

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

2088.

MIKES BÁLINT

**Klinikai és kísérletes kardiológia / atherosclerosis
című program**

Programvezető és Témavezető: Dr. Prohászka Zoltán, egyetemi tanár

A trombotikus trombocitopéniás purpura patogenezisének vizsgálata

Doktori értekezés

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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1.Bevezetés	5
1.1. A trombotikus mikroangiopátiák rövid ismertetése	5
1.2. A TTP történeti áttekintése.....	8
1.3. A TTP etiológiája, klinikuma, diagnózisa.....	9
1.4. A TTP kezelése, prognózisa.....	11
1.5. A TTP részletes patogenezise.....	14
1.5.1. A Von Willebrand Faktor és az ADAMTS13 enzim kapcsolata	14
1.5.2. Az ADAMTS-deficiencia kialakulásának mechanizmusa	20
1.6. A neutrofil granulocita szerepe trombotikus mikroangiopátiákban	22
1.7. Az endotélsejt szerepe trombotikus mikroangiopátiákban.....	25
1.8. A komplementrendszer szerepe trombotikus mikroangiopátiákban	27
2. Célkitűzések.....	29
3. Módszerek.....	30
3.1. Betegbeválogatási kritériumok és definíciók	30
3.2. A neutrophil elasztáz projekt betegleírása.....	33
3.3. Az endothelin-1 projekt betegleírása.....	34
3.4. Az ADAMTS13-aktivitás meghatározása	36
3.5. A komplementproteinek és aktivációs termékeik szintjének meghatározása.....	36
3.6. A neutrofil granulociták aktivációját jelző markerek meghatározása	37
3.7. Az endotélsejt aktivációs markerek meghatározása	38
3.7.1. A VWF-antigén meghatározása	38
3.7.2. A CT-proET-1 meghatározása	38
3.8. Statisztikai analízis	38
4. Eredmények.....	40
4.1. Neutrofil granulocita aktiváció TTP-ben.....	40
4.1.1. A neutrofil elasztáz projekt részletes betegleírása.....	40
4.1.2. A PMNE-szintek megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegek között	40
4.1.3. A PMNE-szintek betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben	41
4.1.4. A PMNE-szintek változása terápia hatására.....	44
4.1.5. A PMNE betegségaktivitási-markerekkel való összefüggése	45
4.1.6. A PMNE összefüggése a komplementaktivációs-markerekkel.....	46
4.2. Endotélsejt-aktiváció TTP-ben	48
4.2.1. Az endothelin-1 projekt részletes betegleírása	48
4.2.2. A VWF-antigén megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegekben	48
4.2.3. A VWF-antigén betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben	49
4.2.4. A VWF antigén szintek változása terápia hatására	50
4.2.5. A CT-proET-1 megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegekben	52
4.2.6. A CT-proET-1 betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben	53

4.2.7. A CT-proET-1-szintek változása terápia hatására.....	55
4.2.8. A komplement aktivációs markerek és a CT-proET-1 kapcsolata TTP-ben.....	56
4.3. A Komplement H-faktor szintek TTP-ben	57
4.3.1. A H-faktor szintek megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegekben ..	57
4.3.2. A H-faktor betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben	58
4.3.3. A H-faktor szintek változása terápia hatására	59
5. Megbeszélés	61
5.1. Neutrofil granulocita aktiváció TTP-ben.....	61
5.2. Az endotélsejt-aktiváció vizsgálata TTP-ben	66
6. Következtetések.....	76
7. Összefoglalás.....	78
8. Summary	79
9. Irodalomjegyzék.....	80
10. Saját publikációk jegyzéke	99
10.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikációk	99
10.1. Disszertációhoz nem kapcsolódó társszerzős publikációk	99
11. Köszönetnyilvánítás	100

Rövidítések jegyzéke:

ADAMTS13: a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin repeats 13

aHUS: atípusos hemolitikus urémiás szindróma

CRP: C-reaktív protein

CT-proET-1: carboxy-terminalis proendothelin-1

DGKE: diacilglicerol kináz enzim

DIC: disszeminált intravaszkuláris koaguláció

EMC: endotélsejt-eredetű mikropartikulum

ET-1: endothelin-1

FFP: friss fagyasztott plazma

HUS: hemolitikus urémiás szindróma

LDH: laktátdehidrogenáz

LPS: lipopoliszacharid

MAC: membrain attack complex

MPO: mieloperoxidáz

NET: neutrophil extracellular trap

PCR: polimeráz láncreakció

PEX: plazmacsere

PMNE: polimorfonukleáris neutrofil elasztáz

STEC: Shiga toxint termelő Escherichia coli

Stx: Shiga toxin

THCY: trombocita

TMA: trombotikus mikroangiopátia

TNF- α : tumor nekrosis faktor alfa

TTP: trombotikus trombocitopéniás purpura

UL-VWF: ultra large von Willebrand faktor

USS: Upshaw-Schulman-szindróma

VWF: von Willebrand faktor

WPT: Weibel-Palade-test

1. Bevezetés

1.1 A trombotikus mikroangiopátiák rövid ismertetése

A trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) a trombotikus mikroangiopátiák (TMA) nagy csoportjába tartozik. A TMA-k klinikai képe sokszor nagyon hasonló egymáshoz. Súlyos, életveszélyes kórképek lévén, mihamarabbi beavatkozást, terápiát igényelnek, ezért sokszor nehéz helyzetben van a beteget ellátó orvos. Mielőtt részletesen bemutatnám a TTP patogenezisét, röviden szeretném ismertetni a TMA-k alcsoportjait (1. táblázat).

1. táblázat. A trombotikus mikroangiopátiák alcsoportjai.

TMA - beosztása			Tünetek	Kiváltó ok	Diganozis
HUS	Fertőzések eredetű	STEC-HUS	Hasmenés, veseelégtelenség	<i>E.coli</i> , <i>S. dysenteriae</i>	Szerológia, PCR, széklet-tenyésztés
		P-HUS	Meningitis, pneumonia, veseelégtelenség	<i>Pneumococcus</i> , <i>Influenza A-H1N1</i>	Szerológia, PCR, váladék-tenyésztés
	Nem fertőzések eredetű	Komplement-diszreguláció	Veseelégtelenség, családi anamnézis pozitív	HF, MCP, IF C3, BF mutációja	Genetikai analízis
		DGKE-HUS		DGKE enzim defektus	
		Cobalamin HUS		Cobalaminanyagcsere zavar	
	Szekunder HUS/TTP			Veseelégtelenség, MOF	Autoimmun, malignus és egyéb kórképek
TTP	Szerzett	Petechiák, purpurák, neurológiai tünetek	Gátló ADAMTS13-elleni autoantitestek	ADAMTS13-aktivitás és gátló antitest vizsgálata	
	Veleszületett		ADAMTS13 gén mutációja	ADAMTS13-aktivitás és genetikai analízis	

A TMA-k közös jellemzője a betegség hirtelen kezdete, többnyire epizódokban zajló lefolyása és a súlyos, akár életet veszélyeztető szervi elégtelenség klinikai képe. A laboratóriumi paraméterek között jellemző a trombocitopénia (<150 G/L), mely nem ritkán 50 G/L érték alá is eshet. A trombocitopénián kívül jellemző a direkt Coombs-negatív hemolízis, mely anémiával, bilirubin- és LDH- (>450 U/L) emelkedéssel jár. A hemolízis mikroangiopátiás eredete mellett szólnak a perifériás vérkeneten látható fragmentociták. A betegség képe hasonlíthat a disszeminált intravaszkuláris koagulációra (DIC), azonban TMA-ban nem jellemző a csökkent fibrinogén-szint.

A TMA-k feloszthatók primer (idiopátiás) és szekunder kórformákra (lásd 1. táblázat). A primer formák háttérében általában más betegség nem mutatható ki, a szekunder kórformák másodlagosan, súlyos alapbetegség szövődményeként alakulhatnak ki.

A TMA-k egy nagy csoportja az etiológiailag és klinikailag is heterogén hemolitikus urémiás szindróma (HUS). A HUS-t két nagy alcsoport alkotja. Az első csoporthoz tartozik a legtöbbször egy epizódban zajló, fertőzéshez köthető HUS, melynek háttérében enterohemorragiás *Escherichia coli* (EHEC), *Shigella dysenteriae* 1 típus, *Streptococcus pneumoniae*, vagy *Influenza A-H1N1* fertőzés igazolható. A második csoporthoz, az ún. atípusos HUS (aHUS) tartozik, mely gyakran relabáló lefolyást mutat és a háttérében infekció, kórokozó nem igazolható. Közös jellemzőjük a mikroangiopátiás hemolitikus anémia, a trombocitopénia (<150 G/L) és az akut veseelégtelenség megjelenése.

Fertőzések eredetű HUS

A fertőzéshez köthető HUS háttérében leggyakrabban a Shiga-toxint (Stx) termelő *Escherichia coli* (STEC) baktérium által okozott fertőzés áll, mely véres-nyákos hasmenést (95%-ban) okoz. Veseelégtelenség képe a betegek 50%-nál látható. A veseelégtelen betegek közel 95%-a igényel dialízist. Általában szupportív terápia elégséges, antibiotikum adása ritkán jön szóba (1).

Atípusos HUS

Az aHUS egy heterogén, relabáló és gyakran rossz prognózisú betegségcsoportot ölel fel. Az 1990-es évek végén vált ismertté, hogy az aHUS-ként diagnosztizált esetek

jelentős részének háttérében a komplementrendszer diszregulációja áll. Az utóbbi években további, a komplementrendszer működésétől független patomechanizmusú alcsoportok is felismerésre kerültek. Az egyik alcsoport háttérében a Cobalamin anyagcsere zavara áll (Cobalamin HUS), a másik háttérében pedig a diacilglicerolkináz-enzim defektusa miatt (*DGKE* mutáció) alakul ki HUS (DGKE-HUS).

Az aHUS-os betegek többségére jellemző a komplementrendszer szabályozását érintő veleszületett vagy szerzett funkciózavar, azonban az esetek egy részében nem sikerül a betegség háttérében prediszponáló tényezőt azonosítani.

Az aHUS háttérében leginkább a komplementrendszer alternatív út szabályozásának defektusa áll. Leggyakrabban a H-faktor, MCP (membrán kofaktor protein), I-faktor, C3, B-faktor génjeit érintő variánsok képezik a prediszponáló tényezőket, de az esetek egy részében az alternatív út defektusát a H-faktor ellen termelő antitestek okozzák. A komplement-diszregulációval rendelkező aHUS-os betegekben nagyobb arányban alakul ki veseelégtelenség a többi HUS formához képest (1). A betegek nagy része a későbbiekben dialízisre, transzplantációra szorul.

Szekunder eredetű HUS

Az ismert, vagy a vizsgálatok során diagnosztizált alapbetegség talaján megjelenő mikroangiopátiát nevezzük szekunder HUS-nak. Az esetek többségében csontvelő-transzplantációhoz, szervtranszplantációhoz, malignus betegséghez, autoimmun betegségekhez (SLE: systemás lupus erythematosus, APS: antifoszfolipid szindróma, scleroderma, dermatomyositis), különböző gyógyszerek (calcineurin-inhibitorok, sirolimus, anti-VEGF), malignus hipertenzió ill. HIV-infekcióhoz asszociáltan jelennek meg. Lényeges az elkülönítésük, ugyanis a szekunder HUS kezelése főként az alapbetegség rendezésén múlik.

Mivel az utóbbi időben világossá vált, hogy az aHUS-os betegek nagy részében a komplementrendszer defektusa kisebb-nagyobb mértékben tetten érhető, igény volt egy olyan gyógyszeres kezelés kifejlesztésére, mely képes a komplementrendszer szabályozatlan túlaktiválódását fékezni. A komplementrendszer C5 komponense ellen kifejlesztett anti-C5 (eculizumab) képes a komplement túlaktivációját

megakadályozni, lehetővé téve a vesefunkció javulását és az aHUS-os betegek vesetranszplantációját (2).

A gyógyszer hatékonysága ellenére, elérhetősége, ára és a kezelési időtartam hosszának bizonytalansága miatt még nem kerülhetett széleskörben alkalmazásra, de fokozatosan bővül felhasználási területe. Ugyan TTP-ben is ismert a komplementaktiváció jelenléte, jelenleg még nem indikált az eculizumab kezelés és az ezidáig történt off-label alkalmazások tapasztalatai alapján nem ítélték meg az eculizumab hatásossága ebben a betegségben (3).

1.2. A TTP történeti áttekintése

A TTP első leírása 1924-ig nyúlik vissza egy 16 éves lány esete kapcsán, akinek a kórtörténetében láz, petechiák és mikroangiopátiás hemolitikus anémia szerepelt. A szindrómát később leírója után, Moschcowitz betegségnek is említik (4). Az autopsziás vizsgálatok során hyalintrombust figyeltek meg több szerv vaszkulaturájában. 1947-re több eset is leírásra került, majd a betegséget Singer (5) nevezte el TTP-nek. A betegség tanulmányozhatóságát azonban nagymértékben korlátozta a TTP magas mortalitása. Schulman az 1960-as években felfigyelt arra, hogy egy krónikus trombocitopéniával rendelkező, több alkalommal relabáló leánygyermeknél az anémiát és a trombocitopéniát vérátömlesztéssel kezelve a trombocitaszám emelkedett. Később azt is megfigyelte, hogy a terápia hatásosságáért elsősorban a vér plazma része felelős (6), ezért a gyermeket a továbbiakban friss fagyasztott plazmával kezelték. A plazma adására klinikai javulás volt megfigyelhető a gyermeknél, azonban a plazma hatása 10-20 napon belül csökkent, ezért krónikus terápia igénye merült föl. Az 1970-es évek végén jelentett áttörést a teljes vércsere, majd a plazmaferezis és plazma infúzió terápiába való bevezetése kongenitális és szerzett TTP-ben, mely jelentősen csökkentette a mortalitást, így a betegség lefolyása, patogenezise jobban tanulmányozhatóvá vált (7). Upshaw (8) egy gyermekkora óta krónikusan trombocitopéniás, plazmaterápiára reagáló beteg tanulmányozása során figyelt fel arra, hogy a betegség hasonló Schulman (6) 1960-as esetleírásához, aki szintén a betegség kongenitális jellegét feltételezte. Később a TTP kongenitális formáját róluk nevezték el (Upshaw-Schulman syndrome-USS).

A TTP patogenezisében a következő áttörést Moake 1982-ben (9) tett megfigyelése jelentette. Moake és munkatársai TTP-s betegek plazmájában a Von Willebrand faktor (VWF) ultra-nagy (ultra large: UL) formáját észlelték (Az UL-VWF-nak a több mint 20 monomer-alegységből álló multimert nevezzük (10), lásd később). A tanulmányba Schulman és Upshaw krónikus relabáló TTP-s betegeit is bevonta. Moake azt feltételezte, hogy egy bizonyos lebontó enzim hibája okozza az UL-VWF jelenlétét. A 90 évek vége felé, a Moake által feltételezett lebontó enzimet Furlan (11) és Tsai (12) egyidőben vizsgálták. Furlan és munkatársai több megfigyelést is tettek, ők vizsgálták először krónikus, relabáló TTP-ben a VWF-t lebontó enzim aktivitását, és igazolták kongenitális TTP-ben az enzim defektusát (13). Nem sokkal később Furlan, egy több beteget felölelő tanulmányban (14) azt is leírta, hogy a VWF proteáz inhibitora egy IgG izotípusú antitest, amely a kongenitális TTP-ben nincs jelen. Furlan megfigyelését még abban az évben Tsai és munkacsoportja is alátámasztotta (15). A VWF-t hasító proteáz azonosítására a kétezres évek elején került sor, ekkor több munkacsoport is bizonyította, hogy a kérdéses proteáz egy metalloproteáz, amely az ADAMTS (**a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin repeats**) enzimcsalád 13-ik tagja (16-19).

1.3. A TTP etiológiája, klinikuma, diagnózisa

A TTP egy meglehetősen ritka előfordulású, hirtelen kezdetű, általában több epizódos, relapszusokkal tarkított, súlyos hematológiai betegség. A TTP incidenciája 1-6/1 millió, amely az elmúlt években valamelyest emelkedett (20). A betegek közel 70%-a nő, jellemzően a 30-40 év közötti korosztály érintett. Az esetek többségében szerzett, inhibitoros típusú TTP-t diagnosztizálnak, kisebb hányadában kongenitális (familiáris vagy de novo mutáció) vagy szekunder TTP a diagnózis (összes eset <10%-a).

Korábban a betegséget öt fő tünet alapján jellemezték (pentád) úgy, mint konzupciós trombocitopénia, fragmentocitás hemolitikus anémia (Coombs negatív), láz, fluktuáló neurológiai tünetek és veseérintettség, mely rendszerint elegendő volt a betegség diagnózisához és a terápia megkezdéséhez. Az öt fő tünet azonban nem minden betegnél volt jelen egyszerre, ezért ezt a kritériumot módosították. Jelenleg a más okkal nem magyarázható, konzupciós, súlyos trombocitopénia és a Coombs negatív, hemolitikus, mikroangiopátiás eredetű anémia alapján kimondható a diagnózis, melyet

az ADAMTS13 enzim deficienciája (<10%) inhibitorral vagy *ADAMTS13*-mutációval, valamint más aktív betegség hiánya jelentősen alátámasz (21).

A trombocitopénia következtében apró petechiák, vagy purpurák jelentkezhetnek a bőrön, ezen kívül előfordulhat hematuria, mérsékelt gasztrointesztinális vérzés vagy epistaxis. A súlyos vérzés előfordulása ritka.

A TTP-ben főként (70-80%-ban) változatos neurológiai tünetek fordulnak elő. A neurológiai tünetek lehetnek enyhébbek (fejfájás, fáradtság, szédülés, zavartság, paresztézia, látászavar, zsibbadás) és súlyosabbak (stroke (afázia, parézis, ataxia), tudatzavar, konvulzió, kóma). Láz fertőzéstől függetlenül jelen lehet (centrális láz). A vesekárosodás előfordulása ritka, a szérum kreatinin ritkán haladja meg a 200 $\mu\text{mol/l}$ -t. Atípusos abdominális panaszok az enterális mikroangiopátia kapcsán kialakuló szervi iszkémia következtében fordulhatnak elő. A kardiális tünetek (akut szívelégtelenség, mellkasi fájdalom, troponinemelkedés) jelentősek lehetnek, akár akut koronária szindróma gyanúját is felvethetik, ami differenciáldiagnosztikai problémát okozhat.

Tekintettel a TTP gyors és súlyos lefolyására, mielőbbi diagnózis felállítása szükséges. A definitív kezelés megkezdéséhez a beteg súlyos állapotán, klinikumán túl a hemolitikus mikroangiopátia, anémia (LDH >450U/L, csökkent haptoglobin, emelkedett bilirubin) jelenléte és a trombocitopénia (<150G/L) elég. Fontos azonban differenciáldiagnosztikai célból mihamarabb az ADAMTS13-aktivitás meghatározása (ADAMTS13-aktivitás <10%) és a hemoszteziológiai paraméterek vizsgálata a DIC-től való elkülönítés miatt. Továbbá fontos az ADAMTS13-inhibitorvizsgálata az ADAMTS13-deficiencia eredetének tisztázása céljából. Ha a deficiens ADAMTS13-aktivitás mellett nem detektálhatók gátló antitestek, célszerű az *ADAMTS13* gén szekvenálása USS lehetősége miatt. Az ADAMTS13-aktivitás értékelésekor figyelembe kell venni azt, hogy az ADAMTS13-aktivitás lecsökkenhet májbetegségekben, disszeminált malignus kórképekben, terhesség során, krónikus metabolikus és gyulladásos állapotok során, valamint újszülött korban.

További differenciáldiagnosztikai laboratóriumi vizsgálatok közé tartozik a teljes koagulációs, májfunkciós, szívizommarkeres, pajzsmirigyhormon-, terhességi teszt, és

felmerülő vírus infekcióra utaló tesztek valamint autoimmun betegségekre utaló antitestvizsgálatok elvégzése.

1.4. A TTP kezelése, prognózisa

A TTP, gyors lefolyása következtében, rendkívül nagy odafigyelést és körültekintést igénylő hematológiai sürgősségi állapot. Jelenleg a plazmacsere (angol szakirodalomban: plasma exchange, továbbiakban PEX) az elsőként választandó terápiás eszköz TTP-ben, amely a 70-es évek előtt jellemző 90%-os akut mortalitást 10-20%-ra csökkentette (22, 23). A szerzett ADAMTS13-deficienciában szenvedő betegeknél naponta elvégzett PEX szükséges, mely során az eltávolított folyadék pótlására friss fagyasztott plazmát (FFP), humán albumint vagy Octaplast (eredeti nevén: SDP - solvent/detergent-treated pooled plasma) használnak (21). A PEX kulcseleme, hogy az ADAMTS13 ellenes inhibitoros antitesteket, az UL-VWF-t, az immunkomplexeket és egyéb gyulladáshoz vezető citokineket, mediátorokat eltávolítja, majd a hiányzó enzimet az FFP-vel pótolja a szervezetbe. Hatékonysága nő a kicserélt plazma mennyiségével, ami általában 50-80 ml/ttkg/nap. Több centrumra kiterjedő kutatások alapján elmondható, hogy a plazmacserét addig célszerű alkalmazni, míg a klinikai tünetek (szervi diszfunkciók) javulnak és a trombocitaszám két egymást követő nap a 150 G/L-t meghaladja (24), továbbá az LDH érték is normalizálódik. A terápiás PEX során visszaadott ADAMTS13 enzim félfélétideje 2-4 nap. A pótolt ADAMTS13 enzim hatása fontos, mivel az enzimaktivitás 5-10% fölött való tartása csökkenti a relapszus valószínűségét TTP-ben (25). A PEX hatásosságát bizonyítja, hogy a szerzett ADAMTS13-defektusos betegek közel 80-90%-a éli túl az első epizódot, jellemzően minimális szervi károsodással.

A relapszus megelőzése céljából az *ADAMTS13*-mutációt hordozó TTP-s betegek általában 3-4 hetente kapnak normál plazmát (10–15 mL/kg FFP/SDP), azonban egyes esetekben a plazmaadás elég bizonyos rizikótényezők (terhesség, infekció) fennállása esetén. Szerzett TTP-ben, a háttérben álló immunfolyamat és az inhibitoros, ADAMTS13-ellenes antitestek jelenléte miatt fontos az immunszuppresszió, mely segít az antitesttiter csökkentésében. Első vonalban általában methylprednisolont adnak, melyet a kezdeti lökésdózis (10 mg/kg/nap) után, 1-2 mg/kg/nap dózisban tartunk fent a hematológiai remisszió eléréséig (26, 27).

Az utóbbi években előtérbe került a rituximab használata (monoklonális anti-CD20 antitest), mely a B limfociták CD20 receptorán keresztül az antitesttermelő plazmasejtekben apoptózist indukál. Egy a rituximab hatásosságát vizsgáló tanulmányban azt figyelték meg, hogy a rituximabbal kezelt TTP-s betegek hamarabb érték el a remissziót és a követés során alacsonyabb relapszus rátát mutattak a standard terápiát kapó betegekkel szemben (28). A vizsgálatban a terápiás hatás következményeként a remissziós állapot átlagban két évig állt fent. A rituximab alkalmazott dózisa általában 375 mg/m²/hét (4-8 hétig) (29).

A splenectomia ritkán, csak akkor jön szóba, ha a beteg állapota a PEX és az immunszuppresszió ellenére terápiarefrakter marad és a klinikai lefolyása sűrű relapszusokkal tarkított.

A TTP patogenezisének egyik fő eleme, az elhasíthatlan UL-VWF hatására kialakuló fibrinszegény, trombocitadús trombusok kialakulása. Az aktivált trombociták és a VWF között kialakuló kötést gátolja a caplacizumab nevű, anti-VWF humanizált antitest, mely a VWF A1-es doménje és a GP-Ib-IX-V-receptor közötti kötést akadályozza meg. Mivel a klinikai vizsgálatok még jelenleg is zajlanak, a caplacizumab egyelőre még nem rutinszerűen alkalmazott gyógyszer TTP-ben, azonban az előzetes eredmények biztatóak. Az egyik klinikai gyógyszervizsgálat során a caplacizumabot kapó TTP-s betegekben a trombocitaszám gyorsabban normalizálódott a placebót kapó csoporthoz képest (30).

Bár a rekombináns ADAMTS13 (rADAMTS13) a gyakorlatban még nem alkalmazott, az egyik legnagyobb fejlődés lehet majd az *ADAMTS13* mutációval rendelkező TTP-s betegek ellátásában, ahol a veleszületetten hiányzó ADAMTS13-t ily módon pótolni lehet (tervezett alkalmazás: 20-40 U/kg, 2-4 hetente). Előnye, hogy a plazmaadás mellékhatásai kiküszöbölhetőek (nagy folyadékvolumen terhelés, patogénátvitel lehetősége stb.), ezen kívül profilaktikus vagy terápiás otthoni kezelésként is alkalmazható. Elméleti hátránya lehet ennek a rekombináns, magasan tisztított szubsztituensnek, hogy különböző anti-ADAMTS13 autoantitestek termelődését indukálhatja, amelyet sem plazmainfúzióval sem pedig PEX-el nem lehet kezelni. Az első klinikai vizsgálatok még zajlanak, a gyógyszer engedélyezése a következő években várható (31).

Vörösvértest-transzfúziót súlyos hemolitikus anémiánál, alacsony hemoglobinszinteknél (<7 g/dl) szükséges alkalmazni. Trombocita adása TTP-ben általában kerülendő, életet veszélyeztető vézésnél vagy invazív beavatkozás előtt szóba jöhet.

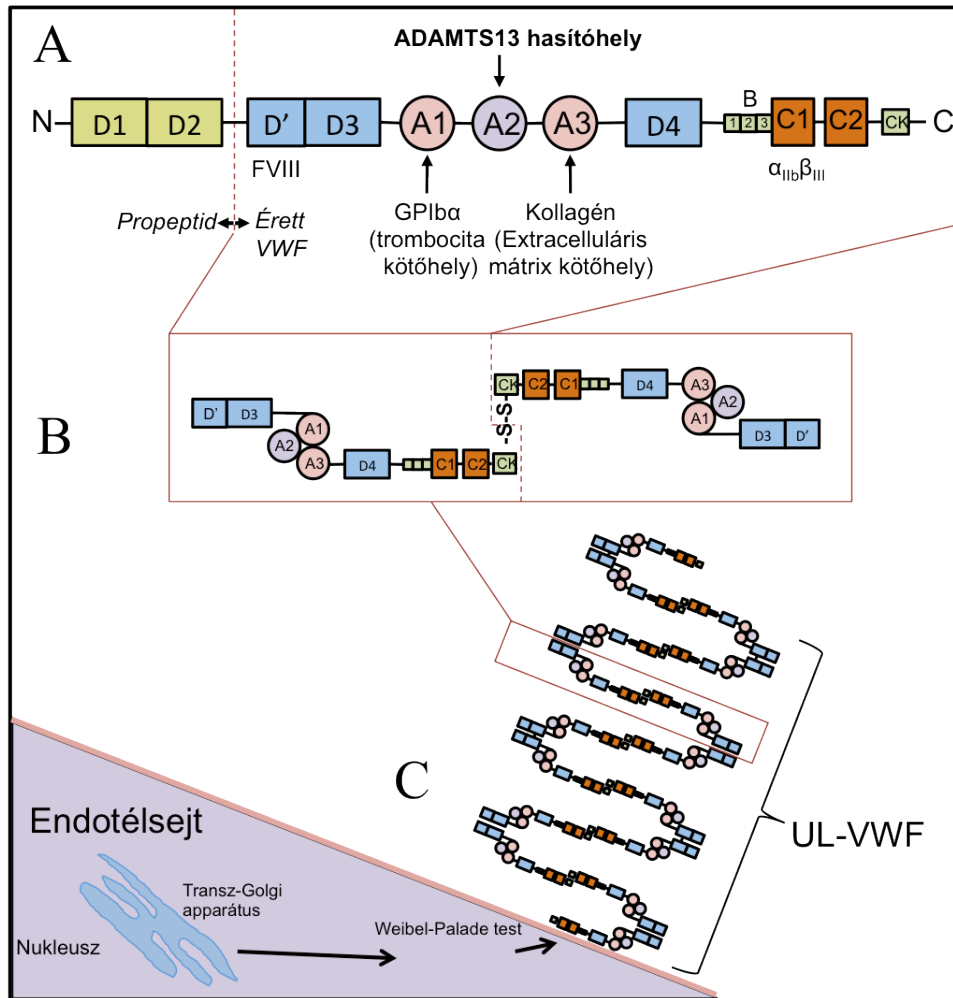
A kezelés alatt naponta szükséges követni a beteg trombocitaszámát, mely jó indikátora a helyes terápia alkalmazásának ezen kívül követni kell a beteg szervi funkcióit is (vese, szív, központi idegrendszer, máj stb.). A betegek hosszú távú követése nélkülözhetetlen az esetleges relapszusok időben való felismerése és megelőzése miatt. Szoros követés szükséges az első 6-12 hónapban, mely során ellenőrzik az ADAMTS13-aktivitást, LDH-t, és a trombocitaszámot.

A betegség prognózisa több tényezőtől is függ. A kongenitális TTP-s betegek folyamatos odafigyelést és kezelést igényelnek, hiszen nem képződik megfelelő funkciójú és mennyiségű ADAMTS13 enzimjük, ezért a relapszus rizikójuk sokkal magasabb, mint a szerzett TTP-s betegeknek. A szerzett TTP-s betegek rendszeres hematológiai kontrollja, folyamatos trombocitaszám és az ADAMTS13-aktivitás meghatározása elengedhetetlen, mivel a TTP-s betegek közel 30%-ában észlelhető a későbbiek során relapszus. Megemlítendő, hogy a férfiaknál a relapszus rizikója nagyobb (32). Mivel a betegség megjelenését, de a relapszusokat is, enyhébb főként gastrointesztinális fertőzések (33) előzhetik meg közvetlenül, a szoros követés a fertőzőes betegségek megjelenésekor még sürgetőbb. Mind a kongenitális mint a szerzett ADAMTS13-deficienciával rendelkező egyéneknél a terhesség is emeli az exacerbáció ill. a relapszusok rizikóját (33, 34), ezért egy ismert TTP-s beteg terhesgondozása sok esetben kihívás, és különös figyelmet igényel. A remisszióba kerülő TTP-s betegek laborparamétereiben megfigyelhetők különbségek. A betegek egy része néhány hét után immunológiai remisszióba kerül (anti-ADAMTS13 antitestek eltűnnek), a másik részében az anti-ADAMTS13 antitestek perzisztálnak és az ADAMTS13-aktivitás mérhetően marad mégis ugyan úgy tartós remisszióban vannak (35). Részben ez a megfigyelés alapozta meg kutatásunkat (lásd célkitűzések).

1.5. A TTP részletes patogenezise

1.5.1. AVon Willebrand faktor és az ADAMTS13 enzim kapcsolata

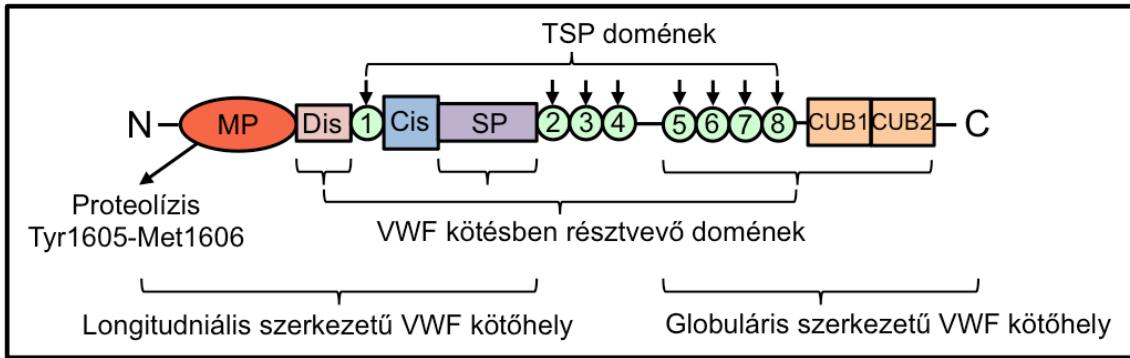
A TTP háttérében a VWF-t hasító metalloprotáz, az ADAMTS13 enzim deficienciája áll. A VWF egy adhezív tulajdonságú, glikoprotein molekula, melynek fő szerepe az érsérülés helyének felismerése és a trombociták bazális membránhoz való kihorgonyozása, (36) továbbá a trombociták aggregációjának elősegítése, primer hemosztázisban való részvétele (37). A VWF főként az endotélsejtekből (38) származik de nem elhanyagolható mennyiségben a megakariociták (39) is termelik. A VWF az endotélsejtekben pálcá alakú sejtorganellumban, a Weibel Palade testekben (WPT)(40), míg a megakariocitákban az alfa-granulomokban raktározódik. A VWF a WPT-ben mint nagy molekulatömegű, monomermonomer alegységekből felépülő, homo-oligomer szerkezetű, diszulfidkötésekben gazdag glikoprotein raktározódik. Az endotélsejtek felszínén megjelenő, adhezív tulajdonságú UL-VWF-t több mint 20 monomer alegység alkotja (10). A monomeren belüli doméneket számokkal jelöljük D1-től C2 (CK)-ig, melyek különböző ligandkötő helyekként is szolgálnak. Részletes struktúráját lásd az 1. Ábrán. A doméneken belül kiemelendő a D3-as struktúra VIII-as faktort kötő, valamint az A, a CK és a D'D3 jelű domének szerepe. Az A1 domén a trombocitákkal való kapcsolat kialakításban és a trombus formálódásban vesz részt. Az A2 doménnél hasít az ADAMTS13 proteáz a Tyr1605-Met1606 aminosavak közt, az A3 domén pedig a kollagénhez való kötődésben játszik fontos szerepet (41). A CK, D' és D3 doméneknek lényeges szerepük van a monomerek közötti diszulfidhidak kialakításában és később a WPT-ben található helikális szerkezetbe való rendeződésben. Az endoplazmatikus retikulumot követően a transz-Golgi rendszerben történik a monomerek dimerekké való kapcsolódása, valamint a glikoziláció, melynek fontos szerepe van a szekrécióban. A transz-Golgi rendszer után három szekréciós út áll a VWF előtt. Az első egy konstitutív, WPT-független, külön szekréciós stimulust nem igénylő útvonal. A második egy regulált, szekréciós stimulushoz kötött útvonal, mely során a WPT-ben raktározott VWF trombin (42), kalcium (43), fibrin (44), hisztamin (45) stb. hatására szekretálódik sejten kívülre.



1. ábra. A UL-VWF felépítése. (A) A VWF monomer szerkezete. Az N-terminális régió, D1- és D2-es doménja a Weibel-Palade-testekben válik le propeptidként, szerepe van a multimér szerkezet összeállításában. A D' és D3 domének alakítják a dimerek közötti diszulfidkötéseket, ezen kívül a D' doménhoz kötődik a VIII-as véralvadási faktor. Az A1-es domén a trombocitákon található GPIb α felszíni molekulához kötődik és trombocita-aktivációt vált ki. Az A2-es doménon a Tyr 1605 és Met 1606 aminosavak között hasít az ADAMTS13 enzim. Az A3 a kollagénhez kötődik. A D4-B (1,2,3), C1, C2 doméneken dokkolódik ki az ADAMTS13 enzim. A CK domének közötti diszulfidkötés köti össze a monomereket. (B) A VWF dimer szerkezete. Az A1,2 domének funkcionális felszínei, a dimer szerkezet következtében rejtve maradnak, míg az A3 képes továbbra is a kollagénhez kötődni. (C) A VWF multimér, más néven UL-VWF. A multimér molekula a Weibel-Palade-testekben raktározódik, ahol speciális helikális szerkezetének köszönhetően felcsavarodva tárolódik. Ismert stimulált és konstitutív szekretálódási útvonala is (ld. szövegben). (Az ábra James T.B. Crawley, 2011-es összefoglaló cikke alapján készült (46).

A harmadik út egy bazális, szekréción ingert nem igénylő, WPT-hez kötött szekréción út (43, 47). Korábban Sporn és munkatársai megfigyelték, hogy az újonnan szintetizált VWF mindössze 5-10%-a kerül a WPT-be, a fennmaradó 90-95% a konstitutív szekréción úton hagyja el az endotélsejtet (47). Az utóbbi két évtizedben újabb adatok láttak napvilágot, melyek a bazális szekréción út szerepét hozták előtérbe (48). A regulált és a bazális szekréción út során fontos szerepe van a WPT-nek, ahol a VWF monomerek multimerekké rendeződve, egy óriás helikális szerkezetbe alakulnak, majd a mikrotubuláris rendszer segítségével sejten kívülre szekretálódnak. Az exocitózis alkalmával a sejten kívül hosszú longitudinális formában a P-szelektinek segítségével horgonyzódnak ki az endotélsejt felszínére. A regulált VWF szekréciónja során a VWF multimer főként basolaterális oldalon kerül a sejt felszínére. A konstitutív termelés során kisebb, pro-VWF (propeptid (D1,D2) és monomer VWF) molekulákat szekretál a sejt az extracelluláris térbe, az apicalis és basolaterális oldalán egyaránt (49). A konstitutív módon szekretált kisebb méretű VWF-ok fontos szerepet játszanak a VIII-as faktor hordozásában. A plazmában 20-40 monomerből álló VWF találhatóak, de ennél nagyobb, akár 100-200 monomerből álló multimereket is kimutattak. A VWF funkciója nagymértékben függ a multimer nagyságától (50), egyrészt a hosszabb molekulán több ligandkötőhely található, másrészt az óriásmolekulára a nyíróerők erősebben hatnak mint a rövidebb oligomerekre, ezáltal még több aktív kötőhely válhat elérhetővé. Ennek következtében az endotélsejt felszínére kihorgonyzott longitudinális szerkezetű UL-VWF-ok rendkívül aktív felszínt képeznek a trombociták számára, ezért fontos, hogy mielőbbi hasításuk megtörténjen. A VWF proteolízisét végző enzim, az ADAMTS13, egy multidoménos szerkezetű 190,000 Dalton súlyú glikozilált protein, melyet a máj csillagsejtek (Ito-sejtek, periszinuszoidális tér) (51) és az endotélsejtek (52) termelnek.

Az ADAMTS13 szerkezete (2. ábra), az N-terminusától kezdve, áll egy cink és kalcium dependens metalloproteáz doménból, egy diszintegrin-szerű doménból (disintegrin-like), thrombospondin-1-es típusú (TSR-thrombospondin-type-1 repeat) doménból, egy cisztein-gazdag doménból (cystein-rich), egy spacer doménból, 7 további TSR-ből (2-8), valamint két C-terminális ún. CUB doménból.

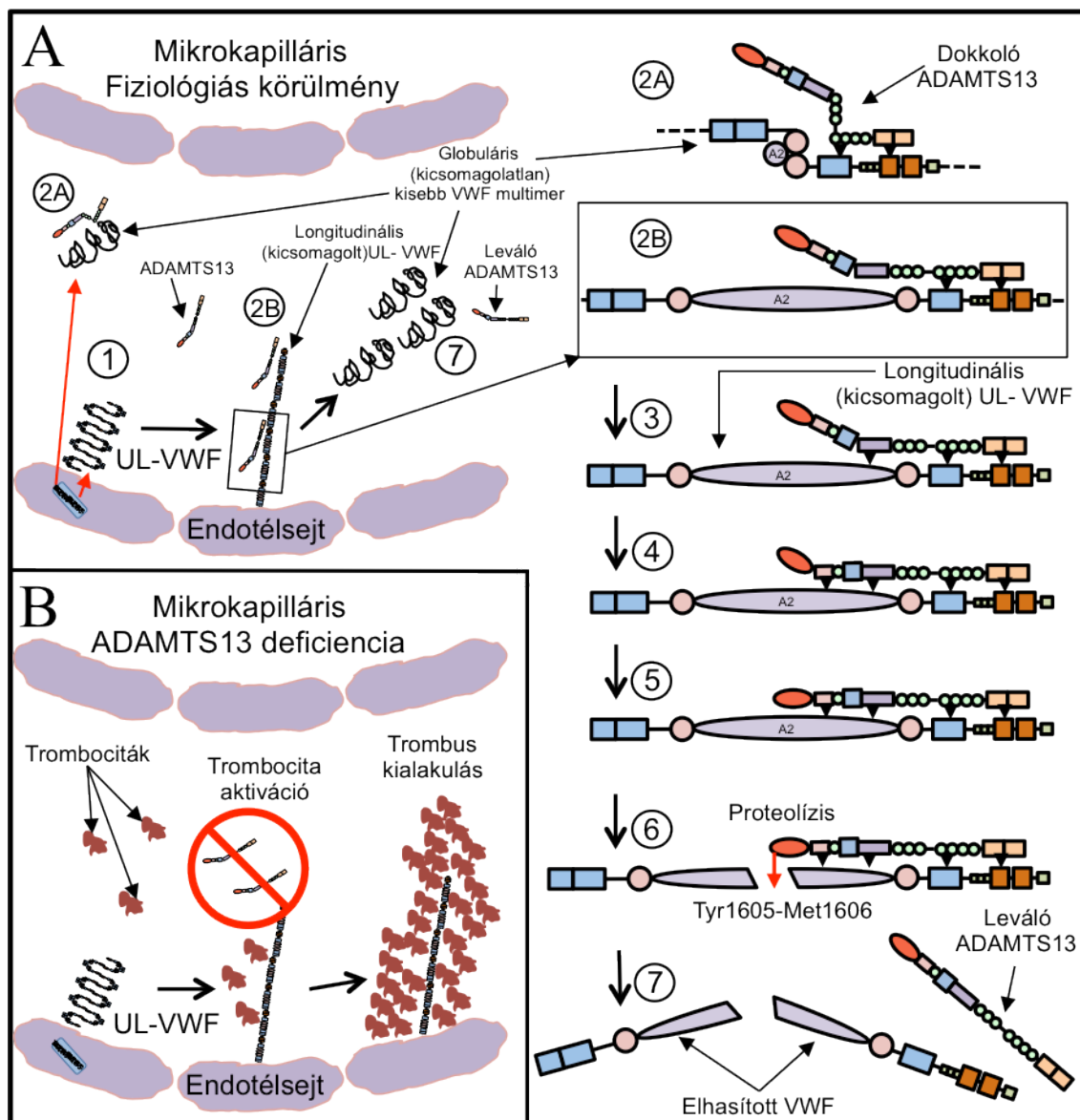


2. ábra. Az ADAMTS13 szerkezete. A Zn^{2+} és Ca^{2+} dependens enzim MP (metalloproteáz) doménje felelős a VWF hasításáért. A Dis (diszintegrin) és a SP (spacer) domén régiók stabilan tartják az ADAMTS13-at a VWF (kicsomagolt, longitudinális) A2-es doménjához csatlakozva. A számmal jelölt TSP (trombospondin) domének egy része (5-8) kapcsolódik a VWF globuláris (“kicsomagolatlan”) formájához, annak D4-CK doménjain keresztül. A Cis domén ciszteinben gazdag domén. A CUB1 és 2 domén által kötődik a globuláris szerkezetű VWF-hoz. (Az ábra James T.B. Crawley, 2011-es összefoglaló cikke alapján készült (46).

