

Plazmaenzimrendszerek és neutrofil granulociták vizsgálata C1-inhibitor hiányában kialakuló herediter angioödémában

Doktori értekezés

Veszeli Nóra

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Farkas Henriette, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Varga Lilian, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Sármai Gabriella, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Krasznai Magdolna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Erdei Anna, az MTA tagja, egyetemi tanár
Dr. Komorowicz Erzsébet, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

1.RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2. BEVEZETÉS.....	7
2.1. A C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditér angioödéma.....	7
2.1.1. Klinikai tünetek.....	7
2.1.2. A C1-INH-HAE diagnózisa.....	8
2.1.3. A C1-INH.....	9
2.1.4. Az ödémás roham patomechanizmusának vizsgálati lehetőségei.....	10
2.2. Plazmaenzimrendszerek.....	11
2.2.1. A komplementrendszer.....	11
2.2.2. A kontakt rendszer.....	18
2.2.3. A koagulációs és fibrinolitikus rendszer.....	21
2.2.4. Plazmaenzimrendszerek kölcsönhatásai.....	25
2.3. Neutrofil granulociták.....	27
2.3.1. Neutrofil granulociták összefüggései a C1-INH-HAE ödémás rohamok patomechanizmusával.....	31
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	33
3.1. A koagulációs, fibrinolitikus és kontaktrendszer változásainak egyidejű, átfogó vizsgálata C1-INH-HAE-ban.....	33
3.2. Neutrofil granulociták vizsgálata C1-INH-HAE-ban.....	34
3.3. A C1-INH hiány közvetlen következményeinek vizsgálata egy C1-INH-HAE ödémás roham lefolyásának nyomon követése során.....	35
4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	36
4.1. A vizsgált betegcsoport és a kontrollok.....	36
4.1.1. C1-INH-HAE betegek.....	36
4.2. Vérvételek.....	39
4.2.1. Vérvételek a nyomonkövetéses vizsgálat során.....	39
4.3. Laboratóriumi vizsgálati módszerek.....	40
4.3.1. A komplementrendszer egyes paramétereinek meghatározása.....	42
4.3.2. A neutrofil granulocitákra jellemző illetve aktiválódásukkal kapcsolatba hozható paraméterek meghatározása.....	48
4.3.3. A kontakt-, koagulációs és fibrinolitikus rendszerek egyes paramétereinek meghatározása.....	50

4.4. Statisztikai elemzés.....	51
5. EREDMÉNYEK.....	53
5.1. A kontakt-, koagulációs és fibrinolitikus rendszer változásainak egyidejű, átfogó vizsgálata C1-INH-HAE-ban.....	53
5.1.1. A kontakt és koagulációs paraméterek vizsgálata ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamok során vett mintáiban.....	53
5.1.2. A fibrinolitikus rendszer paramétereinek vizsgálata ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamok során vett mintáiban.....	54
5.1.3. Plazmaenzimrendszerek paramétereinek LMM és power-analízise a C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamos állapotának összehasonlítása során	56
5.1.4. Plazmaenzimrendszerek paramétereinek közötti összefüggések vizsgálata C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során levett vérmintáiban, valamint egészséges kontroll egyénekben.....	57
5.1.5. A különböző lokalizációjú rohamok, illetve a betegek egymást követő ödémás rohamainak befolyása a plazmaenzimrendszerek paramétereinek szintjére	60
5.1.6. Plazmaenzimrendszerek paramétereinek kinetikai nyomonkövetése egy C1-INH-HAE beteg ödémás rohama során.....	63
5.2. Neutrofil granulociták vizsgálata C1-INH-HAE-ban	66
5.2.1. Neutrofil granulocita szám és fehérvérsejtszám meghatározása C1-INH-HAE-ban.....	66
5.2.2. Neutrofil granulocita aktivációs markerek, valamint az aktiválódásra ható citokinek, komplementfaktorok és CRP meghatározása C1-INH-HAE-ban	67
5.2.3. A neutrofil granulociták vizsgálata kapcsán mért paraméterek összefüggéseinek vizsgálata C1-INH-HAE tünetmentes és rohamos mintákban, valamint egészséges kontroll egyének mintáiban	70
5.2.4. Neutrofil granulocita szám, fehérvérsejt szám és neutrofil granulocita aktivációs markerek kinetikai nyomon követése egy C1-INH-HAE beteg ödémás rohama során	72
5.3. A C1-INH hiány közvetlen következményeinek vizsgálata egy C1-INH-HAE ödémás roham lefolyásának nyomonkövetése során	73
5.3.1. Klinikai tünetek és súlyosságuk egy C1-INH-HAE beteg nyomonkövetése során	74
5.3.2. A C1-INH szint és a klinikai tünetek közötti összefüggések vizsgálata	75
5.3.3. A komplementrendszer klasszikus útvonalának kinetikai vizsgálata a nyomonkövetés során.....	76

5.3.4. A C3 aktiválódásának és a terminális út aktiválódásának vizsgálata egy C1-INH-HAE beteg ödémás rohamának nyomonkövetése során.....	78
6. MEGBESZÉLÉS.....	81
6.1. A koagulációs, fibrinolitikus és kontaktrendszer változásainak egyidejű, átfogó vizsgálata C1-INH-HAE-ban.....	81
6.2. Neutrofil granulociták vizsgálata C1-INH-HAE-ban.....	87
6.3. A C1-INH hiány közvetlen következményeinek vizsgálata egy C1-INH-HAE ödémás roham lefolyásának nyomonkövetése során.	90
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	93
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	95
9. SUMMARY.....	96
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	97
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	121
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk.....	121
11.2. A disszertációtól független publikációk.....	121
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	125

1.Rövidítések jegyzéke

C1-INH	C1-inhibitor
C1-INH-HAE	C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditér angioödéma
CL-K1	Kollektin-11
CL-L1	Kollektin-10
CR1	1-es típusú komplement receptor
CR3	3-as típusú komplement receptor
CRP	C-reaktív protein
CV	Variációs koefficiens
EDTA	Etiléndiamin-tetraacetát
F1+2	Protrombin fragmens 1+2
FIX ill. FIXa	IX-es faktor ill. aktivált IX-es faktor
FV ill. FVa	V-ös faktor ill. aktivált V-ös faktor
FVII ill. FVIIa	VII-es faktor ill. aktivált VII-es faktor
FVIII ill. FVIIIa	VIII-as faktor ill. aktivált VIII-as faktor
FX ill. FXa	X-es faktor ill. aktivált X-es faktor
FXI ill. FXIa	XI-es faktor ill. aktivált XI-es faktor
FXII ill. FXIIa	XII-es faktor ill. aktivált XII-es faktor
FXII _f	XII-es faktor fragmens
FXIII ill. FXIIIa	XIII-as faktor ill. aktivált XIII-as faktor
G-CSF	Granulocita-kolónia stimuláló faktor
GM-CSF	Granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
HK	Nagymolekulasúlyú kininogén
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
LMM	Lineáris Mix Modell
LPS	Lipopoliszacharid
MAP-1	MBL/fikolin-asszociált protein-1
MASP-1/2/3	MBL-asszociált szerin-proteáz-1/2/3
MBL	Mannóz-kötő lektin
MPO	Mieloperoxidáz

NE	Neutrofil elasztáz
NET	Neutrofil extracelluláris trap
PAI-1	Plazminogén aktivátor inhibitor-1
PAR-4	Proteáz aktiválta receptor 4
PK	Plazma kallikrein
PPK	Plazma prekallikrein
PTX3	Pentraxin 3
sMAP	Kis MBL/fikolin-asszociált protein
TAT-komplex	Trombin-antitrombin komplex
TCC	Terminális komplement komplex
TF	Szöveti faktor
TNF- α	Tumornekrózis faktor- α
tPA	Szöveti-típusú plazminogén aktivátor
uPA	Urokináz-típusú plazminogén aktivátor
VAS	Vizuális analóg skála

2. BEVEZETÉS

2.1. A C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditár angioödéma

A C1-inhibitor (C1-INH) hiányában kialakuló hereditár angioödéma (C1-INH-HAE) egy ritka (becsült gyakorisága: 1/10.000-1/50.000), autoszomális domináns módon öröklődő kórkép. A betegség hátterében a komplement-aktiválódás klasszikus és lektin útjának, valamint a koagulációs, a fibrinolitikus és a kontakt-kininrendszer megfelelő szabályozását biztosító szerin-proteáz inhibitor, a C1-INH heterozigóta deficienciája áll (1). Két típusát különítjük el: a C1-INH-HAE I-es típusában a mutáció következtében csökkent a fehérje termelődése, míg a C1-INH-HAE II-es típusában a termelődő mutáns fehérje funkcióképtelen (2). Eddigi ismereteink szerint a C1-INH-HAE ödémás rohamok kialakulásának hátterében a bradikinin fokozott termelődése áll, melynek hatására érpermeabilitás-növekedés következik be (3).

2.1.1. Klinikai tünetek

A betegséget epizódikusan visszatérő, nem gyulladásszerű szubkután és/vagy szubmukózos lokalizációjú angioödémák jellemzik (1. ábra). A szubkután ödémák leggyakrabban a végtagokon, törzsön, arcon vagy a nemiszerveken jelentkeznek, megjelenésüket fájdalom, viszketés, illetve urtikária nem kíséri. A szubmukózos lokalizációjú ödémák közül a gyomor-béltraktus nyálkahártyáját érintő ödémát gyakran görcsös hasi fájdalom, hányinger, hányás kíséri. Gyakran előfordul, hogy az ödéma tünetei tévesen akut has diagnózisának felállításához és ezáltal szükségtelen műtéti beavatkozáshoz vezetnek (4, 5). Ritkábban előforduló a felső légutakat érintő ödéma, amely ugyanakkor életveszélyes állapothoz, akár fulladáshoz is vezethet (6).



1. ábra. A C1-INH-HAE-ra jellemző szubkután (A-B) és szubmukózos (C) ödémák (Prof. Dr. Farkas Henriette képanyagából)

A legtöbb beteg esetében az első tünetek gyermekkorban, illetve serdülőkorban jelentkeznek (7). A tünetek gyakorisága, súlyossága betegenként változó és még családon belül is nagy eltérést mutathat. Az angioödémás tünetek általában 2-5 napon belül spontán elmúlnak (4, 8).

Ismertek bizonyos trigger faktorok, melyek a rohamok kialakulását provokálhatják (emocionális stressz, fizikai sérülés, fertőzések, kimerültség, hormonális változások vagy akár az időjárás változás is) (9-12). Felmérések alapján a leggyakrabban ödémás rohamot provokáló trigger faktorok a mentális stressz, a fizikai kimerültség, illetve a mechanikai trauma (9, 13).

A betegek többségében az ödémás tünetek kialakulását megelőzően gyakran prodromális tünetek jelentkeznek, melyek lehetnek kevésbé specifikusak, mint például kimerültség, rossz közérzet, bőrfeszülés, zsibbadás, izomfájdalom vagy hányinger, illetve a legspecifikusabb, objektív prodromális tünet a bőrön testszerte, térképrajzolathoz hasonló, nem viszkető bőrijelenség az ún. erythema marginatum megjelenése. Meg kell említeni ugyanakkor, hogy ezen tünetek jelenlétét nem minden esetben követi ödémás roham kialakulása. A felmérések alapján a leggyakrabban előforduló prodromális tünetek a rossz közérzet, kimerültség, ingerlékenység, s ezt követően az erythema marginatum (14-18).

2.1.2. A C1-INH-HAE diagnózisa

A diagnózis a klinikai tünetek alapján, a családi anamnézis figyelembevételével valamint laboratóriumi vizsgálatok elvégzésével állapítható meg (10). Mivel a tünetek első megjelenése bármely életkorban bekövetkezhet és a betegség súlyossága előre nem jósolható meg, nagyon fontos a diagnózis korai felállítása, a beteg gondozásba vétele és megfelelő gyógyszerrel való ellátása, amellyel az életveszélyes állapotok kialakulása megelőzhető. A laboratóriumi vizsgálatok a diagnosztikus értékű komplement paraméterek (C1-INH koncentráció, C1-INH funkcionális aktivitás, C4, C1q, C1-INH elleni antitestek) meghatározása mellett molekuláris genetikai vizsgálatot foglalnak magukba. A C1-INH-HAE mindkét típusára jellemző, hogy a betegekben a C1-INH funkcionális aktivitása alacsony. A C1-INH-HAE I-es típusában a mutáns génről nem íródik át a fehérje, így a C1-INH antigenikus koncentrációja csökkent, az egészségesekben mérhető érték 50%-át sem éri el. Ezzel szemben a C1-INH-HAE II-es

típusában a C1-INH fehérje plazmakoncentrációja normális, vagy olykor meg is haladhatja az egészségesekben mért értékeket, így antigenikus mérési módszerekkel nem mutatható ki, míg a C1-INH funkcionális aktivitásának meghatározásával jellemzően az egészségesekben mért aktivitás <10-30%-át mérjük (19). A C4 koncentráció a C1-INH-HAE mindkét típusában alacsonyabb az egészségesekben mért értékeknél, bár ez nem specifikus a C1-INH-HAE-ra – egyes autoimmunbetegségekben is előfordulhat alacsony C4 szint – ugyanakkor kiegészítő vizsgálatként elvégzése javasolt. A C1q és a C3 komplement komponensek szintjei jellemzően a normál tartományon belül vannak, és C1-INH ellenes antitestek sem mutathatók ki, melyek szerzett C1-INH hiányra utalhatnának (20, 21)(1. táblázat).

1. táblázat. Komplement paraméterek jellemző szintje a C1-INH-HAE két típusában. A szimbólumok a normáltartománytól való eltérést mutatják.

	C1-INH koncentráció	C1-INH funkcionális aktivitás	C4	C1q	C3	C1-INH elleni antitestek
C1-INH-HAE I-es típus	↓	↓	↓	Normális	Normális	-
C1-INH-HAE II-es típus	Normális/↑	↓	↓	Normális	Normális	-

Előfordul, hogy a fennálló tünetek mellett a komplement analízis elvégzése után sem egyértelmű a diagnózis, ebben az esetben a C1-INH génjében (*SERPING1*) lévő mutáció kimutatása segít a diagnózis felállításában. Eddig több mint 450 olyan mutációt azonosítottak, amely összefüggésbe hozható a C1-INH-HAE-val, ugyanakkor az esetek 5-10%-ában nem mutatható ki a betegséggel összefüggésbe hozható mutáció. Az eddig közölt mutációk listája internetes adatbázisban elérhető (<http://hae.enzim.hu/>) (22).

2.1.3. A C1-INH

A C1-INH a szerpinek (szerin-proteáz inhibitorok) szupercsaládjába tartozó, erősen glikozilált, 75 kDa tömegű molekula. Elsődlegesen a májban termelődik, de egyéb sejttípusok is termelhetik, mint pl. monocita, fibroblaszt (23). A C1-INH, más inhibitorokkal együttműködve képes gátolni a komplement-, koagulációs, fibrinolitikus és a kontakt-kinin rendszer egyes szerin-proteázait, ezáltal megakadályozva a különböző rendszerek aktiválódását és így proinflammatorikus és érpermeabilitást

fokozó mediátorok felszabadulását. A C1-inhibitor gátló funkciójáért a 8-as exon által kódolt, a fehérje C-terminális végén elhelyezkedő rész a felelős. A folyamatban a C1-INH szubsztráthoz hasonló molekulaként viselkedik, azzal a különbséggel, hogy a target szerin-proteázokról a valódi szubsztrátjuk a hasítás után leválik, míg a szerin-proteáz a C1-INH-t hasítva irreverzibilis, kovalensen kötött komplexet hoz létre (24, 25).

2.1.4. Az ödémás roham patomechanizmusának vizsgálati lehetőségei

Annak ellenére, hogy a jelenlegi ismeretek alapján a fokozott bradikinin felszabadulás eredményeként bekövetkező érpermeabilitás-növekedés áll az ödémás rohamok kialakulásának hátterében, az ödémás roham kialakulásának, lefolyásának pontos biológiai háttere még nem ismert. A mai napig kérdéses, hogy hogyan lehet az, hogy azonos genetikai és/vagy környezeti tényezők mellett a betegség manifesztációja inter- és intraindividuális különbséget mutat. A patomechanizmus megértését célzó vizsgálatok a betegek és egészséges kontroll egyének vérmintáinak összehasonlításán alapulnak, az eredményeket általában összevetik tünetmentes periódusban és ödémás rohamok alatt levett vérmintákban mért értékekkel is. Az irodalomban számos, a patomechanizmusra vonatkozó ellentmondó eredményt találunk, aminek okai lehetnek, hogy legtöbbször nagyon kis esetszámú (5-10 beteg) vizsgálatok alapján vannak lekövetkeztetéseket, illetve gyakran nem ugyanannak a betegnek a tünetmentes és ödémás roham alatt levett vérmintáit hasonlítják össze. Az is befolyásolhatja az eredményeket, hogy a természetes lefolyású ödémás roham maga is egy változó állapot, a tünetek megjelenését követően fokozódás, majd egy stagnáló időtartamú szakaszt követően a tünetek enyhülése következik a megszűnésig. Így nem mindegy, hogy a roham alatt mikor lett levéve a vérminta, ugyanis feltételezhetően az egyes laboratóriumi paraméterek az ödémás roham lefolyása alatt az egyes szakaszokban eltérő értékeket mutathatnak.

Az ödémás rohamok patomechanizmusának megértéséhez nagyban hozzájárulhatna, ha az egyes laboratóriumi paraméterek kinetikáját nyomon tudnánk követni egy-egy ödémás roham alatt, a rohamot megelőző tünetmentes állapottól kiindulva az ödéma teljes elmúlásáig. Ilyen vizsgálatok azonban a mai napig nem történtek, csak klinikai vizsgálatok kapcsán, amiknek a célja azonban a gyógyszer hatásmechanizmusának

vizsgálata volt, nem az ödéma természetes lefolyásában szerepet játszó folyamatok megfigyelése.

Doktori munkám célja az ödémás rohamok patomechanizmusának pontosabb megismerése, a folyamatok megértése volt, ugyanis a mai napig nem, vagy csak alig vizsgálták, hogyan járulhatnak hozzá a C1-INH hiányában érintett plazmaenzimrendszerek az ödémás tünetek kialakulásához és/vagy lefolyásához.

2.2. Plazmaenzimrendszerek

A szervezet homeosztázisának biztosítására a vérben több olyan proteolitikus enzimrendszer található, amelyek kaszkádszerű elven működnek. A plazmaenzimrendszerek komponensei nyugalmi állapotban inaktív zimogénként vannak jelen a szervezetben, azonban megfelelő aktiváló stimulus hatására e komponensek egymással láncreakcióba lépnek. Az egyik komponens proteolitikus hasítás eredményeként aktiválódik és a soron következő komponenst enzimatikusan hasítva aktiválja. Ezen az elven működik a komplement-, a véralvadási, a fibrinolitikus, valamint a kontakt-kinin rendszer.

2.2.1. A komplementrendszer

A komplementrendszer a veleszületett immunitás elengedhetetlen része, ugyanakkor segíti az adaptív immunrendszert is. Több mint 40 szolubilis és membrán-kötött fehérje komponensből, receptorokból és szabályozó fehérjékből álló rendszer (26). Elemei nagyrészt zimogén formában keletkeznek, majd proteolitikus hasítás eredményeként aktiválódnak és további komponenseket aktiválnak szintén proteolitikus módon.

A komplementrendszer aktivációja a sérülés-asszociált molekuláris mintázatok megjelenésével kezdődik, amely lehet egy patogén vagy a szervezet saját DNS-e sérült sejtéből kiszabadulva, módosult lipidek, oligoszacharidok, hősokk-fehérjék. Az aktiválódás három útvonalon mehet végbe: a klasszikus, az alternatív és a lektin útvonalon, attól függően, hogy a sérülés-asszociált molekuláris mintázatok felismerésében és a további lépésekben mely komponensek vesznek részt. Ezen útvonalak a C3-konvertázok létrejöttével egyesülnek, melyek a C3 fehérjét hasítva a C3b-t, és a környezetbe diffundáló C3a anafilatoxint eredményezik. Mindhárom útvonal

végül a membránkárosító komplex - más néven terminális komplement komplex (TCC) - kialakulásához vezet.

A komplementrendszer az egyik leghatékonyabb effektor rendszer, amelynek aktiválódása elősegíti a szervezetbe került kórokozók és testidegen anyagok elpusztítását és eliminálását. Egyrészt a TCC kialakulása által előidézett direkt sejtlízissel, másrészt a patogének opszonizálása által a komplementreceptorokkal rendelkező sejtek fagocitózissal történő felvételét és elpusztítását segítik elő. Ez utóbbi folyamatban a C3 hasításakor keletkező C3b és annak további hasított fragmentumai a célsejten felhalmozódnak, mintegy megjelölik, így az könnyen felismerhetővé válik a komplementreceptorokkal rendelkező fagociták számára. Az opszonizáció folyamata – az effektor funkción kívül – elősegíti az adaptív immunválasz kialakulását, amely magába foglalja az antigén bemutatását, az immunológiai memória kialakulását, a B-limfociták antigénreceptorokon keresztül történő kostimulációját, valamint modulálja a T-limfociták aktivitását. A végrehajtó szerepe mellett a kaszkád egyes komponensei döntő szerepet játszanak a veleszületett és adaptív immunrendszer kölcsönhatásának kialakításában, illetve részt vesznek bizonyos immunfolyamatok megindításában és szabályozásában. Mindezek mellett a komplementrendszer a gyulladásos folyamatokban is központi szerepet tölt be és a szervezet saját elpusztult sejtjeinek eltakarításában is részt vesz (27, 28).

2.2.1.1. Az aktiválódás útjai

A klasszikus útvonalon történő aktiváció

Elsősorban IgG-t vagy IgM-et tartalmazó immunkomplexek indítják el a folyamatot, de emellett a C1-hez kötődő polianionok, egyes vírusok és baktériumok, bakteriális endotoxinok, XII-es faktor (FXII) és pentraxinok (pl. CRP) is eredményezhetik az aktivációt. A C1 molekulakomplex C1q alegysége tölti be a felismerő funkciót, a négy szerin-proteáz (C1s-C1r-C1r-C1s) pedig az aktiválódásért, a komplex proteolitikus aktivitásáért felelős. A C1q az immunkomplexben lévő immunglobulin molekula Fc-részéhez vagy töltéssel rendelkező/hidrofób mintázatokhoz kötődik globuláris feji részével. A kötődés a C1r alegységben konformáció-változást idéz elő, ami ezáltal autokatalízis révén aktiválódik. Az aktivált C1r ezután proteolitikusan hasítja a C1s alegységet, mely szintén enzimátikus aktivitást nyer (29, 30). Az aktív C1s két

szubsztrátja a C4 és a C2. A C4 molekula proteolitikus hasításával keletkező nagyobbik fragmentum a C4b, kovalensen kötődik az aktiváló ágens felszínére, majd a C2 hasítása is megtörténik olyan módon, hogy a felületre kötődött C4b megköti a C2 fehérjét, ami így a C1s számára megfelelő közelségbe kerül és proteolitikusan hasíthatóvá válik. A folyamat során keletkező C2a is kapcsolódik a C4b-hez. Ennek eredményeként létrejön a klasszikus útvonal C3-konvertáz enzime (C4b2a), mely a komplementrendszer működése során központi szerepet játszó C3 molekula aktiválására képes. A C3 molekula hasításából keletkező két fragmentum a C3b és az anafilatoxin C3a. A C3b fragmentum hozzákötődik az aktivátor felszínén lévő C4bC2a-hoz, az így létrejövő trimolekuláris komplex a klasszikus út C5-konvertáza (C4b2a3b). Ha a C5 molekula hasítódik, a létrejövő C5b az antigén felületére kötődik (31). A C5 aktivációs lépést követően a klasszikus, a lektin és az alternatív aktivációs folyamatok megegyeznek.

A lektin útvonalon történő aktiváció

A mannóz-kötő lektin (MBL), fikolinok (fikolin-1, fikolin-2 és fikolin-3) és kollektinek (kollektin-10 (CL-L1)/ kollektin-11 (CL-K1)) szolubilis mintázat-felismerő molekulák, melyek a komplementrendszer lektin útvonalát az MBL-asszociált szerin-proteázok (MASP-1, MASP-2) közreműködésével aktiválják. A mikroorganizmusoknak, illetve elhalt gazdasejteknek a szénhidrát vagy N-acetil mintázatához kötődik az MBL/fikolin/kollektin, melyek hasonlóan a C1 molekula-komplex felépítéséhez, a zimogén MASP-okkal alkotott komplex formájában keringenek a plazmában. Az aktív MASP-2 a C4 és C2 fehérjét hasítja, ezáltal hozzájárul a klasszikus úttal megegyező C3 konvertáz (C4b2a) kialakulásához (31). A MASP-2 aktivációja erősen függ a MASP-1-től, a MASP-1 autoaktivációja következtében hasítja a zimogén MASP-2-t, ezáltal aktiválja. A MASP-1 a C2 hasítására is képes, ezáltal felerősíti a MASP-2 C3-konvertáz (C4bC2a) kialakító képességét (32-34). A MASP-1 gátlásával a MASP-2 aktiválódásának mértéke jelentősen lecsökken, ugyanis a MASP-2 autoaktiválódása nagyon lassú folyamat. A két enzim közötti kooperáció lehet a magyarázata annak a megfigyelésnek, hogy minden MBL/MASP-komplex által létrehozott C4b a C2a-val való kapcsolódás eredményeként C3-konvertázzá alakul, míg a klasszikus útvonal esetén csupán minden negyedik C4b formálódik C3-konvertázzá (34, 35). A létrejött

C3-konvertáz elhasítja a C3 fehérjét C3a és C3b fragmentekre, majd a fentebb leírtak szerint a komplement-aktiválódás a C5 konvertáz (C4b2a3b) kialakulásába torkollik.

Előzetes tanulmányok alapján az MBL-lel, illetve fikolinokkal szintén komplexet formáló MASP-3-nak a komplementrendszer alternatív útjának aktiválásában lehet szerepe (36), valamint a nem enzimikus funkciójú MBL/fikolin-asszociált fehérje 1 (MAP-1) és a kis MBL/fikolin-asszociált fehérjék (sMAP) feltételezhetően a lektin út aktiválódás szabályozásában vesznek részt olyan módon, hogy a MASP-2-vel versengenek az MBL-hez, illetve fikolinokhoz való kötődésben (37, 38).

A fikolinokon és az MBL-en kívül a CL-K1, illetve CL-L1 is képes komplexképzésre a MASP-1, a MASP-2, a MASP-3, illetve a MAP-1 fehérjékkel, és feltételezhetően részt vesznek a lektin út aktiválásában (39-41). A CL-L1 a CL-K1-gyel alkotott 1:2 sztöchiometrikus arányú komplexe képes kötödni a MASP-okhoz. A kollektinek kötődése mannanhoz vagy DNS-hez, MASP-2 jelenlétében CL-L1-CL-K1-mediált C4b depozíciót eredményez (42).

