

A trombotikus trombocitopéniás purpura patogenezisének vizsgálata

Doktori tézis

Dr. Mikes Bálint

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Prohászka Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Zsolt, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Mikala Gábor, PhD., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Fekete György, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Rempert Ádám, PhD., egyetemi docens
Dr. Deák György, PhD., főorvos

Budapest

2017

Bevezetés

A trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) a trombotikus mikroangiopátiák (TMA) közé tartozó, epizódokban zajló, rendkívül súlyos és gyors lefolyású, ritka betegség.

A TMA-k jellegzetessége a vérképben megjelenő trombocitopénia és a mikroangiopátiás eredetű, Coombs negatív hemolitikus anémia. Szemben a betegségcsoport másik gyakrabban előforduló tagjával, a hemolitikus urámiás szindrómával, a TTP az esetek nagy részében nem jár anuriás veseelégtelenséggel. Jellemzőek azonban a széles spektrumú neurológiai eltérések, az egyszerű fejfájástól kezdve, a szédüléssel panaszokon keresztül, egészen a agyi infarktushoz hasonló diszfunkciós tünetekig.

A TTP-re jellemző a mikroerekben felépülő trombotikus trombus. A trombus kialakulásának hátterében az el nem hasított, endotheliumfelszínhez kihorgonyozott ún. extrém nagyságú von Willebrand Faktor (ultra-large von Willebrand Faktor: UL-VWF) áll, mely a trombociták számára erős aktivációs felszín biztosít. Az UL-VWF elhasítását egy 14 doménból álló metalloproteáz enzim, az ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin type 13 motifs) végzi. TTP-ben az ADAMTS13 deficienciája áll fent, melyet leggyakrabban az inhibitoros autoantitestek megjelenése okoz, ezt a formát hívjuk szerzett TTP-nek. Ritkábban az ADAMTS13 deficienciát az enzim mutációja okozza, ekkor beszélünk kongenitális TTP-ről, családi halmozódás esetén pedig familiáris TTP-ről.

A TTP diagnózisát az egy vagy több epizódú a trombocitopénia (gyakran <30 G/L), a Coombs negatív, mikroangiopátiás hemolitikus anémia (fragmentociták jelenléte a perifériás vérkeneten, emelkedett LDH, csökkent haptoglobin) és az ADAMTS13 deficiencia (aktivitás $<10\%$) igazolásával lehet felállítani.

A TTP első számú terápiás eszköze a plazmacsere (plasma exchange: PEX), mely során az ADAMTS13 ellenes inhibitoros autoantitestek eltávolításra kerülnek, majd a PEX alatt visszapótolat friss fagyasztott új, funkcionáló ADAMTS13 enzimet juttatunk a beteg szervezetébe.

Terápia során rendszerint methylprednisolont, továbbá a kevésbé reagáló, magas autoantitest títert mutató esetekben a rituximabot is kap a beteg. Újabb szerként kísérletes fázisban van a caplacizumab, mely a trombociták UL-VWF-hoz való kikötődését akadályozza meg.

Több megfigyelés is arra utal, hogy a TTP kialakulásához önmagában nem elég az ADAMTS13 deficiencia jelenléte, szükségesek másodlagos kiváltó tényezők. Az egyik ilyen megfigyelés, hogy néhány remisszióba kerülő betegnél, annak ellenére, hogy a beteg klinikuma és laboratóriumi paraméterei (hemolízis, trombocitopénia) nem utalnak aktív betegségre, a beteg plazmájában inhibitoros autoantitestek és ADAMTS13 deficiencia detektálható. A másik megfigyelés, hogy az *ADAMTS13* mutációval rendelkező betegben nem újszülött vagy csecsemőkben, hanem később felnőttkorban, esetleg terhességhez asszociáltan manifesztálódik a betegség. További érdekes megfigyelés, hogy a terhesség mellett, a TTP kialakulását gyakran megelőzi sebészeti beavatkozás vagy banális fertőzés.