A CUB domének egyedülálló módon csak az ADAMTS alcsoport 13-as tagjában találhatóak meg és olyan peptid szekvenciákat tartalmaznak, mely hasonló a komplement C1r/C1s-hez (CUB a benne található analóg szerkezetű fehérjéről kapta a nevét: C:C1r/1s; U(rchin) protein; B(one) protein). Az enzim működésében rendkívül fontos szerepet játszik a cink és a kalcium, melyek lehetővé teszik a VWF monomer helyes elhasítását. A VWF hasításán kívül eddig nem ismert más szerepe az ADAMTS13-nak és nem ismert direkt specifikus inhibitora normál körülmények között, azonban ismert a szabad hemoglobin (53), IL-6 (54), thrombin és plazmin (55) ADAMTS13-ra kifejtett gátló vagy proteolitikus (inaktiváló) hatása. Természetes inhibitor hiányában az ADAMTS13 metalloproteáz szabályozása szubsztrátszinten valósul meg: a konstitutívan aktív enzim működése csak akkor érvényesül, ha a ligandja megfelelő konformációban jelen van, és az enzim-szubsztrát interakció kialakulhat.

Az exocitózistól számolva a VWF éltciklusát és az ADAMTS13 enzim általi hasítását hét pontban lehet összefoglalni (3. ábra). Első lépésként a VWF óriásmolekula a sejtet elhagyva a P-szelektinek által közvetlen a sejt felszínre kihorgonyozódhat, vagy közvetlenül bekerülve a plazmába globuláris formát felvéve keringhet a plazmában. A plazmába került globuláris forma származhat már hasított óriásmolekulából vagy közvetlenül a WPT-ből. A globuláris formának az a különleges tulajdonsága, hogy a térszerkezete miatt az A2-es doménjei nem érhetők el az ADAMTS13 számára. Ennek ellenére az ADAMTS13 képes a spacer domén utáni TSR 5-6-7-8 domének és CUB

doménok segítségével, a VWF szabadon lévő D4 és cisztein-gazdag doménjeihez csatlakozni és komplexeket alkotva keringeni a plazmában (56, 57). A második lépésben fontos szerepet játszik az erek belsejében ható nyíróerő (58, 59), mely hatására a VWF multimer szerkezete „kicsomagolódik” és olyan helyzetbe kerül, hogy az ADAMTS13 enzim könnyen hozzáférhet a VWF monomerek A2-es doménjéhez. A nyíróerőnek fontos szerepe van a VWF multimer hasításában. Minél hosszabb a VWF multimer, a nyíróerő annál hatékonyabban képes kicsomagolni a szerkezetét. Az endotélsejt által közvetlen szekretált, kihorgonyozott óriásmolekula a keringés irányába állva, a nyíróerő hatására logitudinális, megnyúlt szerkezetet vesz föl, melynek hatására az A2-es domének hozzáférhetővé válnak az enzim számára. A már hasított, vagy közvetlen a plazmába szekretált VWF multimer a plazmában globuláris szerkezetbe alakulnak, melyen belül az A3-as kollagén kötő domén van egyedül szabad pozícióban, ez lehetővé teszi a dokkolást, a környezettel való kapcsolatot. Az A2 és A1-es domének rejtve vannak az ADAMTS13 elöl addig, míg az A3-as doménon keresztül a VWF ki nem kötődik és a nyíró erő ki nem csavarja a multimer globuláris szerkezetét (60). A kikötődés bekövetkezhet érsérülés hatására, melynek során a szubendoteliális mátrixból felszabaduló kollagénhez kötődik a VWF multimer. A kikötődés következtében a már részletezett módon a nyíróerő képes a globuláris formát olyan helyzetbe hozni, hogy az A2-es domén az ADAMTS13 enzim számára elérhető legyen. A rejtett domének felszínrekerüléséhez a VWF-nak nem kell feltétlenül subendoteliális mátrixhoz vagy endotéliumhoz kikötődnie, ugyanis pusztán a mikroerekben megnövekedett nyíróerő is képes kicsomagolni a VWF multimert. A harmadik lépés során az ADAMTS13 spacer doménja a szabadabbá vált A2-es doménon a Glu1660-Arg1668 epitópokat ismeri fel, aminek következtében az ADAMTS13 affinitása megnő a VWF-hoz. A negyedik lépés során az ADAMTS13 diszintegrin szerű (Dis) doménjén az Arg349 a VWF-on lévő Asp 1614-hoz alacsony affinitással kapcsolódik.



3. ábra. Az ADAMTS13 és a VWF kapcsolata. (A) A VWF hasítása fiziológias körülmények között. (1) A VWF közvetlenül, globuláris (kisebb multimer) szerkezetet felvéve bekerülhet a keringésbe, vagy kihorgonyozódhat UL-VWF fómrában az endotélsejt felszínére. (2A) A globuláris szerkezetű VWF-on a TSP5-8 és CUB1-2 domének segítségével dokkolódik az ADAMTS13. (2B) A kapillárisban lévő nyíróerő hatására longitudinális szerkezetet vesz föl, a VWF A2-es doménja kinyílik, mely így alkalmas lesz az ADAMTS13 általi hasításra. (3) Az ADAMTS13 spacer doménján keresztül stabilizálódik, (4) majd a kötődést a Dis domén tovább erősíti. (5) A metalloproteáz domén pozicionálódik a hasításhoz, (6) majd megtörténik a proteolízis. (7) A proteolízis után az ADMATS13 leválik, majd további hasításokra képes. A hasított VWF multimer rövidebb oligomerei globuláris szerkezetet vesznek föl a keringésben. (B) Mikrokapillaris környezet ADAMTS13 deficiencia esetén. ADAMTS13 mutáció vagy inhibitoros antitestek hatására ADAMTS13 deficiencia lép fel, melynek következtében az UL-VWF elhasíthatatlanul marad nem hasad el, aminek hatására trombocitaaktiváció lép fel a VWF felszínén és trombus, trombotikus mikroangiopátia alakul ki. (Az ábra James T.B. Crawley, 2011-es összefoglaló cikke alapján készült (46))

Az ötödik lépés fontos előfeltétele a hasításnak, melynek során a VWF Leu 1603-a és az ADAMTS13 Metalloproteáz (MP) doménjén lévő S3 (Leu 198, 232, 274) között jön létre kapcsolat. A hatodik lépés során, az előbb leírt kapcsolatok hatására, az ADAMTS13 aktív centruma közel kerül a VWF Tyr1605-Met1606 epitópjához és megtörténik a proteolízis. Az utolsó lépés során a proteáz affinitása csökken, leválik a VWF-ról, majd később újabb VWF hasításra lesz képes.

Az ADAMTS13 funkciói közé tartozik a plazmában keringő, vagy az endotélsejt felszínén lévő VWF óriás multimerek apróbb fragmensekre hasítása és a trombózis túlaktiválódásának szabályozása. Ez utóbbit azzal éri el, hogy (pl. érsérülés alkalmával) a globuláris szerkezetben lévő VWF multimerrel komplexet alkot és annak kikötődésekor a felszabaduló A2 domént hasítja, ezzel megakadályozza a túlzott mértékű trombocita-aktiválódást. Kettős funkciójával az ADAMTS13 nem csupán a VWF multimerek méretét csökkenti, hanem a molekula hemosztatikus funkcióját is szabályozza. Az enzim kulcsfontosságú szerepét támasztja alá az is, hogy deficienciája esetén TTP alakulhat ki, melynek lényege, hogy a plazmába került UL-VWF molekulák nem hasítódnak el, elősegítve így a trombociták kitapadását és aktiválódását, a trombus propagálódását, ennek következtében a szöveti iszkémia kialakulását.

1.5.2. Az ADAMTS-deficiencia kialakulásának mechanizmusa

Az ADAMTS13-deficienciának ismert szerzett és veleszületett formája, mindkettő formánál súlyos ADAMTS13-aktivitáscsökkenés tapasztalható (aktivitás <10%). A TTP háttérében leggyakrabban a szerzett ADAMTS13-deficiencia áll. Tsai és munkatársai írták le először, hogy a szerzett TTP-ben a VWF-hasító enzim aktivitása súlyosan csökkent, és ezt az enzim deficienciát IgG osztályú, gátló autoantitest okozza, amely a TTP veleszületett ADAMTS13-deficienciával járó formájában nem volt kimutatható (15). A későbbiek folyamán, mikor már ismertté vált az ADAMTS13 szerkezete, kimutatták, hogy a betegek közel 100%-ában az ADAMTS13 cisztein-gazdag és szpészer doménja ellen termelődik a gátló autoantitest, ezen kívül nem elhanyagolható mennyiségben (64% Klans és munkatársai) a CUB és más domének ellen is (61, 62). Érdekességként megemlíthető, hogy a szerzett ADAMTS13-deficiens betegek 10-15%-ában közvetlen a proteáz enzimfunkcióját gátló antitestek helyett egyéb doménekhez

kapcsolódó autoantitestek is kimutathatóak voltak, melyek inkább az endotélsejtekhez való dokkolódást akadályozták meg és az antitsten keresztül az enzim clearencét fokozták a szervezetből (63). Az ADAMTS13-inhibitorok leggyakoribb IgG alosztálya az IgG4 majd csökkenő sorrendben IgG1, IgG2, IgG3 (64). Megfigyelték, hogy azoknak a TTP-s betegeknek, akiknél magas titerű IgG4 inhibitor mellett nem mutatható ki IgG1, nagyobb rizikójuk van a relapszusra, szemben azokkal, akiknél az IgG1 dominál az IgG4 felett.

Több munkacsoport is vizsgálta, hogy az ADAMTS13 autoantitest termelődés hátterében milyen tényezők állhatnak. Coppo és munkatársai (65) a T és B sejtek közötti kommunikáció fontos szerepe miatt a HLA (Humán leukocyta antigén) génkomplex MHC (major hisztokompatibilitási komplex) I (A, B) és II (DRB1, DQB1) osztályait vizsgálta. A vizsgálatba 191 TTP-s beteget és kontrollokat vontak be és azt találták, hogy az HLA-DRB1*11 allél hordozása gyakoribb volt TTP-s betegekben az egészségesekhez képest, tehát rizikófaktornak minősült, míg a DRB1*4-es allél hordozása protektív tényező volt a TTP kialakulására nézve. Ezt a genetikai analízist párhuzamosan több munkacsoport is megerősítette (66, 67).

A kongenitális (Upshaw-Schulman-szindróma, USS), de novo mutációként megjelenő vagy familiáris megjelenésű TTP-ben az ADAMTS13 defektusát az enzimet kódoló gén összetett heterozigóta vagy homozigóta mutációja okozza (17). A kongenitális TTP ritkábban fordul elő, az összes TTP-s beteg mintegy 10%-a tartozik ebbe a csoportba. Az *ADAMTS13* a 9q34-es kromoszómára lokalizálódik és megközelítőleg 140 különféle mutációját írták le eddig (68). Leggyakrabban az ún. „missense” típusú mutáció fordul elő (60%), ezen kívül ismertek kisebb deléciók és inzerciók (20%), „nonsense” mutációk és „splice site” variációk is. Az egyik legismertebb, részletesen jellemzett mutáció a 29-es exonon egy bázis inzerciója a 4143insA régióba, a másik ismertebb mutáció pedig az Arg1060Trp missense mutációja a 24-es exonon (69). A kongenitális TTP jellemzően az első életéven belül vagy 20-40 éves kor között, sokszor terhesség kapcsán manifesztálódik. Több tanulmány is készült annak kapcsán, hogy milyen összefüggés van a korai manifesztáció és a mutációk között. Lotte és munkatársai az ADAMTS13 N-terminálisához közeli doménjeiben fedeztek fel mutációkat, melyek a betegség korai megjelenésével, gyakoribb relapszusokkal mutattak összefüggéseket

(70). Ugyanebben a tanulmányban az addig kongenitális TTP-ben szenvedő betegekben mérhetetlen ADAMTS13-aktivitást egy speciális tömegspektrométeres méréssel képesek voltak meghatározni, és azt találták, hogy a reziduális ADAMTS13-aktivitás inverz korrelációban van a relapszusokkal és a remisszióhoz szükséges friss fagyasztott plazma mennyiségével.

A veleszületett ADAMTS13-deficiencia diagnózisa az ADAMTS13-deficiencia ismételt kimutatásán és az ADAMTS13 elleni antitestek konzekvens hiányán alapul; az *ADAMTS13* mutáció kimutatása validálja a diagnózist.

Bár az elmúlt években egyértelművé vált, hogy a TTP hátterében a VWF multimert hasító ADAMTS13 deficienciája a legfontosabb tényező, néhány adat további patogenetikai tényezők szerepére utal a betegség kialakulásában (71). Az egyik ilyen megfigyelés, hogy az akut epizódon átesett, remissziót elérő betegnél is időnként súlyos, tartós ADAMTS13-deficiencia és magas titerű inhibitor detektálható, azonban a beteg emellett tartósan, akár évekig is tünetmentes lehet. Egy másik hasonló megfigyelés, hogy a kongenitális TTP-ben szenvedő betegek, sokszor detektálhatatlan ADAMTS13-aktivitás ellenére sem szenvednek gyakori TTP-s epizódokban, sokszor évekig tünetmentesek lehetnek (32). Továbbá ismert a szoros összefüggés a TTP-s epizód kialakulása és az azt megelőző fertőzések (pl. felső légúti- vagy gastrointesztinális) között (72). Lényeges megemlíteni, hogy szoros kapcsolat van a kongenitális ADAMTS13-deficiens betegek TTP-s epizódja és a terhesség között (73), melynek pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert. A fenti megfigyelések együttesen arra utalnak, hogy az ADAMTS13-deficiencia mellett feltehetően jelen vannak egyéb környezeti vagy genetikai hatások, melyek hozzájárulnak a mikrovaszkuláris egyensúly megbomlásához és a betegség epizód kialakulásához. Ilyen tényezők lehetnek a koagulációs kaskád faktorainak, a VWF-nak, trombocitáknak, az endotélsejteknek vagy az immunrendszernek a tényezői, doktori munkám során ezek vizsgálatát tűztem ki célul (lásd célkitűzések).

1.6. A neutrofil granulocita szerepe trombotikus mikroangiopátiákban

A neutrofil granulociták a csontvelőből különböző szabályozó mechanizmusok révén kerülnek a keringésbe, ahol viszonylag rövid az életidejük. A szervezet veleszületett

védekezési mechanizmusában vesznek részt, segítenek eliminálni a patogéneket, szöveti törmelékeket. Szoros összefüggésben vannak a veleszületett immunitás egyéb alkotóelemeivel így a komplementrendszerrel és más fehérvérsejtekkel is. Infekció, vagy egyéb immunrendszert stimuláló mechanizmus során aktiválódhatnak, ilyenkor megkezdődik a különböző gyulladásos citokinek és komplementtermékek (C3a, C5a) hatására a neutrofil granulociták migrációja és aktiválódása. Aktiválódáskor megkezdődik sejten belül, az enzimtartalmú granulumok migrációja a plazmamebrán felé, valamint az adhézións molekulák intenzív expresszálódása, mely segít majd a vándorlásban, adhéziónban (endotélsejt és trombociták felszínéhez) (74). A neutrofil granulociták védekező mechanizmusai a fagocitózis, reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelése, valamint a mikrobaölő peptidek kibocsátása. A védekező mechanizmus mellett ismert az aktivált neutrofil granulociták szövet- ill. endotélsejtkárosító hatása is (75, 76).

A neutrofil granulumok festődésük és myeloperoxidáz- (MPO) tartalmuk alapján csoportosíthatók. Az azurofil granulumok főbb összetevői: elasztáz, katepszin-G, proteínáz-3. Az elasztáz a véralvadási kaszkádban degradálja a XIII-as faktort és inaktiválja a VII-es, VIII-as, IX-es, XII-es faktorokat, a kollagént, a proteoglikánokat, és részlegesen az elasztint is. Az elasztáz a katepszin G-vel együtt képes aktiválni a pro-MMP-2-t és az MMP-2-t, amely bontja az extracelluláris mátrix komponenseit (kollagén I, IV, IX, proteoglikán, laminin, fibronectin, zselatin).

A neutrofil granulociták szerepét korábban már vizsgálták a TTP patogenezisében, melynek során egy ex vivo kísérletben egy TTP-s beteg akut epizódjából izolált neutrofil granulociták az endotélsejt-tenyészetben endotélsejt-sérülést váltottak ki (77). A tanulmány konklúziója az volt, hogy a ROS és a MPO termékeknek szerepe lehet az endotélsejt-károsodásban. A vizsgálatban az endotéliumon hasonló citotoxikus károsodásokat figyeltek meg, mint amit egy korábbi, aktivált neutrofil granulocita és endotélium kapcsolatát vizsgáló tanulmányban írtak le (75). Alvarez és munkatársai TTP-s betegek plazmájával neutrofil granulocita- és monocitaaktivációt váltottak ki (78). Egy másik hasonló tanulmány során leírták, hogy a TMA-s betegek plazmája a leukocita-trombocita-aggregációt elősegíti (79). Kilgore és munkatársai leírták, hogy a

neutrofil granulocita eredetű ROS, VWF- és P-szelektin-felszabadulást idéz elő, mely a fentiek értelmében jelentősen hozzájárulhat a TTP patogeneziséhez (80).

Számos közvetlen kapcsolat ismert a neutrofil granulociták és a komplementrendszer között is. A neutrofil granulociták felszínén C3a és C5a receptorok vannak, melyek aktiválása elősegíti az ROS termelődését, melynek káros hatása van az endotélsejtekre nézve (81).

Közel két évtizede ismert a neutrofil granulociták egy speciális funkciója is, melynek során kromatinszálakból és granulum eredetű anti-mikrobiális peptidekből (neutrofil elasztáz, katepszin-G, MPO) álló komplexumot bocsátanak a környezetébe erős aktiválódást követően. Ezt a folyamatot NETosistnak (neutrofil extracellular traps) hívják. A kibocsátott anyag a NET, fő alkotóelemei a DNS és hiszton fehérjék (82). A NET kétélű kard, egyszerre tölt be védekező szerepet a mikroorganizmusok eliminálása révén, ugyanakkor proinflammatorikus hatása által fokozhatja a szöveti destrukciót is, amely akár autoimmun folyamatot is indukálhat. A NETosist különféle stimulusok válthatják ki, ilyenek pl. a proinflammatorikus citokinek (IL-8, TNF-alfa), a NO (nitrogén-monoxid), az aktivált endotélsejtek, az aktivált trombociták, és az antitestek. A NETosist úgy is említik, mint a neutrofil granulociták egy sajátos apoptózis formáját. A NET szerepét autoimmun betegségek (83), gyulladásos kórképek, glomerulonephritisek, krónikus tüdőbetegségek, vaszkuláris megbetegedések és a szepszis (84) patogenezisében is vizsgálták. Ezen kívül korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az extracelluláris DNS-nek és hiszton fehérjéknek (NET alkotó elemei) fontos szerepe van a trombus kialakulásban, ugyanis egyfajta hálót, aggregációs felületet képez a trombociták számára (85). A NET természetes degradációját a szervezetben a DNase-I segíti elő (86).

A NET kialakulásában kulcsfontosságú szerepe van a neutrofil elasztáznak, amely az egyik fő lizoszomális proteináz, amely az aktivált neutrofil granulocitákból szabadul fel (87, 88). Elasztáz hiányában nem tud kialakulni a NET komplex szerkezete, így az elasztáz sejten kívüli jelenléte a neutrofil granulocita aktivitásimarkerének is tekinthető. A munkám során vizsgált neutrofil elasztáznak az inhibitorával alkotott komplexét, azaz az elasztáz-proteináz inhibitor komplex szinteket mértük meg, stabilitási, analitikai megfontolások alapján.

A neutrofil granulociták környezetre gyakorolt potenciális káros hatásai (NETosis, ROS, proteáz enzimek) alapján feltételezhető, hogy a már kialakult ADAMTS13-deficiencia esetén aktiválódásuk olyan trigger hatást képezhet, amely az érzékeny egyensúlyt megbontva elősegíti a mikroangiopátia kialakulását.

1.7. Az endotélsejt szerepe trombotikus mikroangiopátiákban

Az endotélsejt-aktiváció szerepe a trombotikus és inflammatorikus folyamatokban ismert volt (89), ezért a TMA-kal kapcsolatos tanulmányok során több alkalommal is vizsgálták. A TMA során a trombusok az endotéliumon, főleg a mikrovaszkulátúrában alakulnak ki, ezért az endotélsejt-aktiválódás kulcsfontosságú tényező TMA-ban (90). Az endotélsejt-aktivációját, károsodását potenciózhatják gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-8, IL-6), infekció, műtéti beavatkozás, csontvelő-transzplantáció, ösztrogénszármazékok és egyéb gyógyszerek (25). Hatásukra az endotélsejtekből több UL-VWF szekretálódhat, valamint megnőhet a P-szelektin expressziója is, ami által a trombociták, leukociták nagyobb mértékben képesek kötődni az endotéliumhoz, így csökken az endotélium tromboerezisztenciája (91-93).

TMA-ban az endotélsejt-aktiváció jelentőségét támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint a TTP-s betegekből származó plazma képes apoptózist indukálni endotélsejteken és trombocitákon (94, 95). Jimenez és munkatársai TTP-s betegek mintáiban endotélsejt-eredetű mikropartikulumokat (EMP) vizsgáltak (96). Kimutatták akut betegeken a CD62E-t és VWF-t expresszáló EMP emelkedését, amely egyértelműen endotélsejt-aktivációra utal. Az EMP-k szintje azonban PEX hatására jelentősen csökkent, így az endotélsejt állapotát nem tudták megítélni a terápia alatt a betegeken. Újabb Mori és munkatársai (97), valamint Stufano és munkatársai (98) is igazolták biomarkerekkel az endotélsejt-aktiváció jelenlétét TTP/HUS betegeken: emelkedett trombomodulin-, antitrombin-, protein C-, és VWF antigén- ill. VWF-propeptid-szinteket mértek betegeken plazmájában. Bár az elmúlt években TMA-ban többször is vizsgáltak endotélsejt-sérülésre jellemző markereket, analitikailag stabil, specifikus markert még nem azonosítottak. Figyelmünk ezért fordult az endothelin-1 (ET-1) felé, melynek elérhető egy stabil, ekvimoláris hasadási termékét mérő módszer (Carboxi-terminális pro-endothelin-1: CT-proET-1, lásd. lejjebb). Az ET-1-nek fontos szerepe van a vérnyomás szabályozásában, melyet főként a kisereken keresztül

szabályoz, valamint a nátrium homeosztázis fenntartásában funkcionál (99). Az ET-1-et több különböző tanulmány során is vizsgálták. Emelkedett ET-1 szinteket mértek krónikus szívelégtelenségben, krónikus veseelégtelenségben, szepszisben, vese- és hasnyálmirigy-transzplantáció következtében kialakult szekunder TMA-s betegekben (100).

Kutatásunk során az ET-1-et mint specifikus endotélsejt-markert vizsgáltuk. Az érett ET-1 egy 21 aminosavból álló vasoaktív peptid (101). Az endotélsejten belül a WPT-ben tárolódik (az UL-VWF-ral és a P-szelektinnel egyetemben). Az ET-1 egy 212 aminosavból álló propeptidként szintetizálódik az ET-1 mRNS-éről, majd szignálpeptidáz hatására először proET-1-é ezt követően endopeptidáz (furin, PC7) hatására egy 38 aminosav nagyságú ún. bigET-1-é alakul. A bigET-1 megtalálható mind intra-, mind extracellulárisan. A bigET-1-et az úgy nevezett endothelin-konvertáló-enzim (ECE) hasítja az érett ET-1 molekulára (102). Az ECE-nek több alegysége is van (főként az ECE-1 hasítja a bigET-1-t), amik megtalálhatóak szintén intracellulárisan, vezikulumokban, valamint extracellulárisan a sejtfelszínre horgonyozva. Az ET-1 katabolizációját a keringésben neutrális endopeptidáz és deamidáz enzimek végzik. Szervi szinten főként a vese felelős az enzimatis lebonthatásért. Az ET-1 termelése egyrészt folyamatos, mely részben az arteriolák tónusának fenntartásáért felelős, másrészt különböző fiziológiás és patológias tényezők hatására stimulált szekréciója is kialakul (lásd később). Az ET-1 két receptor-altípuson fejti ki a hatását. Az ET-1R/A-vasokonstriktós hatást fejti ki, az ET-1R/B-n pedig inkább vazodilatációs hatása van (NO felszabadulás részvételével). Az ECE hatására keletkező ET-1 felezési ideje meglehetősen rövid (1-2 perc), így plazmakoncentrációja meglehetősen alacsony, ami azonban elegendő a lokális hatások kifejtéséhez.

A fent említett rövid féléletidő miatt közvetlenül az ET-1 molekula pontos mérése kifejezetten nehéz, ezért egy stabil, az ET-1-gyel ekvimoláris koncentrációban keletkező fragmensének, a karboxi-terminális-proendothelin-1-nek (CT-proET-1) a mérését alkalmaztuk (103).

1.8. A komplementrendszer szerepe trombotikus mikroangiopátiákban

A komplementrendszer a szervezet veleszületett védekező mechanizmusainak egyik fontos eleme. Aktiválódásának három útja ismert: a klasszikus út, a lektin út és az alternatív út. A három különböző út egy közös terminális útba torkollik, amely az apoptózist indukáló MAC (membrane attack complex, vagy SC5b-9) kialakulásához vezet. A komplementrendszer aktivációja a külső patogéneken kívül, a saját sejtekre nézve is komoly destruktív hatással bírhat.

A komplementrendszer szerepe TMA-ban főként az atípusos HUS-ból ismert, ahol a betegek nagy részében kimutatható a komplement alternatív útjának diszregulációja.

A komplementrendszer TTP-ben betöltött szerepének elemzésével több munkacsoport is foglalkozott az utóbbi években, mely vizsgálatokba munkacsoportunk is becsatlakozott. Ruiz-Torres és munkatársai írták le először, hogy a komplement aktiváció által kiváltott neutrofilaktivációnak és endotélsejt-aktivációnak fontos szerepe lehet a mikrovaszkuláris trombózis kialakulásában ADAMTS13-deficiens TTP-s betegekben. Tanulmányuk során akut TMA-s betegek szérumát adták endotélsejt-tenyészethez, aminek a hatására komplement C3 és SC5b-9 lerakódását, valamint fokozott P-szelektin-expressziót figyeltek meg az endotéliumon. Ugyanilyen szérum hatására aktiválódtak a neutrofil granulociták, majd ezt követően reaktív oxigénszármazékokat (ROS) és proteínázokat bocsátottak a környezetükbe. A káros enzimek és oxigénszármazékok hatására endotélsejt-aktiváció következett be. A komplementrendszer gátlásakor a fent említett reakciók elmaradtak, így ezek a megfigyelések is alátámasztották a komplementrendszer lehetséges szerepét a TTP patogenezisében (77).

Munkacsoportunk azt feltételezte, hogy a komplementrendszer aktiválódása olyan járulékos trigger lehet az ADAMTS13-deficiencia mellett, amely elősegítheti a mikroangiopátiás folyamat manifesztálódását és a TTP-s epizód kialakulását. A feltételezést alátámasztotta az, hogy a TTP-ben jelen lévő ADAMTS13-anti-ADAMTS13 immunkomplexek, az iszkémia következtében sérült sejtek felszíne és az alternatív út túlaktivációja mind hozzájárulhatnak a komplementrendszer aktiválódásához. Munkacsoportunk a vizsgálatot, más kutatócsoportokhoz képest

nagyobb beteganyagon végezte, továbbá a komplement pontos szerepét és összefüggéseit is vizsgálta egyéb klinikai faktorokkal. (104). A tanulmány során huszonhárom TTP-s beteg lett bevonva. Megmérték az alábbi komplementaktivációs termékeket, úgy mint klasszikus/lektin út (C1rs- INH, C4d), alternatív út (C3bBbP), terminális út (SC5b-9) és a központi molekula, a C3 hasadási terméke, a C3a. Az akut TTP-s betegek mintáiban emelkedett C3a- és SC5b-9-szinteket figyeltek meg, melyek terápiás plazmacsere következtében csökkentek. Remissziós TTP-s betegekben, ahol kimutatható mennyiségű gátló anti-ADAMTS13 antitest volt, ott magasabb volt a C4d, a C3bBbP és a C3a szintje, azaz komplementaktiváció volt igazolható. Megemlítendő még az, hogy ezeknek a komplementaktivációs termékeknek a szintje parallel változott az ADAMTS13-ellenes antitestek szintjével. Ez a megfigyelés arra is utalhat, hogy az anti-ADAMTS13 antitestek hozzájárulhatnak a komplementaktivációhoz, és a komplementaktivációs termékek (anafilatoxinok (C3a, C5a) és SC5b-9 membránkárosító komplex), aktiválhatják és károsíthatják az endotélsejteket, a neutrofil granulocitákat és a trombocitákat (105-107). Westwood és munkatársai is hasonló megállapításra jutottak TTP-ben, megerősítve munkacsoportunk korábbi megfigyeléseit. Emelkedett C3a- és C5a-szinteket mértek akut TTP-s betegekben a remisszióhoz képest, és összefüggést találtak az ADAMTS13 elleni gátló antitestek és a C3a között, valamint az Il-10 között, evvel is utalva a komplex komplement- és citokinválasz szerepére TTP-ben.

A fent említett eredmények alapján tehát elmondható, hogy komplementaktiváció zajlik akut TTP során, amely sejtaktiváló és -károsító hatásain keresztül hozzájárulhat a mikroangiopátiás folyamat kialakulásához. Munkám során a kezdeti eredményekre alapozva a lehetséges kapcsolatokat vizsgáltam a komplement-, endotél- és neutrofilaktiváció között.

2. Célkitűzés

A TTP kialakulása komplex, többtényezős folyamat, melyben az ADAMTS13-deficiencián túl egyéb környezeti és genetikai tényezők szerepe is fontos lehet. Klinikai tapasztalat, hogy a TTP kialakulását megelőzhetik az immunrendszert aktiváló folyamatok (fertőzés, terhesség stb.). Ezzel összefüggésben igazoltuk a komplementaktiváció jelenlétét aktív TTP-s betegekben (104). Jelen kutatási projektünkben egyrészt további patogenetikai részegységeket, másrészt a különböző patogenetikai útvonalak kapcsán olyan analitikailag stabil, jól mérhető biomarkereket kívántunk vizsgálni, amelyekkel a betegség klinikai lefolyását, valamint a terápiás válasz hatásosságát monitorizálni lehet. A vizsgálataink első felében a veleszületett immunitásban jelentős szerepet játszó neutrofil granulociták aktivitását és szerepét tanulmányoztuk, amelyet a sejtek aktivációját jelző neutrofil elasztáz (a dolgozatban PMNE (polymorphonuclear neutrophil elastase)-ként utalok rá) nevű enzimmel vizsgáltuk.

Mivel az elmúlt években (108) egyre több adat utal az endotélsejtek fontos szerepére a TMA patogenezisében, igény jelentkezett egy megbízható, jól mérhető, stabil endotélaktivációs markerre, ezért a tanulmányunk másik felében célul tűztük ki az endotélsejtek vizsgálatát. Az endotélsejtek szerepét az endothelin-1 ekvimoláris mennyiségben termelődő stabil prekursorfragsmensevel a CT-proET-1-el vizsgáltuk, továbbá az endotélsejt markerek közül meghatároztuk a VWF-antigént is.

A doktori munkám célkitűzései három pontban foglalhatók össze:

- (1) A neutrofil granulocita- és endotélsejt eredetű markerek vizsgálata aktív és remissziós TTP betegcsoportokban.
- (2) A neutrofil granulocita- és endotélsejt-markerek szintjének követése terápia alatt.
- (3) A vizsgált markerek és a TTP klinikai és betegség aktivitását jelző paraméterek közötti kapcsolatok elemzése, különös tekintettel a komplementaktivációval való összefüggésekre.

3. Módszerek

3.1. Betegbeválogatási kritériumok és definíciók

Disszertációm alapját két projekt eredményei képezik (neutrofil elasztáz (NE) és endothelin-1 (ET-1) projekt), melyek egy közös kutatásból indultak ki (104). A betegek között átfedések vannak, de az áttekinthetőség kedvéért a két tanulmányra vonatkozó betegadatokat és a laborparamétereket külön mutatom be. A betegek bevonása 2007 augusztusában indult meg és 2014 januárjában zárult le a III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában.

A TTP diagnózisa, egyúttal beválogatási kritériuma az egy vagy több, direkt Coombs teszt negatív mikroangiopátiás hemolitikus anémiával és trombocitopéniával (<150 G/L) járó epizód, melyet súlyos ADAMTS13-deficiencia kísér (aktivitás <10%). A mikroangiopátiás hemolízis jelei az LDH emelkedés (>450 U/L) és a fragmentociták jelenléte a perifériás vérkeneten.

Kizárási kritérium volt az oligo-anuriás veseelégtelenség és az anamnesztikus dokumentáció, képalkotó vizsgálatok és speciális labortesztek (infekciós paraméterek, szisztémás autoimmunbetegségekre utaló labor paraméterek) alapján azonosítható krónikus infekció, malignus alapbetegség vagy egyéb autoimmun betegség.

A remissziót elérő TTP-s betegeket két külön csoportba osztottuk az epizód kezdetétől számított idő, trombocitaszám és tünetek szerint. Hematológiai remissziót (HR) akkor állapítottunk meg, ha a trombocitaszám nagyobb volt, mint 150 G/L két egymást követő napon, és a beteg vérében hemolízis nem volt detektálható (vagy csökkenő mértéket mutatott), ettől függetlenül neurológiai, vese és egyéb szervrendszer károsodásának tünetei (melyek az epizód elején kezdődtek) jelen lehettek. Komplet remissziót (KR) akkor állapítottunk meg, ha a trombocitaszám tartósan nagyobb volt, mint 150 G/L legalább 1 hónapig, és legfeljebb maradványtünetek voltak megfigyelhetők.

A mintákat a betegség lefolyása során különböző időpontokban vettük le, ezek alapján alcsoportokat hoztunk létre, amelyeket az analízisek során használtunk. Tekintettel arra, hogy a TTP kezelése során a különböző faktorok szintjeit leginkább a PEX befolyásolhatja, ezért az analízisek során az akut minták elkülönítését a PEX

megkezdéséhez viszonyítottuk. Így a betegek első, akut mintája a terápiás PEX megkezdése előtt lett levéve, amikor még beadott plazma nem befolyásolhatta a különböző paraméterek plazmaszintjét. Több betegnél az első minta akkor lett levéve, amikor a PEX-et már megkezdték. Az utolsó PEX után levett minták a terápiától számítva különböző időpontokban lettek levéve, és a fent ismertetett fogalmak (HR, KR) szerint lettek besorolva a különböző analízisekbe. A részletes betegadatokat a 2.- és 3. Táblázat, a 4.- és 5. ábra valamint a 4.- és 5. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. Az akut TTP-s betegek adatai. A HUN 28, 35, 81 a NE projektnél mint remissziós TTP-s lett beválogatva. HUN: regisztrációs szám, *életkor a mintavétel alkalmával. (Rövidítések: A: abdominális/emésztőszervrendszeri tünetek (hányás, hasmenés, hasi fájdalom stb.), ÁT: általános tünet (gyengeség, fáradékonyág); ET-1: endothelin-1 projekt (n=25 beteg PEX előtt, 12 beteg PEX alatt), N: neurológiai, NA: nincs adat, NE: neutrofil elasztáz projekt (n=21 beteg), R: renális tünet (proteinuria, hematuria) PEX#: plazmacsere száma)

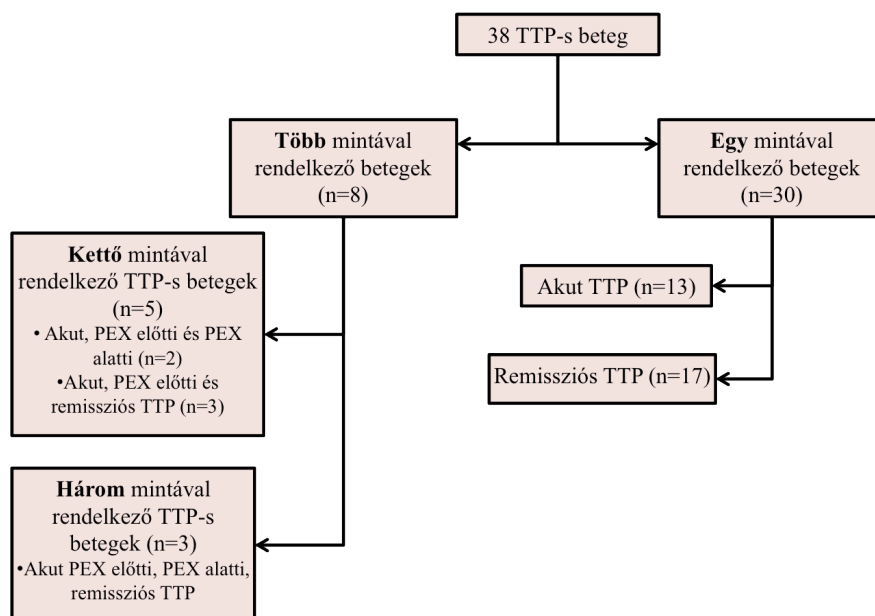
HUN	Nem	Életkor*	Első epizód	Utolsó epizód	Összes epizód	Tünetek	PEX#	Projekt
Akut TTP-s betegek, első mintájuk vagy PEX előtt, vagy PEX alatt lett levéve								
1	Nő	26	2007	2010	3	N	15	NE/ET-1
15	Férfi	55	2008	2008	1	A	10	NE/ET-1
23	Férfi	38	2008	2008	1	R, A	12	NE/ET-1
28	Nő	35	2008	2012	3	N, R, A	6	NE/ET-1
35	Nő	35	2007	2009	2	N	3	NE/ET-1
43	Nő	62	2009	2009	1	N, R, A	5	NE/ET-1
50	Nő	16	2009	2009	1	N	11	NE/ET-1
62	Nő	35	1991	2009	4	N, A	15	NE/ET-1
68	Férfi	43	2010	2010	1	N	19	NE/ET-1
72	Nő	13	2010	2010	1	N, A	15	NE/ET-1
76	Nő	58	2010	2010	1	N	7	NE/ET-1
81	Nő	21	2010	2010	1	N	24	NE/ET-1
85	Nő	49	2010	2010	1	N	38	NE/ET-1
86	Nő	42	2010	2010	1	N, A	9	NE/ET-1
96	Nő	22	2010	2010	1	N	2	NE
97	Nő	31	1990	2010	9	N, R, A	5	NE/ET-1
112	Nő	52	1991	2010	2	N	8	NE/ET-1
113	Nő	21	2006	2011	4	A	6	NE/ET-1
122	Nő	32	2010	2010	2	ÁT	12	ET-1
123	Nő	26	1991	2010	4	N	30	NE/ET-1
126	Férfi	36	2010	2011	2	ÁT	28	NE/ET-1
127	Nő	30	2010	2010	1	N	9	NE/ET-1
131	Nő	39	2006	2011	2	ÁT	4	NE/ET-1
134	Nő	45	2011	2011	1	N	26	NE/ET-1
144	Nő	41	2009	2011	2	N	4	ET-1
145	Nő	59	2011	2011	1	N, A	10	ET-1
148	Nő	65	2011	2011	1	N	NA	ET-1
149	Nő	62	2011	2011	1	N	6	ET-1
183	Nő	45	2011	2011	1	N	28	ET-1
212	Nő	41	2011	2011	1	N	15	ET-1
239	Nő	35	2012	2012	1	N	4	ET-1
251	Nő	35	2012	2012	1	N, A	20	ET-1
292	Nő	22	2012	2012	1	N, A	17	ET-1
353	Nő	39	2012	2012	1	N	20	ET-1
430	Férfi	42	2013	2013	1	N	10	ET-1
447	Nő	34	2013	2013	1	N, R, A	10	ET-1
453	Nő	43	2013	2013	1	N	4	ET-1
462	Férfi	22	2013	2013	1	N, R, A	5	ET-1

3. táblázat. A remissziós TTP-s betegek adatai. A HUN 28, 35, 81 a NE projektnél mint remissziós TTP-s lett beválogatva. A HUN 56 a NE projektnél mint akut TTP-s beteg lett beválogatva. HUN: regisztrációs szám, *életkor a mintavétel alkalmával. (Rövidítések: A: abdominális/emésztőszervrendszeri (hányás, hasmenés, hasi fájdalom stb.), ÁT: általános tünet (gyengeség, fáradékonyság); ET-1: endothelin-1 projekt (n=17 beteg), N: neurológiai, NA: nincs adat, NE: neutrofil elasztáz projekt (n=17 beteg), NR: nem releváns, R: renális tünet (proteinuria, hematuria) PEX#: plazmacsere száma)

HUN	Nem	Életkor*	Első epizód	Utolsó epizód	Összes epizód	Tünetek	PEX#	Projekt
Remissziós TTP-s betegek, az adott markert csak a remissziós mintából határoztuk meg								
3	Férfi	29	1999	2006	3	N	NR	NE/ET-1
31	Nő	31	2008	2008	1	ÁT	NR	NE/ET-1
53	Nő	35	1994	1998	2	N	NR	NE/ET-1
54	Nő	56	1988	2009	>2	N	NR	NE
56	Nő	40	2006	2010	2	N	NR	NE/ET-1
58	Nő	20	1983	2010	3	N	NR	NE/ET-1
59	Nő	44	2003	2003	1	N, R, A	NR	NE
65	Nő	21	1995	2002	6	N, R, A	NR	NE/ET-1
70	Nő	44	2006	2006	1	N	NR	NE/ET-1
78	Nő	38	2001	2001	1	N, R, A	NR	NE/ET-1
80	Férfi	29	2008	2008	2	N, A	NR	NE/ET-1
89	Férfi	19	1996	2003	4	N	NR	NE/ET-1
100	Nő	31	2001	2001	1	N, R	NR	NE/ET-1
101	Nő	53	2002	2002	1	N, R	NR	NE/ET-1
115	Nő	41	2000	2006	4	N, A	NR	NE/ET-1
146	Nő	58	2005	2011	3	ÁT	NR	ET-1
276	Nő	51	2012	2012	1	ÁT	NR	ET-1
279	Férfi	20	2006	2012	3	ÁT	NR	ET-1
396	Nő	21	2013	2013	1	H	NR	ET-1

3.2. A neutrofil elasztáz projekt betegleírása

A vizsgálatba összesen 38 TTP-s beteget (közülük 21 akut (átlag életkor: 40 év, SD: 15 év, 17 nő), 17 remissziós szakaszban volt (átlag életkor: 42 év, SD: 10 év, 14 nő) és 20 egészséges kontrollt (átlag életkor: 35 év, SD: 17 év, 15 nő) vontunk be. Nyolc betegnek több mintája is volt, ezért lehetőségünk nyílt követéses vizsgálatot is végezni. A 8 betegből 5-nek (HUN: 68, 86, 126, 127, 131) a második mintája a PEX sorozat alatt, az aktuális napi PEX előtt került levételre. Nyolc betegből 6-nak hematológiai remisszióban lett levéve a második mintája (HUN: 1, 15, 62, 68, 86, 127) a PEX leállítását követően. Így tehát összesen a 38 beteg 49 EDTÁ-val antikoagulált plazma mintáját használtuk fel a PMNE mérésére.