Az alternatív úton történő aktiváció

A komplement alternatív útvonal folyamatosan, ellenanyagtól függetlenül aktiválódik a C3 fehérjében található tioészter-kötés fluid fázisban kis intenzitással végbemenő spontán hidrolízisének és aktivációjának eredményeképpen (43). A C3(H₂O) strukturálisan és funkcionálisan is hasonló a C3b-hez (44) és kedvező környezetben - mint például a kórokozók, gombák és vírusok nukleofil csoportokkal rendelkező felszíne, amik csak kis mennyiségben tartalmaznak szíálsavat- a felszínhez kötődve aktív marad. A szervezet saját sejtjei nagy mennyiségben tartalmaznak szíálsavat a membránban, ami nem kedvez az alternatív út aktiválásának. A C3(H₂O) B faktort képes kötni, amelyet a D faktor hasít. A keringésben folyamatosan jelenlevő aktív D faktor feltehetően pro-enzimként szekretálódik adipocitákból és MASP-3 hatására aktiválódik (45). A hasítás hatására C3(H₂O)Bb, a fluid-fázis instabil C3 konvertáza keletkezik. A komplexben levő Bb a natív C3-at hasítja. A keletkező C3b az aktivátor felszínhez tud kötödni, B faktoral kapcsolódik Mg²⁺ jelenlétében, majd a B faktor D faktor általi hasítása következtében kialakul a C3bBb, az alternatív út C3-konvertáza (46). A komplexet a properdin stabilizálja (C3bBbP), egyébként pár perc után inaktiválna (47). A C3 lassú, spontán hidrolízise mellett leírták a properdinről, hogy

mint felismerő molekula, direkt módon kötődik apoptotikus és nekrotizáló sejtek felszínére és triggereli az alternatív útvonalon történő aktivációt (48-51). A felszínhez kötődött properdin képes megkötni a C3(H₂O)-t, ezáltal kialakulhat egy új, ún. sejthez-kötött C3(H₂O)-konvertáz (52). A properdin-mediált aktiváció kifejezettebb lehet olyan betegségekben, melyekben a komplementreguláció sérült (53, 54). A C3-konvertáz további C3 molekulákat képes hasítani, ezzel nagyfokú amplifikációt tesz lehetővé. A keletkező C3b komponens a C3bBb mellé kötődve a C5 molekula hasítására képes alternatív C5-konvertáz komplexet (C3bBbC3b) hozza létre (55). A properdin ezt az enzimet is képes stabilizálni.

A komplement-aktiválódás terminális szakasza

A kaszkád utolsó proteolitikus hasítását a C5-konvertáz végzi, melynek eredményeképpen a C5 komponens hasítódik C5a és C5b fragmentumra. A C5a erős anafilatoxin, ami a környezetbe diffundál, míg a C5b a célfelszínre kötődik, majd bekötődik mellé a C6 majd azt követően a C7 komponens, ami által a komplex hibroföbbsé válik. Ez lehetővé teszi, hogy a komplexhez kötődő C8 komponens képes a membránba mélyedni, mely által már végbemehet kismértékű lízis. A célsejt elpusztítását végül a C8-hoz kötődő számos C9-molekula váltja ki pórusképzéssel (56, 57).

2.2.1.2. Anafilatoxinok

A komplementrendszer aktiválódása során keletkező anafilatoxinok - a C3a, C4a és C5a - 10 kDa méretű polipeptidek, melyek a komplement-aktiválódás során a környezetbe diffundálnak. Bár mindhárom fehérje strukturálisan hasonló, csak a C3a és a C5a mutat funkcionálisan hasonló profilt, míg a C4a feltehetően rövid időn belül lekerül az anafilatoxinok listájáról biológiailag limitált aktivitása miatt. A C5a a leghatékonyabb anafilatoxin, részt vesz a szervezet védekező reakcióiban, indukálja a granulociták és monociták kemotaxisát és degranulációját (58, 59), növeli az erek permeabilitását (60, 61) és simaizom-kontrakciót indukál (62). A C5a mellett a C3a is részt vesz ezen folyamatok indukációjában de kisebb határfokkal (63). Aktivitásuk révén továbbá, a mieloid sejtek mellett, vérlemezkék aktiválódását is indukálják (64), modulálják a CD4/CD8 és $\gamma\delta$ T sejteket (65-67), valamint fokozva a citokinek termelését akut fázis

reakciót idéznek elő (68). Szerepük van a sejt homing és szöveti regeneráció folyamatában is (69-72). Ezzel szemben a C4a valószínűsíthetően e funkciókkal nem rendelkezik, illetve működésével kapcsolatban ellentmondó eredmények jelentek meg az irodalomban. Alapvető problémát okozhat a C4a preparátum tisztaságának kérdése. Azon tanulmányok, melyek arra utalnak, hogy a C4a kisebb hatásfokkal (100-szorosára növelt koncentráció mennyiségben), de képes indukálni a C3a-ra illetve C5a-ra jellemző funkciókat abból adódhatnak, hogy a tisztított C4a preparátumok nem 100%-os tisztaságúak, nagyon kis mennyiségben, de C3a és C5a is megtalálható bennük. Így valószínűleg a C4a-nak tulajdonított funkciók a rendszerben maradt C3a/C5a-nak köszönhetőek, mintsem a C4a-nak (73, 74). A C4a-ra és C3a-ra is jellemző receptor-független antimikrobiális hatás Gram⁻ és Gram⁺ baktériumok irányában (75, 76). A C4a pontos funkcióinak feltárása szükséges.

2.2.1.3. A komplement-aktiváció szabályozása

A szervezet saját sejtjeinek védelmét és a túlzott mértékű komplement aktiválódás kivédését inhibitorok biztosítják. A szabályozásban szolubilis molekulák és membránfehérjék is részt vesznek.

Ezek a szabályozó molekulák működésüket tekintve lehetnek enzim gátlók, mint például a szolubilis C1-INH, amely gátolja a C4 és C2 komponensek aktiválását a C1r, C1s, MASP-1 és MASP-2 gátlásával, és ezáltal gátolja a klasszikus és lektin úton történő aktivációt. A C1-INH kizárólagos regulátora a C1s-nek és C1r-nek, és fő regulátora a MASP-1-nek és MASP-2-nek (az antitrombin (AT) mellett), ugyanakkor a MASP-ok és így a lektin út aktivációja gátolható a MAP-1 és a sMAP-ok által is a lektin út aktivációjánál leírt módon (37, 38, 77, 78). Az alternatív úton végbemenő aktivációt oldatban elsősorban a H faktor, vagy annak csonka homológja, a H faktor-szerű fehérje 1 regulálja. A H faktor az alternatív útvonal C3-konvertázán fejt ki hatását. Egyrészt meggátolja a C3-konvertáz létrejöttét, másrészt kompetitív módon gyorsítja a C3bBb szétesését a Bb eltávolításával, valamint kofaktorként szolgál a C3b I faktor általi hasításakor melynek eredménye az iC3b fragmentum. Az I faktor a C3b mellett a C4b-t is hasító szolubilis enzim, így az alternatív út C3-konvertázán túl a klasszikus/lektin-indukált útvonal C3-konvertázának kialakulását is gátolja (79, 80). Az I faktor inaktív formában kering a plazmában, aktivációja és így a C3b és C4b

proteolízise csak akkor következik be, miután az I faktor szubsztrátjához és kofaktor fehérjéinek valamelyikéhez kötődik (81). Ilyen kofaktor fehérje a H faktoron kívül a membrán kofaktor fehérje, az 1-es típusú komplementreceptor (CR1) vagy a C4b-kötő fehérje (78, 82). A klasszikus és alternatív útvonal C3/C5-konvertázainak szétesését gyorsítja még a CR1 és a *decay accelerating factor* (DAF, CD55). A C3-konvertázok regulátoraihoz képest jóval kevesebb C5 specifikus regulátorról van tudomásunk. A H faktorról rokon fehérje 1 direkt módon köt a C5 fehérjéhez gátolva a C5-konvertáz aktivitását, a makrofágokon kifejeződő komplement receptor (CRIg) pedig a C3b megkötése által gátolja a C3-, illetve C5-konvertázok létrejöttét (83, 84). Az anafilatoxin-inaktivátor (karboxipeptidáz N) a C3a és C5a peptidekről lehasítja a terminális arginint, melynek következtében ezek inaktiválódnak, bár a C5a_{desarg} még ebben a formában is ellát bizonyos funkciókat, pl. kemotaktikus aktivitása van. A protektin (CD59), amely egy integráns membránfehérje, kötődik a C5b-8 és C5b-9-hez a lipid kettősrétegben, megakadályozva a TCC kialakulását (85). A TCC kialakulásának kontrolljában részt vesz még két szolubilis regulátor fehérje, a klaszterin és a vitronektin (komplement S-protein). A klaszterin a C7 fehérjéhez kötődve megakadályozza annak membránhoz kötődését (86). A vitronektin egyrészt a C5b-7-hez kötődve megakadályozza a TCC kialakulását oly módon, hogy az TCC komplex nem képes integrálódni a membránba, másrészt gátolja a C9 polimerizációját, ezáltal a kórokozók lízisét (87).

Az aktivált vérlemezkékből felszabaduló polifoszfát negatív regulátora a terminális útnak (88). Számos baktériumról leírták, hogy polifoszfát (89), vagy H-faktor (90) felhasználásával menekül meg a komplement-mediált lízistől.

2.2.1.4. A komplementrendszer összefüggései a C1-INH-HAE ödémás rohamok patomechanizmusával

A C1-INH kizárólagos inhibitora a komplementrendszer klasszikus útvonalának, így a funkcionális C1-INH hiányának következményeit a klasszikus út komponensein jól megfigyelhetjük. A C1-INH funkcionális aktivitását tekintve az irodalomban ellentmondó eredményeket találunk, egyaránt leírtak ödémás rohamok alatti aktivitásemelkedést, illetve -csökkenést is (91, 92). Munkacsoportunk korábban azt találta, hogy kezelésben még nem részesült betegekben a C1-INH diagnóziskor mért funkcionális

aktivitása korrelál a betegség súlyosságával, és előre jelezheti a várható rohamgyakoriságot (93, 94). Ehhez hasonlóan a C1/C1-INH komplex szintje esetében azt találták, hogy előre jelezheti a betegség várható súlyosságát (94), valamint az ödémás rohamok alatt szintjében emelkedést mutattak ki a tünetmentes periódushoz képest, így az ödémás rohamok alatti korai komplement-aktiváció szenzitív markereként említik (95, 96). Annak ellenére, hogy a betegekben mért emelkedett C4b/C4 arány a klasszikus útvonal aktiválódására utal, mégsem találtak különbséget az alaptól normál tartomány alatt mérhető C4 szintben, összehasonlítva a roham alatt levett mintákat a tünetmentes periódusban mértekkel (96). A C4 hasításának hátterében részben a C1-INH hiányában fokozottan aktiválódó MASP-2 is állhat. *Csuka és munkatársai* emelkedett MASP-2 koncentrációt és ficolin-3/MASP-2 komplex szinteket mértek ödémás rohamok során, amely a fikolin-lektin útvonal aktiválódására utal ödémás rohamok során (97). A terminális út aktiválódásával kapcsolatban ellentmondó eredmények jelentek meg az irodalomban. Míg a C3, C3b, C5a esetében nem találtak különbséget a tünetmentes állapotban és ödémás rohamok során levett vérmintákban (96), addig emelkedett TCC-szintet és csökkent ficolin-3-mediált TCC lerakódást tapasztaltak ödémás rohamok során (96, 97).

Míndezek alapján tehát történtek ugyan komplementrendszer változásaira vonatkozó vizsgálatok, de további átfogó vizsgálatok szükségesek a klasszikus és terminális út ödémás rohamok alatt bekövetkező változásainak tisztázására.

2.2.2. A kontakt rendszer

A kontaktrendszer szerin-proteázok és azok szubsztrátjainak csoportjából áll, melyek a keringésben lévő sejtek, valamint az érfal felszínén lépnek egymással kölcsönhatásba. A rendszer szerin-proteáz zimogénjei a FXII, a XI-es faktor (FXI) és a plazma prekallikrein (PPK), a szubsztrát pedig a nagymolekulású kininogén (HK), melyet a PPK aktivált formája, a plazma kallikrein (PK) hasít.

2.2.2.1. A kontakt rendszer egyes elemei

FXII

A FXII (Hageman faktor) fehérjét az 5. kromoszómán található *F12* gén kódolja. Főként a máj hepatocitái szintetizálják, majd a szintézist követő posztranszlációs módosulások

után a zimogén FXII 596 aminosavból felépülő, 80 kDa molakulatömegű egyláncú fehérjeként kerül a keringésbe. Limitált proteolízis által a zimogén FXII aktiválódik, az aktivált FXII (FXIIa) egy 243 aminosavból álló könnyű-láncból és egy 353 aminosavból álló nehéz-láncból épül fel. A két láncot egyetlen diszulfid-híd köti össze. A C-terminális könnyű láncon található a szerin-proteáz aktivitásért felelős katalitikus triád (His393, Asp442, Ser544) (98-101).

FXI

A FXI-t a 4. kromoszómán elhelyezkedő *F11* gén kódolja, és a FXII-hoz hasonlóan a májban szintetizálódik, majd egy 609 aminosavból álló fehérje formájában szekretálódik. Egyedülálló sajátága, hogy két monomerből álló homodimerként található a keringésben. Bár az FXI a PPK-nel 58%-os szekvencia azonosságot mutat, a PPK monomer formában található meg a keringésben. Minden FXI monomer N-terminális nehézlánca 4, ún. „apple-domént” tartalmaz, míg a C-terminális könnyű-láncon található a katalitikus triád (His413, Asp462, Ser557), ami a szerin-proteáz aktivitásért felelős. A zimogén FXI aktiválódása hasonlóan a többi szerin-proteáz aktiválódásához egy peptid-kötés proteolitikus hasításának következménye (102, 103).

PK

Zimogén formáját a PPK-t a 4.kromoszómán található *KLKB1* gén kódolja, és a májban történő szintézist követően 619 aminosav hosszúságú egyláncú glikoproteinként szekretálódik (98). Glikoziláltságától függően kétféle formában található meg a keringésben (85 illetve 88 kDa), 75%-ban a HK-val nem kovalens-módon komplexet alkotva. Limitált proteolízis következtében a PPK aktív PK-né alakul, a hasítás során létrejövő N-terminális nehéz- és C terminális könnyű-láncot egy diszulfid-híd köti össze. Nehézlánca hasonlóan a FXI-hoz, 4 „apple-domént” tartalmaz, könnyű lánca pedig hasonlóan a többi szerin-proteázhoz, tartalmazza a katalitikus triádot (His415, Asp464, Ser559)(104).

A kontaktrendszer központi eleme a FXII, mely aktiválódása következtében képes a prekallikrein aktiválása által a kallikrein-kininrendszer (továbbiakban kontakt-kinin rendszer) és a FXI aktiválása által a koagulációs rendszer beindítására is. A továbbiakban a kontakt-kininrendszer aktiválódásáról, valamint a C1-INH-HAE

patomechanizmusával kapcsolatos összefüggéseiről írok, a FXI szerepéről a „2.2.3. Koaguláció és fibrinolitikus rendszer” c. fejezetben esik szó.

2.2.2.2. *A kontakt-kinin rendszer aktiválódása*

A FXIIa, FXIa és PK tripszin-szerű szerin-proteázok jellemzően bázikus aminosavak utáni peptid-kötéseket hasítanak. Az enzimaktivitásért felelős katalitikus triádot alkotó 3 aminosav – His, Asp, Ser – csak a szerin-proteázok zimogén formáinak aktiválódása következtében végbemenő konformáció-változások hatására kerülnek olyan közelségbe, hogy enzimatis funkciójukat betölthessék (102).

A FXII nagy affinitással kötődik negatív töltésekkel rendelkező felszínhez, ahol azután egy peptidkötés hidrolízise révén autoaktiválódik (105). Az autoaktiváció Zn^{2+} ionok jelenlétében még kifejezettebb (106). További, a FXII autoaktivációját elősegítő biológiai felszíneket az elmúlt években, mint pl. DNS, RNS, aggregálódott fehérjék, amiloid plakkok, bakteriális és sejt polifoszfát, illetve az érfal kollagéne (107-111). A PPK és az FXI „apple-doménjeiken” (főként a második veszenne részt) keresztül kötődnek a sejt felszínén levő HK-hoz (112, 113). A FXIIa fő aktivátora a PPK-nek, a keletkező aktív PK képes pozitív visszacsatolással a zimogén FXII aktiválására ezáltal jelentősen felerősítve a FXII és a PPK aktiválódását (114, 115). A PK másik szubsztrátja a 421 aminosavból felépülő, 120 kDa tömegű HK, mely direkt módon kötődik az endotél sejtek felszíni proteoglikánjaihoz. A HK-nak döntő szerepe van abban, hogy a kontaktrendszer elemei megfelelő felszínen kapcsolatba kerüljenek egymással. Kötőhelyeinek száma vélhetően az endotél sejteken a legmagasabb, de granulocitákon és kisebb mértékben vérlemezkéken is megtalálhatók. A HK kötődése a sejt felszínhez Zn^{2+} -függő folyamat (116, 117). A PK a HK két peptidkötését hasítva bradikinint szabadít fel, a visszamaradt, kétláncú hasított-HK-t diszulfidhíd köti össze. A bradikinin kötődve az endotél sejtek felszínén konstitutíven jelenlevő, G-protein-kapcsolt B2-receptorhoz növeli az erek permeabilitását és vazodilatációt okoz. A bradikinin potenciális stimulánsa a nitrogén-oxid és prosztaciklin termelésnek, valamint a szöveti típusú plazminogén aktivátor felszabadulásának (98, 118-120). A nitrogén-oxid mellett a prosztaciklin E2 és prosztaciklin I2 vazodilatátorok felszabadulása másodlagos, a B2-receptor stimulálásának következménye. A bradikinin féléletideje nagyon rövid, gyorsan degradálódik kininázok, mint például az angiotenzin-

konvertáló enzim által. A bradikinin felszabadulása FXII-független módon is bekövetkezhet a PPK aktiválódásán keresztül. Az endotél sejtek felszínéhez kötődött, HK-val komplexben levő PPK fő aktivátora a prolikarboxipeptidáz (121, 122). A hősokkfehérje 90-ről szintén leírták, hogy hozzájárul a PPK aktiválódásához, felerősítve annak autoaktivációját (123). A bradikinin-képződésnek van egy szöveti útvonala is, amelynek során a prokallikrein intracellulárisan szöveti kallikreinné alakul (124). A szöveti kallikrein szekretálódik, és hasítja a kismolekulású kininogént; a képződő kallidin (lizil-bradikinin) aminoszékretálódás során alakul bradikinné (125).

2.2.2.3 A kontakt-kinin rendszer összefüggése a C1-INH-HAE ödémás rohamok patomechanizmusával

Korábbi vizsgálatokban a C1-INH-HAE betegekben már tünetmentes állapotban is magasabb FXIIa és hasított HK szintet mértek, mely szint az ödémás rohamok során tovább emelkedett (126-129). Ezzel egybehangozóan a betegekben tünetmentes állapotban magasabb PK aktivitást mértek, ami ödémás rohamok során tovább nőtt (126, 129, 130). A bradikinin esetében nem egyértelmű, hogy van-e különbség az egészségesek és C1-INH-HAE betegek tünetmentes állapotban mért bradikinin szintjeiben, ugyanakkor ödémás rohamok során levett vérmintákban emelkedett szintjét írták le, és a mai napig az ödéma kialakulásának fő mediátoraként tartják számon (131-133).

2.2.3. A koagulációs és fibrinolitikus rendszer

A szervezet védekező mechanizmusai között említjük a véralvadási rendszert is, melynek fő funkciója a hemosztázis fenntartása, azaz a vér érpályán belüli folyékony állapotának megőrzése, az erek sérülése esetén pedig annak elvesztése, alvadék képzése. A folyamatban molekuláris és celluláris komponensek részvétele is szükséges. Sérülés hatására a véralvadási rendszert alkotó szerin-proteázok egymást kaszkád-szerűen aktiválják. Kulcsfontosságú lépés a kaszkád központi elemének a trombinnak a képződése, mely felelős a fibrin keletkezéséért és indirekt módon annak további módosulásáért. Ezen kívül aktiválja a vérlemezkéket, és az endotél sejteken keresztül részt vesz gyulladási folyamatokban is.

2.2.3.1. Koaguláció

A szöveti faktor (TF) a vérrel nem érintkező sejtek felszínén folyamatosan jelen van. Különböző fertőző betegségekben a TF expresszióját figyelték meg endotélsejtek, illetve monociták felszínén is, bakteriális lipopoliszacharid, interleukin-1 és tumornekrózis faktor- α (TNF- α) hatására (134-138). A TF a véralvadási kaszkád beindításában nélkülözhetetlen, ugyanis hiányában a véralvadási folyamat legfőbb beindítója, a FVII nem hatékony enzim. A TF, mint kofaktor a FVII-ral komplexet alkotva extrém módon növeli az aktivált FVII aktivitását. A TF/FVIIa komplex aktiválja a X-es faktort (FX), ami a protrombint trombinná konvertálja (139). A protrombin enzimatikusan inaktív glikoproteinként szekretálódik a májból a vérkeringésbe. Az FXa két meghatározott peptidkötést hidrolizál. Az egyik kötés (Arg274-Thr275) hasítása a protrombin fragment 1+2 (F1+2)-t eredményezi, mely a protrombin gammakarboxiglutamát (Gla)-oldalláncokat tartalmazó N-terminális része. Ez a szekvencia felelős a protrombinban a különböző lipid-fehérje-Ca²⁺ kölcsönhatásokért. A másik peptidkötés hasítása olyan konformáció-változást idéz elő, melynek eredményeként kialakul a trombin enzimatikusan aktív centruma. Alapvetően ennek a folyamatnak a reakciósebessége nagyon kicsi, azonban aktivált V-faktor (FVa), Ca²⁺ és membránfoszfolipidek jelenlétében, aktiválódási komplexet kialakítva, a protrombin aktiváció folyamata 300 000-szeresére fokozódhat (140). A protrombin és az aktivált FX nem kovalens módon kapcsolódnak egymáshoz valamint Ca²⁺ jelenlétében Gla-oldalláncaikon keresztül a foszfolipidmembrán-felszínhez. Az FV egy proteolitikusan módosított vérplazmafehérje, mely kofaktor szerepet tölt be a reakcióban (141).

A FVIIa nem csak a FX-t aktiválja, hanem a IX-es faktort is (FIX), és ezután a képződött FIXa hatékonyan aktiválja a FX-et. A FX aktivációja a protrombin aktivációjához hasonlóan, aktiválódási komplexben történik. Az FX-et aktiváló enzim a FVIIa vagy FIX, kofaktorok a TF vagy a VIII-as faktor (FVIII). Az FXa pedig pozitív visszacsatolással további FVII-t aktivál. Hagyományosan ezt a folyamatot a véralvadás „extrinsic útjának” is nevezik.

Egy másik lehetséges útja a véralvadási folyamatok beindításának a FXI aktiválásával kezdődik. A jelen álláspont szerint ebben a kontaktrendszer nem vesz részt. Ezt a

feltevést alátámasztja, hogy FXII, PK vagy HK deficiens betegek nem hajlamosak fokozott vérzékenységre (100). A FXI aktiválódásával beinduló, hagyományosan, „intrinsic” útvonalnak a véralvadási kaszkád felerősítésében lehet szerepe. Erre utal, hogy a FXI potenciális aktivátora a trombin, ami erősíti azt a feltételezést, hogy a véralvadási folyamat elsődleges, ha nem kizárólagos megindítója a TF-mediált (hagyományosan „extrinsic”) útvonal. Alacsony TF szint mellett fokozott vérzékenységet figyeltek meg egér kísérletekben, valamint a TF deficiencia embrionálisan letális egérben és emberben is (142, 143). A FXIa számos Ca-függő, proteolitikus hasítással járó folyamatot indít be, amely trombin keletkezéséhez vezet. A FXIa is aktiválja a FIX-et, a FVIIa-tól független, komplex mechanizmus által (144, 145). Az FIXa pedig aktiválja a FX-et, FVIIIa kofaktor és foszfolipidek jelenlétében (146, 147). A FXa a protrombin hasítását keresztül trombint szabadít fel.

A trombin, mind pozitív, mind negatív visszacsatolással képes szabályozni saját képződését. Egyrészt a véralvadási kaszkád kofaktorainak aktiválása által növeli a véralvadási reakció sebességét, másrészt egy szerin-proteáz, az inaktív prekursor protein C aktiválódását katalizálja ami aztán az FVIIIa-t és FVa-t hasítva inaktiválja azokat. A trombin legfőbb inhibitora az AT. Az enzim ekvimoláris komplexet hoz létre az inhibitorral [(TAT)-komplex], és így elveszti aktivitását. További trombin inhibitorok a heparin kofaktor II, az α 1-antitripszin, a C1-INH, valamint az α 2-makroglobulin (141, 148).

A trombin (36 kDa) egy két láncból felépülő szerin-proteáz, mely a többi szerin-proteázhoz képest nagyfokú specificitással rendelkezik a peptidkötések hidrolízisét tekintve. A trombin egyrészt a fibrinogén proteolízise által fibrin monomereket hoz létre, melyek egymáshoz szabályosan kötődve létrehozzák a fibrinhálót, másrészt aktiválja a XIII-as faktort (FXIII), amely a fibrin szerkezetében kovalens keresztkötéseket hoz létre, így stabilizálja a fibrinhálót (149, 150). A fibrin és a trombin által aktivált vérlemezkék együttesen képezik a véralvadékot. A kaszkád aktiválódása egyben gyulladáskeltő folyamatokat is beindít.

2.2.3.2. Fibrinolízis

Normál körülmények között mindig keletkezik és mindig fel is oldódik valamennyi fibrin. A fibrint több proteáz is képes emészteni (tripszin, elasztáz, katepszin G), de a

fibrinolízisért elsősorban a plazmin felelős. A plazmin egy 83 kDa tömegű szerin-proteáz, mely inaktív formában (plazminogén) található meg a keringésben. Két láncból épül fel, melyet diszulfid-híd kapcsol össze. A plazminogén aktivátorai a főként endotél sejtek által termelt urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) és a szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA). A plazmin fő funkciója a fibrin emésztése. A proteolízis sebessége függ a fibrinháló állapotától, a FXIII által már keresztkötött fibrin emésztése több időt igénylő folyamat. A keresztkötött fibrinben emésztés után ún. D-dimerek jelennek meg (151).

A plazminogén aktivátorok inhibitorai közül a legfontosabb a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1), mely ekvimoláris komplexet képez a plazminogén aktivátorokkal és mind az uPA-t, mind a tPA-t gyorsan inaktiválja. A plazmin leghatékonyabb inhibitora a plazmin-inhibitor, a plazminnal szintén ekvimoláris komplexet képez (152).

A tPA szekréció egyik legfőbb ingere a bradikinin. Az uPA inaktív formában szintetizálódik és szekréciója után a legspecifikusabb aktivátora a PK és a plazmin. A PK szerepe azt jelzi, hogy a kontakt-kinin rendszer szoros kapcsolatban lehet a fibrinolitikus folyamatokkal, míg a plazmin szerepe azt mutatja, hogy a plazminogén aktiválását a plazmin pozitív visszacsatolás útján, mind a zimogén, mind az aktivátorok módosításán keresztül felerősítheti (153).