Célkitűzés

Célkitűzésünk tehát abból a megfigyelésből indult ki, hogy az ADAMTS13 deficiencia mellett kellene másodlagos kiváltó ún. trigger tényezők, hogy a TTP kialakuljon. Kutatócsoportunk korábban igazolta a komplementrendszer aktivációját akut és remissziós betegekben. Mivel egy TTP-s epizódot megelőző terhesség vagy infekció kapcsán a komplementrendszer mellett a neutrofil granulociták is aktiválódhatnak, ezért megvizsgáltuk, hogy milyen a betegség lefolyása során a neutrofil granulocita aktivitás.

Kutatásunk második felében az endotélsejt-aktivitást kívántuk analizálni. Az endotélsejt kulcsfontosságú szerepe jólismert a TMA-k, TTP patogenezisében, azonban speciális, kellően szenzitív endotélsejt-markert nem vizsgáltak nagyobb esetszámú TTP-s beteganyagban, így egy új, TTP-ben eddig nem vizsgált markerrel szeretnénk volna az endotélsejtek aktivitását megfigyelni.

Összefoglalva, tehát szeretnénk volna a neutrofil granulociták- és az endotélsejtek-aktivitását vizsgálni, speciális, analitikailag jól mérhető, stabil markerekkel akut és remissziós TTP-s betegek mintáiban. Továbbá tanulmányozni kívántuk a két marker szintjének változását mintapárokkal rendelkező betegekben, így monitorizálva a terápia markerszintekre kifejtett hatását. Célkitűzésünk volt még a neutrofil granulocita- és endotélsejt-markerek különböző, betegségaktivitást jelző markerekkel való összefüggésének vizsgálata, különös tekintettel a komplementrendszerre.

Módszerek

A betegek beválogatása 2007 augusztusától 2014 januárjáig történt a laboratóriumunkba TTP gyanú miatt érkezett betegmintákból. A betegek beválogatási kritériuma az egy vagy több epizóddal járó Coombs negatív mikroangiopátiás hemolitikus anémiával és trombocitopéniával járó epizód volt, melyet súlyos ADAMTS13 deficiencia kísért. Kizárási kritérium az oligo-anuriás veseelégtelenség és egyéb más (infekció, autoimmun vagy malignus) alapbetegség megléte volt. A betegek mintáit megkülönböztettük aszerint, hogy a betegség melyik szakaszában került levételre. Tekintettel arra, hogy a terápia során használt PEX befolyásolhatta a különböző mérési eredményeket, ezért az akut TTP-s betegmintákat két csoportba soroltuk, így voltak a PEX megkezdése előtt és a PEX beavatkozások között (PEX alatt) levett minták. Aktív betegnek azt tekintettük, akinek trombocitopéniája (<150 G/L), mikroangiopátiás hemolitikus anémiája és ADAMTS13 deficienciája volt. A remisszióban levett mintákat is megkülönböztettük aszerint, hogy hematológiai vagy komplett remisszióban lettek levéve. A hematológiai remissziós betegnek a még aktív klinikum mellett javuló laborértékei voltak (trombocitaszám >150 G/L) az egymást követő két napon. A komplett remisszióban lévő betegeknek legfeljebb maradványtünetei voltak, emellett trombocitaszámuk 30 nap elteltével is normál tartományban volt (>150 G/L).

A neutrofil granulociták aktivitásának vizsgálatához a rendelkezésünkre álló betegek közül 38 TTP-s beteget válogattunk be (21 akut (PEX előtti), és 17 remissziós TTP-s), melyhez 20 egészséges kontrollt illesztettünk.

Egy betegnek több, különböző betegség szakaszban levett mintája is volt, ezért követéses vizsgálatra is lehetőségünk nyílt, így a 38 beteg összesen 49 mintáját használtuk fel.