4. ábra. A neutrofil elasztáz projektbe beválogatott betegek megoszlása.

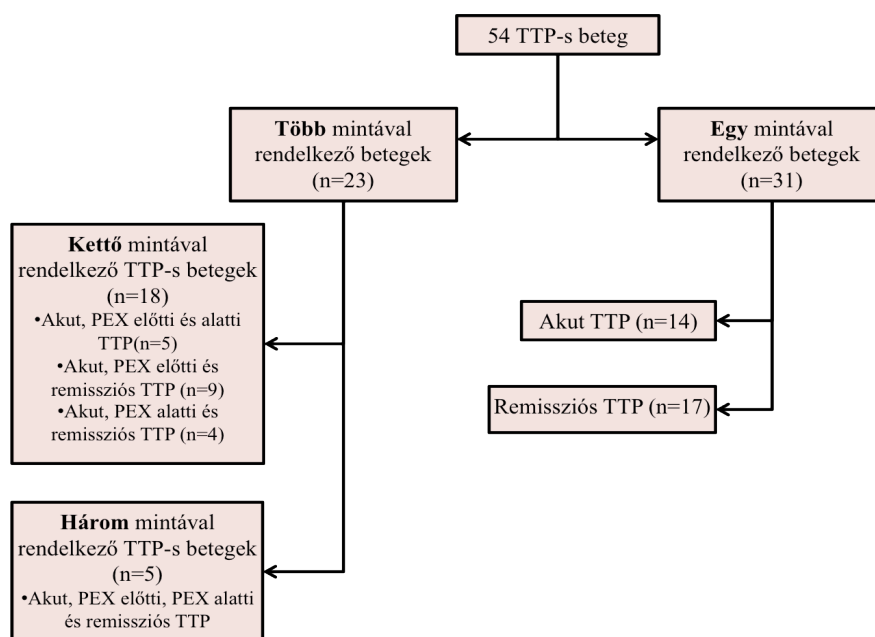
4. táblázat. A neutrofil elasztáz projektbe beválogatott betegek laboratóriumi paraméterei. *PEX előtt és alatt. A változók medián értékei és interkvartilis tartományai lettek feltüntetve. (Rövidítések: EK: egészséges kontroll, NEU#: abszolút neutrophil granulocitaszám, NM: nincs meghatározva, PEX: plazmacsere)

Laborparaméterek	Akut TTP*	Remissziós TTP	EK
Hemoglobin (mg/L)	82,0 (72,5-101,5)	144,0 (134,5-153,5)	134 (127,5-138)
Trombocita (G/L)	28 (18,5-44)	213 (184-260)	296 (268,5-307,5)
Fehérvérsejt (G/L)	8,46 (6,6-11,3)	6,85 (5,86-10,1)	7,6 (6,0-8,3)
NEU # (G/L)	5,86 (4,4-8,4)	4,64 (3,4-6,8)	3,9 (3,3-4,6)
ADAMTS13-aktivitás (%)	0 (0-0)	19 (0-97)	NM
Kevert ADAMTS13-aktivitás (%)	5 (0-15,7)	30 (20-61)	NM
PMNE (ng/mL)	115,2 (67,5-258,9)	57,5 (49,2-88,2)	51 (34,7-56,5)
C3a (ng/mL)	192,0 (157,0-398,6)	139,1 (121,3-245,4)	NM
C3 (g/L)	1,56 (1,2-2,0)	1,6 (1,5-2,1)	NM
Bb (µg/mL)	1,6 (1,1-2,4)	1,1 (0,9-1,4)	NM
B-faktor (%)	114 (98,5-131,0)	122,5 (106,8-152,0)	NM
H-faktor (mg/L)	399,0 (304,0-566,5)	555 (392,5-692,5)	NM
I-faktor (%)	117,5 (99,5-148,3)	113,5 (99,0-127,3)	NM
C1rC1sC1-inh (U/ml)	11 (8,6-13,4)	5 (2,8-12,3)	NM
C4d (µg/mL)	3 (2-4,1)	3 (2-3,2)	NM
C3bBbP (U/mL)	2,0 (1,3-4,3)	2,3 (1,6-3,3)	NM
SC5b-9 (ng mL-1)	325,2 (263,4-424,2)	251,3 (227,2-335,3)	NM

3.3 Az endothelin-1 projekt betegleírása

A vizsgálatba további betegeket vontunk be, így összesen 54 TTP-s betegben vizsgáltuk az endotélsejt-aktivitást. Huszonöt betegnek az akut fázisban, az első PEX előtt lett levéve az első mintája (átlag életkor: 41 év, SD: 13 év, 19 nő), 12 beteg első mintája a

PEX-sorozat megkezdése után, az aznapi PEX előtt lett levéve (átlagéletkor: 40 év, SD: 15 év, 12 nő), 17 betegnek csak remissziós mintája volt (átlagéletkor: 42 év, SD: 12 év, 14 nő). A betegek mellé 57 egészséges kontrollt választottunk (átlag életkor: 36 év, SD: 9, 30 nő). 31 betegnek volt összesen 1 mintája. 18 TTP-s betegnek 2 mintája volt, 5 TTP-s beteg rendelkezett 3 mintával (5. ábra).



5. ábra. Az endothelin-1 projektbe beválogatott betegek megoszlása.

5. táblázat. Az endothelin-1 projektbe beválogatott betegek laboratóriumi paramétereit PEX előtt és alatt. A változók medián értékei és interkvartilis tartományai lettek feltüntetve. *PEX előtt és alatt (Rövidítések: EK: egészséges kontroll, NM: nincs meghatározva, PEX: plazmacsere, Se: szérum)

Laborparaméterek	Akut TTP* [*]	Remissziós TTP	EK
Hemoglobin (mg/L)	83 (72-108)	140 (124-153)	145 (136-161)
Trombocita (G/L)	22 (11-43)	246 (203-361)	271 (236,5-305)
Se-Kreatinin (μmol/L)	80,5 (63,8-99)	69 (56,8-82,8)	69 (61-80)
ADAMTS13-aktivitás (%)	0 (0-0)	0,5 (0-77,7)	NM
Kevert ADAMTS13-aktivitás (%)	0 (0-14)	30 (9-54,5)	NM
VWF antigén (mg/L)	569 (397,1-706,8)	409,8 (324,6-653,2)	138,4 (71,8-217,1)
CT-proET-1 (pmol/L)	57,47 (42,8-88,9)	48,6 (45,2-58,3)	36 (21,5-42)
H-faktor (mg/L)	404 (374-588)	455 (316-654)	597,8(494,9-700,7)
C3 (g/L)	1,37 (1,2-1,9)	1,5 (1,1-1,7)	NM
C3a (ng/mL)	203,1 (165,6-559,9)	195,4 (109,6-328,7)	NM
C3bBbP (U/mL)	2,3 (1,5-4,9)	2,3 (1,8-3,3)	NM
H-faktor (mg/L)	418,7 (279,8-657,1)	289,8 (230,7-347,6)	NM

3.4. Az ADAMTS13-aktivitás meghatározása

Az ADAMTS13-aktivitás meghatározása egy fluorogenikus szubsztráttal, az ún. FRET- VWF73-al történt (109). A citrátos plazmamintákat fehér 384-lyukú lemezekben 1:20 arányban assay pufferben hígítottuk (5mM Bis Tris, 25mM CaCl₂, 0,005% Tween 20, pH 6,0) a mintákhoz 5 μ M FRET- VWF73 szubsztrátoldat lett hozzáadva (20 μ L térfogatban minden lyukba). A fluoreszcencia mérés 37 °C -on történt, minden második percben, egy órán keresztül. A mérés 340 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós filterrel felszerelt Chameleon microplate readerrel történt (Hidex, Turku, Finland). A reakciósebesség számítása a fluoreszcenciaintenzitás és az eltelt idő lineáris regressziós analízisével történt. A standard görbeként normál humán plazmamintákból (10 egészséges donor kevert citrátos plazmamintája) készített felező hígítási sor szolgált, a 100%-os ADAMTS13 aktivitásnak az 1:20-as hígítású mintáknál megfigyelt reakciósebesség felelt meg. Az intra-assay variációs koefficiens (CV) 5% alatti volt, az inter-assay CV 6-9% volt (60 és 100%-os aktivitásnál mért szintek). Az anti-ADAMTS13 inhibitorok jelenlétének és mennyiségének meghatározása a kérdéses plazmaminta és a normál humán plazma 1:1 arányú keverékének két órás, 37 °C-os inkubációt követő ADAMTS13- aktivitásmérése révén történt. Az ADAMTS13 inhibitorok jelenléte akkor igazolódott, ha a beteg plazmájának mért ADAMTS13 aktivitása <10% és a kevert plazma aktivitása <50% volt.

3.5. A komplementproteinek és aktivációs termékek szintjének meghatározása

A komplementkomponensek meghatározása nagyrészt korábbi projektünk alkalmával történt (104). A komplementrendszer aktivációját jelző termékek közül a C3a (MicroVue C3a des-arg EIA A031, egészséges kontroll átlag 129,6 ng/mL), Bb (MicroVue Bb EIA, A027, átlag + 2SD tartomány 0,49-1,42 μ g/mL), C4d (MicroVue C4d EIA, A008, átlag + 2SD tartomány: 0,7-6,3 μ g/mL), SC5b-9 (TCC)(MicroVue SC5b-9 Plus EIA, A020, egészséges kontroll átlag 200 ng/mL, SD85) határoztuk meg. A méréseket kereskedelemben kapható kitékkel végeztük a gyártó utasítása szerint EDTA-s plazmamintát felhasználva (Quidel, San Diego, California, USA).

A komplement C3 (Roche Cobas Integra 800 Tina-quant©C3c 2. Ver. Cat. No.: 3001938, referencia tartomány: 0,9-1,8 G/L), I-faktor és B-faktor (radiális immundiffúzió, mindkettő referencia tartománya 70-130%) és H-faktor (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), referencia tartomány: 250-880 mg/L) szintek szérummintából lettek meghatározva a gyártó utasítása szerint. Az endotélsejt-aktivációt vizsgáló projektünk során kettő betegnek nem lett meghatározva a H-faktor szintje. A C1rC1sC1-inh szérumkoncentrációja ELISA módszerrel lett megmérve (110) kisebb módosítással (111).

A C3bBbP aktivációs termék meghatározása ELISA-val történt. A lemez (Nunc, Maxisorp F96, Nunc GmbH, Langensfeld, Germany) 1:1000-es hígítású kecske anti-humán properdin antitesttel lett fedve (Inctar Corporation, Inctar, Stillwater, MN, USA). Blokkolás után 1:10-es hígítású EDTÁ-s plazmaminták és standard sorok lettek hozzáadva. Az előhíváshoz biotin-konjugált nyúl anti-humán C3a antitestet (Dako, Dako Glostrup, Denmark) és streptavidin-peroxidáz konjugátumot használtunk. (Jackson ImmunoResearch, UK; Jackson West Grove, PA, USA). A koncentráció unit/mL minta egységben lett kifejezve. 1000 unit 1mL 1:10 hígítású, zymozan kezelt normál humán szérum C3bBbP tartamának felel meg (az alternatív út aktivitását jelzi teljes mértékben). Átlagértéke egészséges felnőttekben 3,4 U/mL és SD 1,03 a mérésen belüli és mérések közötti CV <5%, <15%.

3.6. A neutrofil granulociták aktivációját jelző markerek meghatározása

A neutrofil elasztáz szintjének meghatározása egy inhibitorával alkotott stabil komplex molekula szintjének mérésén keresztül történt (polymorphonuclear leukocyte elastase - α 1-proteináz inhibitor: PMNE- α 1-PI, a továbbiakban PMNE-ként hivatkozok a mért enzimkomplexre). In vivo a granulocitákból kibocsátott elasztáz az ún. extracelluláris α 1-proteináz inhibitor (α 1-PI) által semlegesítődik, így az elasztáz és az α 1-PI által alkotott stabil (kovalens) komplexet megbízhatóan lehet meghatározni és ebből következtetni a kibocsátott PMNE mennyiségére (112). A PMNE meghatározása a gyártó instrukciói szerint, a PMNE- α 1-PI komplex szendvics típusú ELISA-val történt (QIA96, Calbiochem, Merk-Millpore, Darmstadt, Germany).

A myeloperoxidázt (MPO) a gyártó utasítása szerint ELISA módszerrel, torma-peroxidázzal jelölt anti-MPO nyúl antitesttel határoztuk meg EDTÁ-s plazmamintákból (Immundiagnostik AG, MPO (serum/plasma) ELISA Kit, Bensheim, Germany).

3.7. Az endotélsejt aktivációs markerek meghatározása

3.7.1. A VWF-antigén meghatározása

A VWF-antigén szintjét a betegek EDTÁ-s plazmáiból mértük meg (referencia tartomány: 53.2-329.1 mg/L, 5-95 percentilis) házi módszerrel, Cejka (113) módszere alapján. A módszerhez primer antitesteket és torma-peroxidáz jelölt poliklonális anti-humán VWF nyúl antitestet használtunk (mindkettő Dako, Glostrup, Denmark)(109). Az endotélsejt-aktivációs projektben tizenegy betegnek nem volt alkalmas mintája, így nem lehetett meghatározni a VWF-antigén szintjét.

3.7.2. A CT-proET-1 meghatározása

Az endothelin-1 rövid, néhány perces féléletideje miatt nehezen mérhető a plazmában, ezért egy prekursor fragmensét a CT-proET-1-et mértük meg. A CT-proET-1 az endothelin-1 végleges formájának kialakulása előtt hasad le a prekursor molekuláról ekvimoláris mennyiségben, nem degradálódik, féléletideje hosszú, szobahőmérsékleten 42 óra (103).

A CT-proET-1-et EDTÁ-s plazmából határoztuk meg egy automatizált ún. time-resolved immunoluminometriás assay-vel, a gyártó utasítása alapján. (BRAHMS Kryptor System, jelenleg a Thermo-Fischer Scientific forgalmazza, Waltham, MA, USA)(114).

3.8. Statisztikai analízis

A tanulmányunk során a mért folytonos változók ferdtült eloszlást mutattak, a Shapiro-Willk-teszt a normál eloszlástól eltérést mutatott, így az értékek eloszlását a medián és az interkvartilis tartomány megadásával írtuk le. A kategorikus változókat esetszám (százalék) formában tüntettük fel. A különböző csoportok összehasonlítására nem-parametrikus tesztekkel használtunk. A két csoport közötti folyamatos változók összehasonlítására Mann-Whitney U tesztet, három vagy több csoport

összehasonlítására Kruskal-Wallis ANOVA tesztet, az ismétlődő mérésekhez Friedman-tesztet alkalmaztunk. Az ANOVA teszt után Dunn's post tesztet végeztünk az alcsoportok összehasonlítására. A Spearman korrelációs koefficienseket nem-parametrikus módszerrel számoltuk. A betegek mintapárjainak összehasonlítására Wilcoxon-tesztet alkalmaztunk. A statisztikai analízisekhez a STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) és GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Softwares Inc, CA, USA) szoftvereket alkalmaztunk. Két-oldalas p-értékeket számoltunk, az eredményt szignifikánsnak 0,05 alatt tekintettük ($p < 0,05$).

4. Eredmények:

4.1. Neutrofil granulocita aktiváció TTP-ben

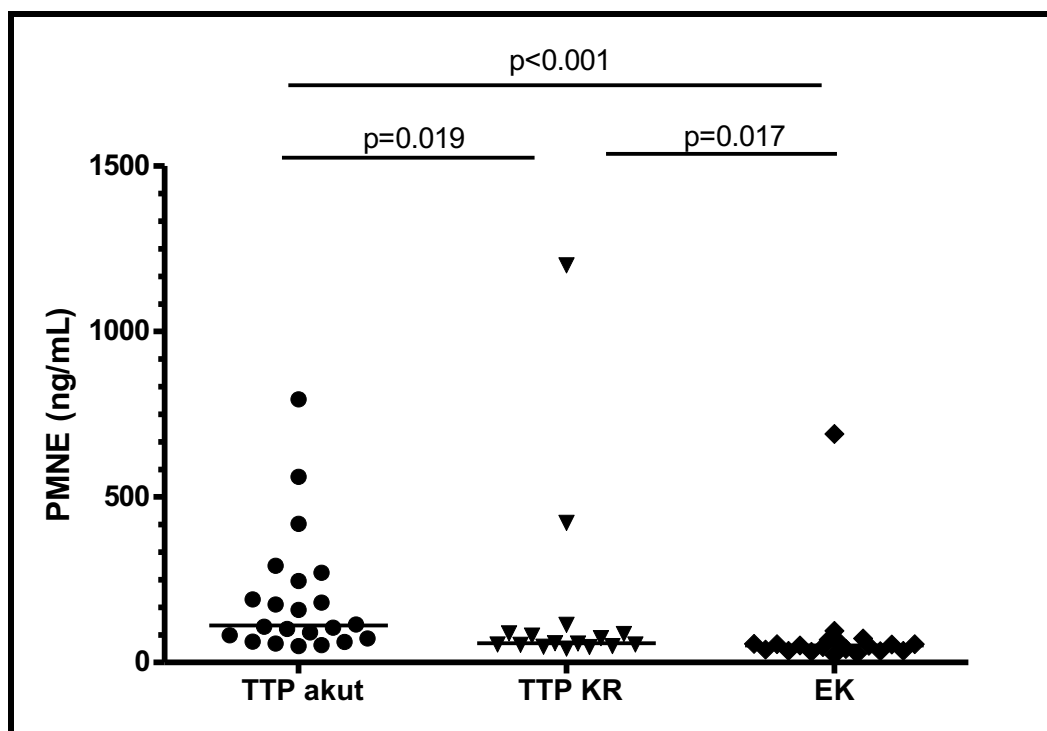
4.1.1. A neutrofil elasztáz projekt részletes betegleírása

Az akut TTP-s betegcsoportba összesen 21 beteget választottunk be, ebből 13 beteg mintája közvetlenül a PEX előtt lett levéve, a fennmaradó 8 beteg mintája pedig már a kezelés megkezdése után/közben (4. ábra). Tizenhét beteg lett beválogatva a remissziós TTP-s betegcsoportba. A remisszió ellenére 8 betegnek volt aktuálisan ADAMTS13-deficienciája. A maradék 9 remissziós beteg közül, 8 betegnek volt normál ADAMTS13-aktivitása és 1 betegnek pedig enyhén csökkent aktivitása. Három beteg esetében (HUN 54, 58, 59) az akut betegség lezajlása idején még nem volt elérhető hazánkban az ADAMTS13-aktivitás meghatározása, ezért az ADAMTS13-aktivitásuk csak később, a kontrollvizsgálatok során lett meghatározva, ezért ők a klinikailag TTP-re utaló tünetek alapján lettek beválogatva.

Az akut TTP-s betegeknél a HUN 26 és 45 kivételével a neutrofil granulocita szám jellemzően nem volt átlagban nagyobb a remissziós betegcsoporthoz képest. Az abszolút neutrofil granulocita szám mediánja az akut betegcsoportban 6,0 G/L (interquartilis tartomány: 4,4-9,7) a remissziós betegek körében pedig 4,7 G/L (3,4-9,1; Mann-Whitney-teszt: $p=0,223$) volt (4. táblázat).

4.1.2. A PMNE-szintek megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegek között

Eredményeink kiértékelésekor először a különböző betegszakaszban (akut, remisszió) levő TTP-s betegek PMNE-szintjeit hasonlítottuk össze az egészséges kontrollcsoportban mért PMNE-szintekkel. Nem paraméteres t-tesztet alkalmaztunk, mivel ferdült volt a minták eloszlása. A csoportok PMNE-szintjei közötti különbséget (akut TTP, remissziós TTP, egészséges kontroll) Mann-Whitney-teszt segítségével vizsgáltuk. (6. ábra)



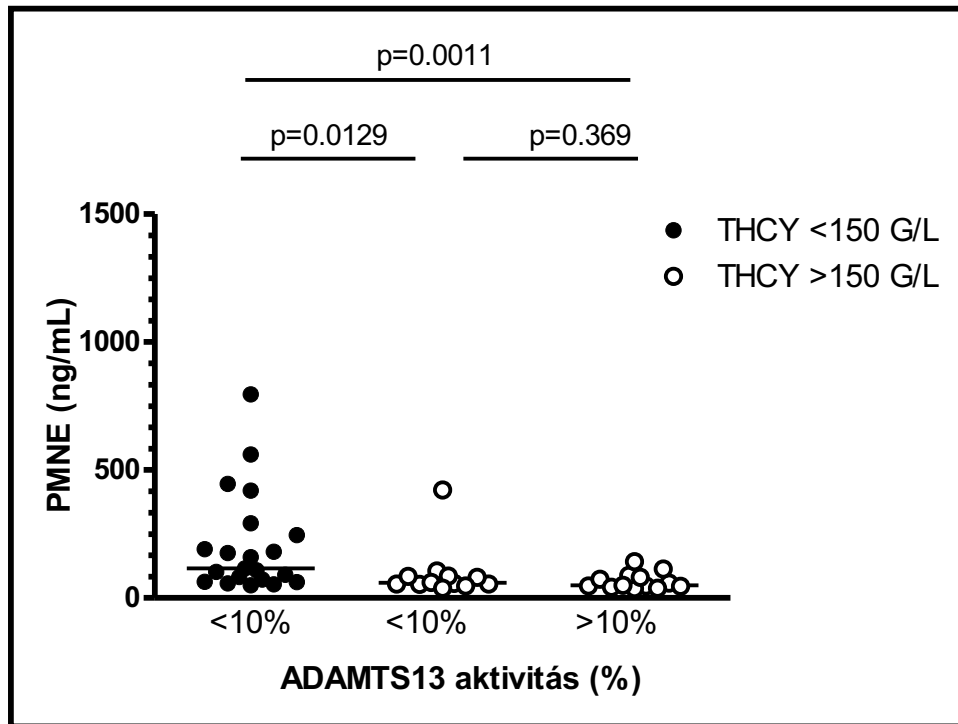
6. ábra. A PMNE, mint az akut TTP egyik markere. A PMNE- α 1-PI komplexet (Calbiochem, Merk-Millipore, Darmstadt, Germany) a TTP-s betegek akut és remissziós EDTA-mintáiból határoztuk meg. A vízszintes vonalak a mediánértékeket mutatják. Az ábrán feltüntetett p-értékeket Mann-Whitney-tesztel számoltuk ki. (EK: egészséges kontroll; KR: komplett remisszió)

A tesztek során azt kaptuk, hogy az akut TTP-s betegekben mért PMNE-értékek szignifikánsan magasabbak voltak a remissziós TTP-s ill. az egészséges kontrollok mintáiban mért értékekhez képest (6. ábra). Az akut TTP-sek medián értéke kétszer magasabb volt a remissziós betegéhez képest. A remissziós betegek és az egészséges kontrollok mediánértékei között nem volt számottevő eltérés, mindkét csoport mediánértékei alacsonyabbak voltak az akut csoport mediánjához képest. A remissziós csoportban észlelt két kiugró érték (HUN 54, 65) háttérben további laboradatok (CRP, fehérvérsejtszám) a lehetséges gyulladás, ill. fertőzés jelenlétét kizárták.

4.1.3. A PMNE-szintek betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben

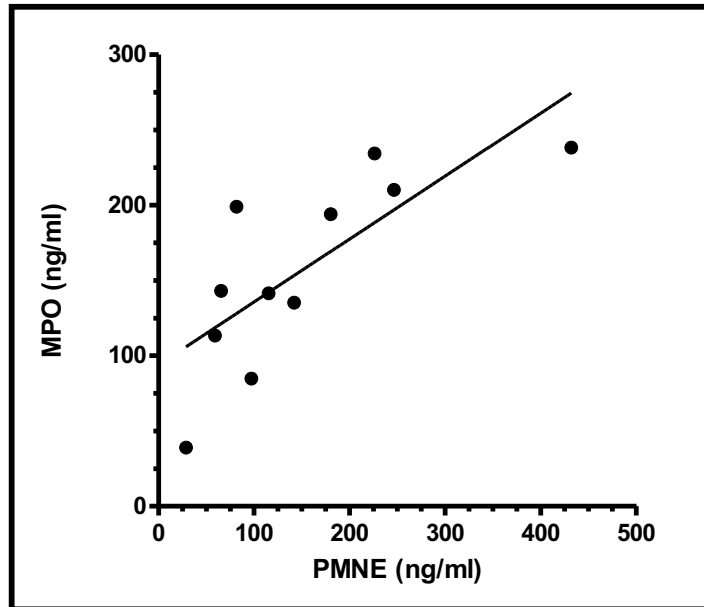
Egy másik analízisben a TTP aktivitási markerei (trombocitaszám (THCY), ADAMTS13-aktivitás) szerint kialakított csoportok PMNE-szintjeit hasonlítottuk össze az egészséges kontrollokéval. A 7. ábrán látható betegségaktivitás szerinti csoportosításban az ADAMTS13-deficiencia (aktivitás <10%) jelenléte (PMNE medián: 58,91 ng/ml, interkvartilis tartomány: 54-86) vagy hiánya (PMNE: 49,24 ng/ml, 44-84)

nem befolyásolta a remissziós TTP-s betegek (THCY>150 G/L) mért PMNE-értékeit. Az ADAMTS13-deficiens betegmintákhoz társuló magasabb PMNE-értékek jellemzőek voltak a hematológiailag aktív betegekre (THCY<150 G/L). Lényeges, hogy vizsgálatunkban nem voltak olyan betegek, akiknek normál ADAMTS13-aktivitás mellett csökkent thrombocitaszámuk lett volna.



7. ábra. Az emelkedett PMNE-szintek együtt az ADAMTS13-deficienciával jellemzőek a hematológiailag aktív TTP-re. Negyvenhat hematológiailag aktív (THCY <150 G/L) és hematológiailag remisszió (THCY>150 G/L) állapotában lévő beteg mintáit csoportosítottuk az ADAMTS13-deficiencia (<10%) jelenléte szerint. A p-értékek Mann-Whitney-teszt alapján lettek kiszámolva.

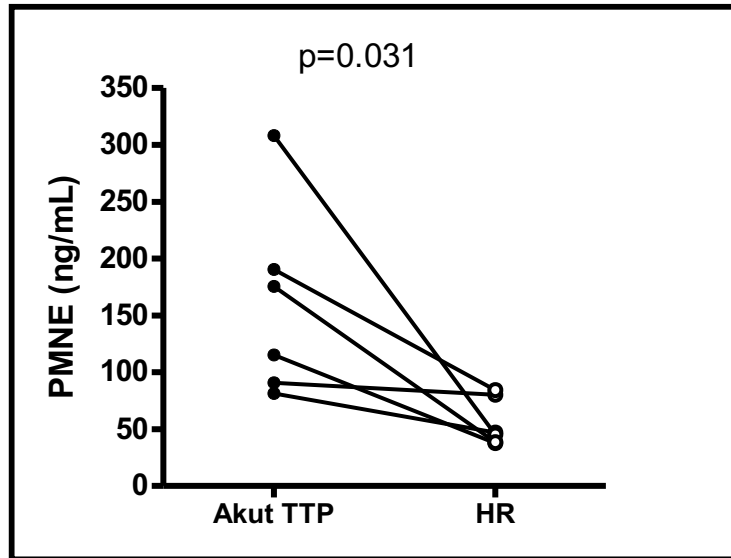
Szorosan ehhez a megfigyeléshez tartozik, hogy a TTP-s betegek mintáiban mért ADAMTS13-inhibitor-szintek (ADAMTS13-aktivitás a kevert beteg/normál 1:1 plazmában) és PMNE-értékek között szignifikáns korreláció mutatkozott (8. ábra). Ezzel szemben az ADAMTS13-aktivitás (beteg saját mintájában mérve) és PMNE-értékek között nem látszott összefüggés ($r=-0,24$; $p=0,13$, Spearman-korreláció), aminek az oka feltehetően a sok deficiens érték előfordulása.



9. ábra. A PMNE és MPO közötti összefüggés. Két neutrofil granulocita eredetű aktivitási marker összehasonlítása akut TTP-ben. ($r=0,78$, $p=0,0045$, Spearman-korreláció)

4.1.4. A PMNE-szintek változása terápia hatására

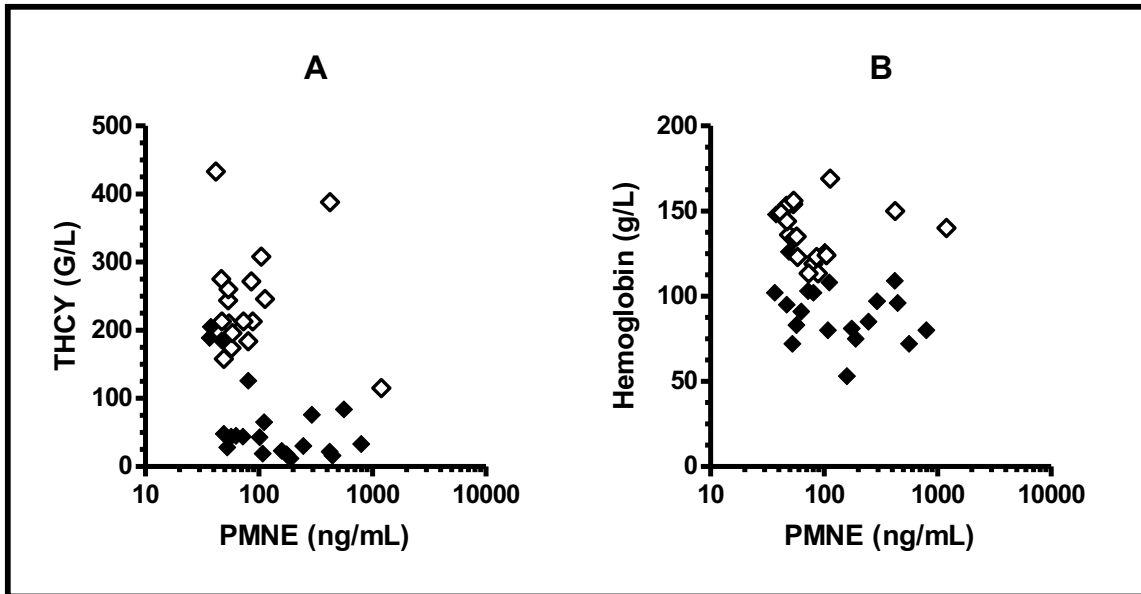
Több betegnél rendelkezésünkre állt különböző fázisból származó minta, így meg tudtuk vizsgálni, hogy a terápia hatására hogyan változik a PMNE-szint TTP-s betegekben. Ebbe az analízisbe 11, egy-egy mintapárral rendelkező beteget vontunk be. Öt betegnél az első minta közvetlenül az első PEX megkezdése előtt, mintapárjuk pedig PEX közben lett levéve. Az 5-ből 4 betegnél 40-60%-os PMNE-csökkenés volt megfigyelhető, míg 1 betegnél nagyfokú növekedés volt látható. A PEX közben levett mintákban nem volt szignifikáns mértékű PMNE-szint csökkenés a PEX előtt levett mintapárjaikhoz képest ($p=0,43$). Hat betegnél (4 nő) az első mintát a PEX megkezdése előtt, a mintapárját hematológiai remisszióban, az utolsó PEX után legalább egy héttel vették le. Ahogy a 10. ábrán is látszik, a PMNE-szint csökkenése szignifikáns mértékű volt a remissziós betegekben a PEX előtt levett mintapárjaikhoz képest ($p=0,031$).



10. ábra. A PMNE-szint változása terápia hatására, követéses vizsgálatban. Hat TTP-s beteg akut és hematológiai remisszióban (HR) levett plazmaminta-párjaiban mért PMNE szintek összehasonlítása. (A p-érték Wilcoxon-tesztel lett meghatározva.)

4.1.5. A PMNE betegségaktivitási-markerekkel való összefüggése

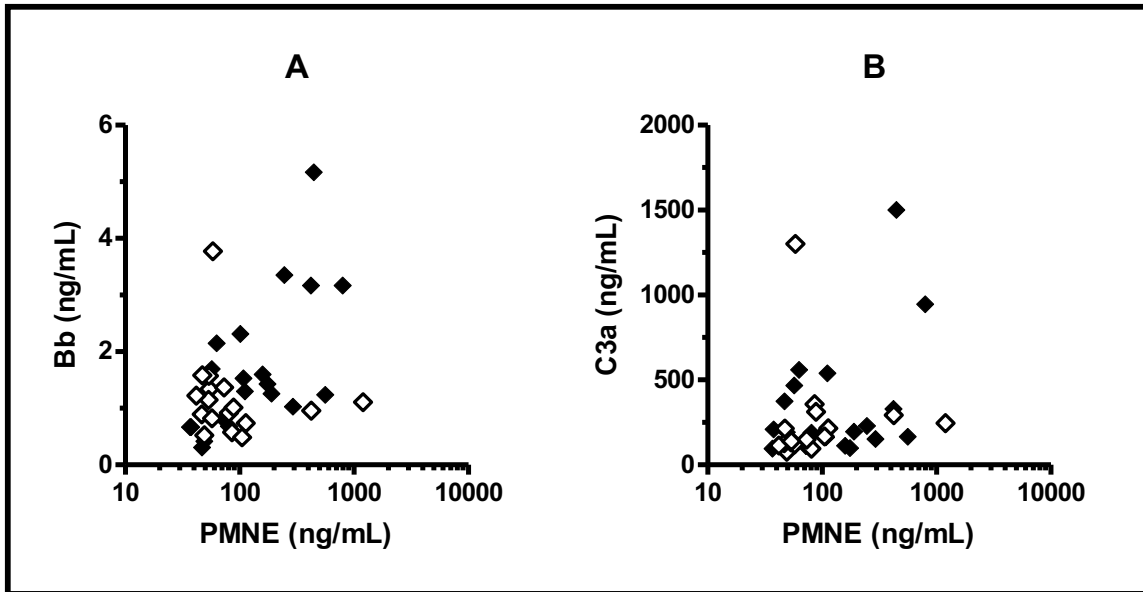
A TTP-s epizód során a betegség aktuális állapotáról, vagyis aktivitásáról gyors és átfogó képet ad a trombocitaszám és hemoglobinérték, ezért a vizsgálatba beválogatott betegekben e betegségaktivitási markereket vetettük össze a mért PMNE-értékekkel. Ha együtt az összes szakból (akut, remisszió) származó betegmintában mért trombocitaszámokat és hemoglobinértékeket hasonlítottuk össze a mintákhoz tartozó PMNE-értékekkel, mind a két esetben inverz, szignifikáns korrelációt tapasztaltunk (11. ábra A, B). A trombocitaszámok az akut TTP-s betegekben mutatták a legerősebb összefüggést a PMNE-értékekkel. Tizennégy akut TTP-s beteg transzfúziót kapott a mintavétel előtt, ami a hemoglobin értékeket befolyásolhatta, míg a PMNE-értékek feltehetően nem, vagy nem arányosan változtak ennek hatására. Ha a transzfúzióban részesült betegeket kizártuk az analízisből, akkor is szignifikáns, inverz korreláció volt tapasztalható a hemoglobin- és PMNE-értékek között akut betegekben ($r=-0,427$; $p=0,037$, 11. ábra B).



11. ábra A, B. A PMNE szintek összefüggései a betegség aktivitását jelző markerekkel TTP-s betegekben. A PMNE- és a thrombocita- (A) vagy hemoglobin- (B) értékek közötti összefüggéseket jelző korrelációs koefficiens és p-értékek nem-paraméteres Spearman-tesztel lettek kiszámolva. Az akut TTP-s betegek teli szimbólummal, míg a remissziós beteget üres szimbólumokkal lettek jelölve. A ábra, összes minta: $r=-0,483$; $p=0,006$; akut TTP: $r=-0,521$; $p=0,015$; remissziós TTP: $r=-0,086$; $p=0,743$; B ábra: összes minta: $r=-0,382$; $p=0,018$; akut TTP: $r=-0,353$; $p=0,116$; remissziós TTP $r=-0,257$; $p=0,318$. (Az X tengely logaritmusos beosztású.)

4.1.6. A PMNE összefüggése a komplementaktivációs-markerekkel

A komplementfaktorokat és komplement aktivációs termékeket a betegek egy részében korábbi kutatásunk során mértük meg, melynek kapcsán emelkedett C3a és terminális út aktivációs komplex (SC5b9) szinteket tapasztaltunk akut TTP-s betegekben (104). Korábbi kutatási eredményeink felhasználásával szeretnénk volna megvizsgálni, hogy milyen kapcsolat van a komplementkomponensek vagy az aktivációs termékek és a neutrofil granulocita aktivációs markerek között. Ahogy az 12. ábrán is látható a PMNE szignifikáns korrelációt mutatott az alternatív út C3 konvertáz komplex aktivációs markerével (Bb, 12. ábra A, $r=0,392$; $p=0,015$, Spearman-korreláció) és a C3a-val (12. ábra B, $r=0,367$; $p=0,024$, Spearman-korreláció). A többi mért komplementkomponenssel (C3, B-, H-, I-faktor $r=-0,171$; $-0,287$; $0,015$; $0,255$; $p>0,05$, Spearman-korreláció) vagy aktivációs markerrel (C1r-C1s-C1-inhibitor, C4d, C3bBbP, SC5b9; $r=0,025$; $0,058$; $0,017$; $0,199$; $p>0,05$, Spearman-korreláció) nem mutatott szignifikáns összefüggést a PMNE.



12. ábra. A, B. A PMNE szintek összefüggései a komplementrendszer aktivációs markereivel TTP-s betegekben. A PMNE és az aktivált B faktor (Bb) (A) vagy az anafilatoxin C3a (B) közötti korrelációs koefficiens és p-értékeket nem-paraméteres Spearman-módszerrel számoltuk ki. Az akut TTP-s betegek teli szimbólummal, míg a remissziós beteget üres szimbólumokkal lettek jelölve. (A ábra, $r=0,392$; $p=0,015$; B ábra $r=0,367$; $p=0,024$).

4.2. Endotélsejt-aktiváció TTP-ben

4.2.1. Az endothelin-1 projekt részletes betegleírása

Az endotélsejt-aktiváció vizsgálatába bevont betegek beválasztási kritériuma az előző vizsgálat beválasztási kritériumával azonos volt (ADAMTS13-deficiencia, trombocitopénia, mikroangiopátiás hemolízis).

Az PMNE-tanulmányhoz képest további betegeket is bevontunk, így összesen 54 TTP-s beteg került a vizsgálatba, akik mellé 57 korban és nemben illesztett egészséges kontrollt választottunk (5. ábra). A betegek medián életkora az első epizódnál 35 év volt, az összes beteget nézve az élethosszra vonatkoztatott epizódok száma átlagosan 1,9 volt. Az akut TTP-s betegek több PEX kezelésben is részesültek az aktuális epizód során, a beavatkozások számának mediánja 10, interkvartilis tartománya: 6-18,5 (n=36) volt. Az anuriás veseelégtelenség kizáró tényező volt a beválogatás során.

A TTP-s betegeinkben a betegség fellángolásakor/kezdetekor 79%-ban voltak jelen neurológiai tünetek (súlyos fejfájás, szédülés, parézis, paresztézia, eszméletvesztés, komatózus állapot), 33%-ban abdominális/emésztőszervrendszeri tünetek (hasi fájdalom, gasztrointesztinális vérzés, hasmenés, hányinger, hányás), továbbá 18%-ban enyhe vesekárosodás is megjelent (proteinuria, hematuria, vesefunkció-csökkenés), a betegek 13%-nál a laboreltéréseken (trombocitopénia, hemolízis) kívül más tünet nem volt.

