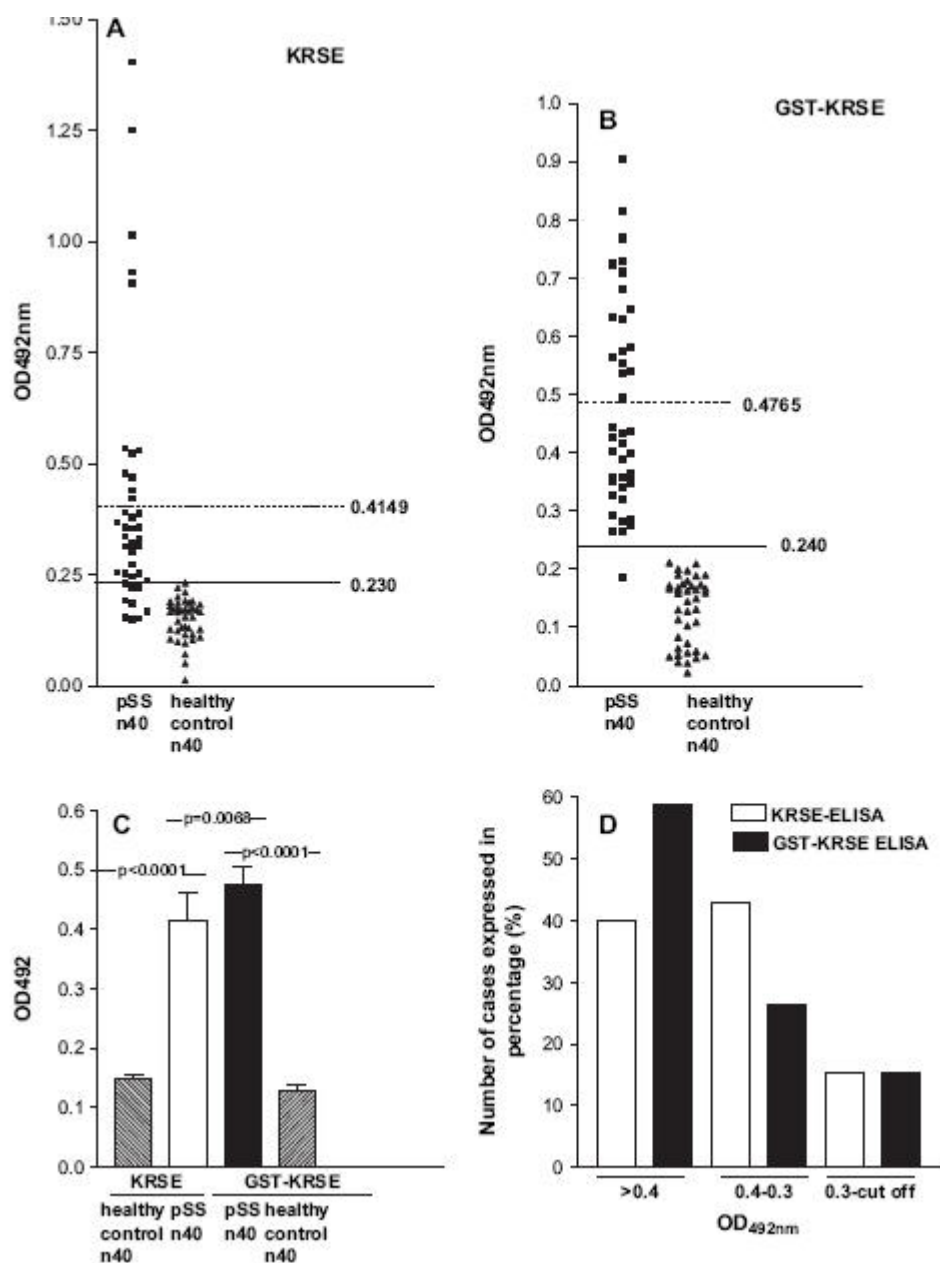


Fig. 2. Detection of autoantibodies against the human m3AChR by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (A) and (B) The scattergrams show the individual optical density (OD) values for each serum sample at dilutions of 1:50 and 1:100, respectively, for the pSS and healthy control groups. Solid lines: cut-off values (mean ODs + 2SD for the healthy controls); dotted lines: median ODs for pSS patients (C). Bars represent the means \pm SEM of the immunoreactivities of the two groups of tested sera. p -values between the groups are indicated. (D) Distribution of the positive sera in three OD ranges. Bars represent the number of sera (giving in percentage) in the given range with the KRSE or GST-KRSE antigens.