2.2.3.3. A koagulációs és fibrinolitikus rendszer összefüggései a C1-INH-HAE ödémás rohamok patomechanizmusában

Az eddigi koagulációs és fibrinolitikus rendszerek vizsgálatára irányuló vizsgálatokról meg kell jegyeznünk, hogy jellemzően kis esetszámú, nem önkontrollált vizsgálatokból születtek az eredmények. A koaguláció folyamatában elsődleges fontosságú enzim, a FVII emelkedett szintjét figyelték meg C1-INH-HAE ödémás rohamok alatt a tünetmentes periódushoz képest (154). A trombin keletkezésére utaló F1+2 szint ugyancsak emelkedett volt ödémás rohamok során (91, 155), ugyanakkor a trombin-anti-trombin (TAT)-komplex szint emelkedését is leírták (96). A FXI szintjét ödémás rohamok alatt még egy munkacsoport sem vizsgálta, ugyanakkor a FXI szintjében C1-INH-HAE tünetmentes és egészséges egyénekből származó vérminták összehasonlítása alapján nem találtak különbséget (127). A koagulációs rendszer aktiválódása mellett a rohamok során emelkedett plazmin-anti-plazmin komplex és D-dimer szint a

fibrinolitikus rendszer aktiváltságára utal ödémás rohamok során (91, 126, 127). Mindezek ellenére a C1-INH-HAE betegek esetében nem írtak le fokozott trombózisra való hajlamot (91, 156). *Cugno és munkatársai* azonban nem találtak szignifikáns emelkedést rohamok során a D-dimer szintjében (155).

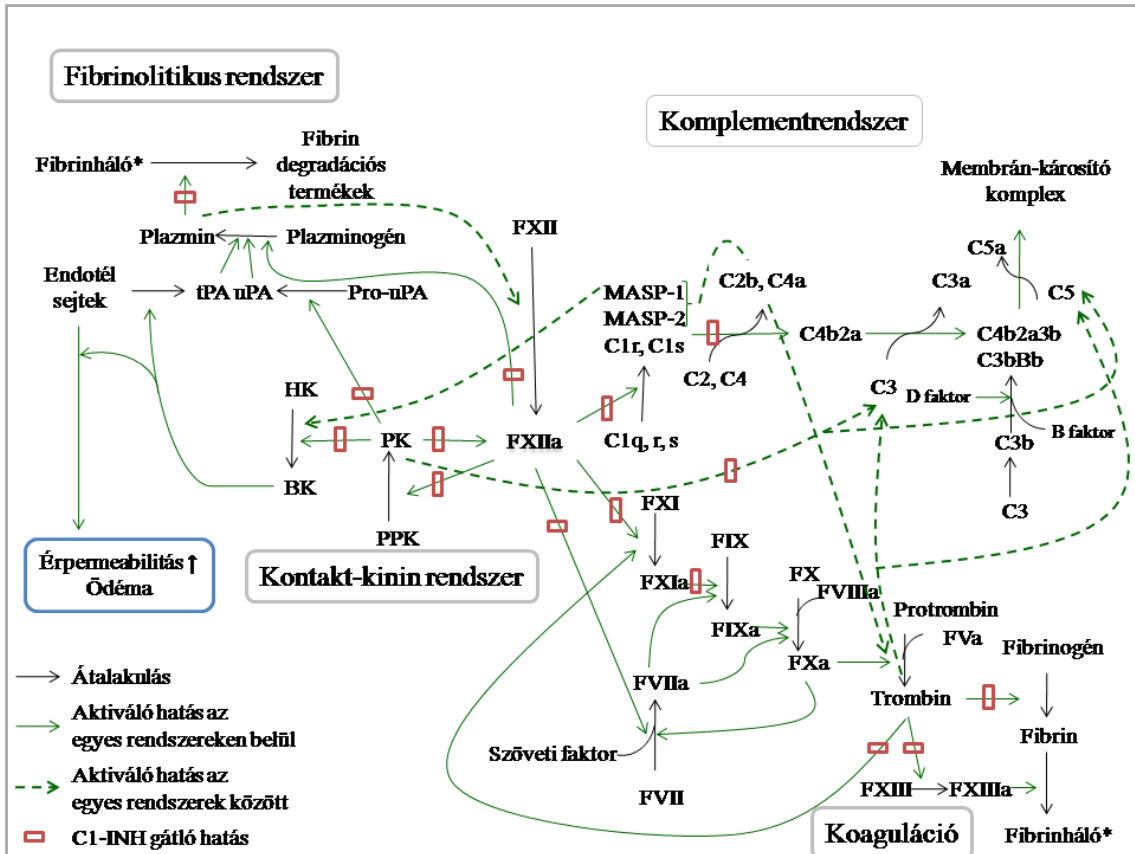
2.2.4. Plazmaenzimrendszerek kölcsönhatásai

Annak ellenére, hogy az egyes plazmaenzimrendszereket külön-külön ismertettem, fontos kiemelni, hogy ezen rendszerek között folyamatos kölcsönhatás figyelhető meg, egymás működésére hatással lehetnek (2. ábra). Az egyik központi résztvevő a FXII, amely autoaktivációja révén a kontakt-kinin rendszer aktiválódását idézi elő, valamint a koagulációs útvonal aktiválására is képes a FXI, illetve a FVII hasítása által. Továbbá a FXII képes a fibrinolízis beindulását is indukálni, közvetlenül – leírták plazminogén aktiváló hatását, bár csekélyebb mértékben, mint a tPA ill. az uPA –, és közvetve is, ugyanis az általa aktivált PK az uPA legspecifikusabb aktivátora, a bradikinin pedig a tPA endotél sejtekből történő szekréciójának egyik legfőbb ingere (157, 158). A PK és a plazmin is képes a FXII aktiválására illetve a FXIIa további hasítására is képesek, ekkor egy 28,5-35 kDa molekuláris tömegű fragment keletkezik (FXII_f), amely megőrzi PPK aktiváló képességét valamint képes aktiválni a komplementrendszer klasszikus útvonalát a C1_r aktivációján keresztül. A FXII_f azonban elveszítette FXI aktiváló képességét (159). A plazmin a HK hasítására is képes, jóllehet a folyamat lassabban megy végbe, és nem eredményez bradikinin felszabadulást, mint a PK általi HK hasítás (160). Ezek alapján a kontakt-kininrendszer szoros kapcsolatban lehet a fibrinolitikus rendszerrel.

A PK direkt módon hasítja a B faktort, ezáltal hozzájárul az alternatív út C3-konvertázának kialakulásához (161), továbbá, Ca²⁺ és Mg²⁺ ionok jelenléte nélkül is képes a komplementrendszer C3 és C5 fehérjéinek hasítására is. A C3 és C5 fehérje hasítására a PK-en kívül még a trombin, a FIXa, FXa és FXIa is képes (162-164). A keletkező C3a és C5a pedig proinflammatorikus és prokoaguláns választ indukálnak főként receptoraikon keresztül, amivel hatással lehetnek a vérlemezkékre, az endotél sejtekre, neutrofil granulocitákra és monocitákra egyaránt. Többek között például a C5a indukálja a TF aktivitást endotél sejteken és neutrofil granulocitákon, így hatással van a TF általi koaguláció beindítására (165). A kialakuló trombusban számos komplement

komponens megtalálható, köztük a C4, C3, C5a és B faktor, melyek valószínűleg a gyulladás kialakulásához és/vagy fenntartásához járulhatnak hozzá (166). A MASP-1 az endotél sejteket a proteáz aktivált receptor 4 (PAR4)- receptorán keresztül aktiválja, ezzel gyulladási citokinek felszabadulását, valamint prokoaguláns választ indukál. A MASP-1 és MASP-2 is képes a protrombint trombinná aktiválni, ugyanakkor a MASP-1-ről leírták, hogy képes a fibrinogén hasítására, ezáltal fibrin monomerek jönnek létre, a FXIII aktiválása által pedig erősíti a fibrinháló stabilitását (167, 168). A PK és a plazmin mellett a MASP-1 is képes a HK hasítására, és hasonlóan a PK általi hasításhoz, a folyamat bradikinin felszabadulását eredményezi (169).

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy számos molekuláris összeköttetés áll fenn a plazmaenzimrendszerek között, melyek mind a szervezet homeosztázisának fenntartását szolgálják. A C1-INH hiányában valamennyi enzimrendszer regulációja sérül, s bár a bradikinin felszabadulásához számos rendszeren keresztüli útvonal vezethet, ezen plazmaenzimrendszerek egyidejű, átfogó vizsgálata a mai napig nem történt meg. Azt is fontos megemlítenünk, hogy a bradikinin kivül számos más faktornak is szerepe lehet az érpermeabilitás növekedésében. Ezen rendszerek átfogó vizsgálata révén akár olyan potenciális biomarkerek azonosítása is lehetővé válhat, melyek a C1-INH-HAE más betegségektől való elkülönítéséhez is hozzájárulhatnak.



2. ábra. plazmaenzimrendszerek és kölcsönhatásaik. Az egyik központi résztvevő a FXII, amely aktiválódása következtében valamennyi plazmaenzimrendszer egyes komponenseinek aktiválására képes. A C1-INH számos ponton regulálja a plazmaenzimrendszerek aktiválódását.

2.3. Neutrofil granulociták

A neutrofil granulociták az első számú immunvédelmi vonalat képezik a fizikai barrieréken (bőr, nyálkahártya) átjutó kórokozók ellen (170). Ezek a mieloid progenitorokból származó sejtek a csontvelőben keletkeznek, majd pár órát töltenek a keringésben, végül spontán apoptózissal elpusztulnak. Naponta körülbelül 100×10^9 sejt lép be, illetve hagyja el a keringést. Fertőzés, illetve gyulladás hatására ez a szám akár meg is tízszeresedhet elsősorban granulocita-, és granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (G-CSF és GM-CSF) hatására, melyek termelődése bakteriális termékek (pl. endotoxin), illetve emelkedett interleukin (IL)-1, valamint TNF- α hatására fokozódik (171-173). Ugyanakkor a már keringésben lévő neutrofil granulociták életidejét is meghosszabbítják a GM-CSF, interferon- γ , C5a, IL-1 β és bakteriális LPS (174, 175).

A neutrofil granulocitákat mikroorganizmusokból eredő anyagok, valamint különböző citokinek hatékonyan aktiválják, kemotaktikus ingerekre gyorsan reagálnak. Ekkor a granulociták anyagsere-folyamatai módosulnak, sejt felszíni struktúrái átalakulnak.

Fertőzés hatására, lokálisan aktivált makrofágok és hízósejtek által termelt citokinek - köztük IL-1 β és TNF- α - hatására az endotél sejtek aktiválódnak és kiragadják a keringésből a neutrofil granulocitákat (176, 177). A neutrofil granulociták kezdetben gyengébb, majd szoros kapcsolatba kerülnek az endotél sejtekkel. Egy bonyolult, több tényezős folyamat játszódik le. Az első ún. rollingnak nevezett folyamatban a neutrofil granulociták az endotél sejtek felszínén jelenlevő szelektinekhez kötődnek. Ennek hatására a neutrofil sejtek aktiválódnak és β 2-integrineket (CD11/CD18; CD11_{a/b/c/d}/CD18) transzlokálnak a sejt felszínükre intracelluláris raktáraikból. Ezen integrinek elengedhetetlenek az endotél sejtekkel történő adhézió kialakításában és a neutrofil granulociták diapedezisében.

A neutrofil granulociták hatékony szerepet játszanak a szervezet bakteriális és gombás fertőzések elleni védelmében, fő feladatuk a fertőző mikrobák felismerése és fagocitózisa. A felismerés történhet mintázat-felismerő receptorok által, amely azonban lassabb fagocitózist eredményez, ugyanakkor ha a kórokozó opsonizálva van IgG-vel vagy komplementfehérjével, akkor FcR-ek, illetve CR1 és CR3 közvetítésével a fagocitózis folyamata jelentősen felgyorsul (178). A fagocitált mikroorganizmus a fagoszómába kerül, mely egy zárt, membránnal körülvett kompartment. A fagoszóma membránjában a NADPH-oxidáz komplex alegységeinek összeállása következtében beindul a szuperoxid(ROS)-termelés, amely alapvetően szükséges a neutrofil granulociták mikrobaölő aktivitásához. Az oxigén jelenlétében működő enzimatis rendszerek mellett oxigéntől független enzimek is részt vesznek a patogén elpusztításában, melyek jellemzően granulumokban találhatóak, és a granulum és fagoszóma membránjának fúziója által kerülnek a fagoszómába. Továbbá, ezen granulumok képesek a sejt plazmamembránjával is fuzionálni, így tartalmukat az extracelluláris térbe üríteni. A folyamatot degranulációnak nevezzük (179). A neutrofil granulociták baktericid és proteolitikus anyagokat tartalmazó granulumai között elsődleges (azurofil), másodlagos (specifikus), harmadlagos (zselatináz tartalmú) granulumok és szekretoros vezikulák találhatóak. A különböző granulumok fehérjéinek szintézise a neutrofil granulociták különböző fejlődési stádiumában történik a

csontvelőben (180, 181). Az azurofil granulomok különféle szerin-proteázokat tartalmaznak, köztük neutrofil elasztázt (NE), proteináz-3-at, katepszin-G-t, valamint baktericid proteineket, mint pl. mieloperoxidázt (MPO) és defenzineket (182). Kiemelendő a NE, amely egy 33 kDa tömegű szerin-proteáz, a szervezet egyik legdestruktívabb enzime, képes degradálni majdnem az összes fő extracelluláris mátrix- és plazmafehérjét (183). Az elasztin hasításán kívül - melyről nevét is kapta - képes hasítani az I-IV típusú kollagéneket, fibronektint, a vérlemezkék IIb/IIIa receptorát, komplementreceptorokat, thrombomodulint (184-187). A plazmafehérjék közül egyes véralvadási és komplement faktorok, immunglobulinok, proteázok és proteáz-inhibitorok hasítására is képes, mely ezek aktiválódásához vagy éppen funkcióvesztéséhez vezet (183, 184, 188). Patológias hatásai között említik a mikrovaszkuláris gyulladást, mely az endotélium sérüléséhez, megnövekedett érpermeabilitáshoz és szövetközi ödéma kialakulásához vezet (189).

A granulociták TNF- α , kemoattraktánsok, mint pl. vérlemezke aktiváló faktor, formil-Met-Leu-Phe vagy IL-8, valamint bakteriális lipopoliszacharid hatására aktiválódnak, ami a granulumaik sejtmembránhoz történő gyors transzlokációjához, majd az extracelluláris térbe történő szekréciójához vezet (190).

A MPO egy 150 kDa tömegű mikrobicid hemoprotein, melyet neutrofil aktivációkor a fagoszómába vagy az extracelluláris térbe bocsájt ki a sejt. A MPO a NADPH-oxidáz által termelt H₂O₂-vel reagálva indukálja hipoklórossav és más klórtartalmú termékek, illetve reaktív nitrogén köztitermékek létrejöttét, melyek a kórokozók membránjának destrukcióját eredményezik (191).

A másodlagos (specifikus) és harmadlagos (zselatináz) granulomok, melyeket peroxidáz-negatív granulomoknak is neveznek, fehérje tartalmukban és szekretoros sajátágaikban is jelentősen különböznek egymástól. A specifikus granulomok nagyobbak, és tele vannak antibiotikum sajátosságú anyagokkal, melyek által a granulociták mikrobaölő aktivitását erősítik, ugyanakkor a zselatináz granulomok jóval gyorsabban mobilizálhatóak, exocitózisuk könnyebben végbemegy (192). Ezen kívül a zselatináz granulomok fontos rezervoárjai a mátrix-degradáló enzimeknek és membrán-receptoroknak, melyek a neutrofilek extravazációja és diapedezise során szükségesek (193-195).

A szekretoros vezikulák a membrán-asszociált receptorok fő rezervoárját képezik, melyekre a neutrofil-mediált gyulladásos válasz során legkorábban van szükség. A vezikulák membránja tele van β 2-integrinokkal (196), CR1-gyel (197), formilált bakteriális peptideket felismerő(fMLP)-receptorokkal (197), LPS/lipoteikol-sav-receptorral, Fc γ III-receptorral (198), melyek mind egyesülnek a plazmamembránnal exocitózist követően. Ezen vezikuláknak nagyon fontos szerepe van a neutrofil granulociták aktivált endotéliummal történő kapcsolatának kialakításában, az adhézióban és diapedezisben (199).

A neutrofil granulociták nem csak sejten belül képesek a patogének elpusztítására, hanem sejten kívül is, ún. „neutrofil extracelluláris trap”-ek (NET) által, melyek filamentumokból álló, hálózatos struktúrák. Ezek részét képezik a sejtmagból származó DNS, hisztonok, illetve granuláris enzimek, mint pl. MPO, NE, katepszin G és laktoferrin (200). A NET képzése ROS termelődést igényel, amely triggereli az azurofil granulomokból a NE kiszabadulását a citoplazmába, ahonnan utána transzlokálódik a sejtmagba és ott elősegíti a kromatin dekondezálódását hisztonok degradációja útján. A kromatin dekondezálódását az időben később sejtmagba érkező MPO felerősíti (201-205). A folyamat következő lépése a plazmamembrán felszakadása és a DNS-granuláris-fehérje komplex kilökődése az extracelluláris térbe. A mikrobaölő hatású enzimeken kívül a NET neutrofil-eredetű mintázat-felismerő molekulákat is tartalmaz. Ilyen mintázat-felismerő molekula a pentraxin 3 (PTX3), mely a neutrofil granulociták másodlagos granulumaiból szabadul fel (206). A PTX3 patogének megkötése által elősegíti azok elpusztítását, ugyanakkor számos más szerepe is van, mint például kölcsönhat az Fc γ -receptorokkal és opsonikus aktivitása mellett hatékonyan aktiválja a komplementrendszert is (207-209). A gyulladásos folyamatokban regulátorként vesz részt, P-szelektinnekkel való kölcsönhatása következtében gátolja a neutrofil granulociták extravazációját (210).

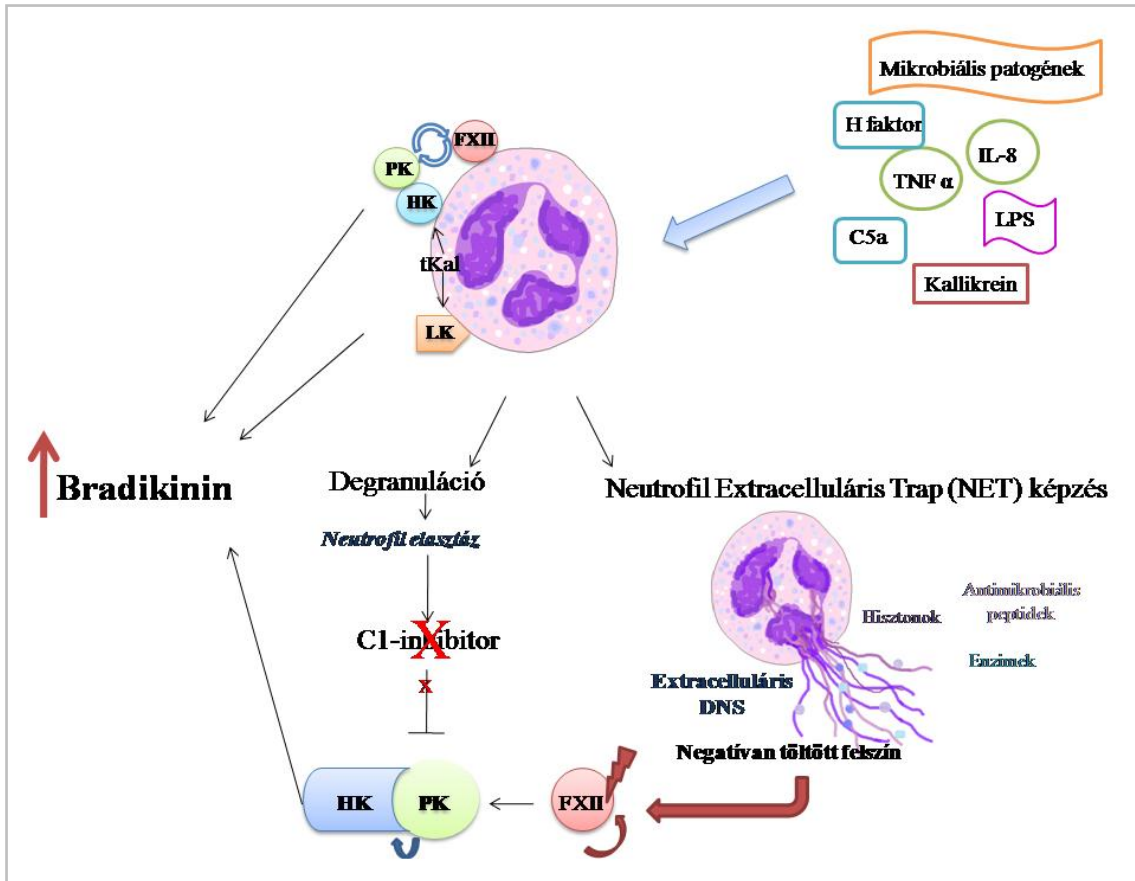
2.3.1. Neutrofil granulociták összefüggései a C1-INH-HAE ödémás rohamok patomechanizmusával

Korábban számos esetismertetésben beszámoltak róla, hogy ödémás roham során a fehérvérsejt-, illetve neutrofil granulocita szám emelkedik (211-214). Egyes munkacsoportok ezt a megfigyelést az ödémás roham során fellépő extravazáció miatt bekövetkező hemokoncentráció jelenségével magyarázták (211, 212). Munkacsoportunk 2010-ben 18 C1-INH-HAE beteg vizsgálatával publikálta, hogy ödémás rohamok során a fehérvérsejt- és neutrofil sejtszám emelkedett, amely megerősítette a korábbi megfigyeléseket. Azt is kimutattuk, hogy a neutrofil sejtszám emelkedése a rohamok során magasabb, mint ami csupán a hemokoncentrációból adódhatott volna (215).

A neutrofil granulociták esetleges szerepét a C1-INH-HAE patomechanizmusában nem vizsgálták, annak ellenére, hogy ezen sejtek funkciói számos ponton kapcsolatba hozhatóak az ödémás rohamok patofiziológiájával (3. ábra). A neutrofil granulociták aktivációját citokinek, illetve bakteriális termékek mellett a plazmaenzimrendszerek egyes komponensei is kiválthatják, illetve regulálhatják, mint például a PK, C3a, C5a, H faktor (178, 216, 217). A sejtek aktivációjakor felszabaduló NE képes hasítani és inaktiválni a C1-INH-t, ezáltal hozzájárulhat a nem kielégítő szabályozás további romlásához, és így az ödémás rohamok kialakulásához. A sejtek aktiválódása NET-képződését is eredményezheti, ami azért is fontos tényező lehet a C1-INH-HAE rohamok során, mert a NET negatívan töltött felszíne lehetővé teszi a kontakt-kininrendszer aktiválódását (218, 219).

Ugyanakkor leírták, hogy a neutrofil granulociták sejtmembránjának felszínéhez a HK és a FXII direkt módon képes kikötődni, a PPK pedig a HK-n keresztül, indirekt módon kötődik. Ilyen formán a neutrofil granulociták felszínén megvalósulhat kininek (bradikinin, kallidin) felszabadulása, FXII-mediált aktiváció révén, vagy neutrofil granulocitákból származó szöveti kallikrein felszabadulása útján (220). Mindezek alapján láthatjuk, hogy a neutrofil granulociták több ponton is részt vehetnek, illetve hathatnak az ödémaképződés folyamatára, a kontakt-kinin rendszer aktivációján keresztül (3. ábra).

Felvetődik a lehetősége, hogy a C1-INH-HAE ödémás rohamok patomechanizmusa háttérben neutrofil granulocitákat is érintő aktív folyamat zajlik. Munkánk során ennek lehetőségét elsőként vizsgáltuk.



3. ábra. A neutrofil granulociták és a kontakt-kinin rendszer aktiválódása. A neutrofil granulociták aktivációjakor felszabaduló NE képes hasítani és inaktiválni a C1-inhibítort (218). Emellett pedig a neutrofil granulociták aktiválódásuk következtében neutrofil extracelluláris trap-eket képezhetnek. Mindkét folyamat hozzájárulhat az ödéma kialakulásának háttérében álló fokozott mértékű bradikinin felszabaduláshoz (206, 219). Másrészt a neutrofil granulociták felszínén is végbemehet a kontakt-kinin rendszer aktivációja, valamint a neutrofilekből felszabaduló aktív, szöveti kallikrein is hozzájárulhat a fokozott mértékű bradikinin felszabaduláshoz (220). [Rövidítések: IL= interleukin, TNF- α = tumor nekrosis faktor- α , LPS= lipopoliszacharid, HK=nagy molekulásúlyú kininogén, PK= plazma kallikrein, tKal= szöveti kallikrein, LK= kis molekulásúlyú kininogén, C1-INH= C1-inhibitor, FXII=XII-es faktor, MPO= mieloperoxidáz, PTX3= pentraxin 3].

3. CÉLKITŰZÉSEK

3.1. A koagulációs, fibrinolitikus és kontaktrendszer változásainak egyidejű, átfogó vizsgálata C1-INH-HAE-ban

Korábbi tanulmányokban az ödémás rohamok során a különböző plazmaenzimrendszerekben bekövetkező változásokat többnyire az egyes rendszerek külön-külön történő vizsgálatával próbálták meghatározni. Ezen munkák eredményei azonban korlátozott értékűek, mivel egyrészt kis esetszámú vizsgálatok voltak, másrészt sokszor a „tünetmentes” és „rohamos” vérminták nem ugyanazon betegektől származtak.

A korábbi tanulmányokban az ödémás rohamok során meghatározott paraméterek - FXIIa, F1+2, TAT-komplex, D-dimer, protrombin idő (PI) - mellett eddig nem vizsgált paraméterek –FXI, fibrinogén, plazminogén és aktivált parciális tromboplastin idő (aPTI) – mérésével kerestük az alábbi kérdésekre a választ:

1. Van-e változás a plazmaenzimrendszerek működésében C1-INH-HAE roham alatt, a tünetmentes időszakhoz képest?

Ezen plazmaenzimrendszerek egyidejű vizsgálata által érdekes lehet annak megfigyelése, hogy:

2. Milyen összefüggést mutatnak az egyes plazmaenzimrendszerek paraméterei az adott rendszeren belül, a betegek tünetmentes állapotában illetve ödémás roham alatt?

Mivel az ödémás rohamok nagy variabilitást mutatnak lokalizációjukat tekintve, és gyakran előfordulnak multilokalizációjú rohamok is, ezért a következő kérdés fogalmazódott meg bennünk:

3. Van e különbség az általunk vizsgált paraméterek szintjeiben a különböző ödéma lokalizációk, illetve az egy vagy több lokalizációt is érintő ödémás rohamok között? Milyen interindividuális és intraindividuális különbségeket mutatnak az egyes paraméterek az ödémás rohamok tekintetében?

Egy önként vállalkozó betegünk bevonásával, akinek gyakran vannak ödémás rohamai, munkacsoportunknak egyedülálló lehetősége nyílt, hogy elsőként kövessünk nyomon egy spontán lefolyású ödémás rohamot – a rohamot megelőző tünetmentes állapottól, az ödémás tünetek teljes elmúlásáig – amely által az alábbi fontos és érdekes kérdések vetődtek fel:

4. A plazmaenzimrendszerekben bekövetkező változások megelőzik az ödémás roham kialakulását, vagy annak következtében zajlanak le?
5. Milyen összefüggést mutatnak az egyes paraméterek esetében megfigyelt változások a klinikai tünetekkel?