Az endotélsejt-aktivitás analizálásához további betegeket tudtunk bevonni, így a betegek száma 54-re egészült ki. Huszonöt beteg első mintája a PEX megkezdése előtt, 12 betegnek a PEX alatt, továbbá 17 beteg mintája a remisszió szakaszában lett levéve. A betegek mellé 57 korban és nemből illesztett egészséges kontrollt válogattunk. Hasonló

módon, mint a neutrofil granulocita aktivitásának vizsgálatakor, itt is egy betegnek több, különböző szakaszból begyűjtött mintája volt, ezért követéses vizsgálatot tudunk végezni. Összesen tehát 54 beteg 82 mintáját használtuk fel.

Az ADAMTS13 aktivitás és az anti-ADAMT13 inhibitorok jelenlétének mérése egy fluorogénikus szubsztárt (FRETs-VWF73) segítségével lett meghatározva. A komplement paraméterek (C3, H-, I-, B-Faktor) és komplement aktivációs termékek (C1rC1sC1-inh, C3bBbP, C3a, Bb, C4d, SC5b-9) mérése nagyrészt sandwich ELISA módszerrel vagy radiális immundiffúziós (RID) módszerrel történt.

A neutrofil granulocita aktivitásának vizsgálatához, a neutrofil granulocita azurophil granulumból származó enzim, a neutrofil elasztáz (polymorphonuclear leukocyte elastase PMNE) α 1-proteináz inhibitorával (α 1-PI) alkotott komplexének mérését használtuk. A PMNE mellett meghatároztuk a MPO-t (myeloperoxidáz), mely szintén neutrofil granulocita eredetű. A mérések ELISA módszerrel történtek.

Az endotélsejt-aktivitásának vizsgálatához, a korábban már vizsgált VWF-antigén-en kívül egy új, eddig nem vizsgált markert, a carboxiterminális pro endothelin-1-et (CT-proET-1) használtuk. A CT-proET-1 az endothelin-1 vazóaktív molecula stabil, ekvimoláris mennyiségben termelődő prekursor fragmense. Méréséhez egy automatizált ún. time-resolved immunoluminometriás assay-t használtunk (BRAHMS Kryptor System). A VWF-antigén mennyiségét ELISA módszerrel határoztuk meg.

A statisztikai analízisekhez nem-paraméteres tesztekkel használtunk. A két csoport közötti folyamatos változók összehasonlítására Mann-Whitney U tesztet, három vagy több csoport összehasonlítására Kruskal-Wallis ANOVA tesztet, az ismétlődő tesztekhez Friedman tesztet alkalmaztunk. Az ANOVA teszt után Dunn's post tesztet végeztünk az alcsoportok összehasonlítására. A Spearman korrelációs koefficienseket nem-parametrikus módszerrel számoltuk ki. A mintapárok összehasonlításához Wilcoxon-tesztet alkalmaztunk. Kétoldalas p-értékeket számoltunk, az eredményt szignifikánsnak 0,05 alatt tekintettük ($p < 0,05$).