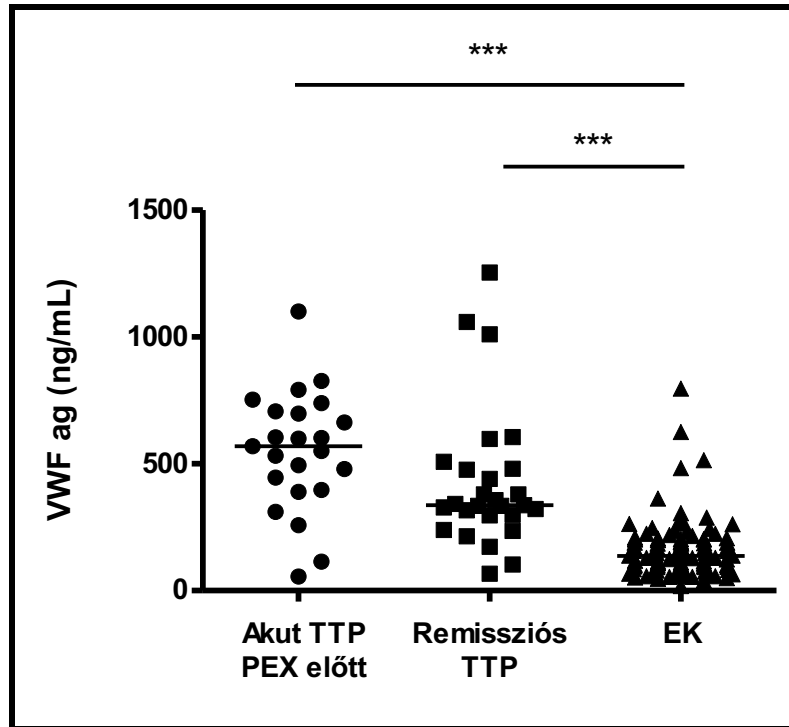
Egyik betegnek sem volt kimutatható anti-H-faktor-autoantitest a mintájában. Összesen két remissziós beteg anamézisében szerepelt idiopátiás trombocitopénia és egy betegnél volt frissen diagnosztizálva SLE.

4.2.2. A VWF-antigén megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegeken

Az analízis során elsőként a VWF antigén szintjét mértük meg a betegeken, mivel korábbi kutatások során ezt a markert használták az endotélsejt-aktiváltság megítélésére, továbbá a VWF fontos patogenetikai tényező TTP-ben, az ADAMTS13-deficiencia kapcsán.

A TTP akut, PEX előtti, vagy remissziós szakban levett minták VWF antigén szintjeit hasonlítottuk össze az egészséges kontrollok VWF antigén szintjeivel. A TTP-s betegek

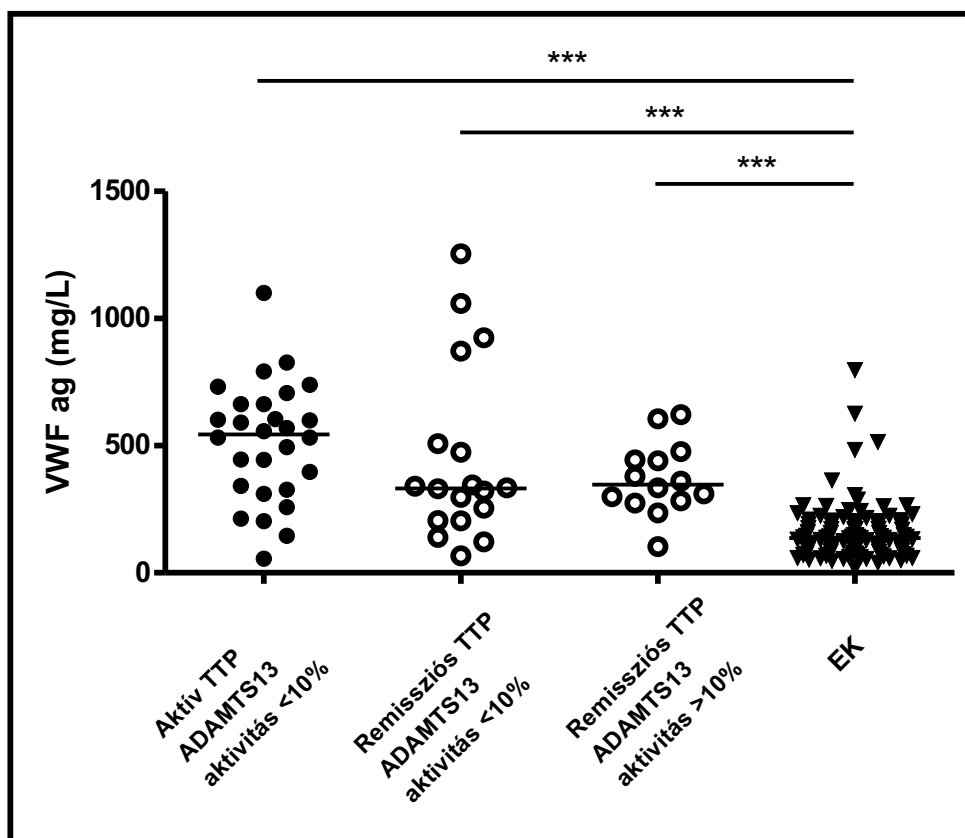
mindkét alcsoportjában emelkedett VWF antigén szintek mutatkoztak az egészséges kontrollcsoporthoz képest (13. ábra). Az egészséges kontrollokhoz képest a TTP-s betegek mintái mintegy 3-4-szer magasabb medián-értékeket mutattak.



13. ábra. A különböző betegsége szakban levő TTP-s betegekben és egészséges kontrollokban mért VWF antigén szintek megoszlása. Szignifikáns különbség volt kimutatható a TTP-s betegek és az egészséges csoport között. A különböző csoportok összehasonlítására Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk. Az ábrán látható jelzések (*) a Mann-Whitney-teszt eredményét (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) a horizontális vonalak a csoportok mediánjait mutatják. (EK: egészséges kontroll)

4.2.3. A VWF-antigén betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben

A továbbiakban szeretnénk volna vizsgálni, hogy a betegek mintáiban mért magasabb VWF antigén szintek, hogyan oszlanak meg és milyen összefüggésben vannak a betegséggel, ha a betegségaktivitás (THCY < 150 G/L, THCY > 150 G/L) és ADAMTS13-deficiencia (ADAMTS13-aktivitás $< 10\%$, $> 10\%$) szerint kialakított betegcsoportokat alakítunk ki és azokat hasonlítjuk össze egymással (14. ábra).



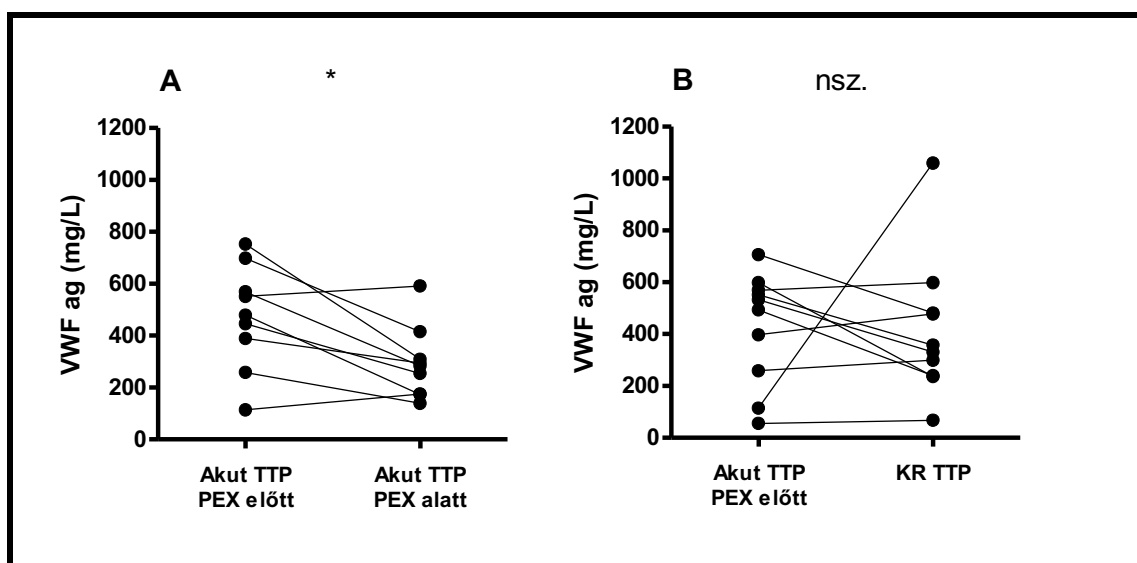
14. ábra. VWF antigén szintek megoszlása a betegségaktivitás és ADAMTS13-deficiencia függvényében, TTP-s betegekben. Emelkedett VWF antigén szintek voltak megfigyelhetők TTP-s betegekben, melyet nem befolyásolt a betegségaktivitás (teli kör szimbólum - $THCY < 150$ G/L, üres kör szimbólum - $THCY > 150$ G/L) vagy az ADAMTS13-deficiencia jelenléte (ADAMTS13-aktivitás szerinti megoszlás, lásd az x tengelyen). Az ábrán látható jelzések (*) a Mann-Whitney-teszt eredményét jelzik az egészséges kontroll csoporthoz képest. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) A horizontális vonalak a csoportok mediánját mutatják. (EK: egészséges kontroll)

Ahogy az a 14. ábrán látható, azokban a csoportokban voltak a legmagasabbak VWF antigén szintek, ahol aktív TTP ($THCY < 150$ G/L) és ADAMTS13-deficiencia (aktivitás $< 10\%$) egyszerre volt jelen. A remissziós csoportokban ($THCY > 150$ G/L) a VWF antigén szintek szignifikánsan magasabbak voltak az egészséges kontrollokhoz képest. A csoporton belül az ADAMTS13-deficiencia jelenléte vagy hiánya viszont nem mutatott összefüggést a VWF antigén szintjével ($p = 0,86$, Mann-Whitney-teszt).

4.2.4. A VWF antigén szintek változása terápia hatására

Néhány betegnél rendelkezésünkre állt több szakból származó minta, ezért ezeknél a betegeknél alkalmunk nyílt a VWF antigén szintek változásának követésére. Két csoportban tudtuk vizsgálni a VWF antigén változását. Az első csoportba (15. ábra A)

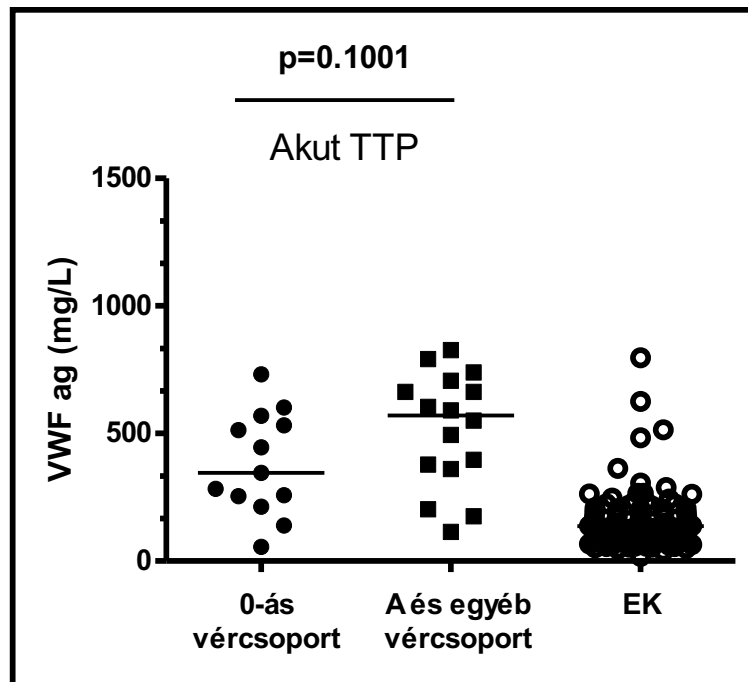
azok a betegek tartoztak, akiknek az első mintája az első PEX előtt, a másik mintája az aktív terápiás időszakban, a sorozatos PEX-ek közben lett levéve (n=9). Ebben a csoportban a PEX hatására VWF-antigén csökkenése volt látható. A terápia alatt levett mintában a VWF-antigén-szintek mediánja 40%-al csökkent a PEX előtt levett mintákhoz képest, mely szignifikánsnak mutatkozott ($p=0,0195$, Wilcoxon-teszt). A második csoportban (15. ábra B) az első minta szintén az első PEX előtt lett levéve, a másik minta pedig az utolsó PEX-et követően legalább 30 nappal, a TTP remissziós szakjában (n=10). Ebben a csoportban is látható volt a csökkenés, de nem volt szignifikáns mértékű ($p=0,492$, Wilcoxon-teszt). Az utóbbi csoportban látható, hogy az egyik beteg (HUN430) mintájában kimagasló VWF-antigén növekedése volt remisszióban, ezért ezt a beteget újramértük, de akkor is hasonló magas értéket kaptunk. Az okot, hogy pontosan mi okozhatta a VWF-antigén növekedését, nem sikerült az anamnesztikus és laboreredmények alapján megállapítani.



15. ábra. A, B. A VWF antigén szintjeinek vizsgálata követései betegmintákban. Az ábrán látható jelzések (*, nsz: nem szignifikáns) a Wilcoxon-teszt eredményét mutatják ($p^* < 0,05$). (KR: komplett remisszió)

Jenkins és munkatársai (115) megfigyelése óta ismert, hogy a 0-s vércsoportú egyének plazma VWF-szintje átlagosan alacsonyabb a többi AB0-vércsoportéhoz képest. Betegeink 25%-nak volt 0-s, 46%-nak A-s, a maradék betegeknek pedig más vércsoportja. A 0-s vércsoportú betegekben alacsonyabbak voltak a VWF antigén szintek a többi vércsoportéhoz képest, azonban ez az eltérés nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,1001$; 16. ábra). Bár eltérés mutatkozott a vércsoportok között, a

TTP-s betegek VWF-szintje vércsoportoktól függetlenül magasabb volt az egészséges kontrollokénál.

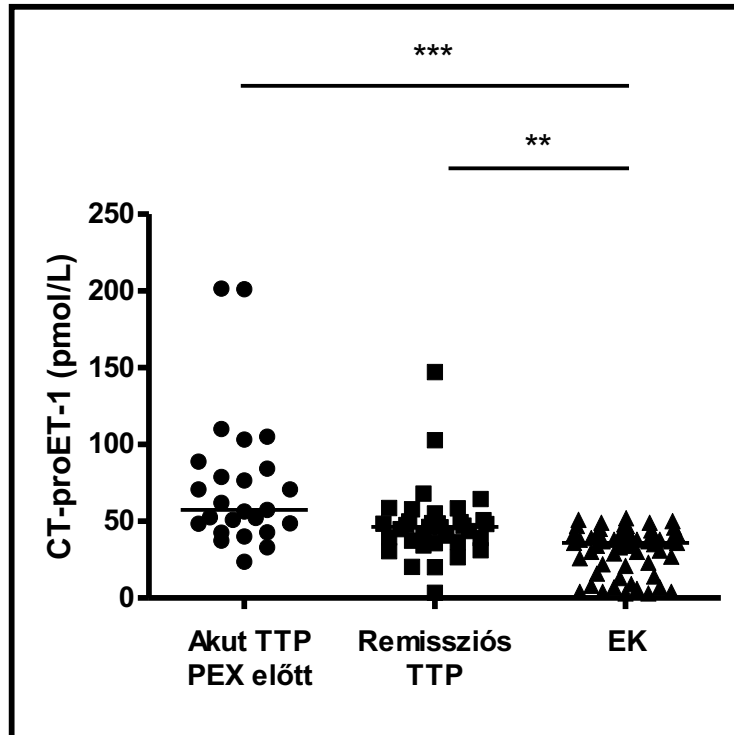


16. ábra. A VWF antigén szint megoszlása a vércsoportok szeirnt. A p-érték Mann-Whitney-teszt eredményét jelzi. A horizontális vonal a csoport mediánját mutatja. (EK: egészséges kontroll)

4.2.5. A CT-proET-1 megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegekben

A TTP-ben jellemző a trombocitaaktiváció és -konszupció, a trombusformálódás következtében, így a betegek plazmájában mért VWF antigén szinteket befolyásolhatta az aktiválódott, vagy éppen széteső trombocitákból származó VWF. A nem kielégítő specificitás miatt választottuk vizsgálatunk további tárgyaként a CT-proET-1-t, mely az endothelin-1 nevezetű vasoaktív molekula stabil prekursor fragmense.

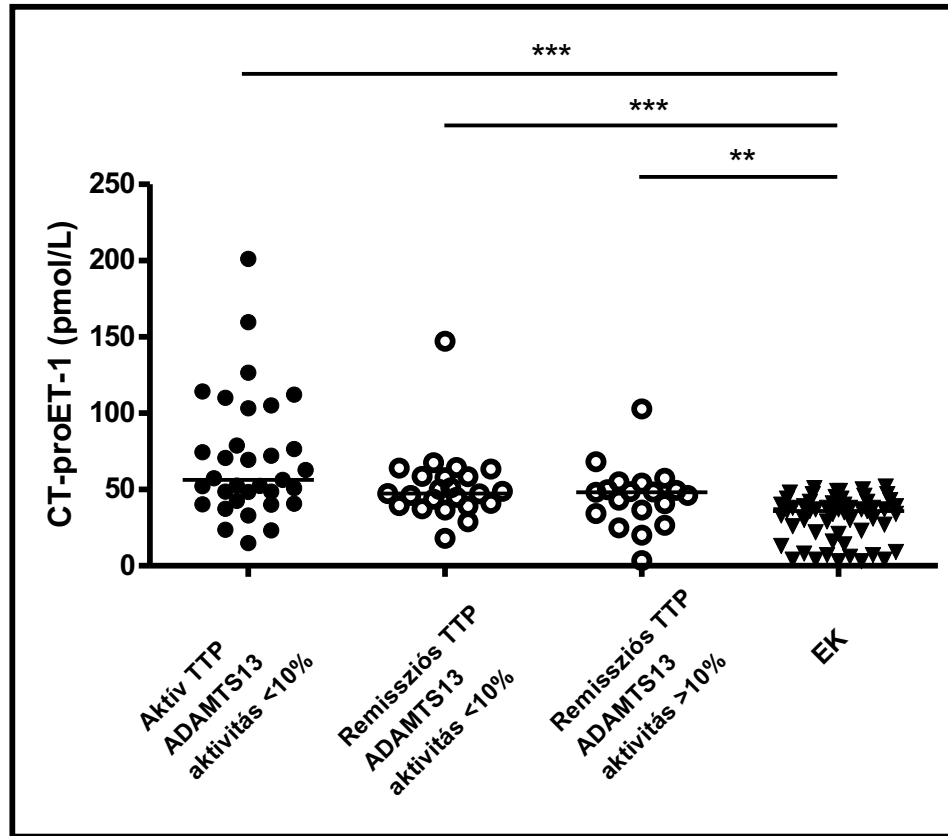
Követve a VWF antigén analízisénel bemutatott szakok (akut, első PEX előtti és remisszió) szerint kialakított csoportokat, a CT-proET-1-nél is először megvizsgáltuk, hogy van-e eltérés a különböző szakokban levett TTP-s minták, valamint az egészséges kontrollok mintái között. Az akut betegcsoportban jellemző volt az endotélsejt-aktiváció és mintegy 37%-al magasabb volt a csoport medián értéke az egészséges kontroll csoporthoz képest (17. ábra, $p < 0,0001$, Mann-Whitney-teszt).



17. ábra. A különböző betegsége szakban levő TTP-s betegekben és egészséges kontrollokban mért CT-proET-1-szintek megoszlása. Szignifikáns különbség volt kimutatható a TTP-s betegek és az egészséges csoportok között. A különböző csoportok összehasonlítására Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk. Az ábrán látható jelzések (*) a Mann-Whitney-teszt eredményét (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$), a horizontális vonalak a csoportok mediánját mutatják. (EK: egészséges kontroll)

4.2.6. A CT-proET-1 betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben

Vizsgáltuk, hogy a betegségaktivitás (THCY < 150 G/L, > 150 G/L) és az ADAMTS13-deficiencia ($< 10\%$, $> 10\%$) szerint kialakított csoportokban milyen a megoszlást mutat a CT-proET-1 és milyen különbségek vannak az így kialakított csoportok között a CT-proET-1-gyet illetően. A legmagasabb CT-proET-1-szinteket ott tapasztaltuk, ahol aktív betegség (THCY < 150 G/L) és ADAMTS13-deficiencia ($< 10\%$) együtt volt megfigyelhető (18. ábra). A remissziós TTP-s betegek mintáiban a CT-proET-1-szintje szignifikánsan magasabb volt az egészséges kontroll csoport CT-proET-1 szintjeihez képest.



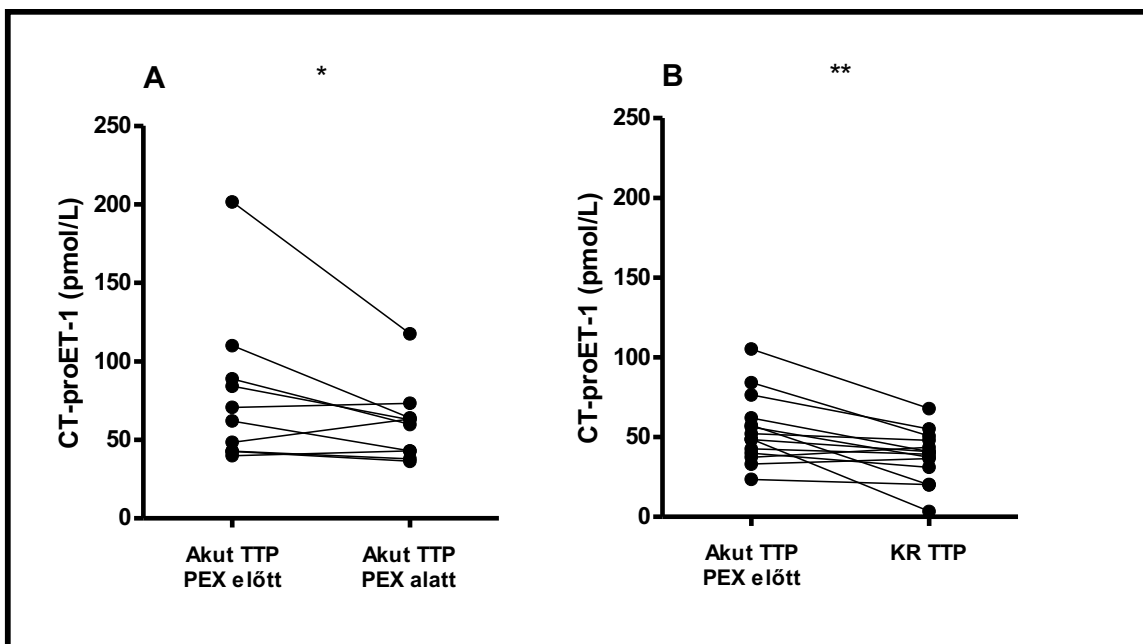
18. ábra. A CT-proET-1-szintek megoszlása betegségaktivitás és ADAMTS13-deficiencia alapján TTP-s betegekben. Emelkedett CT-proET-1-szintek voltak megfigyelhetők TTP-s betegekben, amit nem befolyásolt a betegségaktivitás (teli kör szimbólum $THCY < 150$ G/L, üres kör szimbólum $THCY > 150$ G/L) vagy az ADAMTS13-deficiencia jelenléte (ADAMTS13-aktivitás szerinti megoszlás, lásd az x tengelyen). Az ábrán látható jelzések (*) a Mann-Whitney-teszt eredményét jelzik az egészséges kontroll csoporthoz képest. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) A horizontális vonalak a csoportok mediánját mutatják. (EK: egészséges kontroll)

A remissziós betegekben belül azoknak, akiknek ADAMTS13-deficienciájuk volt, hasonló mértékű CT-proET-1-szintjeik voltak, mint azoknak, akik normál ADAMTS13-aktivitással rendelkeztek ($p = 0,349$, Mann-Whitney-teszt), tehát ebben a csoportban az ADAMTS13-deficiencia megléte vagy hiánya nem befolyásolta az endotélsejt-aktivitást. Hasonlóan a remissziós betegek alcsoportjai közötti megfigyeléshez, az akut és remissziós betegek között is független tényezőnek bizonyult az ADAMTS13-aktivitás, mivel az ADAMTS13-deficienciával rendelkező remissziós betegek mintáiban ugyanúgy alacsonyabb CT-proET-1 szintek voltak jelen az aktív TTP-s betegekhez képest ($THCY < 150$ G/L), mint a normál ADAMTS13-aktivitással rendelkező remissziós ($THCY > 150$ G/L) betegekben. Az ADAMTS13-deficiens remissziós TTP-s betegek csökkent CT-proET-1 szintjeivel szemben ($p = 0,078$, Mann-Whitney-teszt), a

normál ADAMTS13-aktivitású remissziós betegek CT-proET-1 szintjének csökkenése szignifikáns mértékű volt az aktív betegekhez képest ($p=0,017$, Mann-Whitney-teszt).

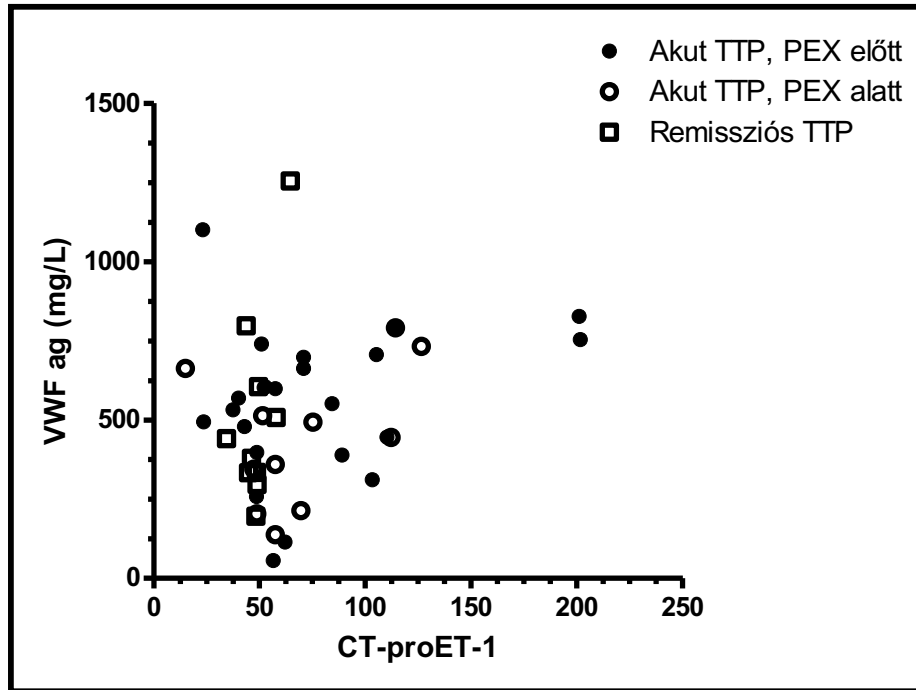
4.2.7. A CT-proET-1-szintek változása terápia hatására

A mintapárral rendelkező betegekben megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a CT-proET-1-szintjük a terápia közvetlen hatására és a remissziót elérve (19. ábra A, B). Két csoportot alakítottunk ki a VWF antigén követéses vizsgálatánál leírt csoportoknak megfelelően, mind a két csoportban szignifikáns mértékű volt a CT-proET-1-szint csökkenése. A PEX közben levett betegek mintáiban a CT-proET-1- szintek mediánja 8%-al (19. ábra, A, $p=0,048$, Wilcoxon-teszt), míg a remisszióban levett minták mediánja 20%-al (19. ábra, B, $p=0,0031$, Wilcoxon-teszt) csökkent az első, PEX előtt levett minták CT-proET-1-szintek mediánjaihoz képest.



19. ábra A, B. A CT-proET-1-szintjeinek vizsgálata követéses betegmintákban. Az ábrán látható jelzés (*) a Wilcoxon-teszt eredményét mutatja ($p^*<0,05$, $p^{**}<0,01$). (KR: kompelett remisszió)

Tekintettel arra, hogy a VWF antigén is nagyrészt endotélsejtekből szabadul fel, összehasonlítottuk az akut, első PEX előtt ($r=0,28$; $p=0,211$, Spearman-korreláció) és a PEX alatt ($r=0,409$; $p=0,211$, Spearman-korreláció) levett mintákban lévő VWF antigén szinteket az endotélsejtre specifikusabb markerral, a CT-proET-1-gyel, hogy látható-e közöttük jelentős összefüggés, azonban egyik fázisban levett mintában sem volt szignifikáns korreláció (20. ábra).



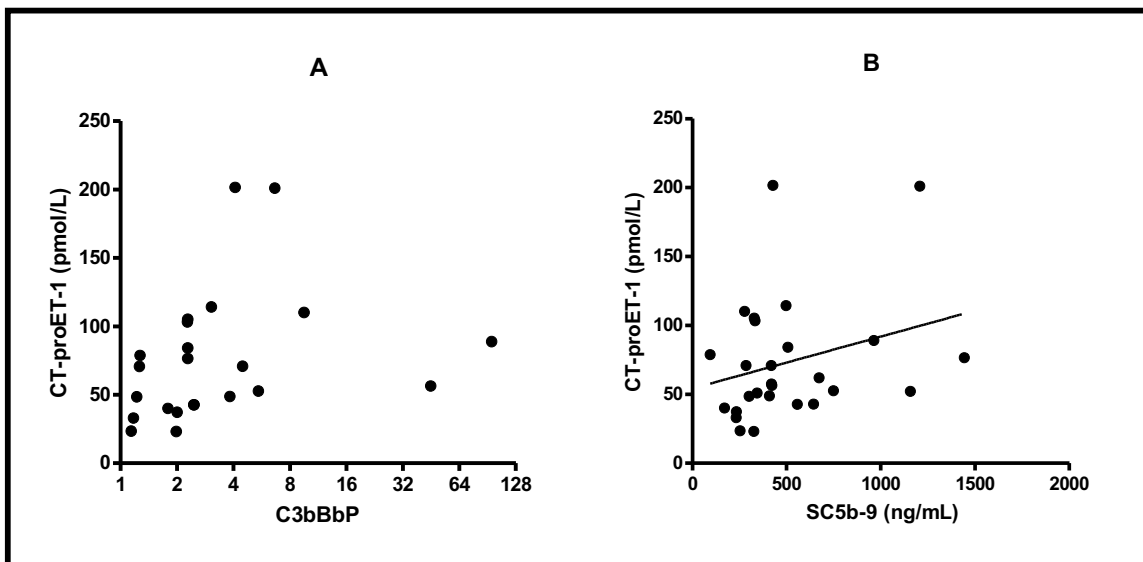
20. ábra. Az endotélsejt-eredetű markerek közötti összefüggés. A VWF ag és CT-proET-1 között egyik betegcsoportban sem volt összefüggés. (akut, PEX előtti: $r=0,28$; $p=0,21$; akut, PEX alatti: $r=0,41$; $p=0,21$; remisszió: $r=0,25$; $p=0,49$, Spearman-korreláció)

Az akut, PEX előtt levett mintákban a CT-proET-1 nem mutatott összefüggést a betegségaktivitási markerekkel (hemoglobin: $r=-0,15$; $p=0,45$; trombocita: $r=0,11$; $p=0,62$; LDH: $r=0,018$; $p=0,93$; Spearman-korreláció). Bár egy enyhe pozitív összefüggés jelen volt a CT-proET-1 és a betegek szérum-kreatininértéke között akut betegekben ($r=0,496$; $p=0,011$, Spearman-korreláció), ez az összefüggés remissziós TTP-ben nem volt megfigyelhető ($r=0,25$; $p=0,14$; Spearman-korreláció). 12 akut TTP-s betegünknel korábban már volt TTP-s epizód, ezért megvizsgáltuk, hogy befolyásolhatja-e az endotélsejt-markerek szintjét az, hogy első vagy ismételt epizódban lett levéve a minta, de nem volt különbség az endotélsejt-markerek szintjei között aszerint, ha a minta első vagy többedik epizódból származott ($p=0,54$, Man-Whitney-teszt).

4.2.8. A komplement aktivációs markerek és a CT-proET-1 közötti kapcsolat TTP-ben

Mivel ismert a komplementrendszer TTP-ben játszott szerepe és az endotélsejtre kifejtett káros hatása, ezért megvizsgáltuk, hogy a CT-proET-1 és a komplement alternatív út aktivációs markere (C3bBbP) és a terminális út aktivációs markere (SCb5-

9) között milyen összefüggések vannak. A komplementfaktorokat és aktivációs markereket egy korábbi tanulmány során mértük meg betegeinkben. A mérési eredményeket a 4. táblázat tartalmazza részletesen. Azoknál az akut TTP-s, első PEX előtt levett mintákban, ahol C3bBbP-meghatározás is történt (n=23), szignifikáns pozitív összefüggés mutatkozott a CT-proET-1 szintekkel (21. ábra A; $r=0,528$; $p=0,013$, Spearman-korreláció). A terminális út aktivációs markerével (21. ábra B; n=27; $r=0,306$; $p=0,135$, Spearman-korreláció) pozitív, nem szignifikáns összefüggést mutatott a CT-proET-1 akut TTP-s betegeknél. A többi komplementkomponens sem mutatott összefüggést a CT-proET-1-gyel az akut, PEX előtti mintákban (C3: $r=0,18$; $p=0,21$, C3a: $r=0,36$; $p=0,31$, Spearman-korreláció).



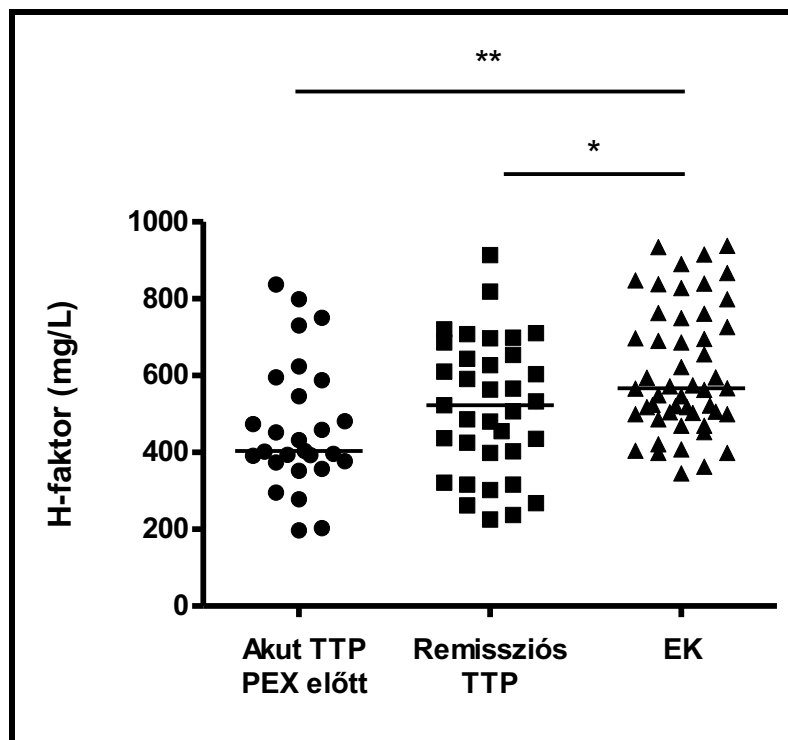
21. ábra A, B. A CT-proET-1 összefüggése a komplement aktivációs markereivel akut TTP-s betegeknél. Az akut, PEX-terápia megkezdése előtt levett mintákban mért CT-pro ET-1-szinteket hasonlítottuk össze a C3bBbP és SC5b-9 komplementaktivációs markerekkel 21 ill. 25 betegen. A p-értéket nem-paraméteres Spearman-korrelációval számoltuk ki. (A ábra, az x tengely mutatja az alternatív út aktivációs markerét, a C3 konvertált log2-es skálán; $r=0,528$; $p=0,013$; B ábra, az x tengelyen látható a terminális út aktivációs markere, az SC5b-9; $r=0,306$; $p=0,135$).

4.3. A Komplement H-faktor szintje TTP-ben

4.3.1. A H-faktor-szintek megoszlása a különböző szakban levő TTP-s betegeknél

Korábbi cikkünkhöz képest további TTP-s betegeknél is megmértük a H-faktor-szinteket, mivel tovább szeretnénk vizsgálni az alternatív út szerepét TTP-ben. A H-faktor a komplementrendszer alternatív útjának egy fontos regulátora, ezen kívül a VWF-ral is fontos funkcionális kapcsolatban áll, így szeretnénk vizsgálni, hogy

hogyan változik a H-faktor a különböző fázisban levett betegmintákban és milyen kapcsolatban áll az endotélsejt-aktivációval. A különböző szakok szerinti csoportosításban (akut PEX előtti, remisszió, egészséges kontroll) (22. ábra) látható volt, hogy a TTP-s betegekben a H-faktor-szintek szignifikáns mértékben alacsonyabbak voltak az egészséges kontroll csoport H-faktor szintjeihez képest. A legalacsonyabb H-faktor-szintek az akut TTP-s betegekben mutatkoztak (akut, PEX előtti vs. remisszió $p=0,11$, Mann-Whitney-teszt).

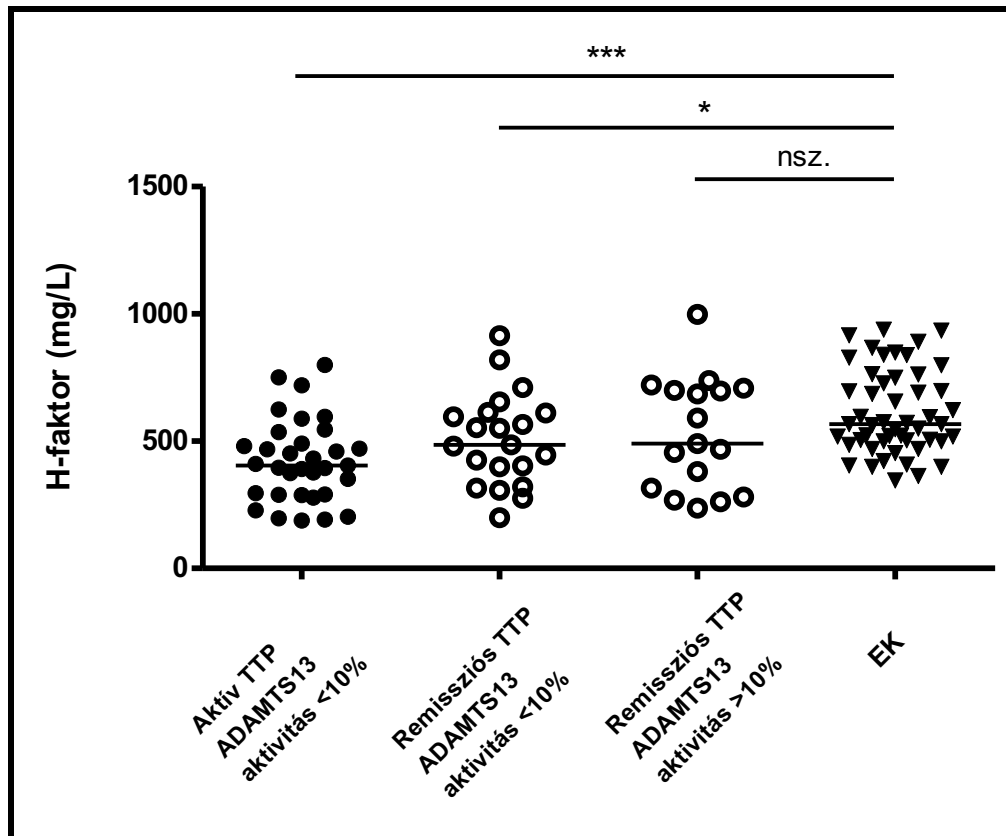


22. ábra. A különböző betegségi szakokban levő TTP-s betegekben és egészséges kontrollokban mért H-faktor-szintek. A TTP-s betegek H-faktor szintjei szignifikánsan alacsonyabbak voltak az egészséges kontrollokhoz képest. A különböző csoportok összehasonlítására Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk. Az ábrán látható jelzések (*) a Mann-Whitney-teszt eredményét ($*p<0,05$; $**p<0,01$), a horizontális vonalak a csoportok mediánját mutatják. (EK: egészséges kontroll)

4.3.2. A H-faktor betegségaktivitás szerinti megoszlása TTP-ben

A betegségaktivitás (THCY <150 G/L, THCY >150 G/L) és ADAMTS13-deficiencia ($<10\%$, $>10\%$) szerinti csoportosításnál azokban volt a legalacsonyabb a H-faktor antigén szint, akikben az aktív betegség (THCY <150 G/L) mellett ADAMTS13-deficiencia volt jelen (23. ábra). A csoportok között önmagában a trombocitopénia mint

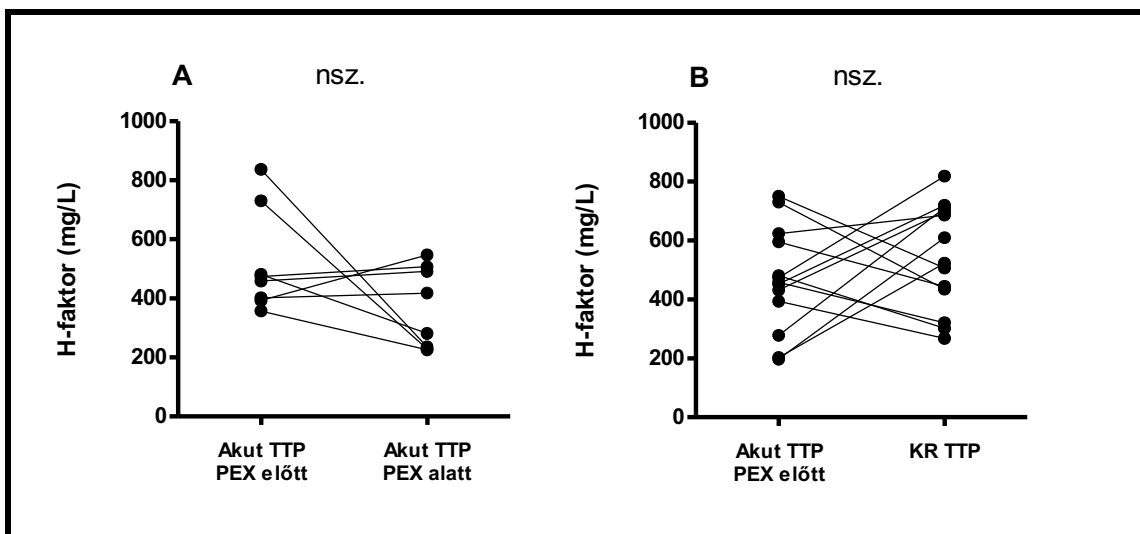
aktív betegséget jelző marker vagy az ADAMTS13-aktivitás nem befolyásolta a H-faktor-szinteket. Külön megemlítendő, hogy azokban a remissziós (THCY >150 G/L) betegekben volt szignifikánsan alacsonyabb H-faktor szint az egészséges kontrollhoz képest, akikben a remisszióban ADAMTS13-deficiencia volt jelen.