3.2. Neutrofil granulociták vizsgálata C1-INH-HAE-ban

Munkánk során először vizsgáltuk a neutrofil granulociták feltételezett részvételét a C1-INH-HAE patomechanizmusában, miután korábban munkacsoportunk emelkedett neutrofil granulocita számot figyelt meg ödémás rohamok során. Első körben nagyobb esetszám bevonásával az alábbi kérdésre kerestük a választ:

1. Figyelembe véve a hemokoncentráció mértékét, valóban emelkedik-e ödémás rohamok során a neutrofil granulocita szám?

Továbbá, a neutrofil granulociták aktiválódása során felszabaduló aktivációs markerek (NE, MPO, PTX3), valamint a sejtek aktiválódására ható citokinek (IL-8, TNF- α), komplementfaktorok (H faktor, C5a) és CRP meghatározása által a következő kérdéseket tettük fel:

2. Aktiválódnak-e a neutrofil granulociták a C1-INH-HAE ödémás rohamok során?
3. Milyen összefüggést mutatnak egymással a mért paraméterek a betegek tünetmentes állapotában, illetve ödémás rohamok során?

Egy C1-INH-HAE betegünk spontán lefolyású ödémás rohamának nyomonkövetése során a neutrofil granulocita szám és neutrofil aktivációs markerek meghatározása által az alábbi kérdést tettük fel:

4. Megelőzi-e a neutrofil sejtszám emelkedés és aktiváció az ödémás roham kialakulását, vagy azzal párhuzamosan megy végbe?

3.3. A C1-INH hiány közvetlen következményeinek vizsgálata egy C1-INH-HAE ödémás roham lefolyásának nyomon követése során

Bár kézenfekvőnek tűnhet, hogy egy C1-INH hiányos kórképben a C1-INH szint és a klinikai tünetek között összefüggés áll fent, ezzel kapcsolatban kevés vizsgálat történt. A spontán lefolyású ödémás roham nyomonkövetése során a C1-INH szint változásait vetettük össze a klinikai tünetekkel, hogy választ kapjunk a következő kérdéseinkre:

1. A C1-INH szint mutat-e összefüggést az ödémás tünetek kialakulásával illetve azok megszűnésével?

Mivel a C1-INH kizárólagos regulátora a C1r és C1s szerin-proteázoknak, hiányának következményeit a klasszikus út paramétereinek (C1q, C1s, C1s, C4, C4a) vizsgálatával elemeztük. Kérdésünk volt, hogy:

2. Megfigyelhető-e a komplementrendszer klasszikus útvonalának aktivációja?

A komplementrendszerben központi szerepet betöltő C3 komponensnek a hasítása során keletkező C3a aktivációs terméknek, valamint a terminális útvonal aktivációs termékeinek (C5a, TCC) tanulmányozásával tisztázni szeretnénk volna, hogy:

3. A C1-INH hiány hatásai kiterjednek-e a C3 komponens hasítására és a komplement kaszkád aktiválódásának azt követő lépéseire?

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A vizsgált betegcsoport és a kontrollok

4.1.1. C1-INH-HAE betegek

Vizsgálatainkba az Országos Angioödéma Központban 2008 és 2015 között nyilvántartott 165 C1-INH-HAE beteg közül, azokat a betegeket vontuk be, akiktől lehetőségünk volt ödémás rohamok során is vérminta vételére. Ez úgy valósulhatott meg, hogy egyes betegek ödémás roham során klinikánk sürgősségi részlegén kapják meg a tünetek akut kezelésére szolgáló humán plazma eredetű C1-INH-koncentrátumot (pdC1-INH; Berinert[®], CSL Behring) intravénás injekció formájában. A vérminták levétele megelőzte az akut kezelést. Elsősorban azon betegeinktől volt lehetőségünk ödémás rohamok során vérvételre, akik a klinika vonzáskörzetében, Budapesten, vagy Pest megyében élnek (összesen 52 beteg), valamint egy-egy vidéki betegünk, aki éppen Budapesten tartózkodott, amikor ödémás roham jelentkezett, szintén a klinikánkra érkezett akut ellátásra és így lehetőségünk volt vérminta vételére az ő esetükben is.

Összesen 43 betegről, 87 ödémás roham alatti vérmintát vizsgáltunk. Disszertációm három tanulmányon alapszik: plazmaenzimrendszerek vizsgálata C1-INH-HAE-ban, neutrofil granulociták vizsgálata C1-INH-HAE-ban, illetve egy C1-INH-HAE beteg ödémás rohamának nyomkövetése. A betegek között vannak átfedések, de az áttekinthetőség kedvéért a három tanulmányra vonatkozó betegadatokat külön mutatom be. Az ödémás rohamok alatt vett vérminták esetében az ödémás tünetek első megjelenésétől számítva a vérvétel időpontjáig eltelt idő medián értéke 3,85 óra volt (25 - 75. percentilisek: 2,3-7,8 óra; továbbá minimum 0,5 óra, maximum 72,0 óra).

A betegek évente legalább egy alkalommal kontroll viziten jelennek meg az Országos Angioödéma Szakambulancián, melynek során vérvétel keretein belül laboratóriumi vizsgálatok elvégzése mellett lehetőség volt C1-INH-HAE szérum- és plazmabank létrehozására. Ennek köszönhetően a fent említett betegektől nem csak ödémás rohamok alatti, hanem tünetmentes állapotban levett vérmintákkal is rendelkezünk. Minden esetben olyan tünetmentes időszakokban gyűjtött vérmintát használtuk fel, amelynél a betegek klinikai paraméterei is rögzítve voltak.

A kontroll viziteken vérkép, kémiai vizsgálat, antropometriai értékelés, hasi ultrahang vizsgálat, az előző vizit óta történt ödémás rohamok rögzítése -a C1-INH-HAE Betegnapló adatai és a beteg orvosi dokumentációi alapján-, illetve az alkalmazott kezelés esetleges nem kívánatos mellékhatásainak áttekintése történt meg. A C1-INH-HAE betegnaplóban a betegek rögzítették az ödémás rohamaik számát és lokalizációját, valamint a rohamok kezelésére felhasznált C1-INH koncentrátum mennyiségét. Ezek alapján a betegség súlyosságát is jól meg lehetett becsülni. A C1-INH-HAE diagnózisának felállítása minden beteg esetében klinikai és laboratóriumi kritériumok (pozitív családtörténet, angioödéma klinikai tünetei, csökkent funkcionális C1-INH aktivitás) figyelembevételével történt. A diagnózist molekuláris genetikai vizsgálat is alátámasztotta.

4.1.1.1. A plazmaenzimrendszerek vizsgálatába bevont C1-INH-HAE betegek és egészséges kontroll egyének

Ebbe a vizsgálatba 39 C1-INH-HAE beteget (12 férfi és 27 nő, medián életkor 35 év, 25-75. percentilisek: 22-50 év) és 40 egészséges kontroll egyént (15 férfi és 25 nő, medián életkor: 33 év, 25-75. percentilisek: 21-58 év) vontunk be. A 33 I-es típusú C1-INH-HAE beteg és 6 II-es típusú C1-INH-HAE beteg közül összesen 17 beteg részesült rendszeres, hosszútávú megelőző gyógyszeres kezelésben (13 beteg attenuált androgént, 4 beteg tranexámsavat szedett rendszeresen), míg 22 beteg nem állt hosszútávú gyógyszeres kezelés alatt.

Vizsgálatunk során összesen 62 roham alatt levett vérmintát vizsgáltunk. Minden betegről legalább egy, maximum 5 ödémás roham során levett vérminta állt rendelkezésünkre, amelyek közül 21 szubmukózus (19 hasi, 2 felső légúti), 29 szubkután és 12 „vegyes”(szubkután és szubmukózus) lokalizációjú ödéma során került levételre.

4.1.1.2. A neutrofil granulociták vizsgálatába bevont C1-INH-HAE betegek és egészséges kontroll egyének

A vizsgálatba 26 C1-INH-HAE beteget (6 férfi és 20 nő, medián életkor 33 év, 25-75. percentilisek: 26-40 év) és 26 egészséges kontroll egyént (7 férfi és 19 nő, medián

életkor: 37 év, 25-75. percentilisek: 30-41 év) vontunk be (Tudományos és Kutatás Etikai Bizottság engedély száma: TUKEB 10006/2015). A 19 I-es típusú C1-INH-HAE beteg és 7 II-es típusú C1-INH-HAE beteg közül összesen 9 beteg részesült rendszeres, hosszútávú megelőző gyógyszeres (attenuált androgén) kezelésben, míg 17 beteg nem állt hosszútávú gyógyszeres kezelés alatt.

Vizsgálatunk során 26 roham alatt levett vérmintát vizsgáltunk (minden betegtől egy ödémás roham alatt vett mintát), közülük 9 szubmukózus és 17 szubkután lokalizációjú ödéma során került levételre.

Mindkét vizsgálatunkban az egészséges kontroll személyek egészségügyi szűrésen vettek részt, és írásos beleegyezésüket adták vizsgálatunkhoz (Tudományos és Kutatás Etikai Bizottság engedély száma: TUKEB 65/2008), ödémás tünetük sohasem volt, a vérvételt megelőzően gyógyszeres kezelésben nem részesültek, és mindegyikük esetében a C1-INH hiány komplement vizsgálattal kizárható volt.

4.1.1.3. Egy C1-INH-HAE beteg és egy egészséges kontroll egyénnyomonkövetéses vizsgálata

A nyomonkövetéses vizsgálatban egy 56 éves, I-es típusú C1-INH-HAE miatt 18 éve az Országos Angioödéma Központban gondozás alatt álló nőbeteg vett részt. A beteg első ödémás tünetei 10 éves korában jelentkeztek, jelenleg átlagosan 26 ödémás rohama jelentkezik évente (az elmúlt két év alapján számolva). Az ödémás rohamokat 95 %-ban erythema marginatum, mint prodromális tünet előzi meg, és ennek megjelenését mindig ödémás roham kialakulása követi. A beteg hosszútávú danazol profilaxisban (100 mg/nap) részesült 2013-ig, azóta rendszeresen nem szed gyógyszert. Az ödémás rohamok kezelésére C1-inhibitor koncentrátumot (pdC1-INH; Berinert, CSL Behring) alkalmaz, átlagosan egy évben 18 ampulla kerül felhasználásra. Egyéb ismert betegsége nincs, gyógyszert nem szed, nem dohányzik, posztmenopauzában van. A központunkban gondozott betegek közül a súlyosabb klinikai lefolyású betegek csoportjába tartozik.

A betegnek vizsgálatunk előtt 9 nappal volt utoljára ödémás rohama, melyet 1000 NE pdC1-INH-ral kezelt és két nap múlva újra tünetmentes lett. Megelőzőképpen, családi esemény kapcsán vizsgálatunk előtt 3 nappal szintén 1000 NE pdC1-INH-t alkalmazott. Egyéb gyógyszeres kezelésben nem részesült. Vizsgálatunk teljes ideje alatt a beteg

kérésünkre egy tüneti naplóban jegyezte a tüneteit a hozzájuk tartozó időpontokkal. A tünetek súlyosságát rendszeresen, különösen, ha változást észlelt 0-100 mm vizuális analóg skálán (VAS) rögzítette külön a prodromális és ödémás tünetekre.

A nyomonkövetéses vizsgálatba kontrollként egy önként vállalkozó 52 éves egészséges nőt vontunk be, akinek ismert betegsége nem volt, és a vizsgálatunk ideje alatt gyógyszeres kezelésben nem részesült.

A beteg és az egészséges kontroll személy írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez (Tudományos és Kutatás Etikai Bizottság engedély száma: TUKEB 10366/2015).

4.2. Vérvételek

A betegetől és egészségesektől vett mintákat alvadásgátlót [etiléndiamin-tetraacetát (EDTA) vagy nátrium-citrát] tartalmazó vérvételi csövekbe vettük és azonnal centrifugáltuk, a plazmákat aliquotokba osztottuk és felhasználásig -70°C -on tároltuk. A szérum minták esetében ugyanígy jártunk el, azzal a különbséggel, hogy a vérmintákat alvadás után, a vérvételtől számított 2 órán belül centrifugáltuk.

4.2.1. Vérvételek a nyomonkövetéses vizsgálat során

C1-INH-HAE betegünktől összesen 12 vérvétel történt a vizsgálat ideje alatt. A vizsgálat kezdetén tünetmentes állapotban egy vérvétel történt. A prodromális tünetek első észlelését követően a beteg klinikánkra érkezésekor a 45. percben szintén egy vérvétel történt és a beteget hospitalizáltuk. Ezt követően 6 óránként történtek vérvételek, összesen 4 vérvétel a prodromális tünetek alatt, 6 az ödémás roham alatt. Mivel a beteg ödémás tüneteinek kezdetét jelezte, így lehetőségünk volt egy extra vérvételre az ödémás roham kezdetének időpillanatában. Az ödémás tünetek teljes megszűnésekor egy vérvételt követően a beteget otthonába bocsátottuk és egy nap múlva visszahívtuk az utolsó vérvételre.

Az egészséges kontrollszemélytől 6 óránként, a nap ugyanazon időpontjaiban vettünk vért összesen 24 órán keresztül, elsősorban azért, hogy lehetőségünk legyen a vizsgált paraméterek esetében az esetleges cirkadián ritmus figyelembevételére.

4.3. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

A vizsgálataink során mért különböző paramétereket az alábbiakban részletezett módszerekkel mértük. A felhasznált puffereket, oldatokat a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat. A felhasznált pufferek, oldatok és azok összetétele

Név	Összetétel
Nátrium-bikarbonát oldat	2,93 g nátrium-hidrogénkarbonát és 1,59 g nátrium-karbonát 1000 ml deszt.vízben feloldva; pH = 9,6
10x PBS oldat	160 g nátrium-klorid, 4 g kálium-klorid, 23 g nátrium- foszfát-2-hidrát és 4 g kálium-foszfát 2000 ml deszt.vízben feloldva, pH = 7,2
1x PBS oldat	10x PBS-ből deszt.vízzel hígítva
PBS-Tween oldat	100 ml 1x PBS oldatban 50 µl Tween 20
0,5% BSA PBS oldat	100 ml 1x PBS oldatban 0,5 g BSA
2% BSA PBS oldat	100 ml 1x PBS oldatban 2 g BSA
1% zselatin PBS	100 ml 1x PBS oldatbn 1 g zselatin
1% BSA PBS-Tween	100 ml PBS-Tween oldatban 1 g BSA
0,5% zselatin PBS-tween	100 ml PBS-Tween oldatban 0,5 g BSA
0,2 M foszfát puffer	3,56 g dinátrium-foszfát 100 ml deszt. vízbe oldva
0,1 M citrát puffer	2,1 g citrát 100 ml deszt. vízben oldva; pH = 2
Citrát-foszfát puffer	10 ml 0,2M foszfát puffer és 39,8 ml 0,1 M citrát puffer; pH = 3
1 M TRIS puffer	30,285 g TRIZMA-Base 250 ml deszt. vízben oldva, 29 ml 5M sósavval pH-zva; pH = 7,4
10 mM TBS puffer	1 ml 1 M TRIS puffer 100 ml fiziológiás sóoldatban
Amidoblack fehérje festék	2 g Amidoblack, 500 ml metilalkohol és 100 ml koncentrált ecetsav 400 ml deszt. vízben feloldva
Differenciáló (Festékmentesítő) oldat	500 ml metilalkohol és 100 ml koncentrált ecetsav 400 ml deszt.vízben oldva
0,1 M EDTA	33,6 g etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) 800 ml deszt.vízben oldva; pH = 7,6-7,7
Veronál puffer	5,9 g Nátrium-barbiturát, 3,9 g Nátrium-acetát és 2 ml tömény sósav 1000 ml deszt.vízben oldva, ebből 900 ml-hez 100 ml 0,1 M EDTA keverünk; pH = 8,6
1,5%-os agaróz	7,5 g agar beoldása 500 ml Veronál pufferben

4.3.1. A komplementrendszer egyes paramétereinek meghatározása

C1-INH koncentráció meghatározása

Laboratóriumunkban a C1-INH koncentrációjának meghatározása ezidáig radiális immundiffúzióval történt, melynek hátránya, hogy gyenge érzékenységgű [detektálási küszöbérték (LOD): 1-5 µg/ml], így inkább csak diagnosztikai célokra alkalmas. Ahhoz, hogy a C1-INH koncentrációt kutatásaink során megfelelő érzékenységgel tudjuk mérni, valamint annak változásait megfelelően érzékeny módon tudjuk megfigyelni a nyomonkövetéses vizsgálat során a betegben, új szendvics-ELISA módszert fejlesztettünk ki, melyhez saját, nyúlban termelt anti-C1-INH ellenanyagot használtunk fel több lépésben tisztított és biotinilált formában.

Az Új-zélandi fehér nyulak immunizálását az Immunogenes Kft. végezte a C1-INH-HAE betegek akut kezelésére alkalmazott plazmából tisztított humán C1-INH koncentrátumával (Berinert, CSL Behring).

Poliklonális anti-C1-INH IgG tisztítása nyúlszérumból

Az anti-C1-INH IgG nyúlszérumból történő tisztítását Protein G agaróz oszloppal végeztük laboratóriumunkban. Az emlősök átlagos IgG tartalma: 10 mg/ml, a Protein G oszlop IgG-kötő képessége 20 mg IgG/ml. Tehát nyúl esetében 10 mg/ml szérumból számolva 1 ml oszlop 2 ml szérumból képes az IgG-t megkötni. Esetünkben az oszlopot 3 ml protein G-t kovalensen kötött agaróz gyönggyel töltöttük fel (protein G agarose fast flow 10 ml, Merck), ami így 6 ml nyúlszérumból 60 mg IgG megkötésére képes.

Az oszlop előkészítését követően aktiváltuk az oszlopot, azaz az oszloptölteten 5-szörös mennyiségű 10 mM-os TBS puffert folyattunk át, majd ha az szinte teljesen átfolyt, akkor 5-szörös mennyiségű citrát-foszfát puffert, végül pedig újra 5-szörös mennyiségű 10 mM-os TBS puffert. Az átfolyót lombikban fogtuk fel. Közben a tisztítandó 6 ml nyúlszérumunkat 20.000 g-vel 5 percig centrifugáltuk, majd 10-szeresére hígítottuk 10 mM TBS pufferben. Az aktiválás után átfolyattuk az oszlopon a 10-szeresre hígított szérumot. Az átfolyót egy külön lombikban, egyben fogtuk fel. Közben egy 24-lyukú lemez lyukaiba 150-150 µl 1M TRIS puffert mértünk. Miután a hígított szérumot átfolyattuk, 10 mM TBS pufferrel lemostuk az oszlopról az aspecifikusan kötődő

fehérjéket. Ezt az átfolyó frakciót is egy külön lombikba gyűjtöttük. Mintát vettünk a kezdeti átfolyóból és 280 nm-en mértük az OD-ját. A mintavételt addig ismételtük (~ 10 ml-enként), amíg a minta OD-ja már 0-hoz nagyon közelített (azaz az átmosott folyadék már biztos, hogy nem tartalmazott aspecifikus fehérjét), illetve jelentősen nem csökkent, de maximum az átfolytatott minta térfogatával megegyező mennyiségű TBS puffert folyattunk át az oszlopon.

Miután az aspecifikus fehérjéket eltávolítottuk az oszlopról az IgG lemosása következett. Az oszlopon átfolyattunk körülbelül 5-6 oszloptérfogatnyi citrát-foszfát puffert úgy, hogy az első 1 ml-nyi átfolyót még nem fogtuk fel, majd utána a többi átfolyót 1,5 ml-enként (~ 30 csepp) az előkészített 24-lyukú lemez lyukaiba engedjük.

Ezután pedig 5 oszloptérfogatnyi 0,1 M-os citrát pufferrel (pH = 2) mindent lemostunk az oszlopról, és a lefolyó puffert szintén egy 24-lyukú lemezen fogtuk fel.

Az IgG tartalmú frakciók koncentrációját ezután spektrofotométerrel (SmartSpec 3000, Bio-Rad Laboratories, Inc, Kalifornia, USA) mértük le. A mérés után a megfelelő fehérje tartalmú frakciókat összemértük, és ennek a koncentrációját is lemértük, majd dializáltuk 10 mM TBS pufferben.

A dializáláshoz egy megfelelő méretű dializáló membránt desztillált vízbe áztattunk 30 percre, majd friss desztillált vízre cserélve membránostól felmelegítettük 60°C-ig és ebben is áztattuk a membránt 20 percig. Ezt követően a membrán egyik végére két csomót kötöttünk. A dializálandó oldatunkat óvatosan belepipettáztuk, majd a membrán másik végére is legalább két csomót kötöttünk, úgy, hogy a membrán feszes legyen. Körülbelül 500 ml TBS pufferbe helyeztük a membránt, (hogy rendesen elfedje) 3-4 órára szobahőmérsékleten. Az idő letelte után a puffert leöntöttük és frissre cseréltük, majd legalább egy éjszakán át +4°C-on hagytuk állni. Másnap a membránt kivettük a pufferből és egy 50 ml-es falkon csőbe állítva fecskendővel kiszívtuk belőle a tisztított ellenanyag oldatunkat. Az így kapott ellenanyag koncentrációját megmérve 3,76 mg/ml-nek adódott.

Ellenanyagunk egy részét ezt követően affinitástisztításnak vetettük alá. Az affinitástisztítás az MTA TTK Enzimológia Intézetében történt, Gál Péter munkacsoportja által. A módszert röviden ismertetem: 14 mg tisztított poliklonális nyúl anti-(humán C1-inhibitor) antitestet felvittek egy 1 ml-es C1-inhibitor / Sepharose 4 FF oszlopra pH = 7,4-es fiziológiás pufferben. Az elúciót lineáris pH gradienssel

biztosították pH = 7,4 és pH = 3,0 között. Az antitest fő tömege pH = 4 és pH = 3 között eluálódott. Az eluált antitest pH-ját azonnal visszaállították körülbelül 7,0-re 1:10 térfogatnyi 1 M Tris pH = 8,0 hozzáadásával.

Az affinitástisztítást követően az ellenanyagunk koncentrációja 0,204 mg/ml lett. Az ellenanyagot aliquotozást követően -20°C-on tároltuk.

Anti-C1-INH biotinilálása

Az anti-C1-INH IgG biotinilálását Thermo Scientific gyártmányú EZ-Link[®] NHS-LC-LC-Biotin (50 mg, succinimidyl-6-(biotinamido)-6-hexanamido hexanoate) készítménnyel végeztük, követve a gyári ajánlást.

A biotinilálni kívánt, nem affinitástisztított anti-C1-INH IgG-ből 2 mg/ml-es oldatot készítettünk PBS pufferben. A gyári töménységű biotinból 10 mM-os oldatot készítettünk, DMSO (dimethyl sulfoxide) puffer felhasználásával majd hozzáadtuk a 2 mg/mL-es anti-C1-INH IgG oldathoz. Ezt követően szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk majd dializáltuk. Aliquotoztuk és -20°C-on tároltuk.

C1-INH ELISA protokoll

A C1-INH koncentrációjának meghatározására EDTA-plazma mintában in-house szendvics-ELISA módszert alkalmaztunk. 96 lyukú Nunc Maxisorp lemezt (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) az előbbieken részletezett 0,025 mg/ml saját immunizálású nyúlban termelt, affinitástisztított anti-C1-INH IgG-vel fedtük nátrium-bikarbonát pufferben és 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Másnap a lemezt blokkoltuk 2% BSA-t tartalmazó PBS-sel 1 órán keresztül. A minták és a standard hígítása 1% BSA-t tartalmazó PBS-Tweennel történt. Az EDTA-plazma mintákat I-es típusú C1-INH-HAE betegek esetében 5000-szeres hígításban, II-es típusú C1-INH-HAE betegek és egészséges kontrollok esetében pedig 10 000-szeres hígításban vittük fel a lemezre. Standardként az intravénás terápiára alkalmas pdC1-INH koncentrátum MTA TTK Enzimológia Intézet munkacsoportja által tovább tisztított változatát (konc.=1,66 mg/ml) használtuk 50 ng/ml-től induló hét-lépéses, felező hígításban. Egy órás, szobahőmérsékleten történt inkubációt követően 2,5 µg/ml biotinilált, saját immunizálású nyúlban termelt, anti-C1-INH IgG vittünk fel a lemezre, majd újabb egy órás inkubációt követően sztreptavidin konjugált tormaperoxidázt

(R&D system, Minneapolis, USA) vittünk fel a lemezre 400-szoros hígításban. Harminc perc inkubáció leteltével, szubsztrátként tetrametil-benzidin(TMB)-t használtunk fel kétszeres hígításban citrát-pufferrel. A színreakciót 0,4 N kénsavval állítottuk le, majd az optikai denzitást – amely arányos a mintákban levő C1-INH koncentrációjával (g/l) - 450 és 620 nm hullámhosszúságon mértük le.

Funkcionális C1-INH szint meghatározása

A funkcionális C1-INH szintet a MicroVue C1-Inhibitor Enzyme Immunoassay kittel (Quidel, San Diego, USA) határoztuk meg, a gyártó útmutatása szerint. Az első lépés során a standardokat, a kontrollokat és a szérum mintákat biotinilált, aktivált C1s-sel inkubáltuk, 30 percig, szobahőmérsékleten (az inkubálás során a mintában lévő funkcionálisan aktív C1-INH az aktivált, biotinilált C1s-hez kötődve komplexeket képez). A második lépésben az előkezelt mintákat avidinnel fedett mikrotitráló lemezen inkubáltuk 10 percig, szobahőmérsékleten, így a mintákból a biotinilált C1s-sel alkotott komplexek kikötődtek a lemezre. Az aspecifikus kötődés kiküszöbölésére a lemezeket ötször mostuk, majd kecskében termelt, tormaperoxidázzal jelölt anti-humán-C1-INH ellenanyaggal inkubáltuk, 1 órán át, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően kromogénikus enzim-szubsztrátot alkalmaztunk, majd a színreakciót oxálsav oldattal állítottuk le. Az optikai denzitást – amely arányos a mintákban lévő C1-INH funkcionális aktivitásával (%) - 405 nm-en határoztuk meg.

C1r koncentráció meghatározása

A szérum antigenikus C1r koncentrációját radiális immundiffúzió alapuló módszerrel határoztuk meg. Az optimális paramétereket más komplement fehérjékre kidolgozott eljárás alapján határoztam meg (221).

Tizenöt ml 1,5%-os töménységű agaróz oldatot 56°C-ra felmelegítettünk, majd hozzákevertünk 120 µL kecskében termelt anti-humán-C1r ellenanyagot (DiaSorin Stillwater, Minnesota, USA). Az ellenanyagot tartalmazó gélt megfelelően zsírtalanított 10x10 cm-es üveglemezre öntöttük vízszintező asztalon, és miután a gél megdermedt, 2,5 mm átmérőjű lyukakat vágunk bele. A fiziológiás sóoldatban kihígított standardból (normál humán szérum keverék töménytől induló 5 lépéses felezőhígítása), valamint az 1:2 arányban hígított szérummintákból 5-5 µl-t mértünk be a lyukakba, majd a

lemezeket vízszintező asztalon, szobahőmérsékleten, 24 órán át inkubáltuk. A lemezeket ezt követően fiziológiás sóoldatban mostuk a nem precipitálódott fehérjék eltávolítása érdekében, a mosófolyadékot 2 óránként háromszor cserélve. Ezt követően a gélt nedves szűrőpapírral lefedtük, és szobahőmérsékleten rászárítottuk a lemezre. A precipitációs gyűrűket Amidoblack fehérjefestékekkel tettük láthatóvá, a felesleges festéket pedig differenciáló/festékmentesítő oldattal távolítottuk el, majd automata mikrométerrel leolvastuk a precipitációs gyűrűk átmérőjét, amelynek négyzete egyenesen arányos a minták C1r koncentrációjával. A vizsgált szérumminták C1r koncentrációját %-ban fejeztük ki a standardként bemért, 100%-nak tekintett normál humán szérum keverék hígítási sorához viszonyítva.