Ezt követően az alábbi betegcsoportok mintáit teszteltük: pSS (n=73), secundaer SS (n=14), rheumatoid arthritis (n=40), SLE (n=19), valamint olyan betegek, akiknél bizonyos klinikai jelek alapján felmerült pSS lehetősége, de részletes vizsgálatok a kórkép fennállását végül nem igazolták: susp SS (n=22). Az anti-m3AChR ellenanyag-pozitivitás megoszlását és klinikai differenciáló képességét az egyes csoportokban a következő táblázat mutatja be:

TABLE 2. Results of the anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸ ELISA in the six groups examined, and the statistical parameters assessing the potential of the method to discriminate between pSS and the other comparison groups

| | pSS (n = 73) | RA (n = 40) | SLE (n = 19) | sSS (n = 14) | suspSS (n = 22) | Healthy (n = 40) |
|--|-----------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Anti-m3AChR ²¹³⁻²²⁸ levels (mean OD) | 0.461 | 0.217* | 0.164* | 0.143* | 0.250* | 0.121 [†] |
| No. of anti-m3AChR ²¹³⁻²²⁸ -positive patients (%) | 66 (90) | 14 (35) [†] | 6 (32) [†] | 4 (29) [†] | 11 (50)* | 0 [†] |
| Specificity | | 65% | 68% | 71% | 50% | 100% |
| Positive likelihood ratio | | 2.58 | 2.86 | 3.16 | 1.81 | n.a. |
| Negative likelihood ratio | | 0.15 | 0.14 | 0.13 | 0.19 | 0.096 |

The mean OD values and the prevalences of anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸ antibody positivity were significantly lower in each of the comparison groups than in the pSS patients.

n.a., not applicable.

* $P < 0.01$; [†] $P < 0.0001$.

Mind az átlagos OD érték, mind a kóros eredmények gyakoriságában szignifikánsan eltért a pSS csoport valamennyi egyéb betegcsoporttól (kétmintás t-próba ill. Fisher's exact test).

A pSS betegcsoporton belül megvizsgáltuk az anti-m3AChR antitestek összefüggését a betegség egyes klinikai és szerológiai jellemzőivel. Azon pSS-s betegek körében, akiknél leukopenia is kimutatható, az anti-m3AChR antitest pozitivitás szignifikánsan gyakoribb volt.

TABLE 1. Demographic features and the presence of extraglandular organ manifestations and serological variables in anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸-positive and anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸-negative pSS patients and in the overall cohort

| Clinical or serological variable | Anti-m3AChR ²¹³⁻²²⁸ -positive (n = 66) | Anti-m3AChR ²¹³⁻²²⁸ -negative (n = 7) | All (n = 73) |
|----------------------------------|---|--|--------------|
| Age (yr; mean) | 55 | 60 | 55 |
| Disease duration (yr; mean) | 14 | 11 | 14 |
| Saxon test (ml/2min; mean) | 1.11 | 1.97 | 1.20 |
| Articular involvement | 52 (79) | 5 (71) | 57 (78) |
| Raynaud's phenomenon | 26 (39) | 2 (29) | 28 (38) |
| Vasculitis | 15 (23) | 0 | 15 (21) |
| Renal involvement | 10 (15) | 1 (14) | 11 (15) |
| Lymphoma | 5 (8) | 0 | 5 (7) |
| Anaemia | 15 (23) | 1 (14) | 16 (22) |
| Leucopenia ^a | 35 (53) | 1 (14) | 36 (49) |
| ANA | 49 (74) | 5 (71) | 54 (74) |
| Anti-SSA | 50 (76) | 4 (57) | 54 (74) |
| Anti-SSB | 33 (50) | 3 (43) | 36 (49) |

Numbers indicate the numbers of patients involved, with the percentages in parentheses, unless otherwise stated.