23. ábra. H-faktor szintek megoszlása betegség aktivitás és ADAMTS13-deficiencia alapján, TTP-s betegekben. Csökkent H-faktor szintek voltak megfigyelhetők TTP-s betegekben, melyet nem befolyásolt a betegség aktivitása (teli kör szimbólum THCY<150 G/L, üres kör szimbólum THCY>150 G/L) vagy az ADAMTS13-deficiencia jelenléte (ADAMTS13 aktivitás szerinti megoszlás, lásd az x tengelyen). Az ábrán látható jelzések (*) a Mann-Whitney-teszt eredményét jelzik az egészséges kontroll csoporthoz képest. (nsz: nem szignifikáns; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$) A horizontális vonalak a csoportok medián értékét mutatják.

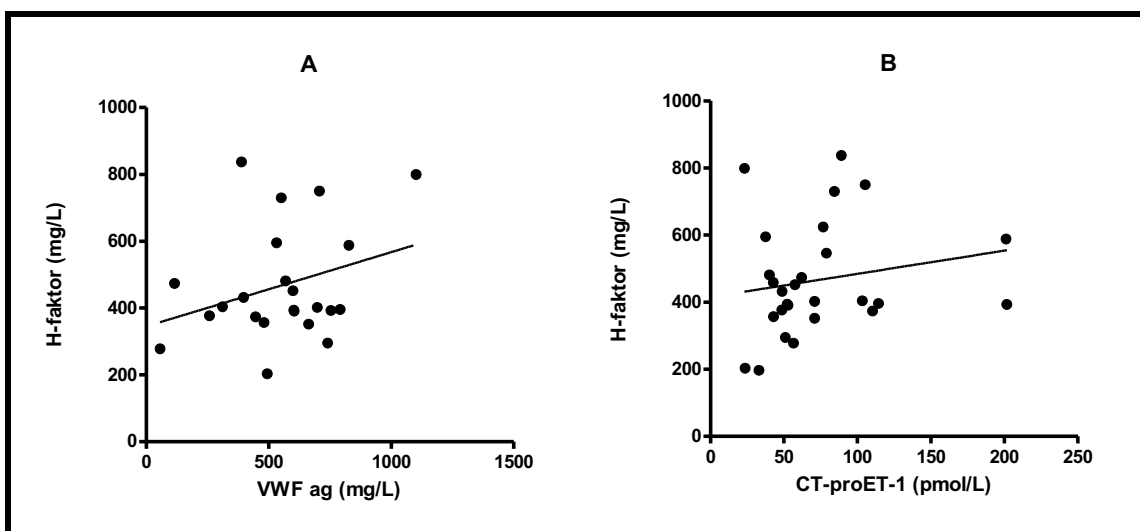
4.3.3. A H-faktor-szintek változása terápia hatására

A H-faktor-szinteket követéses betegmintákban is megmértük, sem a PEX alatt levett, sem a remissziós betegmintákban nem volt egyetelmű változás az akut, első PEX előtt levett mintákhoz képest; a minták felében csökkenés, a másik felében pedig növekedés volt megfigyelhető (24. ábra A, B).



24. ábra. A, B. A H-faktor szintjének vizsgálata követéses betegmintákban. Az ábrán látható jelzés (nsz.: nem szignifikáns) a Wilcoxon-teszt eredményét mutatja. (KR,: koepelt remisszió)

Más, TTP-s betegeinkben mért komplementfaktor vagy aktivációs marker (C3: $r=0,28$, $p=0,17$; C3a: $r=0,23$, $p=0,29$; C3bBbP: $r=0,08$, $p=0,71$; SC5b-9: $r=0,23$, $p=0,27$, Spearman-korreláció) és H-faktor értékek között nem találtunk összefüggést az akut, PEX előtt levett betegmintákban. Továbbá a H-faktor-szintek és az endotélsejt-aktivációt jelző markerek szintjei (VWF antigén- és CT-proET-1-szintek) között sem volt összefüggés (25. ábra A, B).



25. ábra. A, B. H-faktor összefüggése az endotélsejt eredetű-aktivációs markerekkel. Akut, plazmacsere előtt levett mintákban sem a VWF antigén (A, $r=0,16$; $p=0,44$); sem a CTproET-1 (B, $r=0,22$; $p=0,25$) szintekkel nem mutatott összefüggést a H-faktor. A p-értékeket nem-paraméteres Spearman-korrelációval számoltuk ki.

5. Megbeszélés:

Munkánk során a TTP patogenezisének pontosabb megismerésével, a jellemző folyamatok feltárásával foglalkoztunk. A TTP elkülönítése a többi TMA-formától sokszor kihívásokkal teli. Az ADAMTS13-deficiencia TTP-re jellemző eltérés, azonban önmagában nem elég a betegség manifesztálódásához. A TTP kialakulását közvetlen megelőzhetik enyhébb infekciók, terhesség, mely folyamatok során az immunrendszer aktiválódik. Így részben emiatt is vizsgálta kutatócsoportunk az immunrendszer aspektusából a TTP patogenezisét. Munkacsoportunk először a komplementrendszer aktivációját vizsgálta, majd később saját doktori témámként a neutrofil granulocita aktiváció tanulmányozásába kapcsolódtam be. Korábbi tanulmányok az endotélsejt-sérülést a mikroangiopátiák patogenezisének központi elemének tekintették. Mindazonáltal jól definiált, nagyobb beteganyagban, specifikus endotélsejt-markert korábban nem vizsgáltak, így fordult figyelmünk az endothelin-1 vizsgálatának irányába.

Követve az 'Eredmények' szakasz tagolását, a diszkussziót is két alfejezetre bontva taglalom.

5.1. Neutrofil granulocita aktiváció TTP-ben

Kutatásunk során homogén, ADAMTS13-deficiens, ADAMTS13-inhibitor-pozitív TTP-s betegekben vizsgáltuk a patogenezisben fontos szerepet betöltő kiváltó tényezőket. Vizsgálataink során több új elemet fedeztünk föl a TTP patogenezisében. Jelentősen emelkedett PMNE-értékeket mértünk az akut TTP-s betegek plazmájában, a remissziós TTP-s és egészséges kontroll csoport plazmájához képest. Az emelkedett PMNE-értékek összefüggést mutattak a TTP klinikai aktivitását jelző markerekkel, a hemoglobinnal és a trombocitaszámmal is, csakúgy, mint a funkcionális ADAMTS13-inhibitorok mennyiségével. A másik jelentősebb megfigyelésünk, hogy a neutrofil granulocita aktiváció párhuzamosan volt jelen a komplementaktivációval, mivel a neutrofil granulocita aktivációt jelző PMNE a komplementaktivációt jelző C3a-val és Bb-vel pozitív korrelációt mutatott.

A neutrofil granulociták jelentőségét kutatásunk előtt már több alkalommal vizsgálták TMA-ban. Egy korábbi vizsgálat alkalmával azt figyelték meg, hogy az akut shub során

tapasztalt magas neutrofil granulocita szám rosszabb prognózissal függ össze *E.coli* aszociált HUS-ban (116). Ismét egy HUS-sal foglalkozó tanulmány során emelkedett granulocita-eredetű markereket mértek (MPO, elasztáz, Il-8), melyek összefüggést mutattak egy endotélsejt-aktivációs markerral, a szolubilis trombomodulinnal (112), mely utalt az aktivált neutrofil granulocita endotéliumra kifejtett káros hatására. Fitzpatrick és munkatársai emelkedett elasztáz komplexeket mutattak ki hasmenés-negatív HUS-ban, amiáltal kulcsfontosságú tényezőként tekintettek a neutrofil granulocita aktivációra a betegség patogenezisében (87).

Fuchs és munkatársai más megközelítéssel, a mi vizsgálatainkkal egyidőben igazolta a neutrofil granulocita aktiváció fontosságát és jelenlétét TMA-ban. Megfigyelték, hogy az emelkedett NET-szint és ADAMTS13-deficiencia együtt jellemző az akut TTP-s betegekre (117). A tanulmány során akut, PEX közbeni és remissziós TTP-s betegek mintáiból mértek plazma DNS-t, LDH-t (laktátdehidrogenáz) MPO-t (mieloperoxidáz) és egy neutrofil granulocitára jellemző fehérjét, az S100A8/A9-et. Szabad DNS-hiszton komplexeket mértek akut TMA során, és ezek magas szintje korrelált a betegség aktivitásával. A beteg állapotának javulásával és az idő múlásával a plazmában mért szabad DNS-szintek csökkenése negatív korrelációt mutatott a trombocitaszámmal és az ADAMTS13 aktivitásával. A vizsgálatban mért DNS-hiszton komplexeket NET eredetűnek tartották (a párhuzamosan emelkedett MPO- és S100-szintek miatt), mely aktiváció során szabadul fel a neutrofil granulocitákból. Kutatásunk a NET-en keresztül kapcsolódik Fuchs és munkatársai megfigyeléséhez, mivel az általunk vizsgált neutrofil elasztáz az MPO-val együtt a NET fontos alkotóeleme (118). A neutrofil elasztáz NET kialakulásban betöltött szerepét igazolja továbbá egy PMNE knock-out egereket vizsgáló tanulmány, mely során egy *Klebsiella pneumoniae* által kiváltott pneumoniamodellben azt figyelték meg, hogy nem képesek a neutrofil granulociták NET-et termelni PMNE hiányában (119). A fent említett tanulmányok tehát mind rámutatnak a neutrofil granulociták jelentőségére a TMA-k patogenezisében.

Az eredményeink alapján elmondható, hogy a neutrofil granulocita aktiváció jellemző a hematológiailag aktív TTP-re. A 150 G/L-nél nagyobb trombocitaszámmal és deficiens ADAMTS13-aktivitással rendelkező betegeknek átlagban hasonló PMNE-szintjük volt a plazmában, mint a normál ADAMTS13-aktivitással rendelkező, szintén remisszióban

lévő betegeknek, vagy mint az egészséges kontrolloknak (7. ábra). A PMNE neutrofil granulocita eredetét egy másik speciális markerral az MPO-val szerettük volna megerősíteni, akut TTP-ben. Az MPO pozitív összefüggést mutatott a PMNE-szintekkel, ami alapján elmondható, hogy az emelkedett PMNE-szintek neutrofil granulocita eredetűek (9. ábra). A TTP definitív kezelése a PEX, mely során a plazma egy részét eltávolítják és helyében FFP-t kap a beteg. Néhány betegnél lehetőségünk volt a PMNE-szintek monitorizálására a kezelés során és azt követően is. A követéses minták egy részében a PEX előtt és a PEX közben (sokadik beavatkozás előtt levett minta) levett mitákból mért PMNE-szinteket tudtuk összehasonlítani, ezen betegek többségénél, a terápia hatására nagyfokú csökkenés következett be a PMNE-szintekben. A követéses minták másik részében a második minta a PEX leállítását követően, hematológiai remisszióban lett levéve. A hematológiai remissziót elérő betegek PMNE-szintje szignifikánsan csökkent az első, terápiás PEX sorozat előtt levett mintában meghatározott PMNE-szintjeihez képest (10. ábra). A terápia hatására tehát a neutrofil granulocita aktiváció csökkent, mely csökkenés a remisszió állapotát elérő betegeknél jelentősebb mértékűnek bizonyult. Az a jelenség, hogy a betegség javulásával párhuzamosan csökkent a neutrofil granulocita aktiváció, rámutat a neutrofil granulociták fontosságára a TTP patogenezisében. A neutrofil granulociták potenciális káros hatását tovább erősíti a PMNE szintek és az ADAMTS13 inhibitorok közötti pozitív (8. ábra), valamint a betegség aktivitását jelző (trombocita, hemoglobin) paraméterek közötti negatív szignifikáns korreláció (11. ábra). A neutrofil granulocita aktiváció potenciális sejtkárosító hatása révén jól illeszkedik, ahhoz a felvázolt patogenetikai modellhez, mely szerint az ADAMTS13-deficiencia mellett szükség van egyéb trigger tényezőre a TTP kialakulásában, ugyanis a TTP megjelenését közvetlen megelőzhetik különböző virális, bakteriális infekciók (felsőlégúti, gastrointesztinális) vagy a szülés körüli időszak (120, 121). Az említett TTP-t megelőző kórállapotok neutrofil granulocita aktivációval járnak, így az aktiváció hatására termelődő, különböző szekrétaikán keresztül, mint a ROS, proteolitikus enzimek vagy a NET, olyan miliót hoznak létre, mely egy genetikailag (ADAMTS13 mutációja) vagy immunológiailag (gátló ADAMTS13 elleni antitest) arra fogékony személyben, a kiserekben felszaporodó UL-VWF miatt manifeszt TTP-hez vezethet. Az aktivált neutrofil granulocitákból származó NET-nek ismert a saját szervezetre kifejtett

potenciálisan káros hatása is. Leírták, hogy szerepe lehet trombus kialakulásában, és citotoxikus válasz kiváltásában (122-124). Az aktivált neutrofil granulocitáknak több enzime is rendelkezik potenciálisan protrombotikus hatással. A ROS-ok protrombotikus hatásukat úgy érik el, hogy képesek blokkolni az ADAMTS13 enzimátikus funkcióját, ami így képtelen lesz az UL-VWF-t lebontani (125). Ugyanakkor Raife és munkatársai megfigyelése szerint más neutrofil granulocita eredetű enzimek képesek a VWF proteolízisét elősegíteni (126). Raife és munkatársai négy enzimet vizsgáltak, ezek között a neutrofil elasztáz is. A tanulmány során azt feltételezték, hogy a tünetmentes ADAMTS13-deficienciával rendelkező TTP-re hajlamos (vagy már diagnosztizált) egyének plazmájában működik egyfajta kompenzáló, leukocita eredetű VWF-hasítás, mely megakadályozza a manifeszt TTP megjelenését. Ezt az egyensúlyt infekció vagy egyéb külső hatás megbonthatja, melynek eredménye az elégtelen VWF-hasítás következtében létrejövő mikrovaszkuláris trombózis. További tanulmányok eddig nem tisztázták a neutrofil granulocitáknak a VWF proteolízisére gyakorolt pontos hatását, így nehéz megmondani, hogy a TTP során pontosan milyen kölcsönhatás van a neutrofil elasztáz és az UL-VWF között. Jelen kutatási eredményünk így több kérdést vet fel avval kapcsolatban, hogy az elasztáz milyen szerepet tölthet be a VWF proteolízisében akut TTP során. Figyelembe véve Raife munkásságát, felmerülhet akár egy harmadik tényező szerepe, ami blokkolhatja az addig védő hatású, kompenzatórikusan termelődő neutrofil elasztáz, mely így képtelen elhasítani a VWF-t. Ugyanakkor a neutrofil elasztáz egy teljesen független, parallel zajló eseményben is részt vehet. Leíró jellegű kutatásunk miatt ezt az ok-okozati összefüggést nehéz megítélni.

Korábbi tanulmányokból ismert volt a komplementaktiváció jelenléte TTP-ben (127), melyet kutatócsoportunk is megerősített (104). Tati és munkatársai komplementkomponensekkel fedett endotélsejt-eredetű mikropartikulumokat detektáltak TTP-s betegek plazmáiban, továbbá a TTP-s betegek vesebiopsziás mintáiban C3 és SC5b-9 terminális komplexet mutattak ki az endotélsejtek felszínén (128). A komplementrendszer a szervezeten belül sokrétű, oda-vissza ható kapcsolatrendszerrel rendelkezik, akár a koagulációs kaszkád szintjén, akár az immunrendszer más elemei, így a neutrofil granulociták szintjén is. Az aktivált neutrofil granulocita eredetű NET és a komplementrendszer kapcsolatára hívta fel a figyelmet Leffler és munkatársai tanulmánya (129), mely során SLE-s betegekben megfigyelték,

hogy bizonyos komplementkomponensek képesek kötődni a NET-hez. Azt tapasztalták, hogy a klasszikus út C1q és C4d elemei kötődnek a NET DNS és hiszton szerkezetéhez. A csökkent NET-degradációval párhuzamosan komplementaktivációt figyeltek meg, mivel a betegekben C3 és C4 csökkenés volt tapasztalható. Leffler és munkatársai eredményei arra utalnak, hogy a NET elősegíti a komplement aktivációt, úgy, hogy aktív felületet biztosít a komplementkomponenseknek. A NET így hozzájárulhat a komplementaktivációhoz, a C5a képződéséhez, további leukociták kitapadásához és a trombotikus folyamatok elősegítéséhez. Jelen kutatási eredményeink is megerősítik a komplementrendszer és a neutrofil granulocita közötti kapcsolatot TTP-ben. Erre utaló megfigyelésünk volt, hogy pozitív összefüggést találtunk a PMNE és a C3a, Bb komplement aktivációs termékek között. (12. ábra A, B). A két rendszer együttes aktivációja kölcsönösen erősítheti egymást, de az is lehetséges, hogy nincs direkt kapcsolat közöttük. Az aktív neutrofil granulocitákból származó NET aktivációs felületet képezhet a komplement klasszikus és alternatív út komponensek számára, mely a komplementaktivációt tovább erősítheti, vagy akár el is indíthatja. Az alternatív út részvételére utal a PMNE szintjének a Bb aktivációs termékkel mutatott összefüggése. A komplementaktivációs termékek (C3a, C5a) is képesek a neutrofil granulocitákra hatni a rajtuk expresszálandó specifikus receptorokon keresztül, amely hatására fokozódik a neutrofil granulocita vándorlás és aktiváció (130, 131). A neutrofil granulocita aktiváció hatására tehát NET-et bocsát a környezetébe, amely aktív felületet képezve felerősítheti a komplementaktivációt. A NET a komplementaktiváció fokozásán kívül elősegítheti a trombusformálódást. A neutrofil granulociták trombusformálódásban betöltött szerepére mutat rá Montfort és munkatársai tanulmánya (132), mely során emelkedett elasztáz-alfa-1-antitripszin-komplexeken kívül emelkedett cirkuláló nukleoszómákat (NET-komponensek elleni antitestek) detektáltak, mely jelentős mértékben összefüggött a mélyvénás trombózis jelenlétével.

Az immunrendszer veleszületett elemeinek aktivációja (komplementaktiváció, neutrofil granulocita aktiváció) és a közöttük lévő kapcsolat, egymás felerősítése mind elősegíthetik és potenciózzák a trombózis kialakulását és az endotélsejt sérülését, aktivációját (133, 134). Így egy olyan instabil rendszerben, ahol az ADAMTS13-deficiencia jelen van, a neutrofil granulocita aktiváció, komplement aktiváció elégséges triggerként szolgálhat a trombotikus mikorangiopátia manifesztálódásához (26. ábra).

A PMNE- α 1-PI egy könnyen mérhető enzimkomplex, mely eredményeink alapján jól jelzi a TTP aktivitását, így akár a betegség követését, a terápia hatásosságának megítélését lehetővé teszi. A neutrofil granulocita aktivációt alátámasztó eredményeink, Fuchs és munkatársai (117) eredményével párhuzamosan további célzott terápiás lehetőségekre is felhívják a figyelmet. Így az aktivált neutrofil granulocitákból származó NET degradációját elősegítő gyógyszeres beavatkozásra, mely a NET trombólízist és komplementaktivációt elősegítő tulajdonsága miatt a TTP gyorsabb klinikai javulását eredményezhetné.

Hangsúlyozandó, hogy az általunk vizsgált betegszám nem elegendő messzemenő következtetések levonásához, így további, külső megerősítő vizsgálatok szükségesek a neutrofil granulocita aktivációval kapcsolatban TTP-ben.

5.2. Az endotélsejt-aktiváció vizsgálata TTP-ben

További kutatásunk során az endotélsejt-aktiváció kérdésével foglalkoztunk TTP-s betegeinkben. Korábban többször vizsgálták már az endotélsejt-aktivációt TTP-ben, azonban ezekben a tanulmányokban vagy *in vitro* körülmények között vizsgálták az endotélsejt-aktivációt, vagy kevés elemszámú TTP-s betegpopulációban mérték a különböző markerek szintjeit (98). Jelen kutatásunkban tehát az elsők között vizsgáltuk az endotélsejt-aktivációt nagyobb számú TTP-s betegpopulációban specifikus marker mérésével. Az endotélsejt-aktivációt két markerral, a VWF-ral (VWF antigén) és az endothelin-1-gyel (CT-proET-1) vizsgáltuk. Mindkettő marker esetén emelkedett szinteket mértünk TTP-s betegekben, a korban és nemben illesztett egészséges kontroll csoporthoz képest (13., 17. ábra). A legmagasabb markerszintek akut TTP-s betegekben mutatkoztak, de az egészséges kontroll csoporthoz képest, a remissziós TTP-s betegekben is megfigyelhető volt az akut betegek marker szintjét ugyan el nem érő, de emelkedett endotélsejt-markerszint. Annak ellenére, hogy szignifikánsan emelkedett CT-proET-1 szintek voltak láthatók akut TTP-s betegkeben, a CT-proET-1 szintek mértéke változó volt az akut TTP-sek plazmájában és néhány beteg mintájának CT-proET-1 szintjei alacsonyabbak voltak, mint az egészséges kontroll csoport CT-proET-1-ének felső határértékei (17. ábra). Az ADAMTS13-deficiencia kulcstényező a TTP patogenezisében, ezért vizsgáltuk az ADAMTS13-deficiencia és az endotélsejt-aktiváció közötti összefüggést, de sem a VWF antigén, sem az CT-proET-1 tekintetében

nem mutatkozott kapcsolat az ADAMTS13-deficienciával (14., 18. ábra). Ismert a komplementrendszer sejtkárosító, apoptózist indukáló hatása, valamint ismert az endotélsejt-aktiváció következtében kiváltott komplementaktiváció, így megvizsgáltuk, hogy TTP-s betegekben milyen kapcsolat van az endotélsejt-aktiváció és a komplementaktiváció között. A komplementrendszeren belül az alternatív és terminális út markereit mértük meg a betegek plazmájában. A TTP-s betegek plazmáiban enyhe pozitív korrelációt tapasztaltunk az alternatív út (C3bBbP) és az endotélsejt-aktiváció (CT-proET-1) között (21. ábra). Tekintettel arra, hogy az endotélsejt-aktiváció összefüggést mutatott a komplementrendszer alternatív útjával, ezt tovább szeretnénk volna vizsgálni, ezért megvizsgáltuk a H-faktor-szinteket TTP-s betegekben. Jelentősen csökkent H-faktor-szintek voltak megfigyelhetőek az akut TTP-s betegek plazmájában az egészséges kontroll csoporthoz képest, de a remissziós TTP-s betegek mintáiban is megfigyelhető volt egy enyhébb csökkenés (22. ábra).

Az endotélsejtek szerepe korábban több tanulmányban is vizsgálva volt TMA-ban. Kutatómunkánk során kapott eredményeink ismételten rámutattak, az endotélsejt-aktiváció jelenlétére TTP-ben, mely fontos része a TTP patogenezisének. Eredményeink azt igazolták, hogy az endotélsejt-aktiváció nagymértékben összefügg a betegség aktivitásával. A kutatásunk során vizsgált két endotélsejt eredetű marker génexpressziója, transzkripciója, raktározódása és a kibocsátása különbözik. Különbségüket az is jól mutatja, hogy az általunk bevont betegek különböző szakokban (PEX előtt, PEX alatt, remisszió) levett mintáiban a VWF-antigén és a CT-proET-1 között nem mutatkozott szignifikáns, pozitív korreláció, annak ellenére, hogy mindkét marker endotélsejt-aktivációra utal (20. ábra). Eddigi tanulmányokból ismert, hogy míg a VWF az endotélsejteken kívül a trombocitákban is raktározódik, addig az endothelin-1 kizárólag endotélsejt eredetű marker és csak elenyésző mennyiségben termelik más sejtek (makrofágok, neuronok, fibroblasztok (135)). Mind a két endotélsejt-markerek ismert egy folyamatos (konstitutív) és egy különböző ingerek által regulált termelődése, azonban az endothelin-1 termelődése és szekréciója finoman főként géntranszkripciós szinten szabályozott, mely nagymértékben függ a környezeti hatásoktól. Ilyen környezeti hatás lehet a hipoxiás állapot (136), megnövekedett thrombin koncentráció (137), valamint az akutfázis-fehérjék (TNF- α , IL-1, IL-6 (135, 138)) jelenléte. Az endothelin-1 speciális funkcióját mutatja, hogy képes a proinflammatorikus

folyamatokat erősíteni, részben az akutfázis-fehérjék génexpressziójának (139), részben a neutrofil granulociták migrációjának elősegítésén keresztül (140). Az endothelin-1 és a VWF különbözősége és az endothelin-1 speciális szabályozása miatt az endothelin-1 alapul szolgált a hipotézisünknek, mely szerint TTP-ben a CT-proET-1-szint változása érzékenyen jelzi az endotélsejt aktivitási státuszát a betegség lefolyása során, valamint jól követi az endotélsejtek státuszát a terápia alatt. Korábbi tanulmányok során vizsgálták az endotélsejt-aktiváció jelenlétét TTP-ben és több endotélsejt-károsodásra utaló markert vizsgáltak (96). Mori és munkatársai (97) 39 TTP-ben és HUS-ban szenvedő betegen vizsgált különféle endotélsejt eredetű markereket és azok összefüggéseit a betegség kimenetelével. Szignifikánsan emelkedett trombomodulin-szinteket mértek a betegekben az egészséges kontrollokhoz képest. A túlélő betegekben a trombomodulin-emelkedés kisebb mértékű volt, mint az elhunyt betegekben, ezen kívül azokban a betegekben, akikben átlagosan csökkent plazma antithrombin- és protein C szinteket mértek, a mortalitás magasabb volt. A tanulmány során Mori rámutatott az endotélsejt-aktiváció jelenlétére és jelentőségére a betegség prognózisában. Jelen eredményeink tehát egybehangzanak a korábbi tanulmányokkal és tovább erősítik az endotélsejt-aktiváció fontosságát, tényét TTP-ben. Bár magát az endotélsejt-aktivációt korábban már leírták TTP-ben, a mi kutatásunk is jelentősen hozzá tett az endotélsejt-aktiváció igazolásához és részletesebb elemzéséhez. Az eddigi tanulmányok során alkalmazott markereknél specifikusabb, megbízhatóbban mérhető, jól beállított, kereskedelemben is kapható markerral, a CT-proET-1-el vizsgáltuk meg az endotélsejt-aktivációt valamint nagyobb esetszámú, pontosabban definiált, homogén (ADAMTS13-deficiens) aktív TTP-s és remissziós TTP-s betegekben határoztuk meg a markereket.

Mindkét endotélsejt-marker, a VWF antigén és a CT-proET-1 szintjei emelkedettek voltak az aktív TTP-s betegek mintáiban (13., 17. ábra). A PEX előtt levett betegmintákban a VWF-antigén és a CT-proET-1 szintek emelkedettségének a mértéke szignifikáns volt az egészséges kontrollokéhoz képest, ami jelzi az endotélium aktív részvételét a betegség lefolyásában. Ismert, hogy az AB0 vércsoport befolyásolja a VWF antigén szinteket, ugyanis a 0-s vércsoportúak VWF antigén szintje átlagosan alacsonyabb a többi vércsoportéhoz képest a normál populációban. Ez a különbség a mi betegekben is megmutatkozott, azonban a 0-s vércsoportúak és az egyéb (A, B, AB)

vércsoportok között nem volt szignifikáns mértékű eltérés (16. ábra). Néhány beteg esetében rendelkezésünkre állt több, különböző szakban levett minta, így nyomon követhető volt a biomarkerszintek változása. A követéses vizsgálatba bevont betegek első mintája a PEX és egyéb terápia megkezdése előtt lett levéve, így lényegében külső gyógyszeres behatás és a PEX során adott plazma nem befolyásolta a mérést. A második minta a betegek egy részében az aktív, még terápiát igénylő szakban lett levéve, míg a másik részénél a mintavétel remisszióban történt. Terápia során mind a két markernél szignifikáns mértékű, csökkenő tendencia volt látható. A VWF-antigén esetén a medián csökkenés 40%-os, míg a CT-proET-1-nél kisebb mértékű, mindössze 8%-os volt. Mind a két marker esetén a PEX közben levett mintákban szignifikáns markerszint-csökkenés volt tapasztalható, az első PEX előtti mintákhoz képest (15. ábra, A és 19. ábra, A). A remisszióig követett betegek esetében, a csökkenő tendecia ellenére, nem volt szignifikáns mértékű VWF-antigén-szint csökkenés (15. ábra, B), ezzel szemben a CT-proET-1-szintek szignifikáns mértékben csökkentek a remissziós betegekben az első, PEX előtt levett mintákhoz képest (19. ábra, B).

Doktori munkám megkezdése előtt kutatócsoportunk a komplementrendszer szerepét, vizsgálta ADAMTS13-deficienciával rendelkező TTP-s betegekben és leírták a komplementaktiváció jelenlétét TTP-ben, amit azóta több független kutatócsoport is megerősített (127, 128). A komplementrendszer aktivációjának igazolása azért is volt lényeges a betegség patogenezisében, mert aktivációja során sejtkárosodást, trombocitaaktivációt vált ki, ami jelentősen hozzájárul a betegség progrediálásához. Az akut TTP-s betegek plazmamintáiban összefüggést találtunk a CT-proET-1 és az alternatív út egyik aktivitási markere, a C3bBbP között. A komplementrendszer alternatív útja képes az endotélium felszínén a C3 kapcsolódása által aktiválódni és aktiválni, vagy aktivációját tovább erősíteni az endotélsejteknek, ami azért fontos mert az endotélsejt-aktiváció központi eleme a TMA-k patogenezisének. Eredményeink erre a kapcsolatra utalnak és megerősítik a komplementaktiváció TTP patogenezisében betöltött szerepét. A folyamatok pontos irányultságát a vizsgálat leíró jellege miatt nem lehet megítélni, azonban az eddigi adatok alapján lehet következtetni arra, hogy milyen molekuláris rendszerek vehetnek rész a betegség kialakulásában. Az ADAMTS13-deficiens TTP-s betegekben nagyobb számban található meg az UL-VWF az endotélsejtek felületéhez kihorgonyozott állapotban, ami egy potenciális aktivációs

felületet biztosít a keringésben lévő trombociták számára. A trombocitaaktiváció nélkülözhetetlen eleme a TTP patogenezisének, mivel az aktiválódás hatására trombint bocsátanak a környezetükbe, mely a koagulációs kaszkád beindításán túl képes az aktivált trombociták felszínén a komplement C3-at hasítani, így a komplement kaszkádot is elindítani (141). Mindemellett ismert a trombin endotélsejtekre kifejtett aktivációs hatása, melynek következtében az endotélsejt még több VWF-t és endothelin-1-et bocsát a sejt környezetébe. A trombocita aktiválódásához hozzájárulhat a H-faktor diszfunkciója is, úgy, hogy a diszfunkció következtében a trombociták felületén megindul a komplementaktiváció (142), ami fokozza a trombociták aktivációját. A komplementaktiváció hatására egyrészt az endotélsejtek felületén több adhéziós molekula jelenik meg (143), melyek további trombociták és leukociták kitapadását teszik lehetővé, másrészt több C5a termelődik, ami a trombomodulin csökkent expresszióját eredményezi (144). A trombomodulin csökkent expressziójának hatására a komplementaktiváció tovább erősödik, mivel a trombomodulinnak, az ismert antikoaguláns hatás mellett, a lektin szerű doménjai komplemenreguláló szerepet is betöltenek (145). A komplementreguláló hatását részben a H-faktoron, részben a C3a és C5a csökkentésén keresztül éri el (146). A fent felvázolt folyamatok mind hozzájárulhatnak egy olyan, önmagát erősítő, pozitív visszacsatolású rendszerhez, amely a folyamatos trombocitaadhézió, majd -aktiváció, trombintermelődés, komplementaktiváció, következményes endotélsejt-aktiváció keresztül a mikrovaszkulátúrában olyan környezetet eredményez, mely elősegíti a mikroangiopátia kialakulását (26. ábra). Ezt a patogenetikai modellt támasztják alá Tati és munkatársai megfigyelése is, melyek során áramlási rendszerben mesterséges ADAMTS13-deficiens közegben komplementaktiválódást írtak le a trombociták és az endotélsejtek felszínén (128).

Mivel eredményeink szoros összefüggés igazoltak az alternatív út- és az endotélsejt-aktiváció között akut TTP-ben, tovább szeretnénk volna vizsgálni az alternatív út szerepét az egyik fontos regulátorán, a H-faktoron keresztül. Érdekes megfigyelés volt, hogy a H-faktor-szintek szignifikánsan csökkentek voltak az egészséges kontrollokhoz képest, mind az akut, PEX előtt levett mintákban, mind a remisszióban lévő betegekben. A H-faktor szerepe az elmúlt években előtérbe került és az aHUS-on kívül egyéb TMA-ban is vizsgálták. Turner és Moake *in vitro* analizálák a H-faktor és a VWF közötti

kapcsolatot TMA-ban és megfigyelték, hogy az aktivált endotélsejtek felszínéhez kihorgonyozott UL-VWF-on komplementkomponensek (pl. C3, H-faktor) halmozódnak föl. (147). Turnerék eredménye, a mi megfigyelésünkkel párhuzamosan, rámutat a komplementaktiváció és endotélsejt-aktiváció közötti kapcsolat jelentőségére TTP-ben. A tanulmányból következik, hogy az UL-VWF-on való H-faktor-akkumuláció H-faktor-konzupcióhoz vezethet, ami a H-faktor szintjének csökkenését vonhatja maga után a keringésben. A H-faktor-szint csökkenésének hatására komplement-diszreguláció következik be, mely tovább erősítheti a komplementaktiváció destruktív hatását. Feng és kutatócsoportja leírta, hogy a H-faktor C-terminális doménje felelős a VWF A2-es doménjához való kötődésért (148). Rayes és munkatársai (149) a H-faktor és a VWF közötti kapcsolatot vizsgálta tovább, és azt figyelték meg, hogy a H-faktor és a VWF részben együtt raktározódnak a Weibel Palade testekben az endotélsejteken belül. További megfigyelésük volt, hogy a H-faktor komplementreguláló hatása fokozódott a VWF-hoz kötődve, ugyanakkor azt is leírták, hogy a H-faktor a VWF ADAMTS13 általi lebontását gátolta. Rayes megfigyelései kutatásunk eredményeibe úgy illeszthetők, hogy az ADAMTS13-deficiens TTP-s betegekben megjelenő, elhasítatlan UL-VWF hatására, H-faktor-konzupció jelentkezhet, amely a maradék ADAMTS13-enzimaktivitást is gátolja, ezzel elősegítve a trombocitakitapadást az UL-VWF adhezív felületéhez, a trombus kialakulását és ezáltal a betegség progrediálását. Rayes másik megfigyelése, miszerint a H-faktor VWF-hoz való kötődése elősegíti a H-faktor komplementreguláló hatását, látszólag ellentmond a mi eredményeinknek, mivel a mi feltételezésünkbe az illene, hogy a H-faktor az UL-VWF általi konzupció hatására komplementreguláló hatását elveszti, ami így komplementaktivációhoz vezet. Azt azonban, hogy az agyi, glomeruláris ill. más szervekben lévő endotélsejtekben a H-faktor és az UL-VWF között lévő kölcsönhatás hogyan zajlik, vagy hogy milyen egyéb tényező befolyásolhatja a H-faktor funkcióját, az eddigi irodalmi adatok alapján nem lehet megmondani. A fent említett kutatások eredményei *in vitro* modellekből származnak, ezért feltehetőleg *in vivo* egyéb, eddig ismeretlen mechanizmusok is magyarázhatják a látszólag ellentétesnek tűnő eredményeket, ezért további vizsgálatok szükségesek a H-faktor és a VWF kapcsolatának tisztázására TTP-ben. Ezekhez a kutatásokhoz jelenthetnek kiindulópontot a beteganyagunkban tett megfigyelések is. Megvizsgáltuk azt is, hogy a csökkent H-faktor-szintek hatására bekövetkezik-e

alternatív út aktiválódás, de a csökkent H-faktor szint nem mutatott összefüggést egyik, az alternatív út aktivitását jelző markerral sem (C3, C3a, C3bBbP, SC5b-9).

Az endothelin-1-et meglehetősen rövid féléletideje miatt nem könnyű mérni a plazmából, ezért egy olyan specifikus pro-fragmensének, a CT-proET-1-nek a szintjét mértük meg, mely az érett endothelin-1 előtti állapotban válik le a törzsmolekuláról így ekvimoláris mennyiségben termelődik az endothelin-1-gyel. A CT-proET-1 mérését Papassotiriou és munkatársai állították be, (103) és az általuk mért CT-proET-1 referencia értékekhez (326 egészséges kontrollban mért CTproET-1; átlag: 44,3 pmol/l, standard deviáció: 10 pmol/l) hasonló értékeket kaptunk saját egészséges kontrolljainkban (CTproET-1; medián: 36 pmol/l, interkvartilis tartomány: 21,5-42 pmol/l). A CT-proET-1-et vizsgálták szepszisben (150), krónikus szívelégtelenségben (151, 152) és pulmonális artériás hipertenzióban szenvedő betegekben (153). Ezekben a tanulmányokban a CT-proET-1 emelkedésének mértéke hasonló volt a TTP-s betegekben tapasztalt magasabb CT-proET-1-szintekhez. A CT-proET-1 az akut, PEX előtt levett TTP-s betegminták mintegy 48%-ban volt 60 pmol/l fölött. Fontos megemlíteni, hogy hasonló mértékű CT-proET-1 emelkedés volt megfigyelhető szeptikus vagy szívelégtelen betegekben. Két betegünkönél a CT-proET-1 szintek 200 pmol/l fölött voltak, ilyen értékeket korábban szeptikus sokkban vagy súlyos, NYHA (New York Heart Association) IV-es stádiumú szívelégtelenségben mértek. Vizsgálatunkban korábban szívelégtelenségben szenvedő beteg nem volt, így feltételezhetően nem ebből adódott a CT-proET-1 szintjének emelkedése. Mivel szepszisben is magas CT-proET-1 szinteket mértek, ezért megmértük a betegekben a CRP-szinteket, hogy az esetleges fertőzést kizárhassuk. (Ugyan a TTP-t kiválthatják különböző fertőzések, de általában ezek enyhébb vírusfertőzések, melyek nem járnak jelentős szisztémás gyulladással, és sokszor két héttel is megelőzhetik a TTP-t és mire a betegség manifesztálódik, a fertőzések panaszok gyakran már megszűntek). Betegeink többségében a CRP a referencia tartományon belüli, vagy enyhén emelkedett volt. A betegek mindössze 7%-nak volt jelentősebb (50 mg/l-t meghaladó) CRP-emelkedése. Az alacsony CRP-szintek arra utalnak, hogy a TTP manifesztálódásakor, az emelkedett CT-proET-1 háttérében nem, vagy alacsony valószínűséggel állt fenn fertőzés. Az említett tanulmányokban az emelkedett CT-proET-1-szintek aktív, súlyos betegségekre utaltak, ami alapján elmondható, hogy az emelkedett CT-proET-1-szintek TTP-s

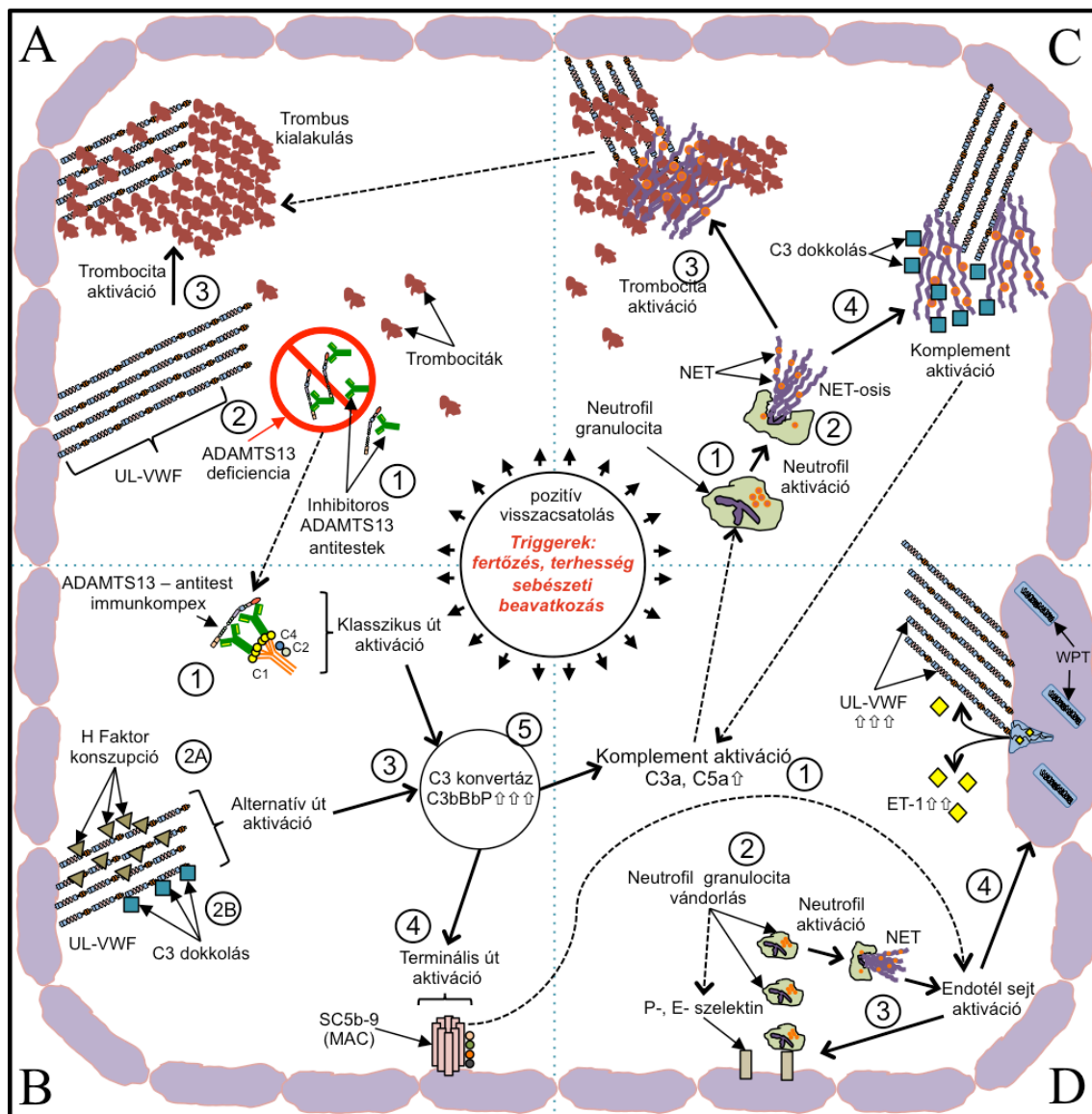
betegeinkben is aktív betegségre utalnak, és jelzik az endotélsejt-aktivációt. Figyelemre méltó jelenség volt, hogy nem csak az akut TTP-s betegekben voltak emelkedettek az endotélsejtek aktiváltságát jelző markerek (VWF, CT-proET-1), hanem a remisszióban lévőknél is (az egészséges kontrollokhhoz képest). Bár a remisszióban lévő betegeknél alacsonyabb markerszinteket mértünk az akut betegekhez képest, a markerek magasabb szintje utalhat egy enyhébb, de folyamatosan jelen levő endotélsejt-aktivációra, vagy a betegség következtében lezajlott endotélsejt károsodásra. Azt, hogy pontosan mi okozhatta a remissziós betegekben a folyamatosan fennálló endotélsejt-aktivációt azt jelen tanulmányunkban nem vizsgáltuk. A remisszióban jelen levő endotélsejt-aktiváltságot okozó faktort, és az emelkedett CT-proET-1 szintek esetleges exacerbációt vagy relapszust jelző prognosztikai jelentőségét a továbbiakban szeretnénk majd vizsgálni.