C1s koncentráció meghatározása

A C1s koncentrációjának meghatározására EDTA-plazma mintában in-house szendvics-ELISA módszert fejlesztettünk ki. Kilencvenhat-lyukú Nunc Maxisorp lemezt (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) 3 µg/ml poliklonális kecske anti-humán C1s ellenanyaggal [amit előzőleg humán-C1s kecske antiszérumból (Quidel, San Diego, USA) tisztítottunk a „*Poliklonális anti-C1-INH IgG tisztítása nyúlszérumból*” fejezetben leírt módon Protein G agaróz oszlopon (protein G agarose fast flow 10 ml, Merck)] nátrium-bikarbonát pufferben (pH = 9,6) és 4 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Másnap a lemezt blokkoltuk 1% zselatint tartalmazó PBS-sel 1 órán keresztül. A minták és a standard hígítása 0,5% zselatint tartalmazó PBS-Tweennel történt. Az EDTA-plazma mintákat 1000-szeres hígításban vittük fel a lemezre. Standardként ismert koncentrációjú Complement Technology Inc. (Texas, USA) gyártmányú C1s-t használtunk 500 ng/ml-től kiinduló hétlépéses, harmadoló hígításban. Egy órás, szobahőmérsékleten történt inkubációt követően 1000-szeres hígításban monoklonális egér anti-C1s (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) ellenanyagot vittünk fel a lemezre, majd újabb egy órás inkubációt követően kecske anti-egér IgG konjugált tormaperoxidázt (Southern Biotechnology, Birmingham, USA) vittünk fel a lemezre 2000-szeres hígításban. Egy további egy órás inkubáció leteltével, szubsztrátként tetrametil-benzidin(TMB)-t használtunk fel. A színreakciót 0,4 N kénsavval állítottuk le, majd az optikai denzitást – amely arányos a minták C1s koncentrációjával (µg/ml) - 450 és 620 nm hullámhosszúságon mértük le.

C3 és C4 szint meghatározása

A beteg és kontroll személy C3 és C4 koncentrációját (g/l) turbidimetriával, Cobas Integra 400 analizátorral (Roche, Svájc) mértük.

A C4a, C3a, C5a és TCC komplement aktivációs termékek meghatározása

A C4a, a C3a, a C5a és TCC komplementaktivációs termékek szintjeit kereskedelmi forgalomban kapható, ELISA módszeren alapuló kitekkel határoztuk meg, a gyártó által mellékelt útmutatások szerint (Quidel, San Diego, USA). Mivel a négy módszer hasonló elveken alapszik, ezért a meghatározások lépéseit együtt taglalom. A C4a, C3a, C5a és TCC szintek meghatározásához a MicroVue Enzyme Immunoassay kitek egérben termelt, monoklonális anti-humán-C4a, anti-humán-C3a, anti-humán-C5a, illetve az TCC C9-gyűrűjét-kötő ellenanyagokkal fedett lemezeit használtuk, melyeken a standardokat, a kontrollokat és a hígított (1:40, 1:200, 1:20 illetve 1:10 arányban, az említés sorrendjében) EDTA-plazma mintákat 60 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mosási lépéseket követően C4a-ra, C3a-ra, C5a-ra, illetve TCC-re specifikus, tormaperoxidázzal jelölt monoklonális ellenanyagokat alkalmaztunk, 60 percig, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően enzimatiszubsztráttal idéztük elő a színreakciót, amit oxálsav oldattal állítottunk le. Az optikai denzitást - amely arányos a mintákban lévő C4a, C3a, C5a, illetve TCC abszolút koncentrációval ($\mu\text{g/ml}$ illetve ng/ml) – 405, illetve 450 nm-en határoztuk meg.

H faktor szint meghatározása szérumban

A H faktor koncentrációjának meghatározására szérumban in-house szendvics-ELISA módszert alkalmaztunk. Nunc Maxisorp lemezt (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) 1:1000 hígításban sheep anti-human factor H IgG fractionnal fedtük (The Binding Site Inc., Birmingham, UK) és egy éjszakán át, 4 °C-on állni hagytuk. Másnap a lemezt blokkoltuk 0,5% BSA-t tartalmazó PBS-sel 1 órán keresztül. A szérumban mintákat 1000-szeres hígításban tettük a lemezre, standardként egészséges egyének szérumból készült keveréket tettünk fel 250-szeres hígítástól induló, hétlépéses, felező hígításban. A minták és a standard hígítása 0,5% BSA-t tartalmazó PBS-Tweennel történt. Egy órás inkubációt követően 1:2000 hígításban egér monoklonális anti-humán

H faktor konjugátumot (Quidel, San Diego, USA) tettünk rá, majd újabb egy órás inkubáció után 1:8000 goat anti-mouse IgG-HRP-t (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) tettünk a lemezre. Szubsztrátként OPD-t alkalmaztunk, a színreakció pedig 0,4 N kénsavval állítottuk le. Az optikai denzitást – amely arányos a minták H faktor koncentrációjával ($\mu\text{g/ml}$) – 492/620nm-en mértük.

4.3.2. A neutrofil granulocitákra jellemző illetve aktiválódásukkal kapcsolatba hozható paraméterek meghatározása

Fehérvérsejtek száma, abszolút neutrofil granulocita szám és hematokrit értékek meghatározása

A betegekben és az egészséges kontroll egyénekben a fehérvérsejtek számát, a neutrofil granulociták számát (Giga/l) valamint a hematokritértékeiket (l/l) Advia 120 Hematology System automatával (Siemens, Erlangen, Germany) határoztuk meg a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Központi laboratóriumában.

A NE és MPO aktivációs marker szintjének meghatározása

A neutrofil granulociták aktiválódására utaló NE és MPO aktivációs markerek szintjeit kereskedelmi forgalomban kapható, ELISA módszeren alapuló kitékkel (QIA96, Calbiochem, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany, illetve Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) határoztuk meg, a gyártók által mellékelt útmutatások szerint. A neutrofil elasztáz esetében, szintjének meghatározását egy inhibitorával alkotott stabil komplex molekula szintjének mérésén keresztül végeztük (NE - α -proteináz inhibitor: NE- α 1-PI, ami arányos a neutrofil granulocitákból felszabaduló NE koncentrációjával). Mind a két aktivációs marker esetében poliklonális anti-NE illetve anti-MPO ellenanyagokkal fedett lemezeket használtunk, melyeken a standardokat, a kontrollokat és a hígított (1:100 illetve 1:10, az említés sorrendjében) EDTA-plazma mintákat 60 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mosási lépéseket követően α 1-proteináz inhibitorra és MPO-ra specifikus, tormaperoxidázzal jelölt poliklonális nyúl ellenanyagokat alkalmaztunk, 60 percig, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően TMB szubsztráttal idéztük elő a színreakciót, amit sósav oldattal állítottunk le. Az optikai denzitást - amely arányos a mintákban a NE és MPO koncentrációjával (ng/ml) – 450/620 nm-en határoztuk meg.

PTX3 szint meghatározása

A betegekben és a kontrollokban a PTX3 szintet kereskedelmi forgalomban kapható, ELISA módszeren alapuló kittel (R&D systems, Minneapolis, USA) határoztuk meg, a gyártó által mellékelt útmutatások szerint. Egérben termelt monoklonális anti-PTX3 ellenanyaggal fedtük a lemezt. A gyári standardot a leírásoknak megfelelően hígítottuk hétlépésben, felezőhígítással. Mind a beteg, mind az egészséges kontrollok EDTA-plazma mintáit 1:1-ben hígítottuk. Ezt követően a lemezt szobahőmérsékleten, két órán keresztül inkubáltuk. A mosási lépéseket követően biotinilált, kecske anti-humán PTX3 ellenanyagot alkalmaztunk, 120 percig, szobahőmérsékleten. A mosási lépést követően 200-szoros hígításban tormaperoxidázzal konjugált sztreptavidint adtunk a lemezhez és 20 percig hagytuk állni. Szubsztrátként TMB-t használtunk, a színreakciót pedig 2 N kénsavval állítottuk le, majd az optikai denzitást -amely arányos a minták PTX3 koncentrációjával (ng/ml) - 450 nm hullámhosszúságon mértük le.

CRP szint meghatározása

A betegek és kontroll személyek CRP koncentrációját (mg/l) kémiai analizátorral mértük (Beckman Coulter Inc., Kalifornia, USA).

TNF- α és IL-8 szint meghatározása

Kereskedelmi forgalom elérhető ultraszenzitív ELISA kitekkel határoztuk meg a betegekben és a kontrollokban a TNF- α és az IL-8 szintjét (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, USA. illetve R&D system, Minneapolis, USA). Monoklonális anti-humán TNF- α , illetve IL-8 ellenanyaggal előre fedett lemezekre első lépésben inkubációs puffer, illetve mintahígító puffer került. Ezekkel megegyező mennyiségben kerültek felrakásra a tömény EDTA-plazma mintáink. A standardok, illetve a kontrollok hígításai és felvittele is a gyári leírásoknak megfelelően történt. A TNF- α esetében még az inkubációt megelőzően felvitelre került a biotinilált anti-humán TNF- α ellenanyag. Ezután mindkét ELISA esetében két órás szobahőmérsékleten történő inkubáció következett. A mosási lépéseket követően került felvitelre a tormaperoxidázzal konjugált sztreptavidin, illetve poliklonális anti-humán IL-8 ellenanyag és 30 percig, illetve IL-8 ELISA esetében 60 percig inkubáltuk a lemezeket szobahőmérsékleten. A

mosási lépéseket követően TMB-vel illetve NADPH szubsztráttal idéztük elő a színreakciót, amit 2 N kénsav oldattal állítottunk le. Az optikai denzitást - amely arányos a mintákban lévő TNF- α , illetve IL-8 koncentrációval (pg/ml) – 450, illetve 490 nm-en határoztuk meg.

4.3.3. A kontakt-, koagulációs és fibrinolitikus rendszerek egyes paramétereinek meghatározása

FXIIa és FXIa szintjének meghatározása

A betegekben és a kontrollokban a FXIIa és FXIa szint (%) meghatározása koagulometriával, kereskedelmi forgalomban elérhető Siemens Healthcare Kitek (Marburg, Németország) felhasználásával történt.

F1+2 és TAT-komplex szintjének meghatározása

Mindkét koagulációs markert kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kitekkel határoztuk meg a betegekben és a kontrollokban (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Németország). Az ELISA lemezek monoklonális egérben termelt anti-humán F1+2-vel, illetve poliklonális nyúlban termelt anti-humán trombinnal előre fedve voltak. A lemezeken minden lukba először 50 μ l mintapuffert mértünk, majd 50 μ l-t adtunk hozzá a standardokból, citrát-plazma mintákból vagy kontrollokból. Harminc illetve 15 percig inkubáltuk 37°C-on a lemezeket. A mosási lépéseket követően peroxidázzal konjugált, monoklonális, egérben termelt anti-humán protrombint illetve poliklonális, nyúlban termelt anti-humán trombin III-at alkalmaztunk 15 percig 37°C-on. A mosási lépéseket követően TMB, illetve OPD szubsztráttal idéztük elő a színreakciót, amit kénsav oldattal állítottunk le. Az optikai denzitást – amely arányos a minták F1+2 illetve TAT-komplex koncentrációjával (pmol/l illetve μ g/ml) – 450/620 nm-en illetve 492 nm-en határoztuk meg.

A plazminogén, a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) és D-dimer szintjének meghatározása

A fibrinolitikus rendszer fehérjéinek és aktivációs markereinek meghatározására kereskedelmi forgalomban elérhető kiteket használtunk fel (plazminogén (%), és PAI-1 (U/ml) esetében kinetikai mérésen alapuló Berichrom kiteket; D-dimer (mg/l) esetében

pedig részecske-erősítéses, immuno-turbidimetriás teszt alapú Innovance D-dimer Kitet, (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Németország).

PI és APTI meghatározása

A protrombin és aktivált parciális tromboplastin időt (PI illetve APTI) citrát plazmából határoztuk meg standard laboratóriumi módszer alapján (222).

Fibrinogén szint meghatározása

A betegekben és kontroll egyéneknél a fibrinogén szint (g/l) meghatározása a Clauss eljárás módosított változata szerint történt (223). A hígított citrát-mintákhoz feleslegben trombin adtunk és mértük az eltelt időt, ami alatt a trombin a fibrinogént fibrinné konvertálta, amely korrelált a fibrinogén koncentrációjával.

4.4. Statisztikai elemzés

Statisztikai számításainkat a Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, www.graphpad.com), valamint a STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) elnevezésű program felhasználásával végeztük. Abban az esetben, ha csoportok összehasonlításáról volt szó és egy beteghez több roham során gyűjtött minta is tartozott, kiszámítottuk az egyes paraméterek átlagát, és az átlagértékeket használtuk a statisztikai elemzések során, tehát minden beteghez egy-egy tünetmentes időszakban mért, illetve roham alatt mért érték tartozott paraméterenként. Ugyanakkor, hogy a betegcsoporton belüli összehasonlítások minden beteghez tartozó ödemás roham során mért érték egyszerre figyelembe vehető legyen Lineáris Vegyes Model (Linear Mixed Model; LMM) analízist végeztünk (ezt a többi számítástól eltérően IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Corp.) programmal végeztük).

Amennyiben két paraméter között fennálló korrelációt vizsgáltunk, úgy minden egyes betegnél egy véletlenszerűen kiválasztott mintavételi időponthoz tartozó vizsgálati mintában mért értékeket használtunk az elemzéshez. Mivel legtöbb eredményünk nem mutatott normál eloszlást, nem-parametrikus tesztek alkalmazását. Betegcsoporton belüli összehasonlításokhoz –ugyanazon betegekhez tartozó roham alatt mért és tünetmentes időszakban mért értékek összehasonlításakor– kétmintás párosított Wilcoxon-tesztet használtunk, míg az egészséges kontroll csoport és a betegcsoport

összehasonlításához Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. A csoportos összehasonlítások során kapott eredmények statisztikai erejének vizsgálatára power-analízist végeztünk. Korrelációk analizéséhez Spearman-féle Rho-tesztet használtunk. Minden statisztikai elemzés kétoldalas volt, és $p < 0,05$ jelentett szignifikáns különbséget vagy korrelációt.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A kontakt-, koagulációs és fibrinolitikus rendszer változásainak egyidejű, átfogó vizsgálata C1-INH-HAE-ban

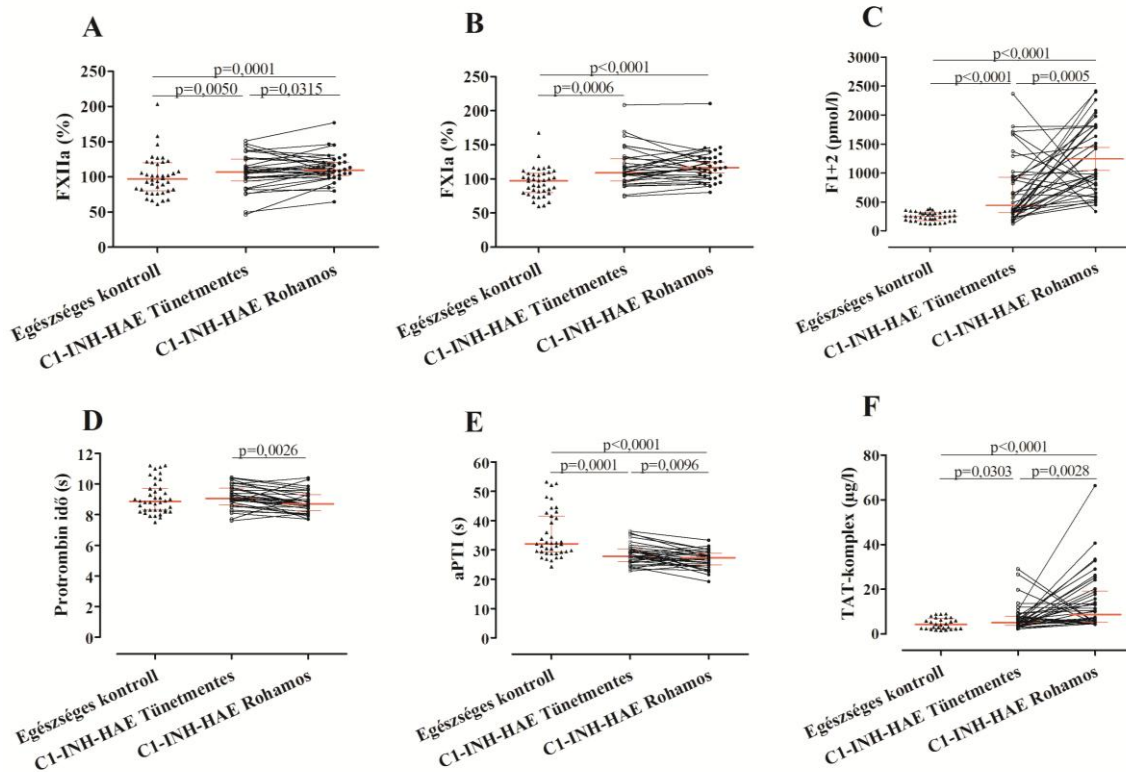
5.1.1. A kontakt és koagulációs paraméterek vizsgálata ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamok során vett mintáiban

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, ödémás rohamok során milyen változások mennek végbe a koagulációs rendszer működésében, aktiválódásában, ugyanazon betegek tünetmentes és rohamok során vett vérmintáit hasonlítottuk össze. Az eredményeket egészséges kontroll egyénekben mért értékekkel vetettük össze. Azon betegek esetében, akiknek több ödémás rohamok során vett mintája volt, az összehasonlításokat úgy végeztük, hogy az ödémás rohamok során mért értékeket átlagoltuk és az átlag értéket vetettük össze a beteg tünetmentes állapotban vett vérmintájában mért értékkel.

Különbséget találtunk a C1-INH-HAE betegek és az egészséges kontroll egyének, valamint ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során levett mintáiban mért értékek között (4. ábra). Emelkedett FXIIa szintet mértünk a betegek tünetmentes mintáiban az egészséges kontroll csoportban mért értékekhez képest, valamint az FXIIa szint tovább emelkedett ödémás rohamok során. Érdekes módon a FXIa szint emelkedett volt, mind a betegek tünetmentes, mind rohamos állapotában az egészséges kontroll csoportban mért értékekhez képest. Ugyanakkor a betegek ödémás rohamok során mért FXIa értékei nem tértek el szignifikánsan a tünetmentes állapotban mért értékektől. A F1+2 és TAT-komplex szignifikánsan emelkedett szintjét tapasztaltuk a C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok alatti állapotában az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva. Rohamok során szintjük tovább emelkedett ugyanazon beteg tünetmentes állapotában mért értékhez képest.

Először vizsgáltuk meg C1-INH-HAE betegekben hogyan változik a PI, illetve az APTI tünetmentes állapotban és rohamok során. Nem találtunk különbséget a PI időkbén a betegek tünetmentes állapota és az egészséges kontroll csoport között, ugyanakkor a betegek ödémás rohama során a PI szignifikánsan csökkent a tünetmentes állapothoz képest. Ezzel szemben rövidebb aPTI-t tapasztaltunk a C1-INH-HAE betegek

tünetmentes állapotában az egészséges kontroll csoporthoz képes, és további csökkenést találtunk ödémás rohamok során ugyanazon betegek tünetmentes állapotához képest.

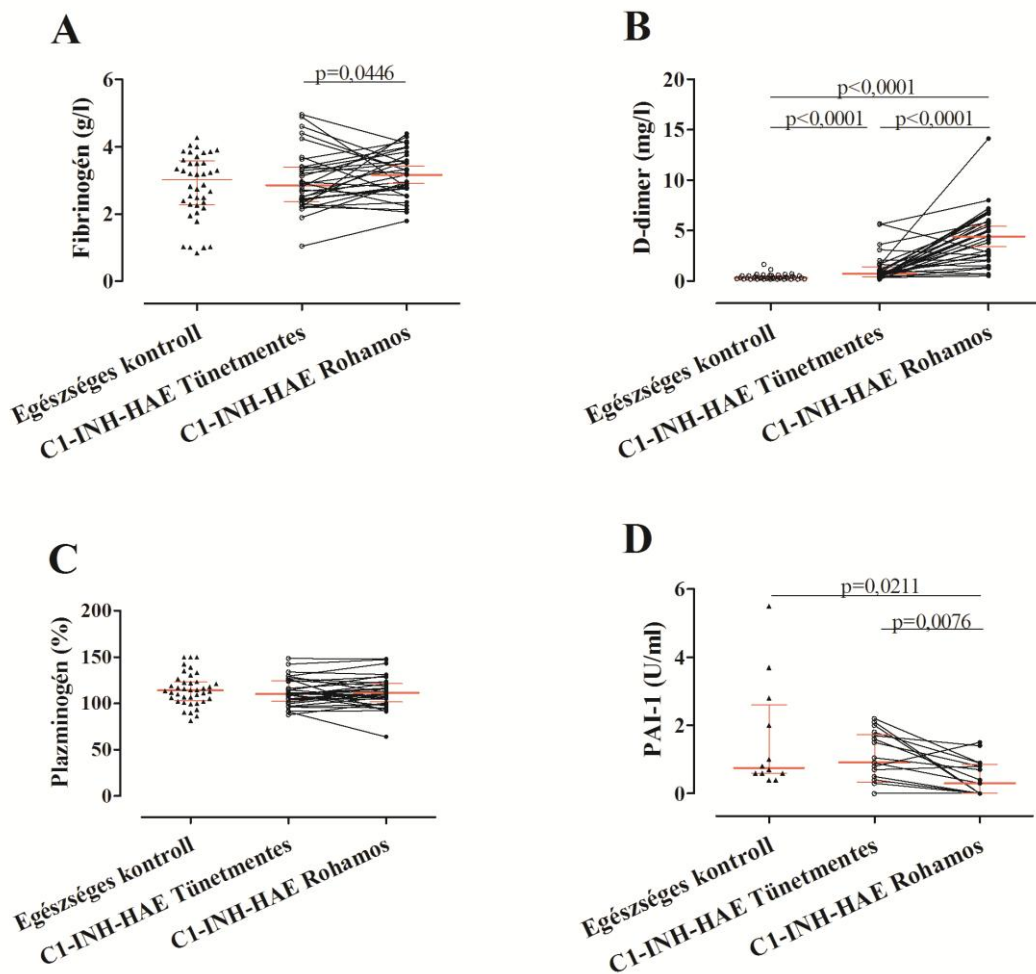


4. ábra. A koagulációs rendszer paramétereinek (A-F) összehasonlítása ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes, illetve roham alatt levett mintáiban, valamint ezek egészséges kontrollok mintáiban mért értékekkel való összevetése. Azon betegek esetében, akiknek több ödémás roham során levett mintája is volt, a rohamok során mért értékeket átlagoltuk, így minden beteghez egy ödémás roham alatti érték tartozik. Az egészséges kontroll egyénnel való összehasonlítást Mann-Whitney teszttel végeztük, míg ugyanazon C1-INH-HAE beteg „tünetmentes” és „rohamos” értékeinek összevetésénél Wilcoxon tesztet alkalmaztunk. Az ábrán a medián és az interkvartilis tartomány piros vonallal van jelölve.

5.1.2. A fibrinolitikus rendszer paramétereinek vizsgálata ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamok során vett mintáiban

Ödémás rohamok során kissé emelkedett fibrinogén szintet tapasztaltunk ugyanazon C1-INH-HAE beteg tünetmentes állapotában mért szintekhez képest. Ugyanakkor az egészséges kontroll csoportban mért fibrinogén szintekhez képest a C1-INH-HAE betegekben mért szintek szignifikánsan nem tértek el. A véralvadék képződésére és

annak elbomlására egyaránt utaló D-dimer esetében markáns különbségeket tapasztaltunk. Emelkedett szintjét tapasztaltuk C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamok során levett mintáiban az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva, valamint a betegek ödémás rohamok során levett mintáiban szintje tovább emelkedett a tünetmentes állapothoz képest. A plazminogén esetén nem kaptunk különbséget a vizsgált csoportok között, ugyanakkor a PAI-1 esetében alacsonyabb szintet mértünk ödémás rohamok során, mind ugyanazon betegek tünetmentes mintáihoz, mind egészséges kontroll egyének mintáihoz hasonlóan (5. ábra).



5. ábra. A fibrinolitikus rendszer fehérjéinek, markereinek (A-D) összehasonlítása ugyanazon C1-INH-HAE beteg tünetmentes, illetve roham alatt levett mintáiban, valamint ezek összevetése egészséges kontrollok mintáiban mért értékekkel. Azon betegek esetében, akiknek több ödémás roham során levett mintája is volt, a rohamok során mért értékeket átlagoltuk, így minden beteghez egy ödémás roham alatti érték tartozik. Az egészséges kontroll egyénnel való összehasonlítást Mann-Whitney

teszttel, míg ugyanazon C1-INH-HAE beteg „tünetmentes” és „rohamos” értékeit Wilcoxon teszttel végeztük. Az egészséges kontroll egyének közül csak 12 egyén esetében volt elérhető a PAI-1 érték. Az ábrán a medián és az interkvartilis tartomány piros vonallal van jelölve.

5.1.3. Plazmaenzimrendszerek paramétereinek LMM és power-analízise a C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamos állapotának összehasonlítása során

Bár a korábbi tanulmányokhoz képest lényegesen nagyobb esetszámú C1-INH-HAE tünetmentes és rohamos csoportok összehasonlítását végeztük el, mégis úgy gondoltuk, hogy azokban az esetekben, amikor szignifikáns eltérést kaptunk, fontos elemeznünk, hogy elegendő-e vizsgálatunk statisztikai ereje. Ennek vizsgálatára *power*-analízist végeztünk, melynek eredményét a 3. táblázatban mutatom be.

3. táblázat. Ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során levett mintáiban mért értékek összehasonlításának elemzése power-analízissel

	C1-INH-HAE Tünetmentes		C1-INH-HAE Rohamos		Power
	átlag	szórás	átlag	szórás	
FXIIa (%)	106,9	25,4	112,2	20,7	0,15
FXIa (%)	116,8	28,4	118,7	24,2	0,05
F1+2 (pmol/l)	697,3	562,3	1241,0	612,7	0,96
TAT-komplex (µg/l)	7,3	6,0	14,2	13,0	0,78
PI (s)	9,2	0,8	8,8	0,7	0,49
aPTI (s)	28,5	3,6	26,7	3,1	0,60
D-dimer (mg/l)	1,1	1,4	4,4	2,8	0,99
Fibrinogén (g/l)	2,9	0,9	3,1	0,6	0,09
PAI-1 (U/ml)	1,0	0,7	0,4	0,5	0,9

Továbbá a vizsgálatunk során mért értékeket a Lineáris Vegyes Model (Linear Mixed Model)-lel is elemeztük. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy egy beteg több ödémás rohama során mért értéke is elemezhető legyen, így adatvesztés nélkül tudtuk vizsgálni ezen plazmaenzimrendszerek markereinek, fehérjéinek szintjének változásait ödémás rohamok során, tünetmentes állapotban mért értékekhez képest. A függő változók a mért paraméterek voltak. Az analízis során az állandó hatások a mintatípusok voltak (tünetmentes vagy ödémás rohamok alatti), míg a random hatások a betegek száma, illetve az egymást követő rohamok száma.