Eredmények

Megvizsgáltuk, hogy a különböző betegségszakaszban (akut, remisszió) levett betegmintákban és egészséges kontrollokban, hogyan oszlanak meg a PMNE valamint a VWF-antigén és CT-proET-1 szintek. A legmagasabb PMNE, CT-proET-1 és VWF-antigén szintek az akut TTP-s betegekben mutatkoztak. Az akut TTP-s betegminták és az egészséges kontrollokban mért PMNE szintek között szignifikáns különbség mutatkozott ($p < 0,001$). Ugyan ezt a tapasztaltuk a VWF-antigén ($p < 0,0001$) és a CT-proET-1 ($p < 0,0001$) esetében is. A remisszióban mért marker szintek jellemzően alacsonyabbak voltak az akut mintákhoz képest, azonban az egészséges kontrollokkal összehasonlítva szignifikáns mértékben emelkedett marker szintek voltak jelen a remissziós betegekben (PMNE: $p < 0,017$, VWF-antigen: $p < 0,0001$, CT-proET-1: $p < 0,01$). A PMNE, VWF-antigén és CT-proET-1 megoszlását megvizsgáltuk az ADAMTS13 aktivitás és a trombocita szám szerint kialakított csoportokban is. Az aktív csoportba trombocitopéniás (trombocita < 150 G/L) és ADAMTS13 deficienciás (aktivitás $< 10\%$) betegminták kerültek. A remissziós betegcsoportban a betegeknek normál trombocita számuk volt. A remissziós csoportot tovább bontottuk az ADAMTS13 deficiencia megléte vagy hiánya szerint. Mind a PMNE, mind a VWF-antigén és CT-proET-1 esetén hasonló megfigyelést tettünk, ugyanis, a legmagasabb markerszinteket az aktív betegekben detektáltuk. A PMNE esetében az aktív betegcsoportban mért markerszintek szignifikáns mértékben emelkedettek voltak a remissziós csoportokhoz képest (aktív TTP vs. ADAMTS13 deficiens remissziós TTP: $p = 0,0129$, aktív TTP vs. normál ADAMTS13 aktivitású remissziós TTP: $p = 0,0011$). Az ADAMTS13 inhibitor mennyiség (kevert normál és beteg plazma keverékéből mért ADAMTS13 aktivitás utal rá) és a PMNE szint között szignifikáns inverz korreláció mutatkozott akut TTP-s betegekben ($r = -0,547$; $p = 0,012$). Szignifikánsan magasabb VWF-antigén és CT-proET-1 szintek voltak láthatóak az aktív betegek mintájában az egészséges kontroll csoporthoz képest (VWF-antigén: $p < 0,0001$, CT-proET-1: $p < 0,0001$). Bár a remisszióban levett mintákban alacsonyabb VWF-antigén és CT-proET-1 szinteket mértünk az aktív TTP-s csoporthoz

képest, a remissziós minták és kontroll minták között is szignifikáns mértékű volt a különbség mindkét marker esetében ($p < 0,0001$). A remissziós betegekben az ADAMTS13 deficiencia megléte vagy hiánya nem befolyásolta a VWF antigén és CT-proET-1 szinteket.

Mivel rendelkezésünkre állt egy beteg több, különböző betegsége szakaszban gyűjtött mintája, ezért lehetőségünk nyílt a markerszintek követésére. Szignifikáns mértékű csökkenést tapasztaltunk a PMNE szintek esetében, a hematológiai remissziót elérő betegekben, az első PEX terápia előtt levett mintákhoz képest ($p = 0,031$). A VWF-antigén esetében jelentős csökkenés volt látható a terápiás protokoll alatt levett mintákban ($p < 0,05$), azonban a komplett remisszió alatt levett mintákban, bár a minták többségében csökkenés volt jelen, a csökkenés mértéke nem volt szignifikáns mértékű. A CT-proET-1 esetében, az első levett (PEX előtti) mintához képest mind a terápia alatt ($p < 0,05$), mind a remisszióban levett mintákban ($p < 0,01$) szignifikáns mértékű csökkenés volt tapasztalható.

A PMNE a TTP hagyományos betegségaktivitást jelző laboratóriumi paramétereivel, a trombocitaszámmal és hemoglobin mennyiséggel fordított arányú összefüggést mutatott (trombocita: $r = -0,521$; $p = 0,015$ akut TTP-s betegekben, hemoglobin: $r = -0,382$; $p = 0,018$ akut és remissziós betegekben).

A betegeink egy részében a komplement faktorokat és komplement aktivációs termékeket a korábbi vizsgálataink során már megmértük. A PMNE szoros, pozitív összefüggést mutatott a komplementrendszer közös útjának markerével a C3a-val ($r = 0,367$; $p = 0,024$), továbbá az alternatív út egyik aktivációs markerével, a Bb-vel is ($r = 0,392$; $p = 0,015$).

A CT-proET-1 lényeges összefüggést nem mutatott a trombocitaszámmal és hemoglobin mennyiséggel, azonban, szignifikáns, pozitív kapcsolat mutatkozott az alternatív út aktivációs markerével (C3bBbP: $r = 0,528$; $p = 0,013$) és a terminális úttal (SC5b-9: $r = 0,306$; $p = 0,135$).