A TTP ritka betegség, és ebből kifolyólag nem állt rendelkezésünkre olyan betegszám, amelyből messzemenő és jól alátámasztott következtéseket vonhattunk volna le. A betegszám a legutóbbi tanulmányunk lezárása óta (2014) sem növekedett olyan ütemben, hogy az lényeges változtatásokat okozzon a kutatási eredményeinkben. A betegség ritkaságából kifolyólag szükséges lenne egy összeurópai regiszterre, melyben több ország betegeit lehetne érdemben vizsgálni, akár a neutrofil granulociták akár az endotélsejtek aktiváltságának szempontjából. Kutatási eredményeink ugyan jó irányvonalat adhatnak, szükséges azonban több független kutatócsoport általi megerősítés.

Annak ellenére, hogy az endotélsejt-aktiváció jelenléte már korábban le volt írva, az aktiváltságot jelző specifikus marker, nagyobb betegszámban nem volt vizsgálva. A TTP-ben egy specifikus prognosztikai és a terápia hatásosságát jelző marker több szempontból is fontos, az egyik ilyen szempont a gondozott betegek és az esetleges relapszusrizikójuk megítélése. A másik szempontot az elmúlt időszakban felgyorsult, drága biológiai terápiák adják, melyek alkalmazási idejét sokszor nehéz megbecsülni. A nemzetközi irodalomban is többször felmerült az igény, hasonló jellegű specifikus biomarkerre TMA-ban (2).

Kutatásunk abból a klinikai megfigyelésből indult ki, miszerint a TTP hátterében álló ADAMTS13 enzim deficienciája önmagában nem elégséges a betegség

manifesztálódásához, egyéb, a szervezetben jelen levő környezeti, genetikai tényezők szükségesek, hogy az ADAMTS13-deficienciát hordozó betegben a betegség kialakuljon. Korábbi kutatások során megfigyelték, hogy a TTP-t gyakran megelőzi enyhébb infékción, sebészeti beavatkozás, de leírták terhességhez asszociáltan is a megjelenését. Mind az infékción és sebészeti beavatkozás, mind a terhesség során ismert a különböző citokin termelő sejtek, a komplementrendszer és a koagulációs kaszkád aktivációja. Korábbi kutatások igazolták az akut TTP-ben jelenlevő nagymértékű citokinválaszt (154), komplement aktivációt (104, 127), a koagulációs és fibrinolitikus rendszer markereinek jelenlétét (155). Mindezek alapján elmondható, hogy a TTP során egy komplex, több szintű és különböző kaszkádszereket beindító környezet van jelen (26. Ábra), melynek hatására megnövekszik a trombin termelődése, a pro-inflammatorikus citokin válasz (IL-6, TNF-alfa) a komplementaktiváció, melyeknek mind ismert az endothelin-1 transzkripcióját fokozó hatása (137, 138, 156, 157). A fent felvázolt patogenetikai folyamatok hatására így a CT-proET-1 szintje is emelkedik, ami alapján úgy gondoljuk, hogy a CT-proET-1 egy specifikus, gyorsan szabályozott, könnyen mérhető és hasznos biomarker TTP-ben és feltehetően a többi TMA-ban is.



26. ábra. Az ADAMTS13-deficiencia és egyéb környezeti tényezők szerepének összefüggései a TTP patomechanizmusában. (A) (1) Az inhibitoros ADAMTS13 elleni antitestek vagy az enzim mutációja miatt a szervezetben kialakult ADAMTS13-deficiencia következtében nem hasítódik el az UL-VWF, mely (2) aktív felületet képez a trombociták számára és teret nyit a (3) trombusképződésnek. (B) Különböző környezeti hatások, vagy a gátló antitestek aktivációs felületet biztosíthatnak a (1) klasszikus út aktivációjának. Ismert az UL-VWF-on a (2A) H-faktor és a (2B) C3 kikötődése, mely hatására aktiválódhat az alternatív út. A közös (3) C3 konvertáz aktiválódását követi a (4) terminális út aktivációja és az ún. MAC kialakulása. (5) A komplement aktiválódás hatására anafilatoxinok kerülnek a keringésbe, távoli hatást kifejtve (C3a, C5a). (C) Fertőzés és egyéb környezeti hatások következtében (1) aktiválódnak a neutrofil granulociták, melyek az aktivációjuk során (2) NET-et (neutrofil extracelluláris trap: DNS, hiszton, enzimek) bocsátanak a környezetükbe, mely elősegítheti a (3) trombocitaaktivációt és a trombus kialakulását, ezen kívül aktivációs felületet képez a (4) komplementrendszer elemei számára, elősegítve, erősítve a komplementaktivációt. (D) (1) A komplementaktiváció, MAC-kialakulás, valamint (2) neutrofil granulocita aktiváció hatására aktiválódik az endotélsejt, melyek hatására több (3) sejtfelszíni receptor (pl. P-, L- szelektin) kerül a felszínre, elősegítve a neutrofil granulocita migrációt. Az endotélsejt-aktiváció hatására az endotélium több UL-VWF-t bocsát a környezetbe, ahol a már meglévő ADAMTS13-deficiencia miatt a trombusképződés felgyorsul.

6. Következtetések:

(1) Emelkedett PMNE-értékek voltak megfigyelhetők mind akut, mind remissziós betegekben az egészséges kontroll csoporthoz képest. A legmagasabb PMNE-szintek az akut betegekben voltak jelen. Az emelkedett PMNE-szint jellemző volt az aktív TTP-s betegekre (trombocitopénia, ADAMTS13-deficiencia). Az emelkedett PMNE-szintek neutrofil granulocita aktivációra utalnak TTP-ben, mely az aktivált granulocitára jellemző NET-osis révén hozzájárul a trombotikus folyamatok felerősítéséhez, felgyorsításához, ezen felül aktivációs felületet képezhet a komplementrendszer számára, evvel is hozzájárulva a betegség progrediálásához. Szintén emelkedett VWF antigén és CT-proET-1 szinteket mértünk TTP-s betegekben az egészséges kontroll csoporthoz képest. A legmagasabb markerszintek a PMNE-hez hasonlóan az akut szakban levő betegekben voltak. Az emelkedett endotélsejt-markerek jellemzőek voltak az aktív TTP-s betegekben. Az emelkedett endotélsejtmarker-szintek aktiválódtak endotélsejtekre utalnak TTP-s betegekben, jellemzően az akut betegség során, de enyhébb fokban a remisszióban is. Az endotélsejt-aktiváltságot egy új speciális markerral, a CT-proET-1 igazoltuk. Az endotélsejt TTP-ben betöltött szerepének újvizsgálatára részben azért volt szükség, mert a korábban vizsgált endotélsejt-markerek specificitása alacsonyabb volt és a vizsgálatokat kis létszámú betegcsoportokban végezték. Az endotélsejt-aktiváció során a felszínen expresszálandó receptorok hatására többek között neutrofil granulocita kitapadás, komplement aktiváció, valamint a trombotikus folyamatok felerősítése következik be, ami az ADAMTS13-deficiencia labilis körülményei mellett jelentősen hozzájárul a TTP kialakulásához. A remissziós betegekben lévő enyhe endotélsejt-aktiváció, ami feltehetően az akut szak endotélsejt-aktivációjának maradványa, figyelemre méltó jelenség, mivel jelenthet egyfajta rizikót az exacerbációra vagy relapsusra. Ennek a jelenségnek a tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

(2) A rendelkezésünkre álló követéses vizsgálatra bevont betegekben szignifikáns PMNE- és CT-proET-1-szint-csökkenés volt tapasztalható a remissziós mintákban, az akut, PEX előtti mintákhoz képest. A mintapárral rendelkező betegekben a vizsgált markerek a betegek állapotának javulásával párhuzamosan csökkentek, így a PMNE és

a CT-proET-1 csökkenése jó mutatója a terápia hatékonyságának és a betegek állapotjavulásának is. A VWF-antigén-szintekben nem volt látható szignifikáns csökkenés.

(3) Az emelkedett PMNE-szintek fordított összefüggést mutattak a TTP aktivitási markereivel (trombocita, hemoglobin). A csökkent aktivitási markerek a betegség súlyosságára is utalnak, az aktivált neutrofil granulociták enzimeik révén hozzájárulhatnak a trombocitaaktivációhoz, a trombus kialakulásához és a mikroangiopátia következtében a hemolízishez, a csökkent hemoglobin értékekhez. A PMNE-értékek pozitív összefüggést mutattak a komplementaktivitási markerekkel is (C3a, Bb) akut TTP-s betegekben. Az aktivált neutrofil granulocitákból származó NET aktivációs felületet biztosít a komplementrendszer számára, ugyanakkor a komplementaktiváció során felszabaduló anafilatoxinok (C3a, C5a) képesek a nyugvó neutrofil granulocitákat aktiválni és a migrációjukat elősegíteni. Az eredmény alapján elmondható, hogy fontos kommunikáció játszódik le a neutrofil granulociták és a komplementrendszer között. Hasonló összefüggés látható a CT-proET-1-gyel. A CT-proET-1 szignifikáns összefüggést mutatott az alternatív út C3 konvertáz enzimével (C3bBbP) és pozitív tendenciózus összefüggést a terminális út markerével (SC5b-9). Az aktivált endotélsejt-felszín lehetőséget ad a komplementaktivációra, a neutrofil granulociták kitapadására, viszont a komplementaktiváció hatására az endotélsejt tovább képes aktiválódni, adott esetben el is pusztulhat, ha a terminális út végső sejtpusztításra alkalmas komplexe (MAC) kialakul a sejt felszínén. Az alternatív út szerepét tovább vizsgálva alacsony H-faktor szinteket mértünk TTP-s betegekben az egészséges kontrollokhoz képest, főként az akut TTP-s betegek mintáiban. Az alacsony H-faktor szint következtében kialakulhat lokálisan komplement-diszreguláció, mivel a H-faktornak szerepe van az alternatív út kontrollálásában.

Látható, hogy a vizsgált rendszerek között sokszor oda-vissza ható, egymást jelentősen befolyásoló kommunikáció, pozitív visszacsatolás van jelen. A vizsgálat leíró jellegéből adódóan messzemenő következtetéseket nem lehet levonni, azonban a megfigyelt összefüggések jó irányvonalat adnak a későbbi kutatásokhoz.

7. Összefoglalás

A TTP a TMA-k közé tartozó ritka, súlyos, epizódokban zajló betegség. Hátterében a VWF-t hasító ADAMTS13 enzim deficienciája áll. Az elmúlt évek során több eredmény arra utalt, hogy a betegség kialakulásában fontos az egyéb patogenetikai tényezők szerepe. Vizsgálni kívántuk a neutrofil granulociták és az endotélsejtek aktiváltságát és azok összefüggéseit a komplementrendszer markereivel TTP-ben. A két projekthez összesen 57 TTP-s beteget válogattunk be. A neutrofil granulocita aktiváltságot a PMNE-vel vizsgáltuk, míg az endotélsejt-aktivációt a CT-proET-1-gyel. Emelkedett PMNE és CT-proET-1-szintek voltak megfigyelhetőek az akut TTP-s betegek plazmamintáiban a remissziós TTP-s betegekhez, valamint az egészséges kontrollokhoz képest. A legmagasabb biomarker-szinteket azokban a betegekben mértük, ahol együtt volt jelen az ADAMTS13-deficiencia és trombocitopénia. Követésem betegekben mind a neutrofil granulociták és endotélsejtek biomarkereinek szintje szignifikánsan csökkent a remissziót elérő betegekben. A PMNE-szintek negatív korrelációt mutattak a betegségaktivációs markerekkel (trombocita, hemoglobin) és pozitív összefüggést mutattak a komplement aktivációs markereivel (Bb, C3a). Akut TTP-s betegekben a CT-proET-1 és az alternatív valamint a terminális út markerei között pozitív összefüggés mutatkozott. Jelentős H-faktor csökkenés volt látható akut TTP-s betegekben a remissziós és a kontroll csoportokhoz képest. Tanulmányunk során igazoltuk a neutrofil granulociták aktiváció jelenlétét, mely a betegség akut fázisában NET-osis révén jelentősen hozzájárulhat a trombotikus állapot, a komplementaktiváció és az endotélsejt-aktiváció fokozásához. Korábban ismert volt az endotélsejt kulcsfontosságú szerepe a TMA-k patogenezisében, azonban specifikus endotélsejt-markerral történő és nagyobb beteganyagra kiterjedő vizsgálat nem született. Kutatásunk során igazoltuk az endotélsejt-aktiváció jelenlétét egy specifikus markerral nagyobb TTP-s betegcsoportban. A PMNE és CT-proET-1 jelentőségét az is mutatta, hogy terápiát követően a betegség javulásával párhuzamosan csökkent a plazmaszintjük. Az akut szakban mind a két marker szoros összefüggést mutatott a komplementrendszer aktivációs markereivel, ami utal a komplementrendszer kulcsfontosságú szerepére. Ezt a jelentősen csökkent H-faktor-szintek és az ebből feltételezhető komplement-diszreguláció ugyancsak megerősíti. A TTP-s betegekben tehát több, fontos, egymás hatását fokozó rendszer van jelen, melyek az ADAMTS13-deficiencia mellett jelentősen hozzájárulnak ahhoz, hogy a trombotikus folyamatok felgyorsuljanak, és a betegség manifesztálódjon.

8. Summary

TTP is a rare, episodic and severe disease. Although in the past years it has been clarified that VWF protease deficiency is responsible for manifest TTP some data has been showed other trigger factors are also needed for development of the disease. Therefore our aim was to investigate the role of possible trigger factors such as neutrophil activation or endothelial cell involvement with special markers. Moreover we wanted to examine the interaction between these markers and complement markers. We enrolled altogether 57 TTP patients. As a neutrophil activation marker we analyzed PMNE. To rule out endothelial activation VWF antigen and CT-proET-1 were measured. Classical, alternative and terminal complement parameters were also measured. Elevated PMNE and CT-proET-1 levels were found in acute TTP compared to remission or the healthy controls. These marker levels were decreased in follow up patients after reaching remission. PMNE levels had a negative correlation with disease activity markers such as platelets and hemoglobin and had a positive correlation with complement C3a and Bb. A positive correlation was also found between CT-proET-1 and alternative pathway activity and also with terminal pathway marker. Factor H levels were decreased in TTP compared to healthy controls. We reported elevated PMNE levels in acute TTP, which refers to a neutrophil activation. Neutrophil activation through NET-osis can be a suitable surface for complement activation and the progression of thrombotic events in microvessels. Our other project suggests the presence of endothelial cell activation, which were confirmed by a special endothelial marker in a larger cohort in active TTP. Lower Factor H levels with potential complement dysregulation and the association of elevated CT-proET-1 levels with alternative pathway markers in acute samples suggest complex pathological directions. Neutrophil and endothelial activation together with complement activation show a positive feedback system and they jointly contribute to the pathogenesis of TTP in patients with ADAMTS13 deficiency.

9. Irodalomjegyzék:

- (1) Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G, Besbas N, Bitzan M, Bjerre A, Coppo R, Emma F, Johnson S, Karpman D, Landau D, Langman CB, Lapeyraque AL, Licht C, Nester C, Pecoraro C, Riedl M, Van De Kar NC, Van De Walle J, Vivarelli M, Fremeaux-Bacchi V and International HUS. (2016) An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr Nephrol*, 31: 15-39
- (2) Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, Loirat C, Fremeaux-Bacchi V and French Study Group for A HCG. (2012) Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol*, 8: 643-57
- (3) Pecoraro C, Ferretti AV, Rurali E, Galbusera M, Noris M and Remuzzi G. (2015) Treatment of Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura With Eculizumab. *Am J Kidney Dis*, 66: 1067-70
- (4) Moschcowitz E. (1924) Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc N Y Pathol Soc*; 24: 21-4.
- (5) Kremer Hovinga JA and Lammle B. (2012) Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012: 610-6
- (6) Schulman I, Pierce M, Lukens A and Currimbhoy Z. (1960) Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood*, 16: 943-57
- (7) Bukowski RM, King JW and Hewlett JS. (1977) Plasmapheresis in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 50: 413-7
- (8) Upshaw JD, Jr. (1978) Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 298: 1350-2

- (9) Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, Seder RH, Hong SL and Deykin D. (1982) Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 307: 1432-5
- (10) Stocksclaeder M, Schneppenheim R and Budde U. (2014) Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 25: 206-16
- (11) Furlan M, Robles R and Lammle B. (1996) Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87: 4223-34
- (12) Tsai HM. (1996) Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87: 4235-44
- (13) Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P and Lammle B. (1997) Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 89: 3097-103
- (14) Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M and Lammle B. (1998) von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 339: 1578-84
- (15) Tsai HM and Lian EC. (1998) Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 339: 1585-94
- (16) Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B and Chung D. (2001) Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*, 98: 1662-6
- (17) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, Mcclintick JN, Mcgee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Jr., Ginsburg D and Tsai HM. (2001)

Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 413: 488-94

(18) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T and Nozaki C. (2001) A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem*, 130: 475-80

(19) Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE and Fujikawa K. (2001) Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*, 276: 41059-63

(20) Scully M, Yarranton H, Liesner R, Cavenagh J, Hunt B, Benjamin S, Bevan D, Mackie I and Machin S. (2008) Regional UK TTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br J Haematol*, 142: 819-26

(21) Blombery P and Scully M. (2014) Management of thrombotic thrombocytopenic purpura: current perspectives. *J Blood Med*, 5: 15-23

(22) Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC and Spasoff RA. (1991) Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med*, 325: 393-7

(23) Bell WR, Braine HG, Ness PM and Kickler TS. (1991) Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med*, 325: 398-403

(24) Bandarenko N and Brecher ME. (1998) United States Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Apheresis Study Group (US TTP ASG): multicenter survey and retrospective analysis of current efficacy of therapeutic plasma exchange. *J Clin Apher*, 13: 133-41

(25) Moake J. (2009) Thrombotic microangiopathies: multimers, metalloprotease, and beyond. *Clin Transl Sci*, 2: 366-73

(26) Balduini CL, Gugliotta L, Luppi M, Laurenti L, Klersy C, Pieresca C, Quintini G, Iuliano F, Re R, Spedini P, Vianelli N, Zaccaria A, Pogliani EM, Musso R, Bobbio Pallavicini E, Quarta G, Galieni P, Fragasso A, Casella G, Noris P, Ascari E and Italian TTPSG. (2010) High versus standard dose methylprednisolone in the acute phase of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a randomized study. *Ann Hematol*, 89: 591-6

(27) George JN. (2010) How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood*, 116: 4060-9

(28) Scully M, McDonald V, Cavenagh J, Hunt BJ, Longair I, Cohen H and Machin SJ. (2011) A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 118: 1746-53

(29) Sayani FA and Abrams CS. (2015) How I treat refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 125: 3860-7

(30) Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Cataland S, Knobl P, Wu H, Artoni A, Westwood JP, Mansouri Taleghani M, Jilma B, Callewaert F, Ulrichs H, Duby C, Tersago D and Investigators T. (2016) Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*, 374: 511-22

(31) Knobl PN. (2013) Treatment of thrombotic microangiopathy with a focus on new treatment options. *Hamostaseologie*, 33: 149-59

(32) Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lammle B and George JN. (2010) Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 115: 1500-11; quiz 1662

(33) Furlan M and Lammle B. (2001) Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von Willebrand factor-cleaving protease. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 437-54

(34) Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T and George JN. (2009) Pregnancy-

induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol*, 144: 742-54

(35) Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT and Sadler JE. (2004) Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103: 4043-9

(36) Sakariassen KS, Bolhuis PA and Sixma JJ. (1979) Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature*, 279: 636-8

(37) Hovig T and Stormorken H. (1974) Ultrastructural studies on the platelet plug formation in bleeding time wounds from normal individuals and patients with von Willebrand's disease. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl*, Suppl 248: 105-22

(38) Jaffe EA, Hoyer LW and Nachman RL. (1973) Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 52: 2757-64

(39) Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ and Wagner DD. (1985) Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, 76: 1102-6

(40) Wagner DD. (1993) The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost*, 70: 105-10

(41) Zhou YF, Eng ET, Nishida N, Lu C, Walz T and Springer TA. (2011) A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J*, 30: 4098-111

(42) Levine JD, Harlan JM, Harker LA, Joseph ML and Counts RB. (1982) Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture. *Blood*, 60: 531-4

(43) Loesberg C, Gonsalves MD, Zandbergen J, Willems C, Van Aken WG, Stel HV, Van Mourik JA and De Groot PG. (1983) The effect of calcium on the secretion of

factor VIII-related antigen by cultured human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 763: 160-8

(44) Ribes JA, Francis CW and Wagner DD. (1987) Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. *J Clin Invest*, 79: 117-23

(45) Hamilton KK and Sims PJ. (1987) Changes in cytosolic Ca²⁺ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. *J Clin Invest*, 79: 600-8

(46) Crawley JT, De Groot R, Xiang Y, Luken BM and Lane DA. (2011) Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood*, 118: 3212-21

(47) Sporn LA, Marder VJ and Wagner DD. (1986) Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell*, 46: 185-90

(48) Giblin JP, Hewlett LJ and Hannah MJ. (2008) Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood*, 112: 957-64

(49) Sporn LA, Marder VJ and Wagner DD. (1989) Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *J Cell Biol*, 108: 1283-9

(50) Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH and Hellums JD. (1986) Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest*, 78: 1456-61

(51) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto TA, Mori T, Wanaka A, Fukui H and Fujimura Y. (2005) Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*, 106: 922-4

(52) Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF and Moake J. (2006) Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*, 4: 1396-404

- (53) Studt JD, Kremer Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheiflinger F and Lammle B. (2005) Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*, 105: 542-4
- (54) Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF and Dong JF. (2004) Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*, 104: 100-6
- (55) Lam JK, Chion CK, Zanardelli S, Lane DA and Crawley JT. (2007) Further characterization of ADAMTS-13 inactivation by thrombin. *J Thromb Haemost*, 5: 1010-8
- (56) Crawley JT, De Groot R and Luken BM. (2009) Circulating ADAMTS-13-von Willebrand factor complexes: an enzyme on demand. *J Thromb Haemost*, 7: 2085-7
- (57) Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM and Sadler JE. (2009) Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*, 7: 2088-95
- (58) Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL and Marchant RE. (1996) Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*, 88: 2939-50
- (59) Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K and Lopez JA. (2002) ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*, 100: 4033-9
- (60) Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP and Springer TA. (2009) Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*, 324: 1330-4
- (61) Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, Dorner F, Lammle B, Mannucci PM and Scheiflinger F. (2004) Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103: 4514-9

- (62) Zheng XL, Wu HM, Shang D, Falls E, Skipwith CG, Cataland SR, Bennett CL and Kwaan HC. (2010) Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 95: 1555-62
- (63) Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F and Rieger M. (2003) Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 102: 3241-3
- (64) Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA and Scheiflinger F. (2009) IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 7: 1703-10
- (65) Coppo P, Busson M, Veyradier A, Wynckel A, Poullin P, Azoulay E, Galicier L, Loiseau P and French Reference Centre for Thrombotic M. (2010) HLA-DRB1*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost*, 8: 856-9
- (66) Scully M, Brown J, Patel R, McDonald V, Brown CJ and Machin S. (2010) Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost*, 8: 257-62
- (67) John ML, Hitzler W and Scharrer I. (2012) The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*, 91: 507-10
- (68) Miyata T, Kokame K, Matsumoto M and Fujimura Y. (2013) ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan. *Hamostaseologie*, 33: 131-7
- (69) Lotta LA, Garagiola I, Palla R, Cairo A and Peyvandi F. (2010) ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Mutat*, 31: 11-9

(70) Lotta LA, Wu HM, Mackie IJ, Noris M, Veyradier A, Scully MA, Remuzzi G, Coppo P, Liesner R, Donadelli R, Loirat C, Gibbs RA, Horne A, Yang S, Garagiola I, Musallam KM and Peyvandi F. (2012) Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 120: 440-8

(71) Tersteeg C, Fijnheer R, Pasterkamp G, De Groot PG, Vanhoorelbeke K, De Maat S and Maas C. (2016) Keeping von Willebrand Factor under Control: Alternatives for ADAMTS13. *Semin Thromb Hemost*, 42: 9-17

(72) Pos W, Luken BM, Sorvillo N, Kremer Hovinga JA and Voorberg J. (2011) Humoral immune response to ADAMTS13 in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 9: 1285-91

(73) George JN. (2003) The association of pregnancy with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Hematol*, 10: 339-44

(74) Sengelov H, Kjeldsen L and Borregaard N. (1993) Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*, 150: 1535-43

(75) Weiss SJ. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 320: 365-76

(76) Lentsch AB and Ward PA. (2000) Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol*, 190: 343-8

(77) Ruiz-Torres MP, Casiraghi F, Galbusera M, Macconi D, Gastoldi S, Todeschini M, Porrati F, Belotti D, Pogliani EM, Noris M and Remuzzi G. (2005) Complement activation: the missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost*, 93: 443-52

(78) Alvarez-Larran A, Petriz J, Martinez A, Sanz C and Pereira A. (2003) Plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura induces activation of human monocytes and polymorphonuclear neutrophils. *Br J Haematol*, 120: 129-34

- (79) Valant PA, Jy W, Horstman LL, Mao WW and Ahn YS. (1998) Thrombotic thrombocytopenic purpura plasma enhances platelet-leucocyte interaction in vitro. *Br J Haematol*, 100: 24-32
- (80) Kilgore KS, Ward PA and Warren JS. (1998) Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: the roles of P-selectin and platelet activating factor. *Inflammation*, 22: 583-98
- (81) Elsner J, Oppermann M, Czech W and Kapp A. (1994) C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood*, 83: 3324-31
- (82) Kaplan MJ and Radic M. (2012) Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*, 189: 2689-95
- (83) Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Grone HJ, Brinkmann V and Jenne DE. (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*, 15: 623-5
- (84) Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, Mcavoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH and Kubes P. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, 13: 463-9
- (85) Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH and Wagner DD. (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 15880-5
- (86) Leffler J, Gullstrand B, Jonsen A, Nilsson JA, Martin M, Blom AM and Bengtsson AA. (2013) Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 15: R84
- (87) Fitzpatrick MM, Shah V, Filler G, Dillon MJ and Barratt TM. (1992) Neutrophil activation in the haemolytic uraemic syndrome: free and complexed elastase in plasma. *Pediatr Nephrol*, 6: 50-3

- (88) Milford D, Taylor CM, Rafaat F, Halloran E and Dawes J. (1989) Neutrophil elastases and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 2: 1153
- (89) Wu KK and Thiagarajan P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*, 47: 315-31
- (90) Ridolfi RL and Bell WR. (1981) Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 60: 413-28
- (91) Ruggenti P, Noris M and Remuzzi G. (2001) Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int*, 60: 831-46
- (92) Caprioli J, Remuzzi G and Noris M. (2011) Thrombotic microangiopathies: from animal models to human disease and cure. *Contrib Nephrol*, 169: 337-50
- (93) Mcever RP. (2001) Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*, 86: 746-56
- (94) Burns ER and Zucker-Franklin D. (1982) Pathologic effects of plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura on platelets and cultured vascular endothelial cells. *Blood*, 60: 1030-7
- (95) Laurence J, Mitra D, Steiner M, Staiano-Coico L and Jaffe E. (1996) Plasma from patients with idiopathic and human immunodeficiency virus-associated thrombotic thrombocytopenic purpura induces apoptosis in microvascular endothelial cells. *Blood*, 87: 3245-54
- (96) Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C and Ahn YS. (2003) Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol*, 123: 896-902
- (97) Mori Y, Wada H, Okugawa Y, Tamaki S, Nakasaki T, Watanabe R, Gabazza EC, Nishikawa M, Minami N and Shiku H. (2001) Increased plasma thrombomodulin as a

vascular endothelial cell marker in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost*, 7: 5-9

(98) Stufano F, S LaM, Pontiggia S, Musallam KM and Peyvandi F. (2012) von Willebrand factor propeptide to antigen ratio in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 10: 728-30

(99) Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW and Pollock DM. (2011) Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev*, 91: 1-77

(100) Burke GW, Ciancio G, Cirocco R, Markou M, Olson L, Contreras N, Roth D, Esquenazi V, Tzakis A and Miller J. (1999) Microangiopathy in kidney and simultaneous pancreas/kidney recipients treated with tacrolimus: evidence of endothelin and cytokine involvement. *Transplantation*, 68: 1336-42

(101) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 411-5

(102) Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, Dewit D and Yanagisawa M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*, 78: 473-85

(103) Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C and Bergmann A. (2006) Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin Chem*, 52: 1144-51

(104) Reti M, Farkas P, Csuka D, Razso K, Schlammadinger A, Udvardy ML, Madach K, Domjan G, Bereczki C, Reusz GS, Szabo AJ and Prohaszka Z. (2012) Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 10: 791-8

(105) Monsinjon T, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Brady JJ and Fontaine MC. (2003) Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*, 17: 1003-14

- (106) Camous L, Roumenina L, Bigot S, Brachemi S, Fremeaux-Bacchi V, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L. (2011) Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood*, 117: 1340-9
- (107) Sims PJ and Wiedmer T. (1991) The response of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol Today*, 12: 338-42
- (108) Rosove MH. (2014) Thrombotic microangiopathies. *Semin Arthritis Rheum*, 43: 797-805
- (109) Gombos T, Mako V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Harsfalvi J, Forhecz Z, Pozsonyi Z, Borgulya G, Janoskuti L and Prohaszka Z. (2009) Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. *Thromb Haemost*, 102: 573-80
- (110) Cat R, Rosario NA, De Messias IT, Resener TD and Kirschfink M. (1993) Evaluation of complement activation in premature newborn infants with hyaline membrane disease. *Eur J Pediatr*, 152: 205-8
- (111) Csuka D, Fust G, Farkas H and Varga L. (2011) Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clin Immunol*, 139: 85-93
- (112) Ishikawa N, Kamitsuji H, Murakami T, Nakayama A and Umeki Y. (2000) Plasma levels of granulocyte elastase-alpha1-proteinase inhibitor complex in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Pediatr Int*, 42: 637-41
- (113) Cejka J. (1982) Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen. *Clin Chem*, 28: 1356-8
- (114) Struck J, Morgenthaler NG and Bergmann A. (2005) Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. *Peptides*, 26: 2482-6
- (115) Jenkins PV and O'donnell JS. (2006) ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion*, 46: 1836-44

- (116) Walters MD, Matthei IU, Kay R, Dillon MJ and Barratt TM. (1989) The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 3: 130-4
- (117) Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD and Lammle B. (2012) Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*, 120: 1157-64
- (118) Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR and Zychlinsky A. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5: e1000639
- (119) Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A and Zychlinsky A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 191: 677-91
- (120) Falter T, Alber KJ and Scharrer I. (2013) Long term outcome and sequelae in patients after acute thrombotic thrombocytopenic purpura episodes. *Hamostaseologie*, 33: 113-20
- (121) Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S and Hahn S. (2005) Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol*, 66: 1146-54
- (122) Massberg S, Grahl L, Von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT and Engelmann B. (2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*, 16: 887-96
- (123) Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA and Wagner DD. (2012) Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*, 10: 136-44

- (124) Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F and Esmon CT. (2009) Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*, 15: 1318-21
- (125) Chen J, Fu X, Wang Y, Ling M, McMullen B, Kulman J, Chung DW and Lopez JA. (2010) Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13. *Blood*, 115: 706-12
- (126) Raife TJ, Cao W, Atkinson BS, Bedell B, Montgomery RR, Lentz SR, Johnson GF and Zheng XL. (2009) Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site. *Blood*, 114: 1666-74
- (127) Westwood JP, Langley K, Heelas E, Machin SJ and Scully M. (2014) Complement and cytokine response in acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br J Haematol*, 164: 858-66
- (128) Tati R, Kristoffersson AC, Stahl AL, Rebetz J, Wang L, Licht C, Motto D and Karpman D. (2013) Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency in human and murine thrombotic microangiopathy. *J Immunol*, 191: 2184-93
- (129) Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tyden H, Lood C, Truedsson L, Bengtsson AA and Blom AM. (2012) Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol*, 188: 3522-31
- (130) Jagels MA, Daffern PJ and Hugli TE. (2000) C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. *Immunopharmacology*, 46: 209-22
- (131) Peng Q, Li K, Sacks SH and Zhou W. (2009) The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8: 236-46
- (132) Van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, Hutten BA, Van Mierlo GJ, Solati S, Middeldorp S, Meijers JC and Zeerleder S. (2013) Circulating nucleosomes and

neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33: 147-51

(133) Noris M, Mescia F and Remuzzi G. (2012) STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol*, 8: 622-33

(134) Karpman D and Tati R. (2013) Complement activation in thrombotic microangiopathy. *Hamostaseologie*, 33: 96-104

(135) Hynynen MM and Khalil RA. (2006) The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 1: 95-108

(136) Motte S, Mcentee K and Naeije R. (2006) Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther*, 110: 386-414

(137) Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Kanno K, Eguchi S and Marumo F. (1992) Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol*, 44: 2409-11

(138) Kahaleh MB and Fan PS. (1997) Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol*, 15: 163-7

(139) Yeager ME, Belchenko DD, Nguyen CM, Colvin KL, Ivy DD and Stenmark KR. (2012) Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46: 14-22

(140) Zarpelon AC, Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Carregaro V, Souza GR, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ and Verri WA, Jr. (2012) Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via TNF α and CXCL1/CXCR2 in mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 90: 187-99

(141) Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, Lopez JA and Afshar-Kharghan V. (2005) Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med*, 201: 871-9

(142) Stahl AL, Vaziri-Sani F, Heinen S, Kristoffersson AC, Gydell KH, Raafat R, Gutierrez A, Beringer O, Zipfel PF and Karpman D. (2008) Factor H dysfunction in patients with atypical hemolytic uremic syndrome contributes to complement deposition on platelets and their activation. *Blood*, 111: 5307-15

(143) Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Introna M, Mantovani A and Dobrina A. (1997) The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med*, 185: 1619-27

(144) Fang W, Guo ZH, Zhang BQ, Wu XF, Li P, Lv FL and Su L. (2009) [Effect of C5a on expression of thrombomodulin in endothelial cells in vitro]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 21: 168-71

(145) Van De Wouwer M, Plaisance S, De Vriese A, Waelkens E, Collen D, Persson J, Daha MR and Conway EM. (2006) The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis. *J Thromb Haemost*, 4: 1813-24

(146) Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G and Conway EM. (2009) Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 361: 345-57

(147) Turner NA and Moake J. (2013) Assembly and activation of alternative complement components on endothelial cell-anchored ultra-large von Willebrand factor links complement and hemostasis-thrombosis. *PLoS One*, 8: e59372

(148) Feng S, Liang X, Cruz MA, Vu H, Zhou Z, Pemmaraju N, Dong JF, Kroll MH and Afshar-Kharghan V. (2013) The interaction between factor H and Von Willebrand factor. *PLoS One*, 8: e73715

(149) Rayes J, Roumenina LT, Dimitrov JD, Repesse Y, Ing M, Christophe O, Jokiranta TS, Halbwachs-Mecarelli L, Borel-Derlon A, Kaveri SV, Fremeaux-Bacchi V and

Lacroix-Desmazes S. (2014) The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood*, 123: 121-5

(150) Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A and Muller B. (2007) Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium*, 14: 345-51

(151) Gombos T, Forhecz Z, Pozsonyi Z, Wallentin S, Papassotiriou J, Kunde J, Morgenthaler NG, Janoskuti L and Prohaszka Z. (2009) Adrenomedullin and endothelin-1 are related to inflammation in chronic heart failure. *Inflamm Res*, 58: 298-305

(152) Jankowska EA, Filippatos GS, Von Haehling S, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Cicoira M, Schefold JC, Rozentryt P, Ponikowska B, Doehner W, Banasiak W, Hartmann O, Struck J, Bergmann A, Anker SD and Ponikowski P. (2011) Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1. *PLoS One*, 6: e14506

(153) Silva Marques J, Martins SR, Calisto C, Goncalves S, Almeida AG, De Sousa JC, Pinto FJ and Diogo AN. (2013) An exploratory panel of biomarkers for risk prediction in pulmonary hypertension: emerging role of CT-proET-1. *J Heart Lung Transplant*, 32: 1214-21

(154) Wada H, Kaneko T, Ohiwa M, Tanigawa M, Tamaki S, Minami N, Takahashi H, Deguchi K, Nakano T and Shirakawa S. (1992) Plasma cytokine levels in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 40: 167-70

(155) Wada H, Kaneko T, Ohiwa M, Tanigawa M, Hayashi T, Tamaki S, Minami N, Deguchi K, Suzuki K, Nakano T and Et Al. (1993) Increased levels of vascular endothelial cell markers in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 44: 101-5

(156) Marsden PA and Brenner BM. (1992) Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol*, 262: C854-61

(157) Yang LL, Arab S, Liu P, Stewart DJ and Husain M. (2005) The role of endothelin-1 in myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: old lessons and new insights. *Can J Physiol Pharmacol*, 83: 47-62

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

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

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

10.2. 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

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném kifejezni köszönetem és hálám témavezetőmnek, Prof. Prohászka Zoltánnak, a sok türelemért, tanácsért, segítségért, irányadásért, kutatásban való részvételi lehetőségért, szakmai és emberi támogatásáért, valamint a rengeteg lehetőségért, hogy résztvehettem hazai és nemzetközi konferenciákon.

Köszönettel tartozom továbbá Témavezetőmnek, hogy felhívta a figyelmemet a kutatói munka fontosságára, szépségeire, hogy segített a kutatói gondolkodás kialakításában és rámutatott a jelentéktelen vélt eredményben rejlő potenciálra is.

Hálával tartozom Karádi István Professzor Úrnak, hogy lehetőséget teremtett PhD munkám elvégzéséhez a Semmelweis Egyetem III. Számú Belgyógyászati Klinikáján.

Köszönöm kollegiális együttműködésüket társszerzőimnek, Dr. Farkas Péternek, Dr. Demeter Juditnak, Dr. Domján Gyulának, Dr. Radványi Gáspárnak, Dr. Rázsó Katalinnak, Dr. Réti Mariennek és Dr. Schlammadinger Ágotának.

Külön köszönettel tartozom az endotél-munkacsoport tagjainak Dr. Cervenák Lászlónak és Kajdácsi Erikának, hogy más meglátásukkal, kritikájukkal, hasznos tanácsaikkal elősegítették eredményeim csiszolását, jobb interpretálását. Köszönöm, hogy a labormunka terén is mindig készségesen segítségemre voltak.

Baráti köszönettel tartozom Dr. Sinkovits Györgynek, aki mind szakmai mind magyar nyelvtani készségeivel hozzájárult dolgozatom érthetőségéhez, minőségéhez.

Köszönettel tartozom Dr. Varga Liliána Ágnesnek a házi opponensi véleményezéséért, a jó kritikáiért és meglátásokért.

Hálásan köszönöm Dóczy Andrásnének, Szendrei Zsuzsannának, Kertész Lászlónének és Szigeti Antalnének a laborban nyújtott segítséget, továbbá Holeczky Rudolfnének a készséges segítségét a hivatalos ügyek lebonyolításában.

Továbbá köszönöm a labor többi munkatársainak a kedvességét, barátságát, szakmai segítségét, így: Prof. Farkas Henriettének, Dr. Csuka Dorottyának, Dr. Gombos Tímeának, Schwaner Endrének, Dr. Kőhalmi Kinga Viktóriának, Mező Blankának,

Veszeli Nórának, Garam Nórának, Takács Beátának, Szabó Edinának, Nagy-Debreczeni Mártának és Trojnár Eszternek.

Végül de nem utolsó sorban hálásan köszönöm feleségem, Mikes-Kovács Sára türelmét és szeretetét, szüleim Mikes Balázs és Mikesné Antóczi Krisztina, valamint testvéreim és családom többi tagjának kitartó, megértő támogatását.



Regular Article

Elevated plasma neutrophil elastase concentration is associated with disease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura



Bálint Mikes^a, György Sinkovits^a, Péter Farkas^a, Dorottya Csuka^a, Ágota Schlammadinger^b, Katalin Rázsó^b, Judit Demeter^c, Gyula Domján^c, Marienn Réti^d, Zoltán Prohászka^{a,*}

^a 3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

^b 2nd Department of Internal Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^c 1st Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest

^d Department of Hematology and Stem Cell Transplantation, St István and St László Hospital, Budapest

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2013

Received in revised form 7 January 2014

Accepted 27 January 2014

Available online 1 February 2014

Keywords:

Polymorphonuclear leukocyte
neutrophil granulocyte
elastase
thrombotic thrombocytopenic purpura
disease activity
complement activation

ABSTRACT

Introduction: Genetic and autoimmune risk factors contribute to the development of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) but triggers are needed to bring about acute disease.

The aim of the study was to investigate the association of neutrophil activation with acute TTP, to assess whether neutrophil activation changes during plasma exchange therapy and to show if complement- and neutrophil activation are parallel, characteristic processes in acute TTP.

Materials and Methods: Altogether 49 EDTA-plasma samples of 21 TTP patients with acute disease and 17 in remission were investigated along with 20 healthy controls.

A stable complex of PMNE-proteinase-inhibitor was measured by ELISA (Calbiochem, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany).