A korábban, szignifikánsan eltérő paraméterek szignifikánsan eltértek a tünetmentes és rohamok alatti állapotban (4. táblázat), ezzel megerősítettük az előzőekben bemutatott eredményeket.

4. táblázat. Ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során levett mintáiban mért érték összehasonlítása LMM analízissel.

Függő változók	Becsült változás*	95% Konfidencia Intervallum		P-érték
		Alsó határ	Felső határ	
FXIIa (%)	5,657	5,644	5,671	0,019
FXIa (%)	4,365	4,350	4,380	0,118
F1+2 (pmol/L)	387,251	386,257	388,245	0,001
PI (s)	-0,533	-0,534	-0,534	<0,0001
APTI (s)	-3,039	-3,041	-3,037	<0,0001
TAT-komplex (µg/l)	4,981	4,971	4,991	0,004
Fibrinogén (g/l)	0,414	0,414	0,414	0,012
D-dimer (mg/l)	3,105	3,104	3,106	<0,0001
Plazminogén (%)	1,731	1,721	1,741	0,361
PAI-1 (U/ml)	-0,524	-0,525	-0,525	0,006

*Becsült változás: az átlagos eltérést mutatja a roham alatti és a tünetmentes állapot között.

5.1.4. Plazmaenzimrendszerek paramétereinek közötti összefüggések vizsgálata C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során levett vérmintáiban, valamint egészséges kontroll egyéneknél

A plazmaenzimrendszerek egyes paramétereinek egyidejű vizsgálata lehetővé tette, hogy elemezzük a rendszerek paramétereinek közötti összefüggéseket a rohamok során és tünetmentes állapotban levett mintákban, és a talált összefüggéseket az egészséges kontroll egyéneknél levett mintákban kapott alapvető összefüggésekhez hasonlítsuk.

Az egészséges kontroll egyéneknél, valamint a betegek tünetmentes illetve rohamos mintáiban talált összefüggéseket az egyes paraméterek között a 5. táblázatban mutatom be.

Az egészséges kontroll egyénekből származó mintákban a legszorosabb összefüggéseket az aktivált parciális trombolasztin idő és a FXIa, a FXIIa, a fibrinogén

szint, valamint a protrombin idő között kaptuk. Ezeken kívül szoros negatív korrelációt mutatott az APTI a C1-INH aktivitással.

A C1-INH-HAE betegek esetében a korreláció vizsgálatát random kiválasztott mintában mért értékekkel végeztük abban az esetben, amikor több, ugyanolyan típusú minta állt rendelkezésünkre egy betegtől. Az egészségesekben kapott legszorosabb összefüggéseket a C1-INH-HAE betegek tünetmentes mintáiban is tapasztaltuk, további számos összefüggés mellett, ugyanakkor a C1-INH funkcionális aktivitása nem mutatott összefüggést egy paraméterrel sem. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a F1+2 koncentrációja esetében a mért TAT-komplex koncentrációval, valamint a D-dimer koncentrációjával.

Az ödémás rohamok során vett vérmintákban eltérő korrelációs mintázatot tapasztaltunk a betegek tünetmentes állapotában tapasztalhoz képest. A F1+2 és TAT-komplex koncentrációja közötti összefüggés még erősebbnek adódott, és mindkét paraméter korrelált a D-dimer szinttel is. Az ödémás rohamok során a C1-INH funkcionális aktivitása negatív összefüggést mutatott a protrombin idővel és a F1+2 szinttel.

5. táblázat. A plazmaenzimrendszerek paramétereinek közötti korrelációk egészséges kontroll egyéneknél (a), C1-INH-HAE betegek tünetmentes (b) és rohamok alatt vett mintáiban (c). Amennyiben valamely betegnek több roham alatt vett mintája is rendelkezésünkre állt, egy random választott mintában mért értékek korrelációi szerepelnek a vizsgálatban. A korrelációk megállapítását Spearman-féle Rho-teszttel végeztük.

R P	FXIa	FXIIa	PI	APTI	F1+2	TAT	Plazminogén	PAI-1	Fibrinogén	D-dímer	C1-INH aktivitás
FXIa		0,4954 0,0012	-0,4095 0,0087	-0,5391 0,0003	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	0,4280 0,0059	n.sz	0,4744 0,0035
FXIIa			-0,3660 0,0202	-0,5547 0,0002	0,3413 0,0334	n.sz	0,4706 0,0022	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
PI				0,6988 <0,0001	n.sz	n.sz	-0,4074 0,0091	n.sz	0,6560 <0,0001	-0,3319 0,0364	-0,4418 0,0070
APTI					n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	-0,6643 <0,0001	n.sz	-0,5632 0,0003
F1+2						0,4928 0,0012	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
TAT							n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
Plazminogén								n.sz	0,4342 0,0051	n.sz	n.sz
PAI-1									n.sz	n.sz	n.sz
Fibrinogén										0,3663 0,0201	0,4681 0,0040
D-dímer											n.sz
C1-INH aktivitás	A. Egészséges kontroll egyénekben megfigyelt korrelációk										

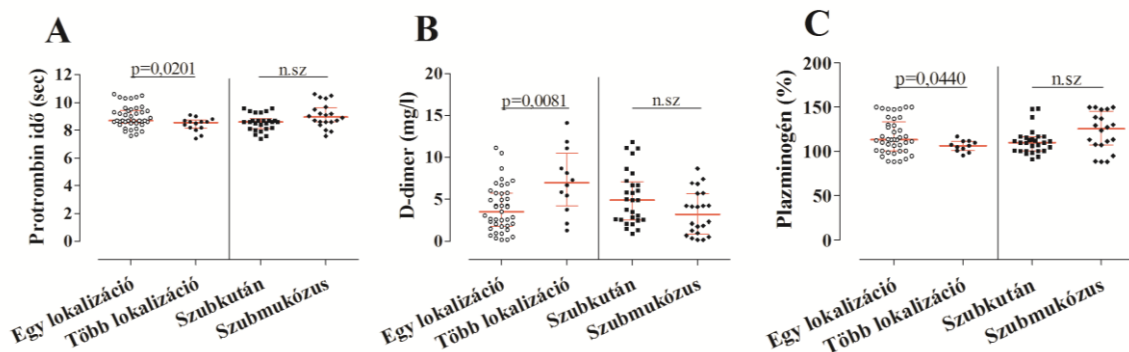
R P	FXIa	FXIIa	PI	APTI	F1+2	TAT	Plazminogén	PAI-1	Fibrinogén	D-dímer	C1-INH aktivitás
FXIa		0,6998 <0,0001	-0,3507 0,0490	-0,7077 <0,0001	0,4175 0,0174	n.sz	0,7176 <0,0001	n.sz	0,6378 <0,0001	n.sz	n.sz
FXIIa			-0,3568 0,0488	-0,7596 <0,0001	0,4146 0,0183	n.sz	0,3655 0,0397	n.sz	0,4974 0,0038	n.sz	n.sz
PI				0,4806 0,0054	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	-0,4292 0,0160	n.sz	n.sz
APTI					n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	-0,5331 0,0017	n.sz	n.sz
F1+2						0,5896 <0,0001	0,4302 0,0140	n.sz	0,3793 0,0323	0,5222 0,0022	n.sz
TAT							n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
Plazminogén								n.sz	0,5576 0,0009	n.sz	n.sz
PAI-1									n.sz	n.sz	n.sz
Fibrinogén										n.sz	n.sz
D-dímer											n.sz
C1-INH aktivitás	B. C1-INH-HAE betegek tünetmentes mintáiban megfigyelt korrelációk										

R P	FXIa	FXIIa	PI	APTI	F1+2	TAT	Plazminogén	PAI-1	Fibrinogén	D-dímer	C1-INH aktivitás
FXIa		0,6430 <0,0001	n.sz	-0,6983 <0,0001	n.sz	n.sz	0,4930 0,0041	n.sz	0,3749 0,0345	n.sz	n.sz
FXIIa			n.sz	-0,6870 <0,0001	n.sz	0,4051 0,0238	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
PI				n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	-0,4905 0,0128
APTI					n.sz	-0,4866 0,0047	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
F1+2						0,7756 <0,0001	n.sz	n.sz	n.sz	0,3899 0,0274	-0,3758 0,0372
TAT							n.sz	n.sz	n.sz	0,3674 0,0386	n.sz
Plazminogén								0,5757 0,0312	0,5003 0,0035	n.sz	n.sz
PAI-1									0,5851 0,0279	n.sz	n.sz
Fibrinogén										n.sz	n.sz
D-dímer											n.sz
C1-INH aktivitás	C. C1-INH-HAE betegek ödémás rohamok során vett mintáiban megfigyelt korrelációk										

n.sz= nem szignifikáns

5.1.5. A különböző lokalizációjú rohamok, illetve a betegek egymást követő ödémás rohamainak befolyása a plazmaenzimrendszerek paramétereinek szintjére

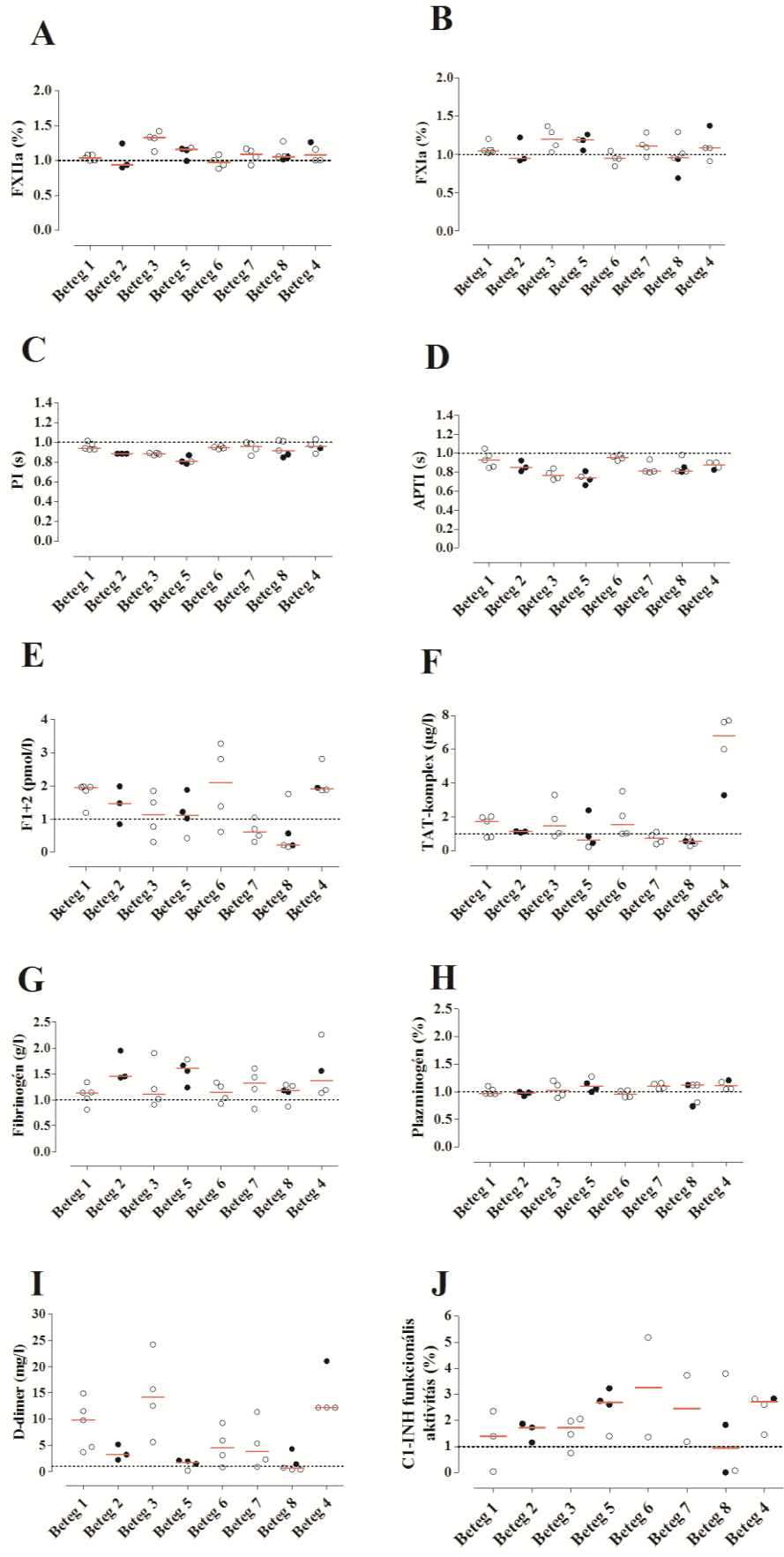
Vizsgáltuk, hogy van-e különbség a plazmaenzimrendszerek markerei tekintetében a különböző lokalizációjú rohamok, illetve az egy vagy több lokalizációt érintő ödémás rohamok között. Minden paramétert figyelembe véve a protrombin időben, a D-dimer koncentrációban és a plazminogén koncentrációban tapasztaltunk eltérést az egy vagy a többlokalizációt érintő ödémás rohamok között. A több lokalizációt érintő ödémás rohamok során magasabb D-dimer szintet, míg csökkent protrombin időt és plazminogén szintet mértünk. Nem találtunk szignifikáns különbséget a szubkután és szubmukózus lokalizációjú ödémás rohamok között a plazmaenzimrendszerek egyes paramétereinek tekintetében. A kapott eredményeinket LMM analízissel is igazoltuk (6. ábra).



6. ábra. Különbségek a koagulációs és fibrinolitikus rendszerek paramétereinek között a roham lokalizációjától függően. LMM analízissel hasonlítottuk össze a paraméterek szintjeit a lokalizáció függvényében: „egy lokalizációt” vs. „több lokalizációt” érintő illetve szubkután vs. szubmukózus lokalizációjú ödémák. Az ábrán a medián és az interkvartilis tartomány piros vonallal van jelölve.

Az ödémás rohamokat kiváltó tényezők a rohamok nagy százalékánál nem tisztázottak, és az ödémás tünetek gyakorisága, lokalizációja és súlyossága is nagy variabilitást mutat a betegek között, de még az egyes betegek esetében is különbségek vannak az egymást követő rohamok között. Figyelembe véve, hogy 8 C1-INH-HAE betegünk esetében (5 C1-INH-HAE I-es típus, 3 C1-INH-HAE II-es típus) egynél több ödémás roham során levett vérminta állt rendelkezésünkre (minimum 2 minta, maximum 5 minta) lehetőségünk volt megvizsgálni ezen betegeink különböző ödémás rohamok

során vett vérmintáiban a különböző paraméterek változékonyságát. Az egyes paraméter esetében a rohamok során mért értéket elosztottuk a tünetmentes mintában mért értékkel, és a kapott arányokat elemeztük. A betegekben a D-dimer és a C1-INH funkcionális aktivitás nagy fluktuációt mutatott az egyes ödémás rohamok között. A fibrinogén, TAT-komplex, D-dimer és C1-INH funkcionális aktivitás nagy variabilitást mutatott a betegek között. Összességében elmondható, hogy a vizsgált paraméterek egyénre jellemző irányba és mértékben változtak a különböző rohamok során (7. ábra).



7. ábra. A több rohamos mintával rendelkező C1-INH-HAE betegekben a FXIIa (A), FXIa (B), protrombin idő (C), aktivált parciális tromboplastin idő (D), F1+2 (E), TAT-komplex (F), fibrinogén (G), plazminogén (H), D-dimer (I) és C1-INH (J) szintek változásaa különböző ödémás rohamok esetében. Azon 8 C1-INH-HAE beteget vontuk be a vizsgálatba, akiknek egynél több ödémás roham alatt levett mintája volt. Minden „roham alatti” értéket elosztottunk a beteg tünetmentes állapotában mért értékkel, és a kapott arányokat különböző szimbólumokkal tüntettük fel az ábrákon a roham lokalizáció szerint. A medián értékeket piros egyenes vonallal tüntettük fel. Pontozott vonal jelöli az 1 arányt. Szimbólumok: üres karika=egy lokalizációt érintő ödémás rohamok; teli karika=több lokalizációt érintő ödémás rohamok

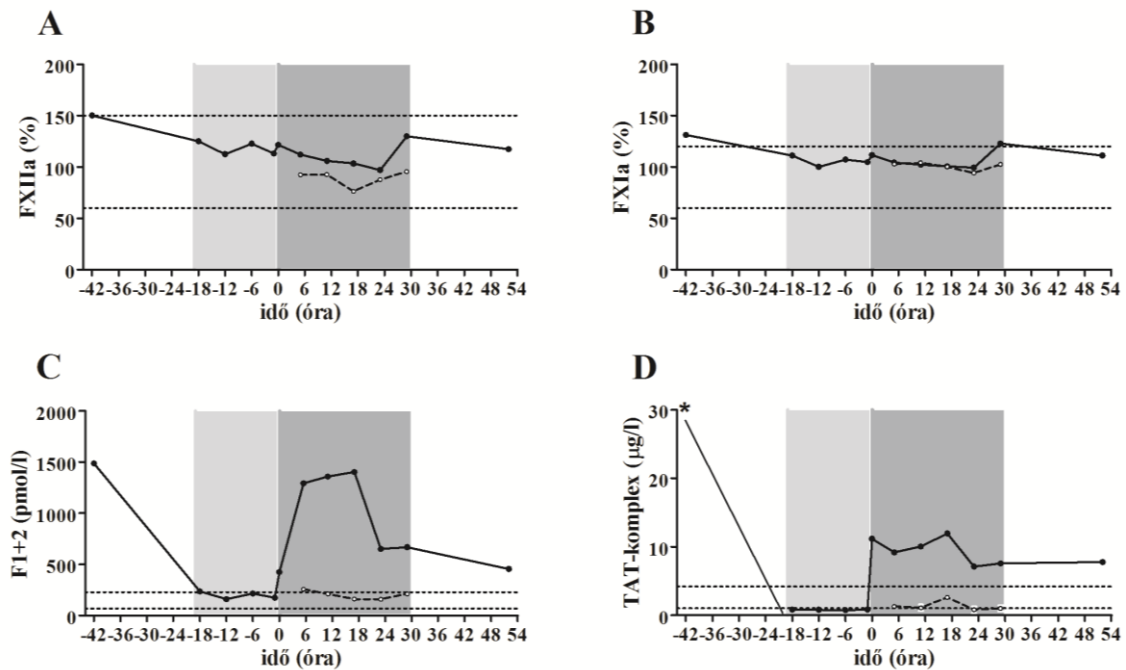
5.1.6. Plazmaenzimrendszerek paramétereinek kinetikai nyomonkövetése egy C1-INH-HAE beteg ödémás rohama során

Először sikerült egy önként vállalkozó betegünk bevonásával nyomonkövetnünk egy spontán lefolyású ödémás rohamot, a rohamot megelőző tünetmentes állapottól kiindulva az ödémás roham kialakulásán keresztül az ödéma spontán elmúlásáig. Ezáltal lehetőségünk adódott a plazmaenzimrendszerek változásainak időbeni nyomonkövetésére is az ödémás roham során. A beteg klinikai tüneteinek változásait részletesen az 5.3. fejezetben mutatom be.

A FXIIa, FXIa, F1+2 és TAT-komplex kinetikáját a megfigyelési időszak alatt a C1-INH-HAE betegben és egészséges kontroll egyénben az alábbi ábrán tüntettem fel (8. ábra). A legmagasabb FXIIa és FXIa aktivitást az alapviziten, tünetmentes állapotban mértük a C1-INH-HAE betegben. Az egész megfigyelési idő alatt normál tartományon belüli, az egészséges kontroll egyénben mért aktivitással összevethető aktivitást mértünk és jelentősebb egyirányú változást egyik paraméter esetében sem találtunk [CV%(FXIIa)= 11,9 vs. 8,5; CV%(FXIa)= 8,9 vs. 3,9 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll egyén)].

Mind a F1+2, mind a TAT komplex esetében rendkívül magas szinteket mértünk az ödémás rohamot megelőző tünetmentes állapotban, majd szintjeik a prodromális periódusra normalizálódtak és hasonlóan az egészséges kontroll egyénhez, stabilan megegyező értékeket mértünk. Az ödémás tünetek kialakulásával mindkét komponens szintje jelentős mértékben (a normál tartományon felülre) megnövekedett, és emelkedett maradt, majd a tünetek javulásával párhuzamosan kezdett el csökkenni [CV%(F1+2)=

74,1 vs. 20,5 CV%(TAT-komplex)=74,7 vs. 53,2 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll)].



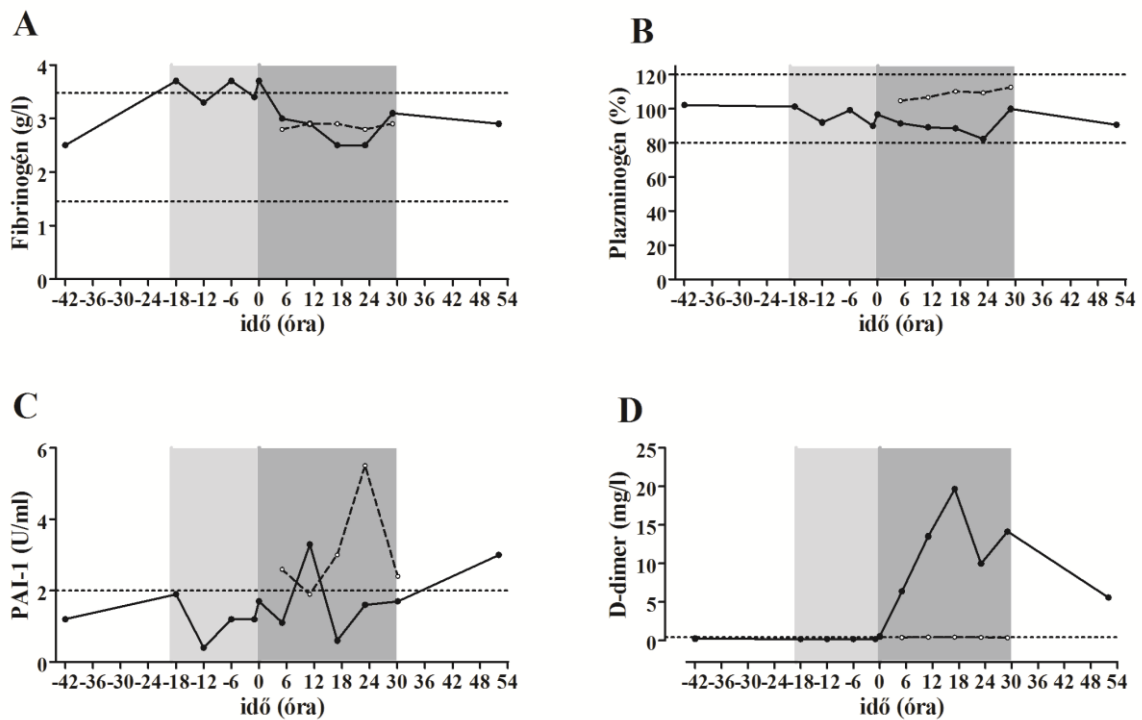
8. ábra. A FXIIa (A), FXIa (B), F1+2 (C) és TAT-komplex (D) koncentrációjának nyomonkövetése a C1-INH-HAE betegben (teli körök) a 96-órás megfigyelési időszakban, illetve az egészséges kontroll egyénben (nyitott körök) a 24-órás megfigyelési időszakban. A pontozott vonalak az adott paraméterre vonatkozó referencia tartományt jelölik. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.*TAT-komplex kezdeti, alapviziten mért értéke 93,44 pmol/l.

A fibrinogén esetében érdekes módon a C1-INH-HAE betegben a prodromális periódusban mértünk kiugróan magas értékeket, mely értékek az ödémás tünetek alatt csökkentek és visszatértek a tünetmentes állapotban mért, illetve az egészséges kontroll egyénben is mért értékek szintjére [CV%=15,0 vs. 1,9 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll)].

A plazminogén szintjében minimális fluktuáció látható, az egészséges kontrollban mért, gyakorlatilag megegyező értékekhez képest, azonban egyirányú változást nem tapasztaltunk. A PAI-1 szintekben mind a beteg, mind az egészséges kontroll esetében jellegzetes mintázatot tapasztaltunk, mely a regulátor fehérje cirkadián ritmusával

hozható összefüggésbe [CV%(plazminogén)= 6,6 vs. 2,8; CV%(PAI-1)=54,6 vs. 45,8 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll)].

A C1-INH-HAE betegben a D-dimer értékek stabilan megegyeztek az ödémás rohamot megelőző tünetmentes és prodromális időszakban ugyanúgy, ahogy az egészséges kontroll egyénben is a 24-órás periódusban. Azonban az ödémás tünetek kialakulásával egyidejűleg a D-dimer szintjében növekedést figyeltünk meg, amelynek csúcspontja 100-szorosa volt a megfigyelési időszak kezdetén mért értékeknek. A D-dimer szintjének csökkenése az ödémás tünetek javulása alatt kezdődött meg [CV%=116,7 vs. 9,4 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll egyén)]. Ezen paraméterek kinetikáját az 9. ábrán mutatom be.



9. ábra. A FXIIa (A), FXIa (B), F1+2(C) és TAT-komplex (D) koncentrációjának nyomonkövetése a C1-INH-HAE betegben (teli körök) a 96-órás megfigyelési időszakban, illetve az egészséges kontroll egyénben (nyitott körök) a 24-órás megfigyelési időszakban. A pontozott vonalak az adott paraméterre vonatkozó referencia tartományt jelölik. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.

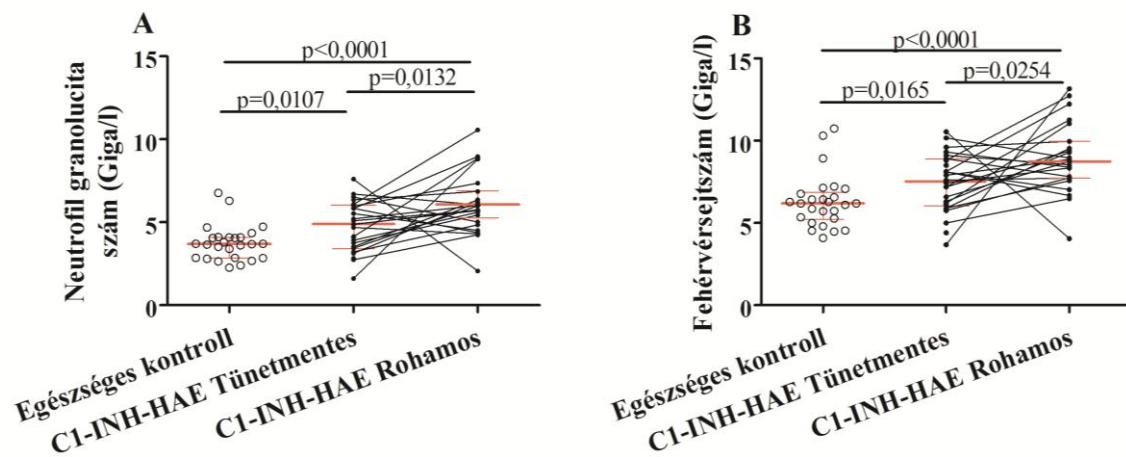
5.2. Neutrofil granulociták vizsgálata C1-INH-HAE-ban

5.2.1. Neutrofil granulocita szám és fehérvérsejtszám meghatározása C1-INH-HAE-ban

Mivel ödémás rohamok során a növekvő érpermeabilitás hatására a plazma kiáramlik a szövetek közé, az ödémás rohamok során vett vérminták esetében számolnunk kell a hemokoncentráció mértékével, így ezt minden beteg esetében meghatároztuk. Az ödémás rohamok során mért vörösvérsejtszámot elosztottuk a tünetmentes állapotban mért vörösvérsejtszámmal, így minden beteg esetében kaptunk egy arányszámot. Az ödémás rohamok során mért fehérvérsejt- és neutrofil granulocita számot elosztottuk az adott mintában kapott arányszámmal, így megállapítottuk a hemokoncentráció mértékével korrigált fehérvérsejt- és neutrofil granulocita számot minden ödémás rohamra. Összehasonlító vizsgálatainkban ezeket a „korrigált” értékeket használtuk. Ha a korrekciót a fent leírt módon a hematokrit értékkel végeztük el, és az abból származó korrigált értékekkel számoltunk, nem befolyásolta a következőkben bemutatott eredményeket.