A VWF-antigén és CT-proET-1 között nem volt összefüggés.

Mivel a PMNE- és CT-proET-1 szintek jelentős összefüggést mutattak a komplementrendszerrel, különösen annak alternatív útjával, ezért megvizsgáltuk, hogy a H-Faktor, mint az alternatív út fontos regulátora, hogyan oszlik meg a betegség szakasz és aktivitás (trombocitaszám és

ADAMTS13 aktivitás) szerinti csoportokban. Mindkét csoportosításban jelentősen csökkent H-Faktor szinteket kaptunk az akut (aktív) betegek mintáiban, továbbá alacsonyabb H-Faktor szintek jelen voltak a remissziós mintákban is az egészséges kontroll csoporthoz képest. A különbség mértéke mind az akut mind a remissziós mintákban szignifikáns mértékű volt, ha az egészséges csoporttal hasonlítottuk össze a H-Faktor szinteket (akut TTP vs. egészséges kontroll: $p < 0,01$, remisszió vs. egészséges kontroll: $p < 0,05$). Azokban a betegekben, akiknek több, különböző szakban levett mintájuk volt, nem volt egyértelmű irányú változás a mért H-Faktor szintek tekintetében.

Következtetések

Munkánk során a TTP patogenezisének mélyrehatóbb elemzésével foglalkoztunk. Vizsgálatunk alapján elmondható, hogy az emelkedett PMNE és CT-proET-1 szint jellemző akut TTP-re. A mért neutrofil granulocita és endotélsejt-markerek szintje jelentős csökkenést mutatott a remisszió elérését követően a követéses betegmintákban. A PMNE szint jelentős, fordított arányú összefüggést mutatott a betegség aktivitását jelző trombocitaszámmal, hemoglobin mennyiséggel, valamint a funkcionális ADAMT13 inhibitor szintekkel is. Továbbá a PMNE összefüggést mutatott a komplement alternatív útjának markerével, a Bb-vel is, ami arra utal, hogy a neutrofil granulocita és komplement-aktiváció párhuzamos van jelen akut TTP-ben. A CT-proET-1 esetében is pozitív összefüggést találtunk az endotélsejt-marker és komplement-aktivációt jelző markerek között, különös tekintettel a komplement alternatív útjára. A komplementrendszerrel kapcsolatos összefüggés miatt vizsgáltuk a H-Faktort, mely az akut és remissziós mintákban szignifikáns mértékű csökkenést mutatott az egészséges mintákhoz viszonyítva.

Eredményeink arra utalnak, hogy akut TTP-s betegek mintájában mért neutrofil granulocita aktivációs marker, a PMNE szintje magas. Az akut TTP-s betegek mintáiban mért magasabb PMNE szintek pedig jellemzően alacsonyabb trombocita számmal, hemoglobin szintekkel és magasabb ADAMT13 inhibitor mennyiséggel jártak, melyek a betegség aktivitását, súlyosságát jelző paraméterek. A neutrofil granulocita szerepét korábban trombotikus mikroangiopátiákban már vizsgálták, melynek során emelkedett DNS és MPO szinteket detektáltak akut TTP-ben. A szabad DNS és MPO molekulákat a neutrofil granulocita eredetű ún. „neutrophil extracellular traps” (NET) alkotó elemeinek tartották, mely az aktivált sejtekből származó hálós szerkezetű molekula. A NET DNS és hiszton alapkomponensein kívül nagy mennyiségben tartalmaz PMNE-t, mely nélkülözhetetlen eleme a NET-nek és a neutrofil granulocita aktiváció során együtt szabadul fel a sejtből. Mindezekből arra következtetünk, hogy a TTP-s betegeinkben mért magas PMNE szint neutrofil granulocita aktiváció hatására emelkedik meg. A mért magas PMNE szintek alapján a neutrofil