Renal involvement: renal tubular acidosis with or without biopsy-proven chronic tubulointerstitial nephritis.

Vasculitis: palpable purpura or other, biopsy-proven skin vasculitic lesion.

Leucopenia was significantly more common in the anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸-positive pSS patients than in those without this antibody.

^a $P < 0.05$.

Emellett, nem szignifikáns módon valamennyi extraglandularis szervi manifesztáció esetében az érintett pSS-s betegek körében gyakoribb volt az antitest

pozitivitás. Az anti-m3AChR antitestek szintje szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az adott betegben fennálló extraglandularis szervi manifesztációk számával.

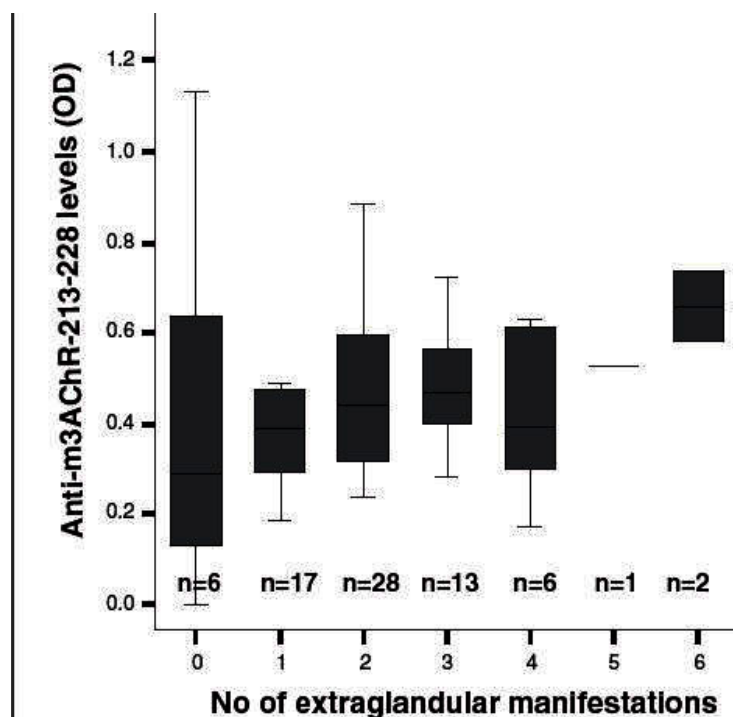


FIG. 1. Box and whisker plots representing anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸ antibody levels in pSS patients with various numbers of extraglandular organ manifestations. An increasing number of extraglandular organ manifestations correlated positively with the mean anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸ antibody titres ($P < 0.05$). Horizontal lines inside the box show median OD values; boundaries of the box show 25th and 75th percentiles; whiskers represent minimum and maximum values that are not extreme or outlier values. The numbers above the horizontal axis indicate the numbers of patients in each subgroup.

Utóbbi munkánkról a Rheumatology 2005;44:1021-1025 folyóiratban számoltunk be.

Ami a Sjögren syndroma klinikumára vonatkozó vizsgálatainkat illeti, megállapítottuk, hogy az acetylcholin-ellenes antitestek szerepet játszanak a primer Sjögren syndroma autonóm dysfunciójában. Ez érinti a cardiovascularis és gastrointestinalis rendszert is. Ez közlésre került abstract formájában (Ann. Rheum. Dis. 2002; Vol: 61. Suppl: I.) és részletesen kifejtve teljes terjedelmű közleményben, igazolva, hogy az autonóm idegrendszer dysfunciója érinti a cardiovascularis rendszert a primer Sjögren syndromás betegek nagy százalékában, melyet a Rheumatology folyóiratban (2004; 43: 95-99.) közöltük.

További vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az autonóm idegrendszer működészavara primaer Sjögren syndromában a nyál- és könnymirigyeken kívül érinti az urogenitális és a gastrointestinalis rendszert is. Ez a gastrointestinum vonatkozásában kórosan meglassúbbodott gyomorürülést jelent, ami a betegek 70%-ában igazolható volt. Urodinamiás vizsgálataink bebizonyították, hogy a kórképben gyakran csökkent a detrusor izom tónusa, és/vagy kontraktilitása (56%). Szerencsére ez a gyakori gastrointestinalis és urológiai funkciózavar az esetek jelentős részében nem jár klinikailag szignifikáns panaszokkal. Erről a Clin. Exp. Rheum. folyóiratban számoltunk be (2003; 21: 697-703).

Eredményeinket a következőképpen értékeltük:

1. Az anti-m3AChR antitestek igen nagy gyakorisággal mutathatók ki pSS-ban.
2. A pSS betegcsoport anti-m3AChR antitestek előfordulási gyakorisága és titere szignifikánsan különbözik a többi vizsgált csoportoktól.
3. Mivel a többi betegcsoportban is előfordulnak ezen antitestek, az anti-m3AChR antitest-pozitivitás klinikai differenciáló képességét csak az ELISA teszt specificitásának további növelésével lehet javítani. Másrészt az általunk fejlesztett ELISA rendszer diagnosztikai használhatóságának megállapításához nagyobb számú betegcsoportra és még pontosabban definiált pozitív kontroll csoportra van szükség.
4. Adataink felvetik, hogy az anti-m3AChR pozitív pSS-s betegek betegsége több extraglandularis szervi manifesztációval járhat, mint azoké, akiknél az antitest nem mutatható ki.
5. Klinikai funkcionális vizsgálatainkkal sikerült igazolni, hogy primaer Sjögren syndromában az acetylcholin antitestek szerepet játszhatnak az autonóm diszfunkcióban, mind a cardiovascularis, mind a gastrointestinalis, és urogenitális rendszert érintő rendellenességek (csökkent szívfrekvencia és vérnyomás variabilitás, lassult gyomorürülés, csökkent detrusor izomzat tónus) vonatkozásában.

Publikációs lista:

1. L. Kovacs, R. Takacs, M. Papos, D. Paprika, A. Kovacs, T. T. Varkonyi, C. Lengyel, L. Rudas, L. Pavics, G. Pokorny: The assesment of autonomic neuropathy in primary Sjögren' syndrome patients, *Ann. Rheum. Dis.*, Suppl. I. 61, p. 225. 2002.
2. L. Kovacs, M. Papos, R. Takacs, R. Roka, Z. Csenke, A. Kovacs, T. Varkonyi, L. Pajor, L. Pavics, G. Pokorny: Autonomic nervous system disfunction involving the gestrointestinal and the urinary tracts in primary Sjögren's syndrome, *Clin. and Exp. Rheum.* Vol 21, pp. 697-703, 2003.
3. L. Kovacs, I. Marczinovits, G.K. Toth, A. György, J. Molnar, G. Pokorny: The structural Organization of a Human Muscarinic Receptor-Specific Peptide is Important in the Serological Detection of anti-Acetylcholine Receptor Autoantibodies in Primary Sjögren's Syndrome, *Ann. Rheum. Dis.*, Suppl. 62, p. 233, 2003.
4. László Kovács, Dóra Paprika, Róbert Takács, Attila Kardos, Tamás T. Várkonyi, Csaba Lengyel, Attila Kovács, László Rudas and Gyula Pokorny. Cardiovascular autopnomic dysfunction in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology*, Vol 43, pp. 95-99, 2004.
5. Ilona Marczinovits, László Kovács, Andrea György, Gábor K. Tóth, László Dorgai, János Molnár, Gyula Pokorny, A peptide of human muscarinic acethylcholine receptor-3 is antigenic in primary Sjögren's syndrome, *J. Autoimmunity* Vol. 24, pp. 27-54, 2005.
6. László Kovács, Ilona Marczinovits Andrea György, Gábor K. Tóth, József Pál, László Dorgai, János Molnár, Gyula Pokorny, Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor-3²¹³⁻²²⁸ in primary Sjögren's syndrome, *J. Rheumatology*, Vol. 44, pp. 1021-1025, 2005.