Az egészséges kontroll csoporthoz képest szignifikánsan magasabb neutrofil granulocita számot mértünk a C1-INH-HAE betegek tünetmentes mintáiban (10. ábra).

Továbbá, a C1-INH-HAE betegekben az ödémás rohamok során magasabb neutrofil granulocita számot tapasztaltunk ugyanazon betegek tünetmentes állapotában mért értékhez viszonyítva. Hasonló különbségeket figyeltünk meg a fehérvérsejtszám összehasonlítása során az egészséges kontrollok mintái és a C1-INH-HAE betegek tünetmentes mintái között, valamint ugyanazon betegek tünetmentes és rohamok alatt vett vérmintái között (10. ábra).

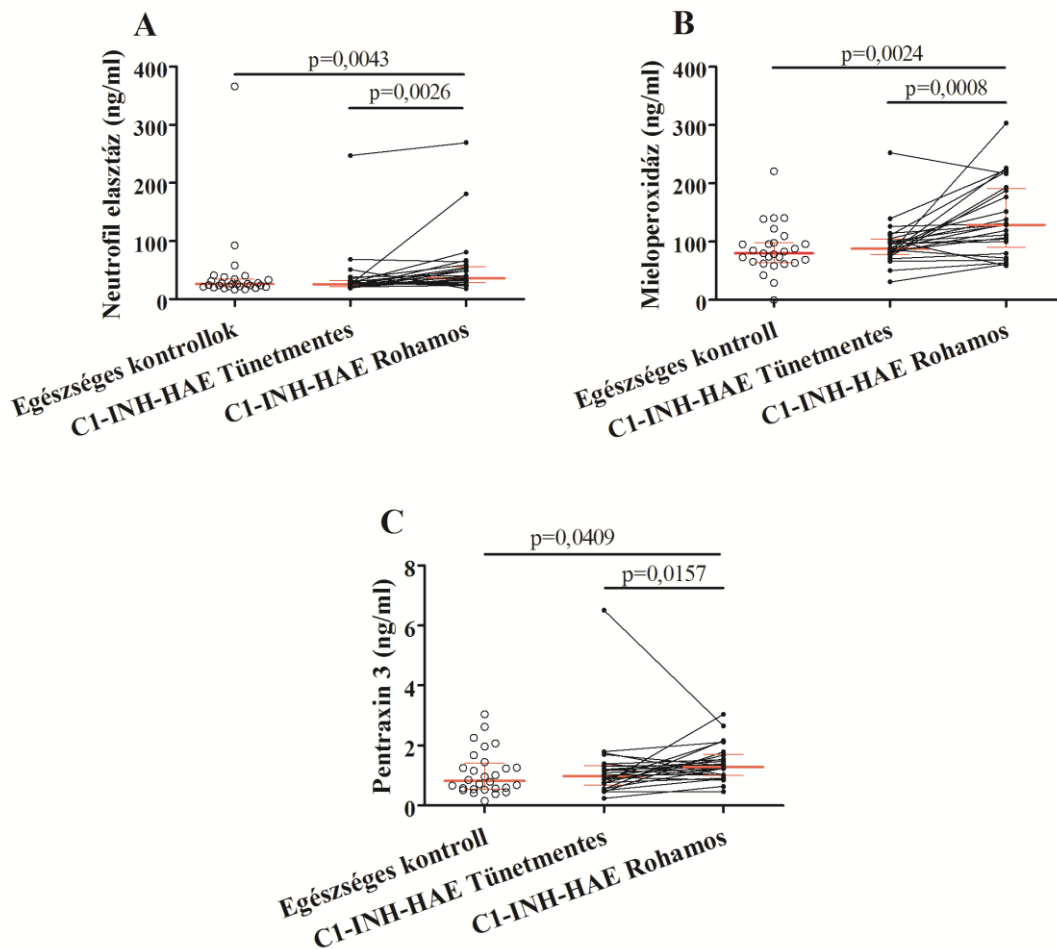


10. ábra. Neutrofil granulociták[‡](A) és fehérvérsejtek[‡](B) számának összehasonlítása ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során levett vérmintáiban, valamint összevetésük egészséges kontroll egyéneknél mért értékekkel. Kétmintás, párosított Wilcoxon-tesztel hasonlítottuk össze az ugyanazon C1-INH-HAE beteg tünetmentes és rohamok alatt levett mintáiban mért értékeket, Mann-Whitney-tesztel pedig a betegeket az egészséges kontroll egyénnel hasonlítottuk össze. Az ábrán a medián és az interkvartilis tartomány piros vonallal van jelölve. [‡]Az ödémás rohamok esetében az abszolút sejtszámok korrigálva lettek a hemokoncentrációval.

5.2.2. Neutrofil granulocita aktivációs markerek, valamint az aktiválódásra ható citokinek, komplementfaktorok és CRP meghatározása C1-INH-HAE-ban

A neutrofil granulociták aktiváltságának vizsgálatára összehasonlítottuk ugyanazon 26 C1-INH-HAE beteg tünetmentes és ödémás rohamok alatt levett vérmintáiban mért NE, MPO és PTX3 szinteket. A betegekben mért értékeket 26 egészséges kontrollban mért értékkel is összevetettük.

Az ödémás rohamok során szignifikánsan emelkedett a plazma NE, MPO és PTX3 szintje a tünetmentes állapotban mért, valamint egészséges kontroll egyéneknél mért szintekhez képest. Ugyanakkor a C1-INH-HAE betegek tünetmentes állapotában mért szintek nem különböztek az egészséges kontroll csoportban mért szintektől (11. ábra).



11. ábra. A NE (A), MPO (B) és PTX3 (C) összehasonlítása ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamok során levett mintáiban, illetve egészséges kontroll egyénekben mért értékekkel való összevetése. Kétmintás, párosított Wilcoxon-tesztel hasonlítottuk össze az ugyanazon C1-INH-HAE beteg tünetmentes és rohamok alatt levett mintáiban mért értékeket, Mann-Whitney-tesztel pedig a betegeket az egészséges kontroll csoporttal hasonlítottuk össze. Az ábrán a medián és az interkvartilis tartomány piros vonallal van jelölve.

Az IL-8 szintje nem különbözött az egészséges kontroll egyének és a betegek tünetmentes állapotában vett mintáiban, ugyanakkor az ödémás rohamok során emelkedett szintjét tapasztaltuk a betegek tünetmentes állapotához képest. Hasonlóan az IL-8-hoz, a betegek rohamok során levett mintáiban emelkedett TNF- α szintet tapasztaltunk ugyanazon betegek tünetmentes mintáiban mért szintekhez képest. Nem várt módon a betegek tünetmentes állapotában mért TNF- α szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az egészséges kontroll csoportban mért szintekhez képest (4.

Táblázat). A TNF- α mérést megismételtük a fentiekől különböző C1-INH-HAE betegekől és egészséges egyénektől származó mintákban is, és hasonló összefüggést kaptunk a betegek rohamok alatti és tünetmentes állapot alatti mintáit összehasonlítva ($p=0,0159$), illetve a tünetmentes és egészséges kontroll csoport között is ($p=0,0015$).

A CRP szint a C1-INH-HAE betegekben szignifikánsan magasabb volt az egészséges kontroll egyénekhez viszonyítva, és C1-INH-HAE ödémás rohamok során még magasabb CRP szintet tapasztaltunk ugyanazon C1-INH-HAE beteg tünetmentes állapotban levett mintájához képest.

A C1-INH-HAE betegekben mért C5a és H faktor szintek az egészséges kontrollokban mért szintekhez viszonyítva szignifikánsan nem tértek el, valamint ugyanazon betegek rohamok során levett vérmintáiban sem tapasztaltunk eltérést a tünetmentes periódushoz képest (6. táblázat).

6. táblázat. A neutrofil granulociták aktiválásával kapcsolatba hozható egyes citokinek, fehérjék szintje C1-INH-HAE betegek tünetmentes időszakban, illetve roham során gyűjtött mintáiban, valamint egészséges személyekben. Az ugyanazon egyénhez tartozó tünetmentes és rohamos értékeket kétmintás, párosított Wilcoxon-tesztel hasonlítottuk össze, míg a C1-INH-HAE betegek és az egészséges egyének közötti különbségek elemzésére a Mann-Whitney U-tesztet használtuk.

	Egészséges egyének (N=26)	C1-INH-HAE betegek (N=26)		p-érték
		Tünetmentesen	Roham során	
IL-8 (pg/ml)	0,99 (0,34-2,79)	1,69 (0,82-2,71)	2,43 (1,95-5,46)	^c 0,0061
TNF-α (pg/ml)	1,78 (0,56-2,3)	0,81 (0,01-1,64)	1,27 (0,83-1,97)	^a 0,0296 ^c 0,0186
CRP (mg/l)	1,50 (0,85-2,17)	2,20 (1,85-3,78)	3,39 (1,96-4,98)	^a 0,0031 ^b 0,0008 ^c 0,0321
C5a (ng/ml)	10,45 (7,92-14,04)	9,61 (6,51-13,87)	10,51 (8,57-15,63)	n.sz.
H faktor (μg/ml)	596 (431-775)	711 (527-878)	625 (533-711)	n.sz.

A vizsgált csoportok közötti különbségeket az alábbiak szerint jelöltük:

^aTünetmentes C1-INH-HAE betegek vs. egészséges kontroll egyének (Mann-Whitney teszt)

^bRohamos C1-INH-HAE betegek vs. egészséges kontroll egyének (Mann-Whitney teszt)

^cTünetmentes C1-INH-HAE betegek vs. rohamos C1-INH-HAE betegek (Wilcoxon-teszt)

A C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamos állapotának összehasonlítása során kapott összefüggések statisztikai erejének vizsgálatára a neutrofil granulociták és azok aktiválódásával kapcsolatos paraméterek tekintetében power analízist végeztünk. A kapott power értékeket az alábbi táblázatban tüntettem fel (7. táblázat).

7. táblázat. Ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során levett mintáiban mért érték összehasonlításának elemzése power-analízissel

	C1-INH-HAE Tünetmentes		C1-INH-HAE Rohamos		<i>Power</i>
	átlag	szórás	átlag	szórás	
Neutrofil granulocita szám (Giga/l)	4,8	1,4	6,1	1,9	0,80
Fehérvérsejtszám (Giga/l)	7,4	1,7	8,9	2,1	0,81
NE(ng/ml)	37,1	44,1	54,3	54,1	0,25
MPO (ng/ml)	96,3	39,6	140,3	63,7	0,85
PTX3 (ng/ml)	1,2	1,1	1,4	0,6	0,14
TNF-α (pg/ml)	0,9	0,8	1,4	0,9	0,55
IL-8 (pg/ml)	2,2	2,1	3,8	3,3	0,50
CRP (mg/l)	2,8	1,6	4,7	5,4	0,38

5.2.3. A neutrofil granulociták vizsgálata kapcsán mért paraméterek összefüggéseinek vizsgálata C1-INH-HAE tünetmentes és rohamos mintákban, valamint egészséges kontroll egyének mintáiban

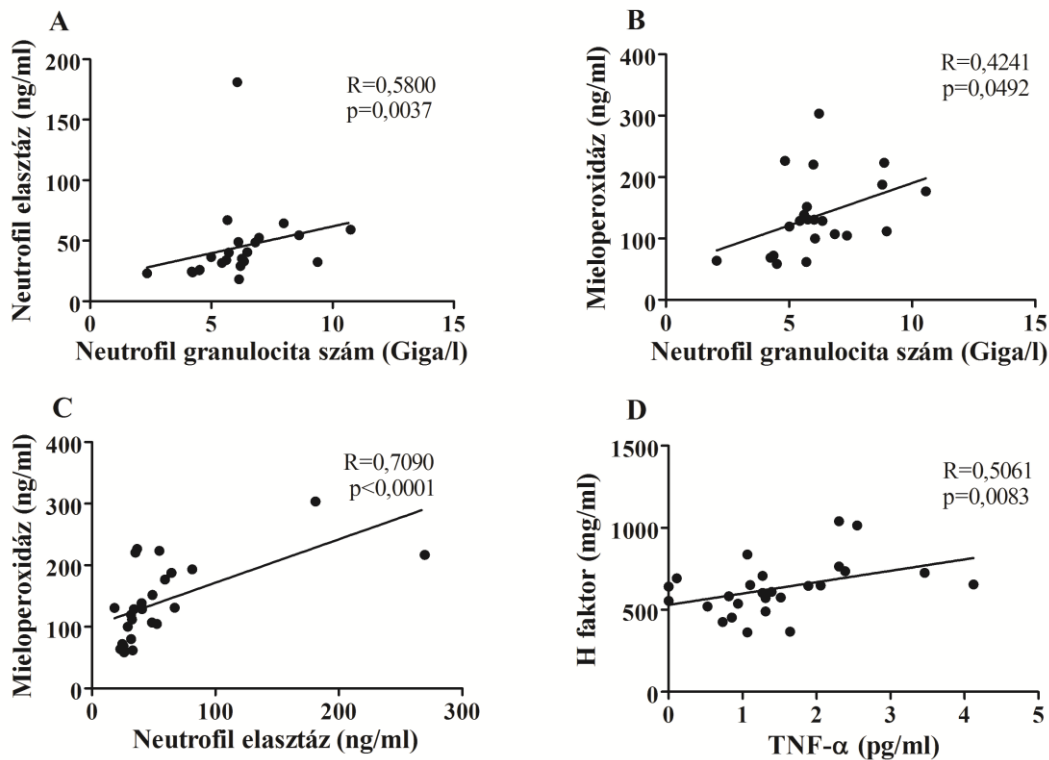
Egészséges egyéneknél, ahol nem történik számottevő neutrofil sejt aktiváció, a neutrofil granulocita szám és az aktivációs markerek szintje között sem várható jelentős összefüggés. Miután megvizsgáltuk az általunk mért összes paraméter egymáshoz való viszonyát az egészséges kontroll csoport mintáiban, csupán egyetlen negatív korrelációt találtunk a TNF- α és a C5a szintje között ($R=-0,4464$, $p=0,0373$).

A C1-INH-HAE betegek tünetmentes mintáiban a mért értékek között egyáltalán nem találtunk szignifikáns korrelációt egyik paraméter tekintetében sem.

Ugyanakkor a betegek ödémás rohamok során vett mintáiban mért értékek között számos összefüggést tapasztaltunk. Szoros pozitív korrelációt kaptunk a neutrofil granulocita szám és a NE szint között ($R=0,5800$, $p=0,0037$), valamint még szorosabb összefüggést mutatott a NE és a MPO szint ($R=0,7090$, $p<0,0001$) (12. ábra). Kevésbé

szoros pozitív korrelációt kaptunk a neutrofil granulocita szám és MPO koncentrációja között ($R=0,4241$, $p=0,0492$). A H faktor és a $TNF-\alpha$ szintek is korreláltak, minél magasabb a $TNF-\alpha$ szintje, annál magasabb a H faktor szintje ($R=0,5061$, $p=0,0083$). Az itt fel nem sorolt paraméterek (IL-8, C5a) esetében nem kaptunk szignifikáns összefüggéseket.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a mért neutrofil aktivációs markerek milyen összefüggést mutatnak a C1-INH-HAE diagnosztikus paramétereivel – antigenikus és funkcionális C1-INH, C4 szint – de egyik paraméter esetében sem kaptunk szignifikáns korrelációt sem a betegek tünetmentes, sem rohamos állapotában levett mintákban vizsgálva.



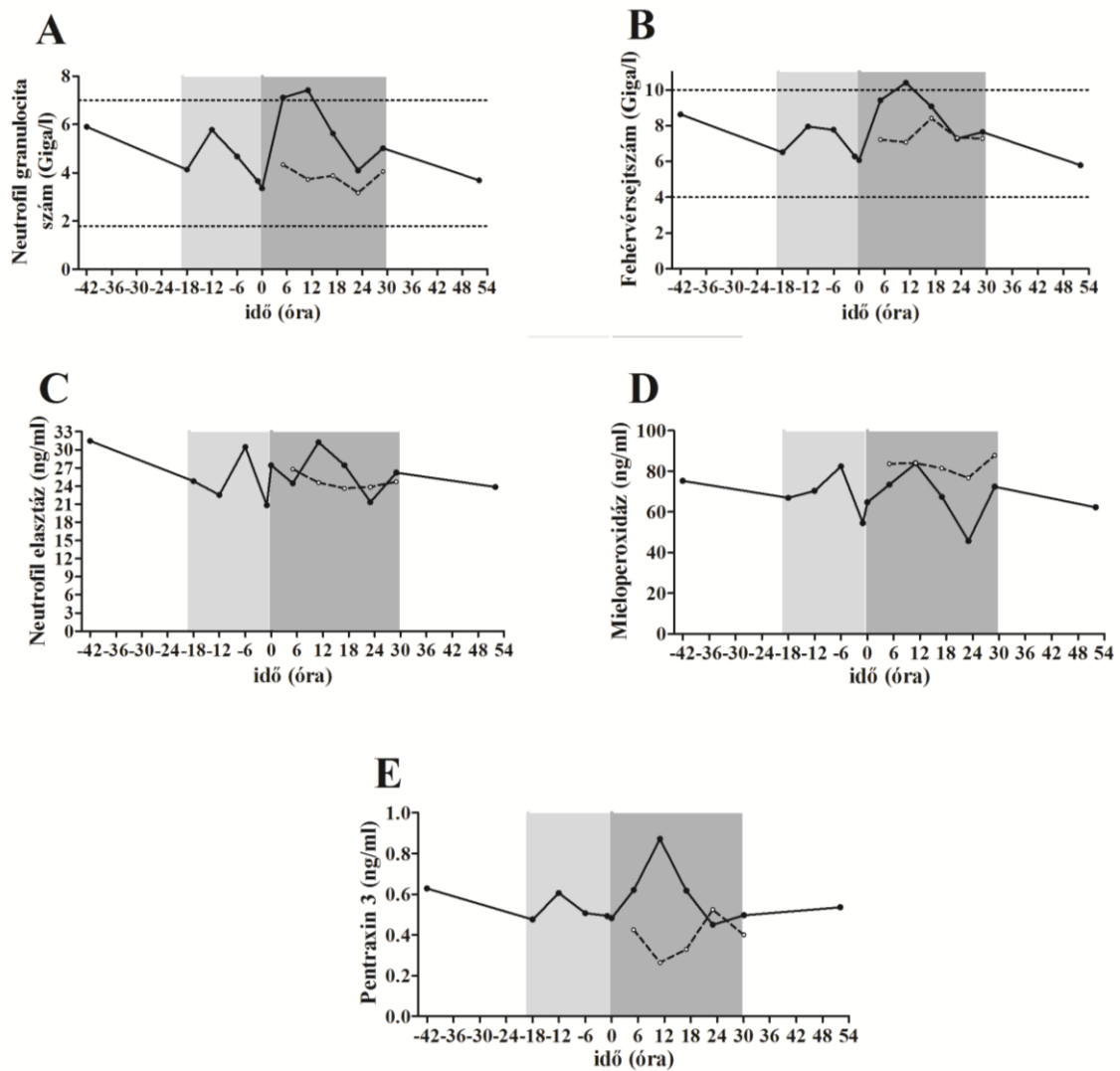
12. ábra. Szignifikáns korrelációk a neutrofil granulocita szám és a NE szintek (A) illetve MPO szintek (B) között, a NE és a MPO (C), valamint a H faktor és a $TNF-\alpha$ szintek (D) között C1-INH-HAE betegek ödémás rohamai során levett vérmintákban. A korrelációk megállapítását Spearman-féle Rho-teszttel végeztük.

5.2.4. Neutrofil granulocita szám, fehérvérsejt szám és neutrofil granulocita aktivációs markerek kinetikai nyomon követése egy C1-INH-HAE beteg ödémás rohama során

A neutrofil granulocita szám és fehérvérsejtszám is az ödéma kialakulásával párhuzamosan emelkedik meg jelentősebben, majd az ödémás tünetek javulása során a sejtszámokban csökkenés kezdődik és az ödéma elmúlására az ödémás tüneteket megelőző szintre csökken vissza [CV%(neutrofil granulocita szám)=26,7 vs. 11,3, CV%(fehérvérsejtszám)=18,6 vs. 7,3; C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll egyén].

A NE és MPO aktivációs markerek szintjei az egész megfigyelési időszakban fluktuálnak, szemben az egészséges kontroll személyben mért stabil értékekkel [CV%(NE)=14,2 vs. 5,1, CV%(MPO)=15,8 vs. 4,9; C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll egyén].

A PTX3 esetében határozott csúcértéket mértünk az ödémás roham lefolyása alatt, majd az ödémás tünetek megszűnése után mért érték megegyezett a vizsgálatunk kezdetén, tünetmentes állapotban mért értékkel [CV%(PTX3)=20,5 vs. 25,1; C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll egyén](13. ábra).



13. ábra. A neutrofil granulocita szám (A), fehérvérsejtszám (B), NE (C) MPO (D) és PTX3 koncentrációjának nyomonkövetése a C1-INH-HAE betegben (teli körök) a 96-órás megfigyelési időszakban illetve az egészséges kontroll egyénben (nyitott körök) a 24-órás megfigyelési időszakban. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.

5.3. A C1-INH hiány közvetlen következményeinek vizsgálata egy C1-INH-HAE ödémás roham lefolyásának nyomonkövetése során

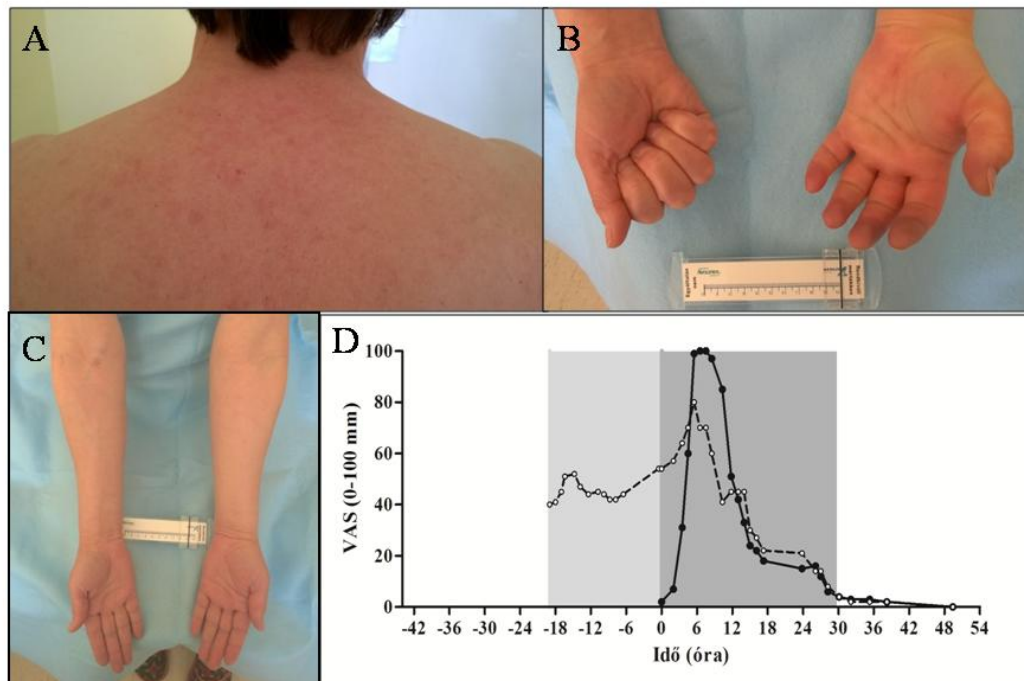
A nyomonkövetés magába foglalta a beteg rendszeres időközönkénti fizikális kivizsgálását, a klinikai tünetek változásainak, súlyosságának folyamatos feljegyzését és meghatározott időközönként vérvételt.

5.3.1. Klinikai tünetek és súlyosságuk egy C1-INH-HAE beteg nyomonkövetése során

Nyomonkövetésünk a beteg tünetmentes időszakában kezdődött, és 42 óra múlva a beteg egy végtagödéma jeleit észlelte magán. A továbbiakban ezt az időpontot tekintettük kezdetnek, és ehhez képest ábráztuk a változásokat az időskálán. A roham kezdetéhez képest 19 órával hamarabb prodromális tünetek jelentek meg, melyek kezdetben émelygés, a combokon és a bal felkaron bőrfeszülés voltak, majd később a bal kéz ujjai merevvé váltak. Egy órával később szájszárazság majd erythema marginatum jelent meg mindkét kézfejen és az arcon, közben a bal kéz ujjainak merevsége enyhült. Az erythema marginatum az ezt követő 12 órában változó lokalizációkban is megjelent (mellkas, nyak, jobb kézfej, bal könyökhajlat) (14. ábra), valamint a beteg fokozott hasi bélmozgást tapasztalt. A hasi tünetek miatt hasi ultrahang vizsgálat történt, ami nem mutatott eltérést. A prodromális tünetek a roham lefolyása alatt végig fennálltak, illetve a roham elmúlásával párhuzamosan enyhültek és múltak el ($VAS < 3$). A beteg a különféle prodromális tünetek súlyosságát összegezve egy VAS skálán értékelte (14. ábra).

Az ödéma kialakulása a balkézfejen kezdődött. Az ödéma kezdetéhez képest két óra elteltével a kézfej duzzanat fokozódott és a jobb comb is dagadni kezdett. Az ödémás tünetek a kialakulás kezdetétől számítva 5,5-8,5 órás periódusban voltak a legsúlyosabbak, ezt követően javultak. A legsúlyosabb periódusban a balkézfej teljesen bedagadt, a beteg nem tudta ökölbe szorítani a kezét, illetve csuklótól felfelé a bal alkar is elkezdett dagadni. A comb dagadása ettől jelentősen enyhébb volt. A beteg multilokalizációs ödémás rohama a roham kezdetétől számítva 30 óra alatt múlt el ($VAS < 3$). Összességében a beteg nyomonkövetése 96 órán keresztül zajlott, mely idő alatt összesen 38 alkalommal történt meg a tünetek értékelése a tüneti naplóban.

A beteg a különféle ödémás tünetek súlyosságát összegezve egyetlen VAS skálán értékelte (14. ábra).