granulocita aktiváció jellemző volt akut TTP-re. A normál thrombocita számmal rendelkező, hematológiai remisszióban lévő TTP-s betegeknél, függetlenül az ADAMTS13 deficiencia meglététől vagy hiányától, jellemzően alacsonyabb PMNE szintek voltak mérhetőek. Az egészséges kontrollokban a remissziós TTP-s betegek PMNE szintjénél is alacsonyabb enzim szintek voltak jelen. Követéses mintáinkban azt figyeltük meg, hogy az akut betegség során alkalmazott PEX terápia hatására a betegek többségében a terápiás sorozatok alatt csökkent, a hematológiai remissziót elérve pedig szignifikáns mértékben csökkent a PMNE szintje az akut mintapárhoz képest.

A TTP fellángolását gyakran megelőzi infekció, sebészeti beavatkozás vagy terhesség, mely folyamatok során ismert a neutrofil granulociták aktivációja. Az aktivált sejtek olyan enzimeket, reaktív oxigénszármazékokat (ROS), NET-et, makromolekulákat bocsátanak a környezetükbe, ami egy genetikailag (ADAMTS13 mutáció) vagy immunológiailag (ADAMTS13 inhibitoros autoantitest) arra hajlamos egyénben a TTP manifesztálódását eredményezheti. A NET képes a trombus kialakulását elősegíteni DNS komponensén keresztül, valamint a ROS képes a VWF molekula elhasítását gátolni, parciális ADAMTS13 enzim gátlásán keresztül. A NET továbbá képes a komplementrendszer aktivációjára, miután a komplement elemek számára (C3b) aktivációs felületet biztosít. Más kutatócsoportokkal párhuzamosan mi is igazoltuk a komplementrendszer (klasszikus/lektin/alternatív) aktivációját TTP-s betegekben. Jelen tanulmányunkban pozitív összefüggést találtunk a PMNE és C3a szintek között, melyek a NET-en keresztül kapcsolódhatnak össze. A PMNE Bb-vel való összefüggése az alternatív út jelenlétére utal, mely aktivációján keresztül a komplement-aktivációt tovább erősíti. A komplement-aktiváció hatására (C3a, C5a) további neutrofil granulociták aktiválódhatnak, további NET-et bocsátva a környezetbe, melynek hatására egy pozitív visszacsatolású, egymást felerősítő rendszer alakul ki a betegség előrehaladását eredményezve. A neutrofil granulocita aktiváció a NET kibocsátásán keresztül, tehát olyan másodlagos trigger lehet az arra hajlamos egyénben, ami a TTP manifesztálódását okozhatja.

A PMNE mérése jelenleg manuális immuno/enzimatis assayel történik és mérése költséges, ezért klinikai alkalmazása nehezen

megoldott. Vizsgálatunk további független megerősítést igényel mivel a vizsgálatunk kis betegszámon végzett leró jellegű tanulmány. Mindazonáltal eredményeink arra utalnak, hogy a PMNE alkalmas lehet a terápia hatékonyságának megítélésére, a betegség lefolyásának és aktivitásának megítélésére.

A neutrofil granulocita aktiváció mellett az endotélsejt-aktivitást is vizsgáltuk TTP-s betegeinkben.

A korábbi tanulmányokhoz képest lehetőségünk nyílt nagyobb TTP esetszámban vizsgálni az endotélsejt-aktivitást. Az endotélsejt-aktivitást akut, remissziós TTPs-s és egészséges kontroll csoportokat összehasonlítva tudtuk vizsgálni. A legnagyobb VWF-antigén és CT-proET-1 szinteket akut TTP-ben, ugyanakkor az akut mintáknál alacsonyabb, de az egészséges kontrollcsoporténál magasabb endotélsejt-marker szinteket detektáltunk a remissziós mintákban. Sem a VWF-antigén, sem a CT-proET-1 szinteket nem befolyásolta az ADATMS13 deficiencia megléte vagy hiánya a remissziós betegek mintáiban. Vizsgáltunk az endotélsejt-aktiváció és komplement aktiváció közötti kapcsolatot és pozitív korrelációt kaptunk a két rendszer között. A komplementrendszer mentén tovább haladva a H-Faktor szinteket is vizsgáltuk és a H-Faktor csökkenését tapasztaltunk az akut és remissziós betegek mintáiban az egészséges kontroll csoporttal összevetve.