Results: Acute disease was associated with significantly increased PMNE levels, the group medians were similarly low in TTP patients in remission and in healthy controls. Increased PMNE levels were characteristic for hematologically active and ADAMTS13 deficient form of TTP. PMNE concentration inversely correlated to disease activity markers platelet count ($r = -0.349$, $p = 0.032$) and hemoglobin levels ($p = -0.382$, $p = 0.018$). Achievement of remission was associated with significant reduction of plasma PMNE levels ($p = 0.031$, Wilcoxon test). There was positive correlation between PMNE levels and complement activation markers C3a and Bb.

Conclusions: We report increased PMNE levels in acute TTP and showed its association to activity markers of acute TTP and complement activation. Effective treatment of an acute TTP episode resulted in marked decrease in PMNE levels. Our data support and extend previous observations that neutrophil extracellular traps may be released in acute TTP and potentially contribute to the pathophysiology of this disease.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Various etiological factors represent increased risk for the development of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), a life-threatening disorder. Characteristic clinical features of TTP are microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and various involvements of other organs, for example the kidneys and the nervous system [1,2]. In most cases development of functional inhibitors (autoantibodies) against the von Willebrand factor (VWF) cleaving protease (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin-1 like motifs-13, ADAMTS13) predispose to disease. Inherited variations of ADAMTS13 may also confer increased risk of TTP development, whereas a minor part of TTP patients presents with non-ADAMTS13 deficient disease form [3]. Severe deficiency of ADAMTS13 leads to the increased presence of unusually

large multimers of VWF that promote the formation of platelet rich thrombi in the capillaries and small vessels leading to tissue ischemia and organ failure [4].

However, ADAMTS13 deficient patients may remain asymptomatic for several years [5,6]. Furthermore, several patients may go into sustained clinical remission despite deficient ADAMTS13 activity [7,8]. In addition, although patients with acute TTP often present without acute disease in history, in the majority of TTP patients infections or pregnancy precede the acute disease flare [9]. These well-known clinical observations collectively indicate that multiple hits may be necessary for the development of clinically active TTP, and ADAMTS13 deficiency, even though it is probably the most important predisposing risk factor, it is alone not sufficient to cause acute TTP.

Previously our group reported on the presence of complement activation in patients with acute TTP [10] an observation recently confirmed in an independent cohort [11]. Our data indicated that activation of the classical/lectin and alternative pathways that lead to the activation of the terminal pathway was present in TTP. It is known

* Corresponding author at: H-1125 Budapest, Kútvolgyi st. 4. Tel.: +36 1 3251379, +36 20 8250962; fax: +36 1 225 3899.

E-mail address: prohoz@kut.sote.hu (Z. Prohászka).

that activation of the complement system and of neutrophil granulocytes is characteristic for most infections and also in pregnancy, especially if complicated with preeclampsia and/or fetal growth restriction [12,13]. Therefore, we hypothesized that neutrophil activation may associate with acute, ADAMTS13-deficient TTP and potentially contribute to the development of clinically active thrombotic microangiopathy. Supporting this hypothesis were results of a recent study showing increased circulating DNA and myeloperoxidase levels in patients suffering from thrombotic microangiopathies (TMAs) [14]. Hence, the aim of the current study was to formally investigate the association of neutrophil activation with acute TTP, to assess whether neutrophil activation changes during plasma exchange therapy and to show if complement- and neutrophil activation are parallel, characteristic processes in acute TTP.

Materials and Methods

Patients and Plasma Samples

Thirty-eight patients with TTP were enrolled in this single-research laboratory based investigation providing diagnostic services (ADAMTS13 and complement measurements) since August, 2007 for patients suspected to have HUS or TTP in Hungary. The patient enrolment for

this study was closed in January, 2011. The criteria used to guide patient stratification, diagnosis and sample selection have been described in details [10]. Briefly, diagnosis of TTP was based on one or more episodes of Coombs-negative microangiopathic hemolytic anemia with thrombocytopenia defined as serum lactate dehydrogenase (LDH) >450 U/L; fragmented erythrocytes in the peripheral blood smear and platelet count <150 G/L; only patients with severely decreased ADAMTS13 activity levels (<5%), or history of it, were included in this study. Patients with acute oligo-anuric renal failure were excluded from the study. Hematological remission (HR) was determined when platelet counts were >150 G/L on two consecutive days without any sign of hemolysis even if there were any neurological, renal or other residual clinical symptoms, whereas complete remission (CR) was established when, platelet count remained above the lower limit continuously for at least 1 month.

Table 1 shows clinical and laboratory data of the cohort who had available plasma samples for the current study. Using samples of this TTP cohort we measured plasma polymorphonuclear cell elastase (PMNE) levels during acute disease flare, in remission, and for comparison in controls. Samples of 38 TTP patients have been investigated. Twenty-one patients with acute disease (mean age 40 years, SD 15, 17 women), 17 TTP patients in remission (mean age 42 years, SD 10, 14 women) and 20 healthy age- and sex matched controls (mean age 35 years, SD 17, 15 women) were enrolled. Eight patients with acute

Table 1
Clinical and laboratory data of the 38 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura.

Registry code	Age at blood sampling (years)	Sex	Acute/Remission	ADAMTS13 activity of patient's sample (FRET5-VWF73); reference range 67-147%	ADAMTS13 activity of mixed sample (patient's plasma with pooled plasma 1:1) (FRET5-VWF73); reference range >50% of the daily control sample	Hemoglobin; reference ranges, females 123-153 g/L, males 140-175 g/L	Platelets; reference range 150-400 G/L	White Blood Cells; reference range 4-10 G/L	Absolute neutrophil count; reference range 2.12-7.5 G/L	PMN elastase proteinase inhibitor complex (ng/mL)
HUN1	26	F	Acute	0	0	80	33	31,50	25,51	3,10
HUN15	55	M	Acute	0	0	108	22	12,06	10,61	0,82
HUN23	38	M	Acute	0	30	91	45	6,40	3,21	0,63
HUN43	62	F	Acute	0	26	72	28	6,53	5,68	0,53
HUN50	17	F	Acute	0	9	76	17	11,20	7,71	2,72
HUN56	44	F	Acute	0	0	83	44	6,81	4,44	0,57
HUN62	35	F	Acute	0	11	81	18	11,63	9,13	1,76
HUN68	43	M	Acute	5	6	64	9	6,30	4,38	1,15
HUN72	13	F	Acute	0	0	72	84	10,80	8,48	5,61
HUN76	57	F	Acute	0	23	85	30	7,11	5,02	2,46
HUN85	49	F	Acute	0	0	85	31	11,34	10,26	0,62
HUN86	42	F	Acute	0	5	78	12	5,37	3,17	0,91
HUN96	22	F	Acute	5	23	53	23	7,16	4,48	1,59
HUN97	51	F	Acute	0	15	126	43	12,19	5,88	1,01
HUN112	71	F	Acute	0	ND	103	44	3,69	2,14	0,72
HUN113	25	F	Acute	0	0	109	22	10,45	6,21	4,19
HUN123	45	F	Acute	0	18	97	76	32,82	12,61	2,92
HUN126	36	M	Acute	0	0	69	43	6,79	3,63	1,81
HUN127	30	F	Acute	0	0	75	12	8,93	8,09	1,90
HUN131	44	F	Acute	0	0	126	48	11,12	7,77	0,49
HUN134	44	F	Acute	0	0	80	19	7,99	5,84	1,08
HUN3	40	M	Remission	0	30	154	244	10,51	8,20	0,54
HUN28	36	F	Remission	68	61	NA	213	NA	NA	0,88
HUN31	33	F	Remission	0	29	153	275	6,82	3,41	0,47
HUN35	37	F	Remission	0	0	123	272	18,70	10,28	0,86
HUN53	51	F	Remission	0	18	135	174	6,85	4,67	0,57
HUN54	56	F	Remission	104	ND	140	115	6,11	3,92	12,00
HUN58	46	F	Remission	74	ND	136	158	5,71	3,31	0,49
HUN59	44	F	Remission	112	ND	119	184	5,85	3,35	0,81
HUN65	35	F	Remission	0	44	150	388	15,70	11,41	4,22
HUN70	47	F	Remission	97	33	NA	213	NA	NA	0,73
HUN78	47	F	Remission	0	0	134	210	7,94	4,64	0,55
HUN80	31	M	Remission	109	87	169	246	9,68	4,84	1,13
HUN81	21	F	Remission	7	20	124	308	22,93	19,42	1,05
HUN89	33	M	Remission	0	23	156	260	5,37	2,84	0,54
HUN100	40	F	Remission	109	75	144	213	5,88	3,65	0,47
HUN101	61	F	Remission	79	65	123	196	6,89	5,49	0,58
HUN115	51	F	Remission	19	ND	149	433	12,99	10,05	0,42

NA: not available; ND: not done.

TTP had available follow-up plasma samples. Six of them (patient's registry codes 1, 15, 62, 68, 86, 127) had plasma samples taken in hematological remission, after finishing the PEX series. Five of them (registry codes 68, 86, 126, 127, 131) had plasma samples taken during PEX series, before reaching hematological remission. Thus, altogether 49 EDTA-plasma samples were used for PMNE determination.

Blood samples (EDTA-anticoagulated plasma and sodium-citrate anticoagulated plasma) were taken by antecubital venipuncture or from central catheter, cells and supernatant separated by centrifugation and shipped in cooled packages (-20 degrees of Celsius) to the Research Laboratory, where aliquots were made and stored in ultrafreezers on <-70 degrees of Celsius until determinations.

From each subject, informed consent was obtained and the study was approved by the institutional Ethics Committee on human research.

Determination of Plasma Polymorphonuclear Cell Elastase (PMNE) Levels and other Laboratory Parameters

A stable complex of PMNE- α 1-proteinase-inhibitor was measured by sandwich type ELISA (QIA96, Calbiochem, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), according to the instructions given by the manufacturer.

The fluorogenic substrate, FRET5-VWF73, was applied for the determination of ADAMTS13 enzyme activity as described [15]. Briefly, citrated plasma was diluted 1:20 in assay buffer (5 mmol/l Bis-Tris, 25 mmol/l CaCl_2 , 0.005% Tween 20, pH 6.0) and mixed with 5 $\mu\text{mol/l}$ FRET5-VWF73 substrate solution (20 μl each), in white 384-well plates. Fluorescence was measured at 37 °C every 2 minutes for 1 hour in Chameleon microplate reader (Hidex, Turku, Finland) equipped with a 340 nm excitation and a 460 nm emission filter. The reaction rate was calculated by linear regression analysis of fluorescence over time. A two-fold dilution series of normal human plasma (mixed from citrated plasma samples of 10 healthy blood donors) was applied as standard curve, 100% ADAMTS13 activity was set at the reaction rate observed in the 1:20 diluted sample. The intra-assay variation coefficient was $<5\%$, the inter-assay CV was 6–9% (measured at 60 and 100% activity levels). The presence of anti-ADAMTS13 inhibitors was determined by mixing 1 part of the patient's sample with 1 part of normal pooled plasma, incubation at 37 degrees of Celsius for 2 hours, and measurement of ADAMTS13 activity of the sample. The presence of ADAMTS13 inhibitors was considered if the patient's original sample had $<7\%$ activity, and that of the mixed sample was $<50\%$.

Levels of complement activation products C3a (MicroVue C3a desarg EIA A031, mean of healthy controls 129.6 ng/mL), Bb (MicroVue Bb EIA, A027, mean + 2SD range 0.49–1.42 $\mu\text{g/mL}$) were determined with commercial Kits (Quidel, San Diego, California, USA) according to the manufacturer's instructions in EDTA plasma samples.

Statistical Analysis

The continuous variables reported in this study showed skewed distribution and according to results of Shapiro-Willk's test deviated from the normal distribution. Therefore, for descriptive purposes the values of each measurement are given as median and 25th–75th percentile, or as numbers (percent) and non-parametric tests were used for group comparisons; continuous variables between two groups were compared with Mann-Whitney U test, for three or more groups with the Kruskal-Wallis ANOVA by ranks test, and for repeated measures with the Friedman test. Dunn's post-test was used for group comparisons after analysis of variance. Spearman's correlation coefficients were calculated by non-parametric method. Statistical analyses were carried out using STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Softwares Inc., CA, USA) softwares. Two tailed p values were calculated and the significance level was put at a value of $p < 0.050$.

Results

Acute TTP is Associated with Increased PMNE Levels

Table 1 shows clinical and laboratory data of the cohort. All of the patients in acute disease flare ($n = 21$) were ADAMTS13 deficient (activity $<5\%$) and positive for anti-ADAMTS13 inhibitors. Samples for PMNE determinations were taken before the initiation of a series of plasma exchange sessions in 13 patients, whereas for the remaining 8 cases sampling was done during the PEX series. Seventeen patients were enrolled in complete remission, 8 of them were ADAMTS13 deficient (1 patient had 7% activity and was positive for inhibitor), 8 patients had ADAMTS13 activity within the reference range, and 1 patient had moderately decreased level. Increased absolute neutrophil counts were not associated with acute TTP (Table 1), the median (IQR) values for acute patients was 6.0 G/L (4.4–9.7) whereas for patients in remission 4.7 G/L (3.4–9.1; $p = 0.223$).

Acute disease was associated with significantly increased PMNE levels, whereas the group medians were similarly low in TTP patients in remission and in healthy controls (Fig. 1). Patients in remission with (0.54 ng/mL, 0.53–0.86) or without (0.73 ng/mL, 0.48–1.00) ADAMTS13 deficiency had similar PMNE levels ($p = 0.680$). Furthermore, increased PMNE levels and deficient ADAMTS13 activity together characterized hematologically active disease ($\text{plt} < 150$ G/L, Fig. 2, panel A). Note, that there were no patients in our cohort with non-deficient ADAMTS13 activity and decreased platelet counts. In line with this observation there was a significant association between amounts of functional ADAMTS13 inhibitors (as assessed by measuring the ADAMTS13 activity of the mixed patient/normal plasma samples) and PMNE levels (Fig. 2, panel B). There was no significant correlation between ADAMTS13 activity (measured in patient's own samples) and PMNE levels (data not shown). Similarly, no association between PMNE levels and neutrophil counts was observed ($r = -0.381$, $p = 0.064$, data not shown) and neutrophil counts were similar in acute and remission groups, excluding the possibility of the mere reflection of higher neutrophil counts by increased PMNE levels. Finally, we investigated changes of PMNE levels during therapy. There were 5 patients with available samples before the initiation of PEX series, and during that. In 4 out of the 5 patients, PMNE levels decreased by 40–60%, whereas in one patient it increased by 187%. Similarly, we investigated PMNE levels in samples of 6 patients (4 women) with available samples collected on the day of admission, before the initiation of PEX series, and also in hematological remission at least 1 week after the last session of the PEX series. As shown in Fig. 3, achievement of remission was associated with significant reduction of circulating plasma PMNE levels in patients with TTP.

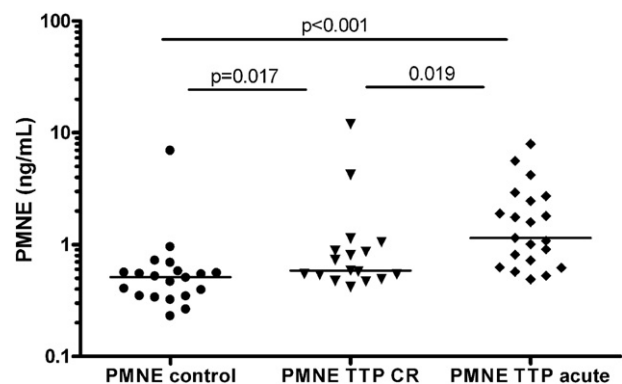


Fig. 1. Neutrophil elastase (PMNE) is marker of acute TTP. (A) Plasma neutrophil-elastase- α 1-proteinase inhibitor complex (Calbiochem, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) was measured in EDTA-plasma samples of healthy controls, TTP patients in complete remission) and in TTP patients with acute disease flare. Horizontal lines indicate group median, P values were obtained by Mann-Whitney test.

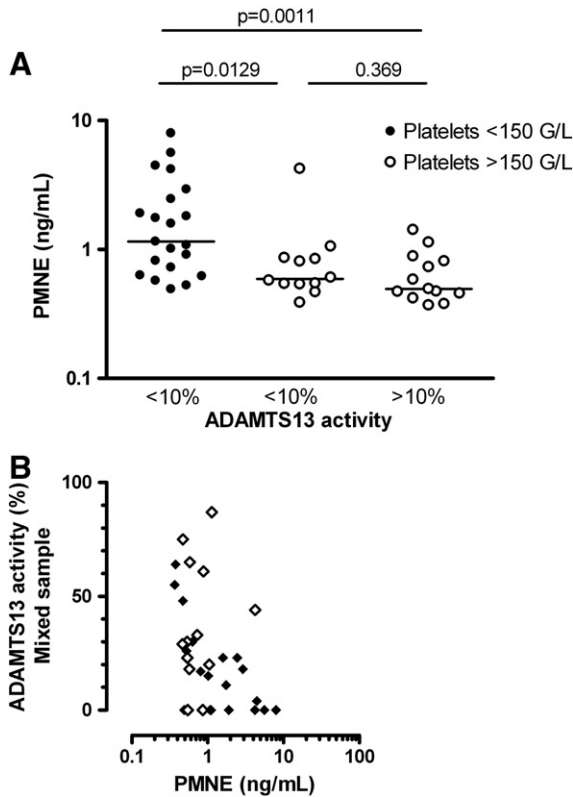


Fig. 2. (A) Elevated PMNE level together with deficient ADAMTS13 activity is characteristic for hematologically active TTP. Analysis of 46 samples of patients with hematologically active TTP (platelet below 150 G/L) or in hematological remission (platelet above 150 G/L), as stratified by the presence of ADAMTS13 deficiency (activity <5%). P values were obtained by Mann-Whitney test. (B) Correlation between functional ADAMTS13 inhibitor and PMNE concentrations. Inhibitors against ADAMTS13 were assessed in 33 samples of patients with TTP by mixing studies as described in the Materials and Methods section. Samples taken in acute TTP are marked with closed symbols, whereas those taken in remission are marked with open symbols. Horizontal lines indicate group median, correlation coefficient with p value was calculated by Spearman's non-parametric method: pooled analysis $r = -0.428$, $p = 0.013$; acute TTP: $r = -0.547$, $p = 0.012$; TTP in remission: $r = 0.171$, $p = 0.577$.

Association between PMNE Levels, Activity Markers of TTP and Complement Activation Products

Next, correlations between TTP activity markers and PMNE levels were analyzed. The amount of PMNE showed inverse correlation to

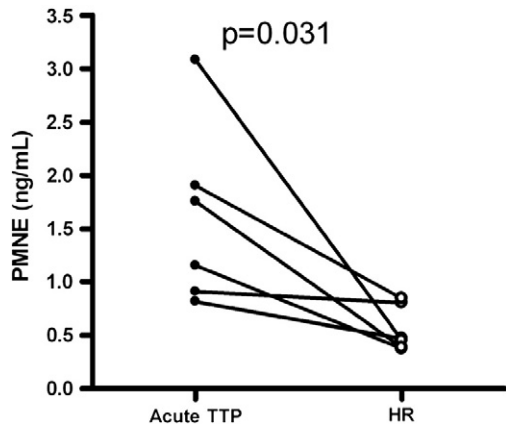


Fig. 3. Changes of plasma neutrophil elastase (PMNE) levels during treatment of acute disease flare in TTP. Comparison of PMNE concentrations in plasma from 6 patients (4 women) with TTP collected at the presentation with acute disease (acute TTP) or in hematological remission (HR). P value was obtained by Wilcoxon test.

platelet count and hemoglobin levels in the whole TTP cohort (Fig. 4, panel A and B). Fourteen patients with acute TTP received packed red blood cells before sampling for PMNE determinations. The significant inverse association is present between PMNE and hemoglobin levels if these subjects are excluded from the analysis presented on Fig. 4B ($r = -0.427$, $p = 0.037$). Result of stratified correlation analysis (although underpowered due to low patient numbers) is presented in legend for Fig. 4.

In a subset of these patients levels of complement factors and activation products have been measured previously. Increased levels of C3a and terminal pathway complex (TCC) were observed in acute TTP [10]. Therefore, we analyzed if any of the complement factors or activation products show association with activity markers of neutrophils. As shown in Fig. 5, concentrations of the activity marker of the alternative pathway convertase's enzymatic component Factor B (Bb, $r = 0.392$, $p = 0.015$) and anaphylatoxin C3a ($r = 0.367$, $p = 0.024$) showed significant, positive correlation to PMNE levels. No other significant correlation between complement components (C3, Factors B, H, I, $r = -0.171, -0.287, 0.015, 0.255$, respectively, all $p > 0.05$) or activation products (C1r-C1s-C1-inhibitor, C4d, C3bBbP, TCC, 0.025, 0.058, 0.017, 0.199, respectively, all $p > 0.05$) and PMNE concentration was observed.

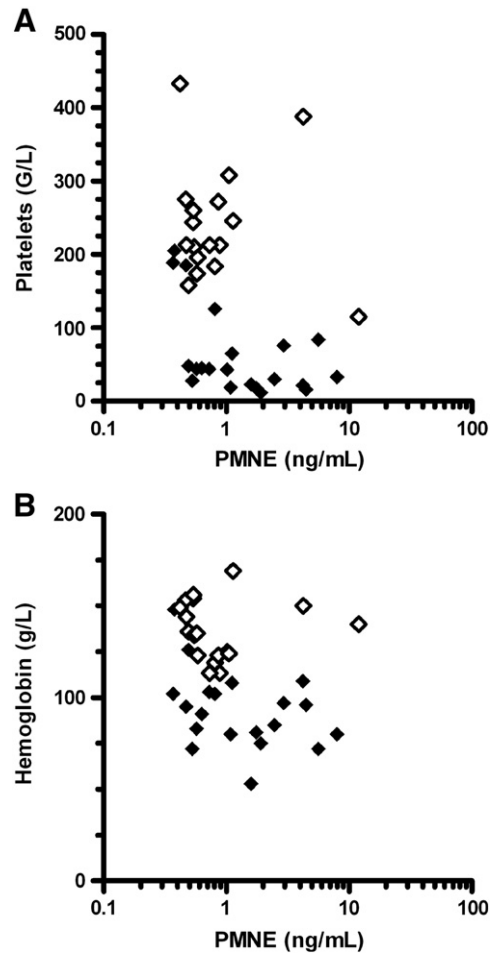


Fig. 4. Association of plasma neutrophil elastase (PMNE) levels with disease activity markers in TTP. Correlation coefficients and p values between plasma PMNE levels and platelet counts (A) or hemoglobin levels (B) were calculated by the Spearman non-parametric method (Panel A, pooled analysis: $r = -0.483$, $p = 0.006$; acute TTP: -0.521 , $p = 0.015$; TTP in remission: $r = -0.086$, $p = 0.743$; Panel B, pooled analysis: $r = -0.382$, $p = 0.018$, acute TTP: -0.353 , $p = 0.116$; TTP in remission: $r = -0.257$, $p = 0.318$). Samples taken in acute TTP are marked with closed symbols, whereas those taken in remission are marked with open symbols.

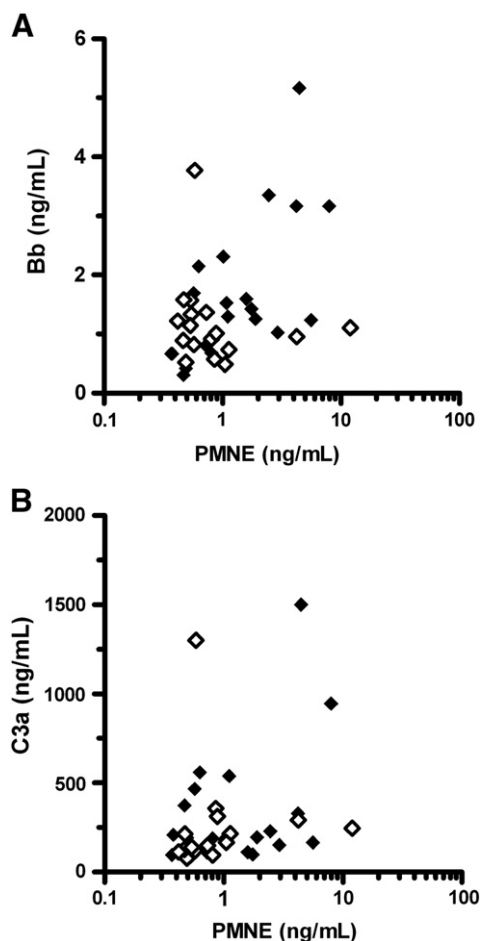


Fig. 5. Association of plasma neutrophil elastase (PMNE) levels with complement activation products in TTP. Correlation coefficients and p values between plasma PMNE levels and activated factor B (Bb) (**panel A**) or anaphylatoxin C3a (**panel B**) levels were calculated by the Spearman non-parametric method (Panel A $r = 0.392$, $p = 0.015$; Panel B $r = 0.367$, $p = 0.024$). Samples taken in acute TTP are marked with closed symbols, whereas those taken in remission are marked with open symbols.

Discussion

Here we report on two novel findings. First, in a well-characterized, homogenous ADAMTS13-deficient, inhibitor positive cohort of TTP patients elevated neutrophil activation marker, PMNE, was shown to be increased in acute disease flare. PMNE levels were directly related to disease activity markers hemoglobin and platelet count, and correlated with the amounts of functional ADAMTS13 inhibitor. Second, according to the presented data, neutrophil- and complement activation are present parallel in acute TTP and correlate to each other.

The potential link between thrombotic microangiopathy and neutrophils was first studied and characterized in *E. coli* caused typical HUS. Increased initial neutrophil count was shown to be predictive for bad outcome in D + HUS [16]. Further, neutrophil markers (elastase, myeloperoxidase and IL-8) were elevated and linked to endothelial cell damage and thrombin activity in typical HUS [17]. Similar observations have been reported for a few diarrhea negative HUS patients [18]. Recently, elevated myeloperoxidase and circulating DNA levels were shown in patients with various forms of TMA (ADAMTS13 deficient TTP, D + HUS, tumor-associated TMA and TMA of with unknown etiology). Increased plasma DNA and MPO levels together with ADAMTS13 deficiency characterized the acute disease state in patients with acquired TTP. Authors concluded that circulating DNA and histones in patients with TMA could have originated from neutrophil extracellular traps (NETs) [14].

Neutrophils release processed chromatin termed neutrophil extracellular traps (NETs) to trap and kill pathogens [19]. NETs are implicated in immune defense [20], sepsis [21] and autoimmunity [22]. NET is formed by a DNA-histones scaffold that contains granule proteins such as elastase and myeloperoxidase, as well as antimicrobial peptides [23]. Results obtained in PMNE knock-out mice showed that these animals do not form NETs in a pulmonary model of bacterial infection [24]. These and other studies [24] collectively demonstrated that PMNE is essential for the initiation of NET formation and is externalized together with NETs after stimulation of neutrophils. Therefore, based on our results we conclude that the increased PMNE levels in acute TTP may originate from neutrophils in a process of cell activation and NET release. Our observations independently confirm the results of Fuchs et al., regarding the contribution of neutrophil activation to the pathogenesis of acute TMAs, and its correlation to disease activity.

Activation of neutrophils, as assessed by a specific biomarker, elastase, is characteristic for hematologically active TTP. Patients with >150 G/L platelet counts and deficient ADAMTS13 activity had similar mean PMNE level to those in remission without ADAMTS13 deficiency (Fig. 2), and also similar to healthy controls (Fig. 1). Furthermore, treatment of acute TTP by a series of PEX sessions resulted decrease of PMNE levels in the majority of patients during PEX, whereas the reduction was significant (Fig. 3) after reaching of hematological remission. These results support the multiple hit concept in the pathogenesis of TMAs, specifically, TTP. Acute TMA flares often follow infections or precipitate during or after pregnancy and neutrophil activation is known to be increased in these clinical states [9]. In genetically (rare or common variants in ADAMTS13) or immunologically (ADAMTS13 inhibitors) predisposed individuals, activation of neutrophils and release of NETs may precipitate acute TTP by multiple mechanisms. As shown in mouse model, DNA and histones stimulate thrombosis and promote cytotoxicity [25–27]. In addition, reactive oxygen species released by activated neutrophils have prothrombotic effect, mediated in part by inhibition of VWF cleavage by ADAMTS13 [28]. Finally, leukocyte proteases including elastase cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site and may therefore participate in the proteolytic regulation of VWF [29].

Furthermore, NETs may activate complement leading to C3b deposition to NET components and generation of C5a [30]. Previously we [10] and others [11] documented the activation of the classical/lectin, the alternative and the terminal pathways of complement in TTP. Our current results indicate the association between PMNE and C3 activation (C3a), and the presence of NETs may be a potential link between these factors. The presence of correlation between PMNE and Bb levels point to the initiation of alternative amplification loop extending complement activation. Complement activation attracts and activates neutrophils [31,32], and in turn may exacerbate NET release, initiating a positive feed-back loop. These observations are in line with the recent report on the association among circulating nucleosomes, activated neutrophils (as indicated by increased neutrophil elastase- α 1-antitrypsin complexes), and presence of deep vein thrombosis [33]. Taken together, evolutionarily conserved innate mechanisms acting in concert may stimulate thrombosis, endothelial damage [34,35] and contribute to the precipitation of acute TTP.

Currently PMNE measurement is possible only by manual immuno- and enzymatic assays, therefore this restricted availability and relatively high costs limit its potential clinical application. However, if these observations can be repeated in independent cohorts markers of neutrophil activation may potentially help to stratify patients between therapeutic modalities and to guide time and frequency of plasma exchange treatment.

We acknowledge potential limitations of our study. TTP is a rare disorder, and we were unable to enrol more patients in a reasonable short time-frame allowing the correct analysis of elastase and neutrophil activation. Therefore, due to the low number of patients some of the

analysis presented here are underpowered, there is a possibility for the presence of false negative or false positive conclusions in the results (especially for the correlation analysis), and therefore some of the conclusions have to be taken as preliminary, until independent confirmation is published.

In conclusion, we report the association of increased plasma neutrophil elastase levels with acute TTP. Increased PMNE levels were directly related to hematologically active TTP, to functional ADAMTS13 inhibitors, disease activity markers of acute TTP (hemoglobin concentrations and platelet counts) and complement activation markers of the alternative pathway. Effective treatment of an acute TTP episode resulted in marked decrease in PMNE levels. Our data lend credence to the hypothesis that neutrophil extracellular traps may be released in acute TTP and may potentially contribute to the pathophysiology of this disease. We identified complement activation products associated with high PMNE levels indicating for the presence of a potential positive feed-back loop between innate mechanisms behind the precipitation of acute TTP.

Conflicts of Interest Statement

None to Declare.

Acknowledgements

The authors are grateful for the patients for their participation in the study and for the excellent technical support from Szigeti Antalné, Márta Kókai, Zsuzsanna Szendrei and Holeczky Rudolfiné. The study was financially supported by a grant from National Research Fund of Hungary (T100687 to ZP). The authors are grateful for the expert medical support and sharing of clinical data to Krisztina Madách, Csaba Bereczki, Attila J Szabó, György S Reusz, Gáspár Radványi, and Klára Gadó.

Addendum

Study concept and design: M Réti, P Farkas and Z Prohászka. Experimental procedures: B

Mikes and G Sinkovits and D Csuka. Acquisition of data: M Réti, P Farkas, K Rázsó, Á

Schlamadinger, J Demeter, G Domján, Analysis and interpretation of data: Z Prohászka, D

Csuka, M Réti, P Farkas Critical writing of the manuscript: M Réti, P Farkas, Z Prohászka

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: B Mikes, M Réti, P

Farkas, D Csuka, K Rázsó, Á Schlamadinger, J Demeter, G Domján, Obtaining funding: Z

Prohászka Study supervision: M Réti, Z Prohászka

References

- [1] Chapman K, Seldon M, Richards R. Thrombotic microangiopathies, thrombotic thrombocytopenic purpura, and ADAMTS-13. *Semin Thromb Hemost* 2012;38(1):47–54.
- [2] Clark WF. Thrombotic microangiopathy: current knowledge and outcomes with plasma exchange. *Semin Dial* 2012;25(2):214–9.
- [3] Kremer Hovinga JA, Lammle B. Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:610–6.
- [4] Tsai HM. von Willebrand factor, shear stress, and ADAMTS13 in hemostasis and thrombosis. *ASAIO J* 2012;58(2):163–9.
- [5] Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, et al. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost* 2011;9(Suppl 1):283–301.
- [6] Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, Boisseau P, Galicier L, Azoulay E, et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2012;119:5888–97.

- [7] Peyvandi F, Lavoretano S, Palla R, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Battaglioli T, et al. ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica* 2008;93:232–9.
- [8] Chaturvedi S, Carcioppolo D, Zhang L, McCrae KR. Management and outcomes for patients with TTP: analysis of 100 cases at a single institution. *Am J Hematol* 2013.
- [9] Falter T, Alber KJ, Scharrer I. Long term outcome and sequelae in patients after acute thrombotic thrombocytopenic purpura episodes. *Hamostaseologie* 2013;33(2):113–20.
- [10] Reti M, Farkas P, Csuka D, Razzo K, Schlamadinger A, Udvardy ML, et al. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2012;10:791–8.
- [11] Westwood¹ J-P, Langley¹ K, Heelas¹ E, Machin¹ S, Scully² M. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Mol Immunol* December 15 2013;56(3):1.
- [12] Derzsy Z, Prohászka Z, Rigo Jr J, Fust G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol* 2010;47:1500–6.
- [13] Hung TH, Chen SF, Lo LM, Li MJ, Yeh YL, Hsieh TT. Myeloperoxidase in the plasma and placenta of normal pregnant women and women with pregnancies complicated by preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Placenta* 2012;33:294–303.
- [14] Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lammle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* 2012;120:1157–64.
- [15] Gombos T, Mako V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Harsfalvi J, et al. Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. *Thromb Haemost* 2009;102:573–80.
- [16] Walters MD, Matthei IU, Kay R, Dillon MJ, Barratt TM. The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1989;3:130–4.
- [17] Ishikawa N, Kamitsuji H, Murakami T, Nakayama A, Umeki Y. Plasma levels of granulocyte elastase-alpha1-proteinase inhibitor complex in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Pediatr Int* 2000;42:637–41.
- [18] Fitzpatrick MM, Shah V, Filler G, Dillon MJ, Barratt TM. Neutrophil activation in the haemolytic uraemic syndrome: free and complexed elastase in plasma. *Pediatr Nephrol* 1992;6:50–3.
- [19] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532–5.
- [20] Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012;198(5):773–83.
- [21] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007;13:463–9.
- [22] Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonemerck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009;15:623–5.
- [23] Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000639.
- [24] Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010;191:677–91.
- [25] Massberg S, Grahnl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010;16:887–96.
- [26] Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2012;10:136–44.
- [27] Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009;15:1318–21.
- [28] Chen J, Fu X, Wang Y, Ling M, McMullen B, Kulman J, et al. Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13. *Blood* 2010;115:706–12.
- [29] Raife TJ, Cao W, Atkinson BS, Bedell B, Montgomery RR, Lentz SR, et al. Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site. *Blood* 2009;114:1666–74.
- [30] Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tyden H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 2012;188:3522–31.
- [31] Jagels MA, Daffern PJ, Hugli TE. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. *Immunopharmacology* 2000;46(3):209–22.
- [32] Peng Q, Li K, Sacks SH, Zhou W. The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8:236–46.
- [33] van Montfort ML, Stephan F, Lauw MN, Hutten BA, Van Mierlo GJ, Solati S, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(1):147–51.
- [34] Karpman D, Tati R. Complement activation in thrombotic microangiopathy. *Hamostaseologie* 2013;33(2):96–104.
- [35] Noris M, Mescia F, Remuzzi G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol* 2012;8(11):622–33.



Corrigendum

Corrigendum to “Elevated plasma neutrophil elastase concentration is associated with disease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura”
[Thromb. Res. 133 (2014) 616–621]



Bálint Mikes^a, György Sinkovits^a, Péter Farkas^a, Dorottya Csuka^a, Ágota Schlammadinger^b, Katalin Rázsó^b, Judit Demeter^c, Gyula Domján^c, Marienn Réti^d, Zoltán Prohászka^{a,*}

^a 3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

^b 2nd Department of Internal Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^c 1st Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

^d Department of Hematology and Stem Cell Transplantation, St István and St László Hospital, Budapest, Hungary

The authors apologize for a misprint in the text and Table 1, Figs. 1., 2., 3., 4.: the PMNE values should be multiplied by 100.
The authors would like to apologise for any inconvenience caused.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.01.034>.

* Corresponding author at: H-1125 Budapest, Kútvölgyi st. 4, Hungary.

E-mail addresses: prohoz@kut.sote.hu, prohaszka.zoltan@med.semmelweis-univ.hu (Z. Prohászka).

Carboxiterminal pro-endothelin-1 as an endothelial cell biomarker in thrombotic thrombocytopenic purpura

Bálint Mikes¹; György Sinkovits¹; Péter Farkas¹; Dorottya Csuka¹; Katalin Rázsó²; Marienn Réti³; Gáspár Radványi⁴; Judit Demeter⁵; Zoltán Prohászka¹

¹3rd Department of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary; ²2nd Department of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; ³Department of Hematology and Stem Cell Transplantation, St István and St László Hospital, Budapest, Hungary; ⁴Department of Hematology, Semmelweis Hospital Miskolc, Miskolc, Hungary; ⁵1st Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Summary

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is characterised by the deficiency of the von Willebrand factor (VWF) cleaving protease (ADAMTS-13). Although several observations indicate an important role of endothelial activation in the pathogenesis of TTP, no reliable endothelial activation markers are available in the clinical management of TTP. Our aim was to investigate the presence of endothelial activation in TTP and to determine its connections with disease activity, therapy and complement activation. We enrolled 54 patients (median age 40.5; 44 females) and 57 healthy controls (median age 34; 30 females), VWF antigen, carboxiterminal-pro-endothelin-1 (CT-proET-1), complement Factor H and complement activation products (C3bBbP and SC5b-9) were measured. In both the acute and remission phase of TTP we found increased CT-proET-1 and VWF levels, while Factor H levels decreased compared with healthy controls. In remission, however, the elevated CT-proET-1 levels showed 22% de-

crease when compared with the acute phase in paired samples ($p=0.0031$), whereas no changes for VWF and Factor H levels were observed. We also found positive correlations between CT-proET-1 levels and alternative pathway activation markers (C3bBbP; $p=0.0360$; $r=0.4299$). The data we present here demonstrate a role of endothelium activation in patients with acute TTP. The finding that CT-proET-1 levels decreased in remission compared with the acute phase further supports endothelial involvement. In addition, we show that endothelial activation also correlated with the activation of the alternative complement pathway. The data suggest that complement and endothelium activation jointly contribute to the development of TTP episodes in patients with predisposition to TTP.

Keywords

TTP, endothelial cell, endothelin-1, ADAMTS13 deficiency, complement activation

Correspondence to:

Bálint Mikes, MD
Kútvölgyi st. 4
H-1125 Budapest, Hungary
Tel.: +361 208860893, Fax: +361 225 3899
E-mail: mikesbalint@gmail.com

Received: July 17, 2015

Accepted after major revision: December 2, 2015

Epub ahead of print: January 14, 2016

<http://dx.doi.org/10.1160/TH15-07-0564>

Thromb Haemost 2016; 115: 1034–1043

Supplementary Material to this article is available online at www.thrombosis-online.com.

Introduction

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is an acute, potentially life-threatening, rare disease belonging to the thrombotic microangiopathies. TTP is classically characterised by thrombocytopenia, microangiopathic haemolytic anaemia with the presence of fragmentocytes in the blood smear. Ultra-large von Willebrand Factor (ULVWF) was shown to be present in plasma samples of TTP patients (1), and more than a decade ago TTP was recognised to be associated with the deficiency of the VWF-cleaving protease ADAMTS-13 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin-1 like motifs-13) (2). VWF is a multimeric glycoprotein present in blood plasma, in the subendothelial matrix, as well as in storage granules in endothelial cells (Weibel-Palade bodies) and in platelets (alpha-granules) (3). Whereas alpha-granules release VWF predominantly upon platelet activation, endothelial cells combine basal and stimulated release of Weibel-Palade body

contents (4). ULVWF multimers released by endothelial cells rapidly undergo ADAMTS13-mediated cleavage. VWF has a crucial role in clot generation at the site of blood vessel damage, since anchored VWF multimers exert an adhesive potential for platelets (5). In case of ADAMTS13 deficiency, i.e. in patients with TTP, plasma VWF levels (especially in form of ULVWF) are increased (6) but it is currently unknown whether this increase is due to platelet or endothelial activation, or a combination of both.

It has been suggested that endothelial cell activation and dysfunction play a major role in the pathogenesis of various thrombotic microangiopathies including TTP. The terms endothelium activation or injury have been known for many years in connection with TMA as a key point in the pathogenesis. During endothelial cell perturbation the anticoagulant homeostasis of the endothelium is decreased and many factors and ligands such P-selectin, ICAM-1 are upregulated on the cell surface and contribute to leukocyte and platelet adhesion and aggregation. Moreover, the

increased ULVWF release from endothelial cells also promotes thrombosis. Endothelial cells treated by TTP patient sera showed up-regulation of P-selectin and increase in the adhesiveness for neutrophils, as demonstrated by Ruiz et al. (7). In addition, Jimenez et al. observed the presence of CD62E and VWF expressing microparticles in the plasma of TTP patients (8), indicating the activation of endothelial cells in these patients. Finally, the study of Mori et al. (9) and Stufano (6) documented vascular endothelial injury in TTP/HUS patients as reflected by increased plasma thrombomodulin, antithrombin, protein C levels and increased VWF antigen, VWF propeptide levels. Although several endothelial cell markers have been investigated in TMAs, endothelin-1 has not been studied yet. The main function of endothelin-1 is to regulate blood pressure in small vessels and has a function in sodium homeostasis (10). Increased levels of endothelin-1 have been described in chronic heart failure, chronic kidney diseases, sepsis models and in secondary microangiopathy associated with kidney/pancreas transplanted patients (11).