A betegség aktivitása és az endotélsejt-aktiváció között szoros összefüggést találtunk. Bár mind a VWF-antigén, mind a CT-proET-1 endotélsejt eredetű marker, expressziójuk, tárolásuk és kibocsátásuk szabályozása eltérő. Míg a VWF az endotélsejteken kívül nagymennyiségben megtalálható trombocitákban is, addig a CT-proET-1 speciálisan endotélsejt eredetű, továbbá termelődésének szabályozása génexpressziós szinten finomabban szabályozott. Ez a megfigyelés alátámasztja azt az elképzelésünket, hogy a CT-proET-1 szintjének változása jól követi az endotélsejt-aktivitását, továbbá ezen keresztül a terápiára adott válasz hatékonyságát. Korábbi kutatócsoportok hozzánk hasonló módon igazolták az endotélsejt-aktivációt akut TTP-ben, azonban jelen tanulmányunkat specifikusabb markerrel és relatíve nagyobb, jól strukturált beteganyagban végeztük.

Az aktív TTP betegek mintáiban magas VWF-antigén és CT-proET-1 szinteket mértünk az egészséges kontrollokhoz képest. Lényegesen

magasabb VWF-antigén és CT-proET-1 szinteket mértünk a PEX előtt levett akut TTP-s betegmintákban az egészséges kontrollcsoporthoz képest. A remissziós betegek mintáiban, az akut, PEX előtt levett mintákhoz képest szignifikáns mértékben csökkent CT-proET-1 szinteket detektáltunk a mintapárral rendelkező betegeinkben. VWF-antigén esetében szignifikáns mértékű csökkenés nem volt tapasztalható. A terápia alatt levett mintákban mindkét marker esetében csökkenés volt látható.

Tekintettel korábbi komplementrendszerrel kapcsolatos eredményeinkre megvizsgáltuk, hogy milyen összefüggés áll fent az endotélsejt-aktiváció és komplement-aktiváció között. Az akut TTP betegeken pozitív, szignifikáns összefüggést találtunk a CT-proET-1 és az alternatív út aktivációs markere a C3bBbP között, továbbá jelzett pozitív összefüggést a komplement terminális út markere, az SC5b-9 között. Továbbá H-Faktor csökkenést tapasztaltuk akut és remissziós betegeken az egészséges kontrollokhoz képest. Az utóbbi megfigyelésünkre magyarázatot adhat az a megfigyelés, hogy az elhasítatlan UL-VWF-hoz képes nagy mennyiségben a H-Faktor kötődni, amely így, egy konzupciós mechanizmus útján a H-Faktor szint csökkenéséhez vezet. A H-Faktor csökkenése az alternatív út diszregulációjához, komplement aktivációhoz vezet. Az a megfigyelésünk, hogy a komplement alternatív út aktivációs markere (C3bBbP) pozitív összefüggést mutatott az endothelin-1-gyel, továbbá a H-Faktor csökkenés és az evvel járó alternatív út diszreguláció, arra utalhat, hogy a komplement aktivációnak fontos szerepe lehet a trombotikus mikroangiopátia progressziójában. Az ADAMTS13 deficiencia következtében felhalmozódó UL-VWF trombocita aktivációt idéz elő, mely trombin felszabadulással jár. A megnövekedett trombin képes a C3-on keresztül a komplementrendszer aktivációját előidézni, valamint az endotélsejteket aktiválni, mely további UL-VWF és endothelin-1 felszabaduláshoz vezet. A H-Faktor diszfunkció mindezt a folyamatot tovább segíti azáltal, hogy a trombociták felszínén zajló alternatív út aktivációt nem képes szabályozni. Mindezek a folyamatok a trombocita-, trombin-, komplement- és endotélsejt-aktiváción keresztül egy egymásra ható és egymást felerősítő környezetben a trombotikus mikroangiopátia progressziójához vezetnek.

Eredményeink arra utalnak tehát, hogy az emelkedett CT-proET-1 szint TTP-ben az endotélsejtek aktivációját, a betegség aktivitását jelzi. A remissziós betegekben tapasztalt magasabb CT-proET-1 értékek egy folyamatos, de enyhébb endotélsejt-aktivációra utalnak. Azt, hogy pontosan mi okozza ezt az endotélsejt-aktivációt remissziós betegekben, jelen tanulmányunk nem taglalja, ehhez további tanulmányok szükségesek, valamint további vizsgálatot igényel az is, hogy a CT-proET-1 mérés előre jelezhet-e egy esetleges exacerbációt vagy relapszust. Az endotélsejt-aktiváció szerepének vizsgálata, tisztázása fontos tényező trombotikus mikroangiopátiákban, ugyanis több tanulmány is arra utal, hogy az endotélsejt-aktivitás követése alkalmas eszköz lehet a prognózis megítélésére és a terápia időtartamának, hatékonyságának a követésére.

Az ADAMTS13 deficiencia mellett magas a rizikója a TTP kialakulásának, de az elmúlt évek megfigyelései arra utalnak, hogy kellenek további események, melyek hozzájárulnak a TTP manifesztálódásához. A TTP kialakulását időben megelőzheti infekció, sebészeti beavatkozás, vagy kialakulhat a peripartum időszakban. Ezek a klinikai állapotok olyan citokin termelődést (IL-6, TNF-alfa), komplement aktivációt, valamint koagulációs kaszkádok aktivációját eredményezik, melyek aktiválják az endothelin-1 géntranszkripcióját és termelődését. Mindezek alapján a CT-proET-1-et egy speciális, a környezeti változásokra gyorsan reagáló, jól mérhető biomarkernak gondoljuk TTP-ben és potenciálisan más trombotikus mikroangiopátiákban.

Eredményeink tehát arra utalnak, hogy TTP során egy olyan oda-vissza ható, egymást potenciózó rendszerek aktív jelenlétével lehet számolni (neutrofil granulocita-, endotélsejt-, komplement-aktiváció), melyek egy fertőzés, terhesség, vagy egy sebészeti beavatkozás kapcsán aktiválódnak és ezáltal elegendő triggertényezők lehetnek az ADAMTS13 deficiencia mellett, hogy a TTP manifesztálódjon.

Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Mikes B, Sinkovits G, Farkas P, Csuka D, Schlamadinger A, Razso K, Demeter J, Domjan G, Reti M and Prohaszka Z. (2014) Elevated plasma neutrophil elastase concentration is associated with disease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res*, 133: 616-21

IF: 2,447

Mikes B, Sinkovits G, Farkas P, Csuka D, Razso K, Reti M, Radvanyi G, Demeter J and Prohaszka Z. (2016) Carboxiterminal pro-endothelin-1 as an endothelial cell biomarker in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*, 115: 1034-43

IF: 5,255

Disszertációhoz nem kapcsolódó, társszerzős publikációk

Leffler J, Prohaszka Z, Mikes B, Sinkovits G, Ciacma K, Farkas P, Reti M, Kelen K, Reusz GS, Szabo AJ, Martin M and Blom AM. (2017) Decreased Neutrophil Extracellular Trap Degradation in Shiga Toxin-Associated Haemolytic Uraemic Syndrome. *J Innate Immun*, 9: 12-21

IF: 4.273

Farkas P, Csuka D, Mikes B, Sinkovits G, Reti M, Nemeth E, Racz K, Madach K, Gergely M, Demeter J and Prohaszka Z. (2017) Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies. *Immunobiology*, 222: 119-127

IF: 2.781