Activation of the complement system on endothelial cells may contribute to the development of thrombotic microangiopathies. The mechanisms of complement activation in TTP may include initiation of the classical pathway by ADAMTS13-anti-ADAMTS13 immune complexes, by damaged self cells in response to tissue ischemia, and also the over-activation of the alternative pathway. Importantly, in the study of Westwood et al, acute TTP was not only characterized by increased complement activation, but also by complex pro-inflammatory and regulatory cytokine response. Turner and Moake (12) published that components and regulators (including Factor H) of the alternative pathway are assembled and activated on ULVWF anchored to endothelial cells, which may provide a direct link between endothelial cell injury and complement system. Current concepts in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies convincingly support the role of endothelial cell activation (13), and reliable endothelial biomarkers could potentially reflect the efficacy of therapy and predict risk of relapse in these diseases.

We hypothesised that endothelin-1 may serve as a useful endothelial cell biomarker in TTP. Endothelin-1 release is known to depend upon gene transcription [regulated by cytokines (14), thrombin (10), etc.], and only minor amounts are stored. Changes in endothelin-1 levels, therefore, may be a specific marker of endothelial cell activation that could reflect the actual clinical state of TTP patients and would monitor their therapy-response. The goal of the presented study was to validate this new marker by measuring carboxiterminal pro-endothelin-1 (CT-proET-1), a stable precursor of endothelin-1, in relation to TTP activity, to plasma exchange (PEX), and to assess its potential association with complement activation.

Materials and methods

Patients and samples

This study is an extension of our previous study (15), where patient selection criteria, definitions of clinical syndromes and a set of lab-

oratory methods were described. In the current analysis a total of 54 TTP patients were enrolled between August 2007 and January 2014. Active TTP was defined as: thrombocytopenia (<150 G/l), direct Coombs negative haemolysis with fragmentocytes in the peripheral blood smear. Although in most patients ADAMTS13 deficiency was documented (<10% ADAMTS13 activity levels), in three patients (out of 54) this marker could not be determined because their episodes occurred prior to the availability of the ADAMTS13 assay and they were in remission at the time of the study. Other concomitant diseases such infection, malignancy, autoimmune diseases were excluded with careful analysis of patient's history, imaging, and specific laboratory tests (serology for systemic autoimmune diseases, infections). Patients with acute oligo-anuric renal failure were also excluded. The term remission refers to inactive disease, i.e. complete remission (CR), defined by platelet counts >150 G/l for one month without signs of haemolysis, without symptoms of active organic involvement or residual symptoms only. Suppl. Table 1 (available online at www.thrombosis-online.com) shows baseline clinical data of the patients enrolled in the study.

Eighty-two samples from the 54 TTP patients were available for this study, details of the number of patients and available samples are presented on the study flow chart (Suppl. Figure 1, available online at www.thrombosis-online.com). Fifty-seven healthy controls (age and sex matched) were recruited from a pool of healthy employees scheduled for mandatory medical check-up.

Samples (serum, EDTA-anticoagulated plasma and sodium-citrate anticoagulated plasma) were taken from antecubital venipuncture or from central venous catheter. Cells and supernatants were separated by centrifugation and shipped on ice for processing. The aliquoted samples were stored at <-70°C until use. The study was approved by the institutional Ethics Committee on Human Research and informed consent was obtained from each subject.

Determination of CT-proET-1 levels and other laboratory parameters

Endothelin-1 is hardly measurable in human plasma due to its very short half-life (1–2 minutes in circulation). Therefore, a stable precursor (Carboxy-Terminal (CT)-proET-1, half-life is 42 hours in room temperature) (16), which is produced in equimolar concentration to endothelin-1, was measured.

CT-proET-1 was measured in EDTA plasma with immunoluminometric assay by following the manufacturer's instruction (BRAHMS Kryptor System currently Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (16, 17).

The methods were described previously in full detail. Shortly, the fluorogenic substrate FRET-S-VWF73 was applied for the determination of ADAMTS13 enzyme activity (reference range 67–147%) and inhibitors as described (15, 18). The concentration of C3bBbP was measured by ELISA, based on Cat et al. (19) with some alterations (15, 20). Serum concentrations of Factor H antigen (FH:Ag) were determined using ELISA (reference range 250–880 mg/l)(15). Two patients had no available samples for Factor H antigen measurement. VWF antigen levels (reference range:

53.2–329.1 mg/l (5–95 percentile) were measured in EDTA plasma by an in-house ELISA assay based on Cejka (21), using primary antibodies and horseradish peroxidase-labelled polyclonal rabbit anti-human VWF antibodies (both from Dako, Glostrup, Denmark) as described (18). Eleven patients had limited samples for VWF antigen measurement.

Statistical analysis

The continuous variables in this study showed skewed distribution, and failed Shapiro-Wilk's test. Accordingly, for descriptive purposes, continuous variables are given as median and 25th–75th percentiles, categorical variables as numbers (percent). Non-parametric tests were used for group comparisons (Mann-Whitney U test to compare two groups) and for correlation analyses (Spearman rank test). Median difference with 95% confidence intervals (CI) between paired groups was calculated by the 1000-bootstrap method. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Softwares Inc., San Diego, CA, USA) software. Two tailed p-values were calculated and the significance level was put at a value of $p < 0.05$.

Results

Patients

Over the study period 54 TTP patients and 57 healthy controls were enrolled. ► Table 1 shows the clinical and laboratory data of

the groups studied. All of the patients in acute disease flare were ADAMTS13 deficient (activity $\leq 10\%$) and positive for anti-ADAMTS13 inhibitors. Therefore, the study represents a homogenous ADAMTS13 deficient TTP cohort, however there were three patients who were seen in remission only and their ADAMTS13 deficiency could not be documented. The median age at first TTP episode was 35 years and the average number of episodes was 1.9 (lifelong episodes). Each of the acute TTP patients had PEX treatment with various numbers of sessions, the median was 10, interquartile range: 6–18.5 ($n=36$). At the onset of the acute disease flare neurological signs (severe headache, dizziness, aphasia, paresis, numbness, loss of consciousness, coma) occurred in 79% of the patients, abdominal signs (abdominal pain, bleeding, diarrhoea, nausea, vomiting,) in 33%, renal injury (proteinuria, haematuria, kidney function impairment) in 18%, whereas 13% of the patients had no other symptoms than thrombocytopenia and haemolysis. None of the patients had anti-Factor H antibody or any other known autoantibody mediated autoimmune disease. Two patients, who were seen in remission only, had idiopathic thrombocytopenic purpura in their history, whereas 1 patient had ADAMTS13 deficiency and newly diagnosed systemic lupus erythematosus when admitted.

Endothelial cell activation in TTP and its changes in relation to disease activity

First, VWF antigen, an important pathogenic factor of TTP was measured in the patients enrolled in our study. Increased VWF

Variable	Acute TTP, before PEX	Remission TTP	Healthy controls
Number	25	17	57
Age at sample collection (year)	39 (34.5–47.5)	44 (33–51)	34 (29.5–40)
Gender (F/M)	19/6	13/4	30/27
Haemoglobin (mg L ⁻¹)	83 (72–108)	140 (124–153)	145 (136–161)
Platelets (G L ⁻¹)	22 (11–43)	246 (203–361)	271 (236.5–305)
Creatinine ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	80.5 (63.8–99)	69 (56.8–82.8)	69 (61–80)
ADAMTS13 activity %	0 (0–0)	0.5 (0–77.7)	ND
ADAMTS13 activity of mixed sample*	0 (0–14)	30 (9–54.5)	ND
VWF antigen (mg L ⁻¹)	569 (397.1–706.8)	409.8 (324.6–653.2)	138.4 (71.8–217.1)
CT-proET-1 (pmol L ⁻¹)	57.47 (42.8–88.9)	48.6 (45.2–58.3)	36 (21.5–42)
Factor H antigen (mg L ⁻¹)	404 (374–588)	455 (316–654)	597.8 (494.9–700.7)
C3 (g L ⁻¹)	1.37 (1.2–1.9)	1.5 (1.1–1.7)	ND
C3a (ng mL ⁻¹)	203.1 (165.6–559.9)	195.4 (109.6–328.7)	ND
C3bBbP (U mL ⁻¹)	2.3 (1.5–4.9)	2.3 (1.8–3.3)	ND
SC5b-9 (ng mL ⁻¹)	418.7 (279.8–657.1)	289.8 (230.7–347.6)	ND

Table 1: Clinical and laboratory characteristic of the various groups of TTP patients and healthy controls.

*Test sample and normal pooled plasma sample was mixed in 1:1 ration and ADAMTS13 activity determined. Data refer to median and interquartile range. (F: female; M: male; ND: not determined; PEX: plasma exchange). Reference ranges: ADAMTS13 activity 67–147%, inhibitor for ADAMTS13 activity (mixed sample): $> 50\%$, C3 0.9–1.8 g L⁻¹, C3a 70–270 ng mL⁻¹, SC5b-9 110–252 ng mL⁻¹. There is no reference range for C3bBbP; however, in our previous study its level was 1.71 U mL⁻¹ (IQ range 1.32–2.99) measured in 17 healthy subjects (15).

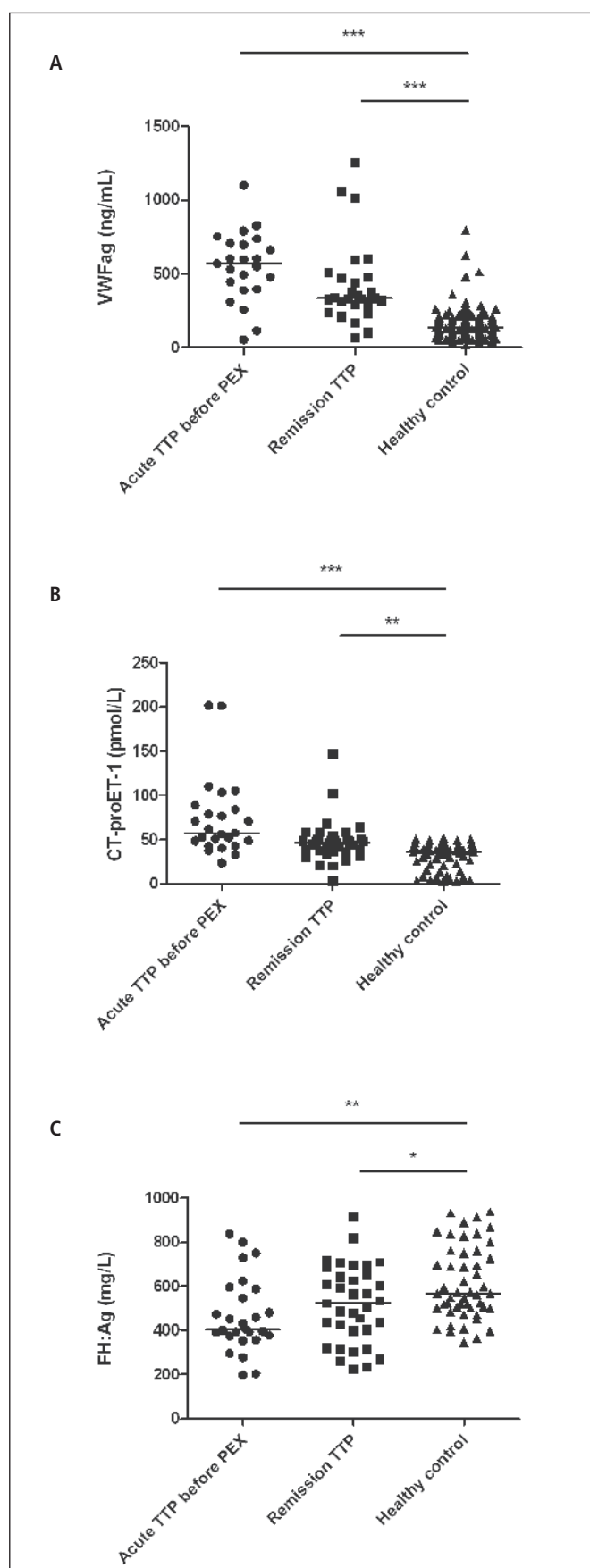
antigen levels were observed in all groups of TTP patients (stratified according to disease activity) vs healthy controls (► Figure 1A) Patients with active disease or in remission showed 3–4 times higher median VWF antigen levels than controls. The association between elevated VWF antigen levels and active TTP was further demonstrated when patients were grouped according to disease activity of TTP (platelet counts: <150 G/l or >150 G/l) and ADAMTS13 deficiency (activity <10% or >10%). As shown on ► Figure 2A, VWF antigen levels were highest when both ADAMTS13 deficiency and active TTP were present, as compared with healthy controls. VWF antigen levels were still higher in patients in remission vs normal controls and the presence or absence of ADAMTS13 deficiency did not seem to influence its levels at this phase ($p=0.86$, Mann-Whitney test.).

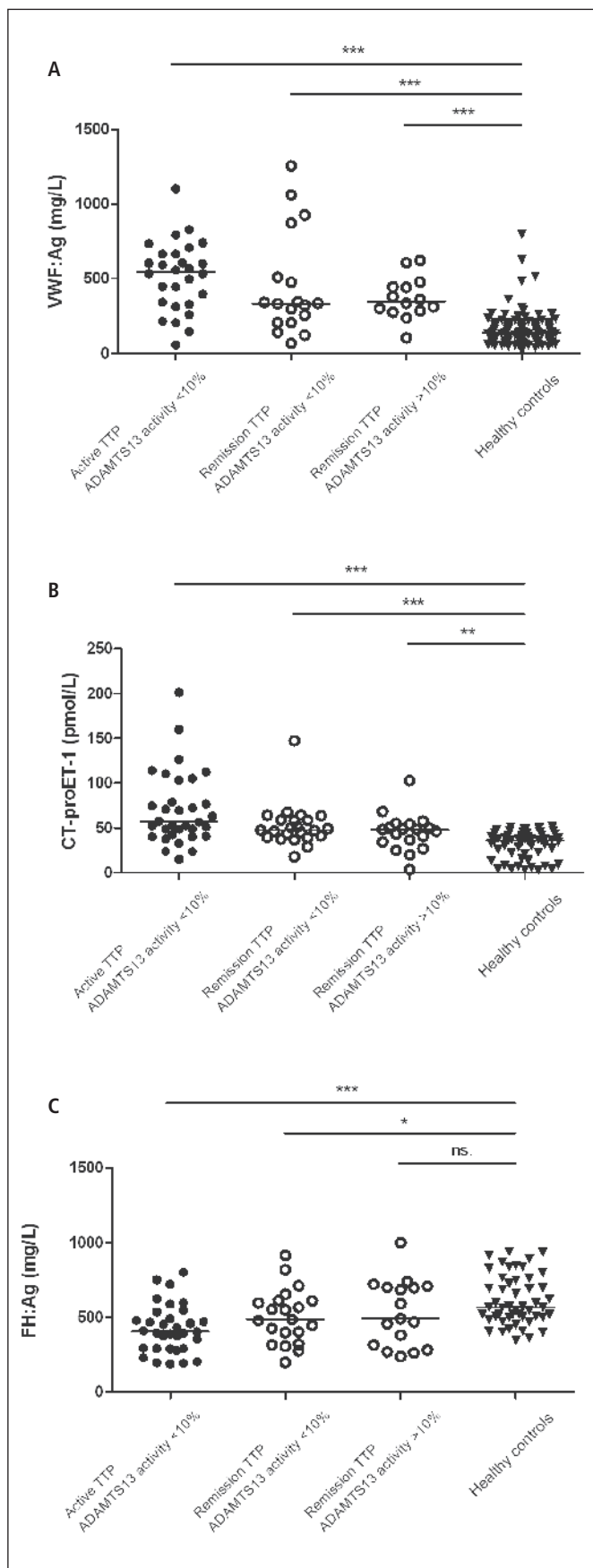
If we restricted the analysis to the subjects with available sample pairs before PEX and during PEX, a decrease in VWF levels (median difference of VWF antigen 191.5 mg/l, 95% CI –40.1–306.3) was observed in response to PEX therapy (► Figure 3A). Similarly, no significant difference (median difference of VWF antigen 91.4, 95% CI –80.0–254.4) was shown for samples in remission (► Figure 3B).

Next, we examined whether ABO blood groups could influence the levels of VWF antigen as Jenkins et al. (22) described earlier. In our study 46% of the patients had blood group A, 25% blood group 0. Our results were in line with findings of Jenkins et al., since VWF antigen levels were lower in patients with blood group 0, than in those with group A, or other blood groups (data not shown). Nonetheless, VWF antigen levels were increased in TTP patients independently of blood group, when compared with healthy controls.

As TTP is characterised by platelet activation and consumption, a portion of the increased VWF levels may potentially originate from these platelets. To assess the involvement of the other known source, endothelial cells, we measured CT-proET-1, a specific endothelial marker in these groups. Endothelial cell activation was present in acute TTP, median CT-proET-1 levels were 37% higher when compared with healthy controls (► Figure 1B, $p<0.0001$, Mann-Whitney test). As presented on ► Figure 2B, the highest CT-proET-1 levels were observed in active, ADAMTS13 deficient TTP patients. In samples taken in remission, the CT-proET-1 levels were higher than in controls, but the presence or absence of ADAMTS13 deficiency did not influence CT-proET-1 levels ($p=0.349$, Mann-Whitney test). Importantly, CT-proET-1 levels were lower in remission than in acute TTP (where

Figure 1: Biomarker levels in relation to disease activity in TTP and in healthy controls. We measured VWF antigen (VWF:Ag) (A) and CT-proET-1, a stable fragment of endothelin-1 (B) in EDTA plasma samples in TTP patients and in healthy controls. Significant differences were observed between the patient groups and healthy controls. Factor H antigen (FH:Ag) levels were also measured in the detailed groups (C) and FH:Ag levels were significantly decreased in patients compared with the healthy controls. Mann-Whitney test were used to compare patients to healthy controls. Asterisks indicates results of Mann-Whitney test ($p^*<0.05$; $^{**}<0.01$; $^{***}<0.0001$.) Horizontal lines show medians of the groups.





ADAMTS13 deficiency was again an independent variable) (► Figure 2B, columns 1 and 2 $p=0.079$ and columns 1 and 3 $p=0.017$, Mann-Whitney test).

During PEX (i.e. during active TTP) CT-proET-1 levels tended to decrease (median difference 12.6 pmol/l, 95%CI -2.6-33.8) compared with pre-PEX concentrations (► Figure 3C). However, significantly lower CT-proET-1 levels were observed in remission as compared with pre-PEX samples (► Figure 3D), the median CT-proET-1 difference between pre-PEX and remission samples was 13.9 pmol/l (95% CI: 3.7-33.6). CT-proET-1 concentrations did not correlate to VWF levels in the pre-PEX samples ($r=0.284$, $p=0.211$, Spearman correlation) or in the samples taken during PEX ($r=0.409$, $p=0.211$, Spearman correlation), or to disease activity markers (LDH, platelets, data not shown). However, CT-proET-1 levels showed a moderate positive correlation with creatinine levels in acute TTP ($r=0.496$, $p=0.011$, Spearman correlation), but no similar correlation was observed during remission, although patients with oligo-anuric kidney failure were excluded from this study. The nature of TTP episode (acute, first or relapse of previous TTP) did not influence CT-proET-1 or VWF antigen levels (data not shown).

Connection between endothelial cell activation and complement alternative pathway

In the next analysis the potential link between endothelial cell- and complement activation was explored in acute TTP. Complement factor and activation product levels are shown in ► Table 1. The results of Factor H antigen measurements are presented on ► Figure 1C, ► Figure 2C and ► Figure 3E-F. Decreased Factor H antigen levels were observed in TTP when compared with control (► Figure 1C and ► Figure 2C), even in remission with deficient ADAMTS13 activity. Analysis of patients with available corresponding samples and sample pairs from pre-PEX, during PEX and remission phase of the disease showed no significant changes (half of the patients had increase, whereas the other half had decreased Factor H antigen levels, ► Figure 3E-F). No correlations were observed between decreased Factor H antigen levels and other complement parameters such C3, C3a, C3bBbP, sCb5-9 (data not shown).

In patients who had available plasma samples before the initiation of PEX series levels of alternative pathway convertase complex C3bBbP were also measured, and showed positive correlation to CT-proET-1 levels (► Figure 4A, $r=0.528$; $p=0.013$; Spearman correlation), whereas correlation of CT-proET-1 with the terminal pathway activation complex (sC5b-9) was weak, non-significant

Figure 2: Biomarker levels in TTP in relation to disease activity and ADAMTS13 deficiency. Elevated VWF:Ag (A), and CT-proET-1 (B) and decreased FH:Ag levels (C) were present independently of disease activity (closed dots: PLT <150 G/l, opened dots: PLT >150 G/l) or of ADAMTS13 deficiency (indicated on the x-axis) in TTP patients. Asterisks indicates results of Mann-Whitney test compared with healthy controls (ns.:non-significant; $p^* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.0001$). Horizontal lines show medians of the groups.

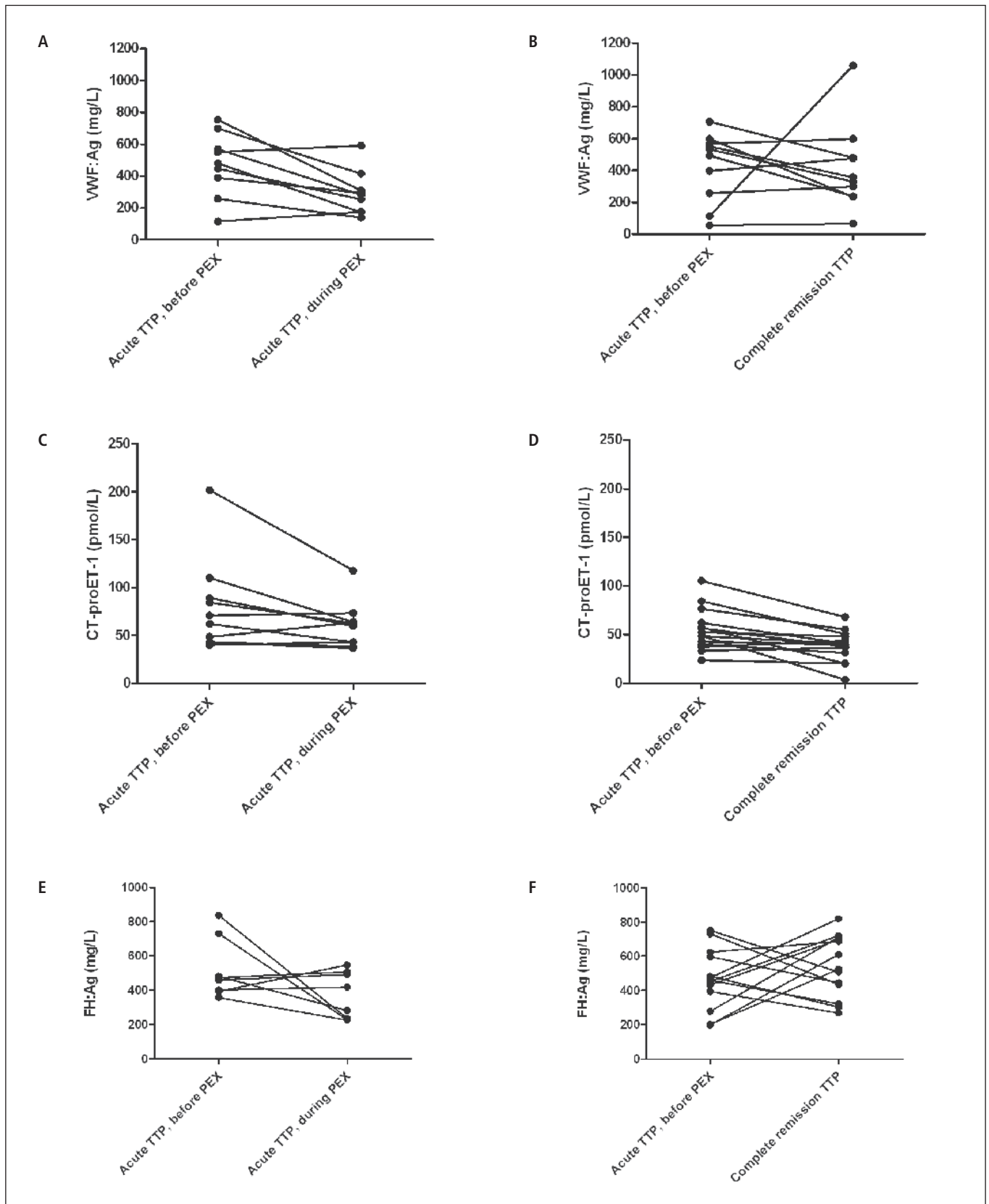


Figure 3: Changes of VWF antigen (A, B), endothelin-1 (C, D), and Factor H antigen (E, F) levels in follow up samples. Biomarker levels were determined in sample pairs of TTP patients. Median difference and 95 % CI for A: 191.5 (-40.5–285.5); B: 91.4(-80.0–254.4); C: 12.6 (-2.9–46.2); D: 13.9 (3.3–37.3); E: -16.0 (-154.0–602.0); F: -62.0 (-345.1–150.5).

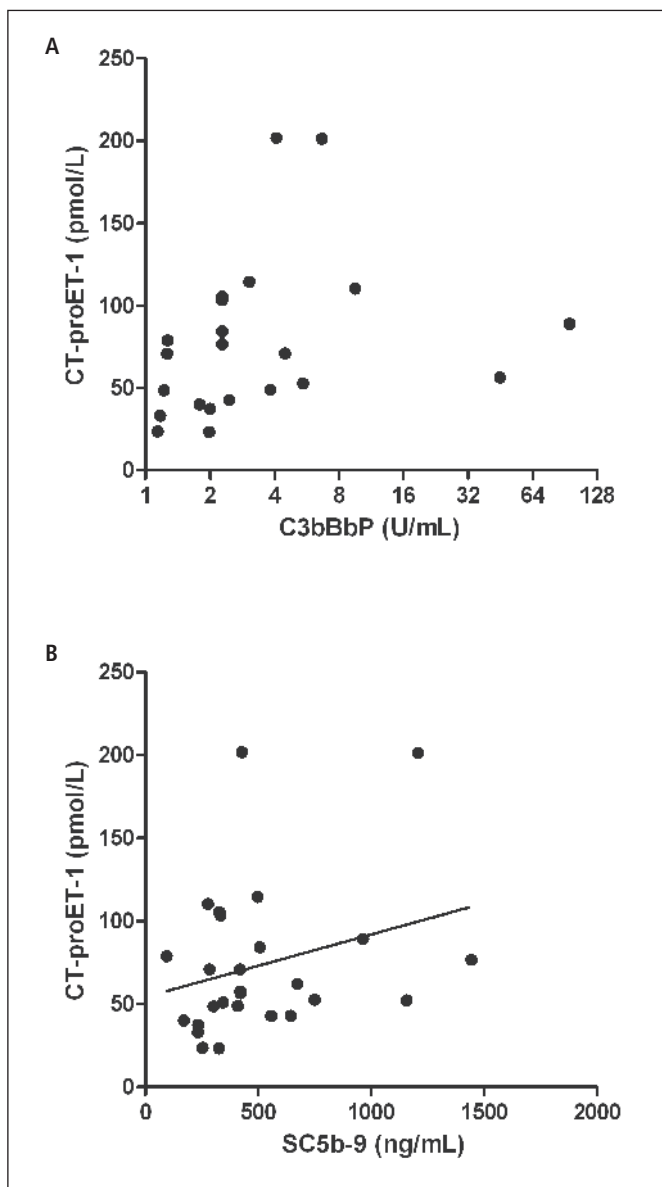


Figure 4: Association of endothelin-1 levels with complement activation markers in acute TTP. CT-proET-1 levels were compared with C3bBbP and SC5b-9 levels in 21 and 25 patients (with available samples for the measurement) from the acute phase before the initiation of PEX session. P-values were determined by Spearman rank correlation test. (Panel A, X-axis shows alternative pathway convertase activation complex (C3bBbP) on a log₂ scale; $r=0.528$; $p=0.013$; Panel B, terminal complement pathway activation complex SC5b-9; $r=0.306$; $p=0.135$).

(► Figure 4B, $r=0.306$; $p=0.135$; Spearman correlation). In addition, there were no correlations with other complement components such as C3, C3a (data not shown).

Discussion

We have presented the largest study to date on the association of increased CT-proET-1 and von Willebrand factor levels with acute

and remission TTP. Endothelial cell activation was demonstrated by comparing groups of patients with acute and remission TTP, in relation with healthy controls. The highest levels of CT-proET-1 and VWF were observed in acute TTP, and lower, but still increased levels of both markers were observed in remission, when compared with healthy controls. There was a wide variation in CT-proET-1 levels in acute TTP and not all patients had increased levels above the upper limit of control. Neither VWF, nor CT-proET-1 levels were associated with ADAMTS13 deficiency in remission. We also quantified levels of complement Factor H, an important regulator of the alternative pathway, and observed its decrease in acute and remission TTP when compared with control subjects. Furthermore, we looked at the relationship between endothelial cell activation and complement alternative and terminal pathway activation in TTP and observed a moderate positive correlation between the endothelial cell activation and alternative pathway activation.

The finding of endothelial activation in TTP is interesting, particularly its association with disease activity. Although both VWF and endothelin-1 are considered endothelial markers, their regulation of expression, storage and release are different. Whereas VWF is expressed in, and released by platelets and endothelial cells, endothelin-1 is a specific endothelial marker. Both molecules are known to share similar constitutive and stimulated expression patterns and are stored in specific storage granules in endothelial cells. Endothelin-1 expression and release, however, reflect regulation at the level of gene expression. This observation constituted the foundation of our hypothesis that changes in CT-proET-1 levels in TTP are specific for the activation state of endothelial cells, and rapidly follow activation level changes during therapy. Our results are consistent with previous observations on the presence of endothelial activation in TTP, where increased plasma levels of CD62E and VWF-expressing microparticles (8) and high concentration of plasma thrombomodulin, antithrombin and protein C were reported (9). The strength of our study is two-fold: we based our measurements on a well standardised, reliable and commercially available specific endothelial biomarker, CT-proET-1 (16) and our study represents a higher number of subjects with *de novo* acute phase disease and remission.

The high VWF antigen and CT-proET-1 levels in active TTP are intriguing. Increased levels of both markers were observed in pre-PEX TTP samples when compared with healthy controls (► Figure 1A, B). When comparing pre-PEX and remission samples in matched pairs analysis only CT-proET-1 showed significant decrease (► Figure 3D), while VWF antigen did not (► Figure 3B). Levels of the two markers tended to decrease during PEX (VWF antigen level by 40% and CT-proET-1 by 8%); however, the decrease did not reach statistical significance.

We have recently observed that activation of complement is a feature of ADAMTS13 deficient TTP, and the observation has also been confirmed by an even larger series of studies (23). Our data on the decreased Factor H antigen concentration (► Figure 1) in TTP is notable and is consistent with the findings published previously (12, 24, 25). ULVWF present in TTP may increasingly bind and consume circulating Factor H, a mechanism that may

further increase the risk of alternative pathway dysregulation (12). This observation was confirmed in two other studies. Rayes et al. presented that VWF and complement Factor H co-localised in endothelial cells, and Factor H partially protected ULVWF from ADAMTS13-mediated degradation (24), whereas Feng et al. showed that the presence of C-terminal half of Factor H is important for binding to VWF molecule (25). We did not observe correlation between decreased Factor H antigen levels and increased complement activation products such as C3, C3a, C3bBbP and SC5-9. The levels of complement factors and activation products were comparable to previously published data (15, 23). The fact, however, that the alternative pathway activation marker C3bBbP correlated with endothelin-1 levels supports the idea that complement activation in TTP may contribute to the progression of TMA. First, the activation of platelets by ULVWF is an important step in the pathogenesis of TTP, and this process is accompanied by thrombin development. Second, thrombin is able to directly activate C3 and initiate complement activation, and in parallel, thrombin is a known activator of endothelial cells resulting in increased production and release of VWF and endothelin-1. In addition, Factor H dysfunction may contribute to complement deposition to platelets and to their activation in atypical HUS (26). Furthermore, complement activation products are potent inducers of adhesion molecule expression on endothelial cells (27) and complement anaphylatoxin C5a may down-regulate the expression of thrombomodulin (28). Finally, since thrombomodulin is not only a regulator of coagulation, but also interferes with complement activation (29, 30), these processes may jointly turn into a self-expanding circle of increased platelet adhesion and activation, thrombin production and complement activation, propagating endothelial damage, microangiopathy, increased shear-stress and progression of TMA. This pathogenesis model is supported by results of elegant flow-system model experiments as well, where Tati et al. reported induction of complement activation on platelets and on the endothelium in ADAMTS13 deficiency (31).

Previous studies documented increased CT-proET-1 levels in sepsis (32), chronic heart failure (33, 34) and pulmonary artery hypertension (35), and the magnitude of CT-proET-1 increase observed in our cohort is similar. The method applied in this study is reliable for the measurement of endothelin-1 production since it is not measuring the short half-life active hormone, but its inactive, metabolically stable, equimolar pro-fragment, CT-proET-1 (16). Higher than 60 pmol/l CT-proET-1 concentration was present in 48% of our acute pre-PEX patients, which was similar in patients with sepsis, or with chronic heart failure. In addition, in two patients CT-proET-1 levels were higher than 200 pmol/l, a finding similar to what has been described in septic shock, or in severe heart failure (NYHA IV). It is important to note that C-reactive protein (CRP) levels in the majority of our acute patients were in reference range or moderately elevated, and only 7% of the patients had CRP concentrations above 50 mg/l. Therefore, the contribution of infection-related endothelial activation to the CT-proET-1 elevation observed in this study can be considered as minor. The reference values for CT-proET-1 in our study (median: 36 pmol/l; interquartile range: 21.5–42) were in line with pre-

viously published data (16), where the mean CT-proET-1 level was 44.3 pmol/l (standard deviation: 10) in 326 healthy controls. Hence, in accordance with these studies the elevated CT-proET-1 levels in TTP may indicate the activated state of endothelium and active disease process. The observation of higher CT-proET-1 and also VWF antigen levels in remission (when compared with control) may be related to damage or activation of endothelium in these patients. It is the task of further studies to identify those factors that may cause constant activation of endothelium during remission in TTP patients, and to investigate if elevated CT-proET-1 is also a prognostic marker of an exacerbation and relapse in TTP.

We acknowledge potential limitations of our study. Although the number of new patients with non-treated, acute TTP has increased since the publication of our previous analysis, the cohort represents a moderate number of TTP patients. However, TTP is a rare disorder, and it was not possible to enrol more patients during the study period. Therefore, some of the analyses presented here may be underpowered (especially those with wide CIs), and the results should be considered as preliminary only, until independent confirmation is published.

Elucidating the role of endothelial activation in TTP is important, given the necessity and potential importance of prognostic and therapy guiding biomarkers as suggested by Zuber et al. (36). ADAMTS13 deficiency is an important determinant of the

What is known about this topic?

- Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is characterised by the deficiency of von Willebrand factor cleaving protease, ADAMTS13, and by the presence of ultra-large von-Willebrand factor multimers (ULVWF).
- There are a number of pathogenic pathways involved in TTP including initiating of platelet activation, coagulation resulting in endothelial cell injury.
- There are no available and reliable endothelial biomarkers to monitor the disease state of patients with TTP.

What does this paper add?

- As a first step a large cohort of ADAMTS13 deficient TTP patients was enrolled in various diseases states.
- Next, a reliable, stable, well-measurable, specific endothelial biomarker, CT-proET-1 measured and ADAMTS13 activity, complement regulators and activation products were also determined.
- Elevated endothelin-1 levels were observed in acute TTP and levels decreased in response to plasma therapy. Endothelin-1 levels remained higher in remission, when compared to healthy controls.
- There was a close relationship between complement activation and high endothelin-1 level in TTP.
- This study clearly shows that endothelium activation is characteristic to acute TTP episodes and endothelin-1 is a suitable biomarker to follow the state of endothelium during the disease course.

increased risk for the development of TTP, but this factor alone is insufficient to explain the development of active TTP. Additional factors, such as infections, pregnancy or surgery may all contribute to the precipitation of an acute TTP episode, and these states and diseases are known inducers of profound cytokine response, complement activation and coagulation. High levels of coagulation and fibrinolysis biomarkers (37), together with elevated cytokine concentrations (38) and complement activation (15, 23) are characteristic for acute TTP. Biological effects of these processes, such as generation of thrombin, increase of pro-inflammatory cytokines like interleukin-6 and tumour necrosis factor- α and complement activation products, may all activate transcription of endothelin-1 and increase its production (14, 39–41). Therefore, we suggest CT-proET-1 as a specific, rapidly regulated and well-measurable endothelial biomarker to be used in TTP and potentially in other forms of thrombotic microangiopathies as well.

Acknowledgements

The authors are grateful for the expert medical laboratory support from V. Marina, and for the excellent technical support from I. Szigeti, M. Kókai, É Szendrei and E. Kertész, as well as for the expert medical support from members of the following departments: National Institute of Hematology, Blood Transfusion and Immunology (Department of Hematology, Department of Hemapheresis); National Medical Center (Department of Hematology and Stem-cell transplantation, Department of Anaesthesiology and Intensive Care); St István and St László Hospital of Budapest (Department of Hematology and Stem cell transplantation, Department of Internal Medicine and Hematology, Department of Anaesthesiology and Intensive Care); National Blood Transfusion Service; Semmelweis University (Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, and Central Laboratory, Kútvolgyi Clinical Center), University of Debrecen Clinical Centre Institute of Internal Medicine 2nd and 3rd Department of Medicine; University of Szeged Department of Pediatrics and Pediatric Health Center; Semmelweis University 1st Department of Pediatrics; and staff of the Haemobil Health Care Ltd Service. We acknowledge for Peter Geck (Tufts University) the critical reading of the manuscript with many thanks and for Tímea Gombos helping in the statistical analysis. We are grateful to our patients for their participation in the study. This study was financially supported by the National Research Fund of Hungary (OTKA-NKFI K100687 (ZP)).

Conflicts of interest

None declared.

References

- Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307: 1432–1435.
- Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339: 1578–1584.
- Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Ann Rev Biochem* 1998; 67: 395–424.
- Verweij CL. Biosynthesis of human von Willebrand factor. *Haemostasis* 1988; 18: 224–245.
- Ribes JA, Francis CW. Multimer size dependence of von Willebrand factor binding to crosslinked or noncrosslinked fibrin. *Blood* 1990; 75: 1460–1465.
- Stufano F, S LAM, Pontiggia S, et al. von Willebrand factor propeptide to antigen ratio in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 728–730.
- Ruiz-Torres MP, Casiraghi F, Galbusera M, et al. Complement activation: the missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost* 2005; 93: 443–452.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol* 2003; 123: 896–902.
- Mori Y, Wada H, Okugawa Y, et al. Increased plasma thrombomodulin as a vascular endothelial cell marker in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001; 7: 5–9.
- Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, et al. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 2011; 91: 1–77.
- Burke GW, Ciancio G, Cirocco R, et al. Microangiopathy in kidney and simultaneous pancreas/kidney recipients treated with tacrolimus: evidence of endothelin and cytokine involvement. *Transplantation* 1999; 68: 1336–1342.
- Turner NA, Moake J. Assembly and activation of alternative complement components on endothelial cell-anchored ultra-large von Willebrand factor links complement and hemostasis-thrombosis. *PLoS one* 2013; 8: e59372.
- Rosove MH. Thrombotic microangiopathies. *Semin Arthr Rheum* 2014; 43: 797–805.
- Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheum* 1997; 15: 163–167.
- Reti M, Farkas P, Csuka D, et al. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 791–798.
- Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, et al. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin Chem* 2006; 52: 1144–1151.
- Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. *Peptides* 2005; 26: 2482–2486.
- Gombos T, Mako V, Cervenak L, et al. Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. *Thromb Haemost* 2009; 102: 573–580.
- Cat R, Rosario NA, de Messias IT, et al. Evaluation of complement activation in premature newborn infants with hyaline membrane disease. *Eur J Ped* 1993; 152: 205–208.
- Csuka D, Fust G, Farkas H, et al. Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clin Immunol* 2011; 139: 85–93.
- Cejka J. Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen. *Clin Chem* 1982; 28: 1356–1358.
- Jenkins PV, O'Donnell JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion* 2006; 46: 1836–1844.
- Westwood JP, Langley K, Heelas E, et al. Complement and cytokine response in acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br J Haematol* 2014; 164: 858–866.
- Rayes J, Roumenina LT, Dimitrov JD, et al. The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood* 2014; 123: 121–125.
- Feng S, Liang X, Cruz MA, et al. The interaction between factor H and Von Willebrand factor. *PLoS One* 2013; 8: e73715.
- Stahl AL, Vaziri-Sani F, Heinen S, et al. Factor H dysfunction in patients with atypical hemolytic uremic syndrome contributes to complement deposition on platelets and their activation. *Blood* 2008; 111: 5307–5315.
- Tedesco F, Pausa M, Nardon E, et al. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med* 1997; 185: 1619–1627.
- Fang W, Guo ZH, Zhang BQ, et al. Effect of C5a on expression of thrombomodulin in endothelial cells in vitro. *Chin Crit Care Med* 2009; 21: 168–171.
- Van de Wouwer M, Plaisance S, De Vriese A, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1813–1824.

30. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, et al. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 2009; 361: 345–357.
31. Tati R, Kristoffersson AC, Stahl AL, et al. Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency in human and murine thrombotic microangiopathy. *J Immunol* 2013; 191: 2184–2193.
32. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium* 2007; 14: 345–351.
33. Gombos T, Forhecz Z, Pozsonyi Z, et al. Adrenomedullin and endothelin-1 are related to inflammation in chronic heart failure. *Inflam Res* 2009; 58: 298–305.
34. Jankowska EA, Filippatos GS, von Haehling S, et al. Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1. *PloS one* 2011; 6: e14506.
35. Silva Marques J, Martins SR, Calisto C, et al. An exploratory panel of biomarkers for risk prediction in pulmonary hypertension: emerging role of CT-proET-1. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 1214–1221.
36. Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, et al. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nature Rev Nephrol* 2012; 8: 643–657.
37. Wada H, Kaneko T, Ohiwa M, et al. Increased levels of vascular endothelial cell markers in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1993; 44: 101–105.
38. Wada H, Kaneko T, Ohiwa M, et al. Plasma cytokine levels in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1992; 40: 167–170.
39. Emori T, Hirata Y, Imai T, et al. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 2409–2411.
40. Yang LL, Arab S, Liu P, et al. The role of endothelin-1 in myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: old lessons and new insights. *Canad J Physiol Pharmacol* 2005; 83: 47–62.
41. Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol* 1992; 262: C854–861.