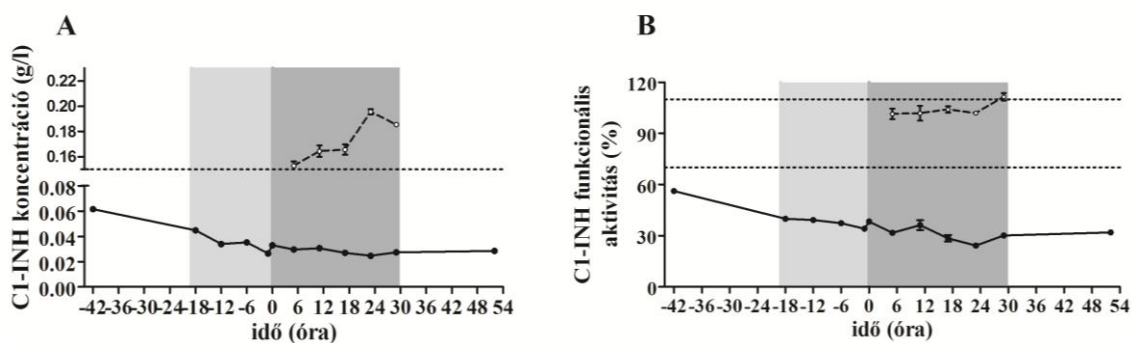


14. ábra. A klinikai tünetek (A-C) és súlyosságuk (D) egy C1-INH-HAE roham nyomkövetése során. A – erythema marginatum, B – kézödéma, C – kezek az ödémás tünetek megszűnése után, D – A prodromális (üres körök) és ödémás (teli körök) tünetek súlyosságának nyomkövetése a 96-órás megfigyelési időszakban. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.

5.3.2. A C1-INH szint és a klinikai tünetek közötti összefüggések vizsgálata

A C1-INH koncentráció és funkcionális aktivitás kinetikáját a beteg 96-órás illetve az egészséges kontroll 24-órás megfigyelése során, az alábbi ábrán mutatom be (15. ábra). A betegben megfigyelésünk kezdetén, tünetmentes állapotban mértük a legmagasabb C1-INH koncentrációt és funkcionális aktivitást, azonban ahogy az C1-INH-HAE-ban várható is, mindkét paraméter értéke a normál tartomány alatt volt. Az egész megfigyelési idő alatt folyamatos csökkenést figyeltünk meg a koncentrációban és aktivitásban is. A roham kezdetének időpontjában a C1-INH koncentráció és aktivitás is felére csökkent a tünetmentes időszakban mért kiindulási értékhez képest és nem emelkedett sem az ödémás tünetek javulása során, sem a teljes elmúlása után, tünetmentes állapotban. A $CV\%(C1-INH \text{ koncentráció és } C1-INH \text{ funkcionális aktivitás})=30,8 \text{ és } 22,5 \text{ volt.}$

Az egészséges kontroll egyénben normál tartományon belüli C1-INH koncentrációt és aktivitást mértünk, s bár a C1-INH koncentráció egy napon belül mutatott ingadozást, a C1-INH funkcionális aktivitása a vizsgált 24-órás periódusban stabil volt (CV%: 9,9 illetve 4,1 az említés sorrendjében) (15. ábra).



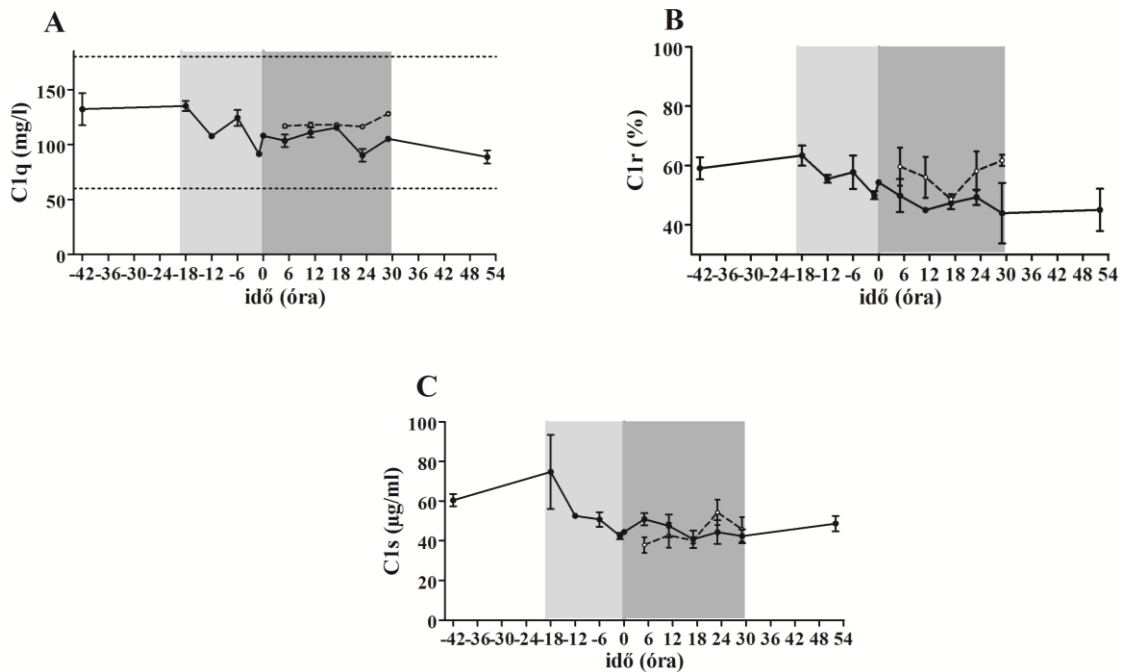
15. ábra. A C1-INH koncentráció (a) és funkcionális aktivitás (b) nyomonkövetése a C1-INH-HAE betegben (teli körök) a 96-órás megfigyelési időszakban illetve az egészséges kontroll egyénben (nyitott körök) a 24-órás megfigyelési időszakban. A pontozott vonalak az adott paraméterre vonatkozó referencia tartományt jelölik [a C1-INH koncentráció esetében a referencia tartomány felső értéke (0,3 g/l) nincs feltüntetve az ábrán]. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.

5.3.3. A komplementrendszer klasszikus útvonalának kinetikai vizsgálata a nyomonkövetés során

Mivel a C1-INH kizárólagos regulátora a C1r, C1s szerin-proteázoknak, hiányának következményeit a klasszikus út paramétereinek (C1q, C1r, C1s, C4, C4a) vizsgálatával elemeztük.

A C1q koncentráció a betegben megfigyelésünk alatt végig a normáltartományon belül volt. A betegben a C1 mindhárom szubkomponense (C1q, C1r és C1s szintek) a nyomonkövetés során hasonló kinetikát mutatott. A prodromális periódus kezdetén szintjükben csökkenés kezdődött az alapértékhez képest, mely csökkenés az ödémás roham ideje alatt mérséklődött. A tünetmentes állapot elérése után sem tapasztaltunk szintjükben az alapszinthez való visszatérést. A nyomonkövetés során mért C1q, C1s, C1r szintek CV%-a 14,1, 19,1 és 12,1 volt, az említés sorrendjében. Az egészséges kontroll egyénben mért C1q, C1s, C1r szintek a 24-órás periódusban nem mutattak

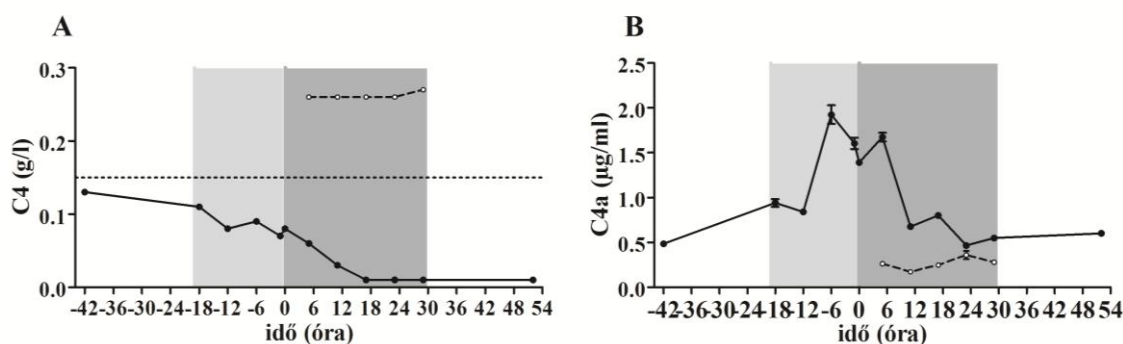
egyirányú változást és az ingadozás is mérsékeltebb volt, mint a betegben (4,1, 14,4 és 8,9, az említés sorrendjében) (16. ábra).



16. ábra. A C1q (A), C1r (B) és C1s(C) koncentráció nyomonkövetése a C1-INH-HAE betegben (teli körök) a 96-órás megfigyelési időszakban illetve az egészséges kontroll egyénben (nyitott körök) a 24-órás megfigyelési időszakban. A pontozott vonalak az adott paraméterre vonatkozó referencia tartományt jelölik. A C1r és C1s esetében laborunk nem rendelkezik referencia tartománnyal, mivel ezen paraméterek meghatározása nem része a mindennapi diagnosztikában alkalmazott vizsgálatoknak. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.

A C4 koncentráció a 96-órás nyomonkövetés alatt a betegben végig a normál tartomány alsó határa alatt volt. Az alapviziten, tünetmentes állapotban vet vérmintában mértük a legmagasabb C4 koncentrációt, majd a prodromális tünetek megjelenésével koncentrációjában csökkenés kezdődött, ami az ödémás tünetek megjelenésével fokozódott. Az ödémás tünetek javulásával sem változott a csökkenő tendencia és miután a C4 szint elérte a detektálási limit alsó határát, ezen a szinten maradt a megfigyelési idő hátralevő idejében. Emelkedést a C4 koncentrációban még a tünetek teljes elmúlása után sem tapasztaltunk. Az egészséges kontrollban a 24-órás

periódusban végig stabilan megegyező 260 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációt mértünk a normál tartományban [CV%: 74,2 vs. 1,7 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll egyén)]. A C4a aktivációs termék az alapviziten, tünetmentes állapotban mért koncentrációhoz képest már a prodromális periódusban emelkedett, az ödémás rohamot megelőző 7. órában mért maximuma az alapkonzentráció négyszerese volt, az egészséges kontrollban mért értékekhez viszonyítva hétszerese. Az ödémás roham alatt a C4a szint magas maradt, majd a tünetek javulásával egyidejűleg csökkent a szintje. A tünetek elmúlására a koncentrációja visszatért az alapkonzentrációhoz. Az egészséges kontrollban a 24-órás megfigyelési periódusban a betegben mért C4a értékeknél alacsonyabb, és stabilan megegyező értékeket mértünk [CV%: 51,8 vs. 25,7 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll) (17. ábra).



17. ábra. A C4 (A) és C4a (B) koncentráció nyomonkövetése a C1-INH-HAE betegben (teli körök) a 96-órás megfigyelési időszakban, illetve az egészséges kontroll egyénben (nyitott körök) a 24-órás megfigyelési időszakban. A pontozott vonalak az adott paraméterre vonatkozó referencia tartományt jelölik [a C4 koncentráció esetében a referencia tartomány felső értéke (0,55 g/l) nincs feltüntetve az ábrán]. A C4a esetében laborunk nem rendelkezik referencia tartománnyal, mivel ezen paraméter meghatározása nem része a mindennapi diagnosztikában alkalmazott vizsgálatoknak. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.

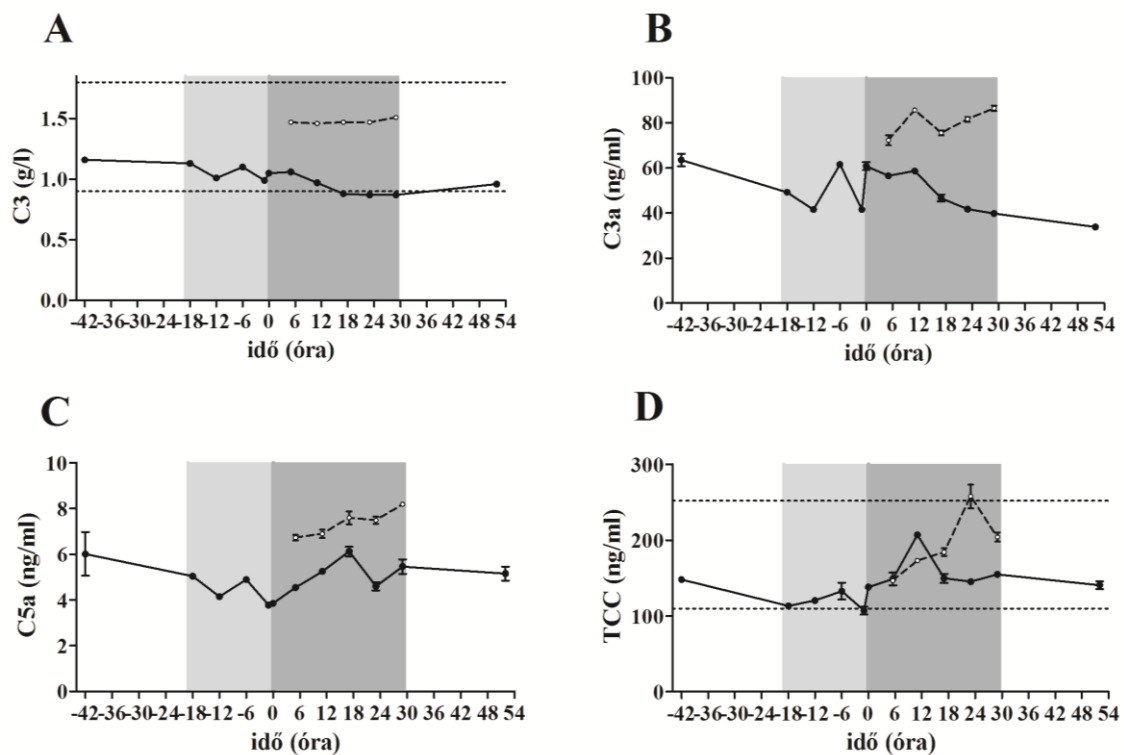
5.3.4. A C3 aktiválásának és a terminális út aktiválásának vizsgálata egy C1-INH-HAE beteg ödémás rohamának nyomonkövetése során

A komplementrendszerben központi szerepet betöltő C3 komponensnek, a hasítása során keletkező C3a aktivációs terméknek, valamint a terminális útvonal aktivációs termékeinek (C5a, TCC) tanulmányozásával tisztázni akartuk, hogy a hiányos C1-INH reguláció hatásai a komplement kaszkád mely lépéséig terjednek ki. A C3 fehérje,

valamint a C3a, C5a és TCCaktivációs termékek kinetikája a 96-órás nyomonkövetés során az 18. ábrán látható.

A C3 szintje a betegben a prodromális tünetek megjelenésével egy időben elkezdett ingadozni, majd az ödémás roham alatt a tünetek javulásával együtt szintje csökkenésnek indult és a normál tartomány alá süllyedt. Az egészséges kontroll egyénben a megfigyelési időszak alatt konstans stabil értékeket mértünk, CV%: 9,9 vs. 1,32 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll).

A C3a, a C5a és TCC aktivációs termékek szintje nem mutatott emelkedő tendenciát, és a megfigyelési időszak alatt mért koncentrációkvégig az egészséges kontrollban mért koncentrációk alatt maradtak. A CV% -ok a C3a esetében 20,5 vs. 7,8, a C5a esetében 15,5 vs. 7,9 és az TCC esetében pedig 17,9 vs. 21,5 (C1-INH-HAE beteg vs. egészséges kontroll egyén).



18. ábra. A C3 (A), C3a (B), C5a (C), TCC (D) koncentráció nyomonkövetése a C1-INH-HAE betegben (teli körök) a 96-órás megfigyelési időszakban, illetve az egészséges kontroll egyénben (nyitott körök) a 24-órás megfigyelési időszakban. A pontozott vonalak az adott paraméterre vonatkozó referencia tartományt jelölik. A C3a, C5a és TCC esetében laborunk nem rendelkezik referencia tartománnyal, mivel ezen paraméter meghatározása nem része a mindennapi diagnosztikában alkalmazott

vizsgálatoknak. A fehér háttér a tünetmentes periódust, a világosszürke háttér a prodromális tünetek periódusát és a sötétszürke háttér az ödémás tünetek periódusát jelöli.

6. MEGBESZÉLÉS

Doktori disszertációmban bemutatott munkáim a C1-INH-HAE ödémás rohamok patomechanizmusának pontosabb megismerését, megértését célozták. A napjainkban elfogadott álláspont szerint az ödémás rohamokban a vérplazma kiáramlásért elsősorban a bradikinin a felelős, ugyanakkor az ödémás rohamok rendkívül nagy változatosságot mutatnak (van-e kiváltó tényező, jelentkezik-e prodromális tünet, mi befolyásolja az ödéma kialakulásának gyakoriságát, lokalizációját, súlyosságát). Így felmerül, hogy a bradikinin kivül esetleg más biomarkereknek is szerepük lehet az ödémás roham patomechanizmusában (224). Korábbi tanulmányok beszámolnak a kontakt-, koagulációs és fibrinolitikus rendszerek érintettségéről ödémás rohamok során, ugyanakkor jól definiált, nagyobb esetszámú betegcsoportban (amelyben a tünetmentes és ödémás rohamok során vett vérminták ugyanazon C1-INH-HAE betegektől származtak volna) ezen rendszerek átfogó vizsgálata nem történt még meg. Ezért is próbáltuk tisztázni részletesebben több paraméter vizsgálatával a szerepüket az ödémás roham patomechanizmusában. Elsőként foglalkoztunk a neutrofil granulociták és aktiválódási markereik vizsgálatával C1-INH-HAE-ban. Munkámban egyedülálló lehetőségünk nyílt egy spontán lefolyású ödémás roham kinetikai nyomonkövetésére, mely mind a beteg klinikai tüneteinek változásainak megfigyelését, mind pedig sorozatos vérmintavételek által a komplement-, kontakt-, koagulációs, fibrinolitikus rendszerek és neutrofil granulociták egyes paramétereinek kinetikájának megfigyelését tette lehetővé számunkra. Az eredmények tárgyalását a célkitűzésekben megfogalmazott főbb pontoknak megfelelően részletezem.

6.1. A koagulációs, fibrinolitikus és kontaktrendszer változásainak egyidejű, átfogó vizsgálata C1-INH-HAE-ban.

A szakirodalomban a korábbiakban megjelent publikációkhoz képest nagy esetszámú vizsgálatunkban egyidejűleg elemeztük a kontakt-, koagulációs és fibrinolitikus rendszerek változásait C1-INH-HAE ödémás rohamok során. Átfogó vizsgálatunk megbízhatóságát növeli, hogy ugyanazon betegekhez tartozó tünetmentes és rohamok során levett vérmintákban mért értékeket hasonlítottunk össze, így minden beteg egyben saját maga kontrolljának is számított.

A C1-INH-HAE betegek tünetmentes vérmintáiban emelkedett FXIIa szintet tapasztaltunk az egészséges kontroll csoportban mért értékekhez képest, amely tovább emelkedett a betegekben az ödémás rohamok során. Ez utóbbi eredményünk összhangban van egy munkacsoport korábban már publikált eredményeivel (128, 154). Egy korábbi vizsgálattól eltérően – melyben összesen 5 beteg tünetmentes és rohamok során levett vérmintáját hasonlították össze (96) – a FXIa esetében emelkedett szintet tapasztaltunk a betegek tünetmentes vérmintáiban az egészséges kontrollcsoportban mért értékekhez képest. Ödémás rohamok során azonban nem tapasztaltunk eltérést a FXIa szintekben, tünetmentes állapothoz képest. Hasonlóan a korábban publikált eredményekhez (91, 155) emelkedett F1+2 szintet tapasztaltunk C1-INH-HAE betegek tünetmentes vérmintáiban, az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva, és további emelkedést tapasztaltunk ugyanazon betegek ödémás rohama során, a tünetmentes állapothoz képest, amely hiperkoagulációs állapotra utal. Ennek ellenére a fokozott trombólízisra való hajlam C1-INH hiányos betegekre nem jellemző. Ez adódhat abból is, hogy megfigyeléseink alapján, az ödémás rohamok során jelentősen megemelkedett a D-dimer koncentrációja, ami a fibrinháló plazmin általi hasításakor keletkezik, tehát a fibrinolitikus aktivitás a hiperkoagulációs állapotot ellensúlyozhatja. A hiperfibrinolitikus állapotra korábbi publikációkban is utalnak (128, 154, 156). Mivel azonban a plazminogén szint esetében nem kaptunk eltérést egyik vizsgált csoportunk esetében sem, valószínűsíthetően másodlagos hiperfibrinolízisről lehet szó, mivel nagyobb mértékű fibrinolitikus aktivitás esetén a plazminogén szintjében csökkenést kellett volna tapasztalnunk.

A koagulációs rendszer aktiválódik ödémás rohamok során, amit az F1+2 szint emelkedése mellett az általunk először meghatározott alvadási időkben (PI és APTI) mért csökkenés is alátámaszt. Az APTI csökkenése, szemben a PI-vel már a betegek tünetmentes állapotára is jellemző egészséges kontroll egyénekhez viszonyítva. *Bork és munkatársai* 2016-ban megjelent munkájukban megerősítették eredményünket, összesen 45 beteg, 33 tünetmentes vérmintájában mértek alacsony [referencia tartomány (26-36 s) alsó határa alatti] értékeket, ezek alapján felvetették az APTI lehetséges diagnosztikai markerként való felhasználását (225). A trombin keletkezésére utaló F1+2 szint emelkedése ugyanakkor együtt járt a TAT-komplex szint emelkedésével, így valószínűsíthetően a keletkező trombin antitrombin által semlegesítődik. Ennek alapján

feltehetően a tromboembóliás események kivédésében a trombin inhibitorainak is szerepe lehet, és ez magyarázatul szolgálhat arra, miért nincs a C1-INH-HAE betegeknek ödémás rohamok során trombózisa. Bár egy korábbi tanulmányban *Nielsen és munkatársai* nem találtak különbséget a C1-INH-HAE betegek és egészséges kontroll egyének vérmintáiban mért TAT-komplex szintek között (96), a mi munkacsoportunk a C1-INH-HAE betegek tünetmentes mintáiban emelkedett TAT-komplex szintet tapasztalt az egészséges kontroll csoportban mért értékekhez viszonyítva, és további emelkedést ödémás rohamok során a tünetmentes állapothoz képest. A korábbi vizsgálat eredményeit gyengíti a rendkívül kicsi esetszám (ugyanazon 5 C1-INH-HAE betegtől származó tünetmentes és ödémás rohamok során levett minta és 5 egészséges kontroll), szemben az általunk vizsgált 39 beteggel és 39 kontroll egyénnel. Eredményeink alapján tehát a C1-INH-HAE betegekre már tünetmentes állapotban is jellemző a fokozott mértékű trombin képződés, ami ödémás rohamok során tovább fokozódik. Ennek ellenére, mivel a keletkező trombin - eredményeink alapján úgy tűnik - inaktiválódik az antitrombin által, hatása az érpermeabilitásra elég csekély mértékű lehet *in vivo*.

Átfogó vizsgálatunk keretén belül a fibrinogén és a plazminogén szinteket először vizsgáltuk C1-INH-HAE betegekben. Egyik paraméter esetében sem kaptunk különbséget a C1-INH-HAE betegek és egészséges kontroll egyének plazma mintáiban mért szintek között. Ugyanazon betegekben a fibrinogén szint ödémás rohamok során kissé megemelkedett a tünetmentes állapothoz képest, amely valószínűleg a fehérje akut fázis jellegére utalhat.

A PAI-1 szint esetében ödémás rohamok során csökkenést tapasztaltunk ugyanazon betegek tünetmentes állapotban levett mintáiban mért értékekhez képest, és az egészséges kontroll csoportban mért értékekhez képest is. *Van Geffen és munkatársai* korábban csak az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva tapasztaltak csökkent PAI-1 szintet ödémás rohamok során. A csökkenést a fokozott trombin képződéssel és ennek következményeképpen a protein C aktivációjával magyarázták, ami a PAI-1 konzumpciójához vezet (91). A PAI-1 szintek változásaira a „C1-INH-HAE betegünk nyomomonkövetése” kapcsán visszatérek.

A különböző plazmaenzimrendszerek paramétereinek egyidejű analizisével lehetőségünk volt megvizsgálni a különböző rendszerek közötti összefüggéseket.

Először vizsgáltuk és írtuk le, hogy a különböző plazmaenzimrendszerek paramétereinek közötti összefüggések eltérőek egészséges egyéneknél, sőt ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes állapotában és rohamai során is, melyre a különböző korrelációs mintázatok alapján következtetünk. Amiben a különböző csoportok megegyeznek, hogy mindhárom csoportban korrelációt tapasztaltunk az aPTI és a FXIa vagy FXIIa között. Az aPTI és a FXIIa között szignifikáns negatív korrelációt tapasztaltunk, mely az egészséges kontroll csoportban volt a leggyengébb. Ez azt jelenti, hogy minél több FXIIa van jelen annál rövidebb lesz az alvadási idő, amit valószínűleg a fibrinolitikus rendszer aktiválódása ellensúlyoz. Érdekes módon, míg az egészséges kontroll csoportban a C1-INH funkcionális aktivitása számos paraméterrel korrelációt mutatott (PI, aPTI, FXIa, fibrinogén), addig C1-INH-HAE betegek tünetmentes mintáiban nem tapasztaltunk egy paraméterrel sem összefüggést. Ödémás rohamok során azonban a C1-INH funkcionális aktivitása negatívan korrelált a PI-vel, illetve a F1+2-vel is. Ez utóbbi megfigyelésünk a koagulációs rendszer aktiválódásának részvételére utalhat C1-INH-HAE ödémás rohamok patofiziológiájában, egyetértésben egy korábbi tanulmánnyal (91).

Először vizsgáltuk, hogy a különböző lokalizációjú illetve egy, vagy többlokalizációt érintő ödémás rohamok befolyásolják-e a plazmaenzimrendszerek paramétereinek szintjét. A több lokalizációt érintő ödémás rohamok során a plazmaenzimrendszerek fokozottabb mértékű aktiválódására következtetünk – a magasabb D-dimer szint, csökkent PI és plazminogén szint alapján –, mint az egylokalizációt érintő ödémás rohamok esetében. *Reshef és munkatársai* szintén emelkedett D-dimer szintet mértek a több lokalizációt érintő ödémás rohamok alatt levett mintákban, valamint szubmukózus lokalizációjú rohamok esetében is magasabb D-dimer szintet tapasztaltak a szubkután lokalizációjú ödémák során mért értékekhez képest (156). Ezzel szemben mi a szubkután és szubmukózus lokalizációt tekintve nem tapasztaltunk különbséget a mért paraméterek szintjeiben, egyetértésben egy korábbi tanulmánnyal (155).

Vizsgáltuk a plazmaenzimrendszerek paramétereinek interindividuais különbségét, illetve ugyanazon C1-INH-HAE betegek több ödémás rohamában mért értékek összehasonlításával az intraindividuais „roham-változatosságot” is elemeztük. A TAT-komplex, fibrinogén, D-dimer és C1-INH szintek nagy interindividuais különbséget

mutattak, továbbá a D-dimer és C1-INH funkcionális aktivitás jelentősen fluktuált az egyes betegek különböző ödémás rohamai során.

Mindent figyelembe véve elmondhatjuk, hogy megerősítve a korábbi tanulmányokat, eredményeink alapján a koagulációs és fibrinolitikus rendszerek aktiválódnak C1-INH-HAE rohamok során, illetve tünetmentes állapotban is magasabb mértékű prokoaguláns és fibrinolitikus aktivitást tapasztaltunk egészséges kontroll egyéneknél tapasztaltakhoz képest.

Egy C1-INH-HAE betegünk egy ödémás rohamának nyomonkövetése során a koagulációs és fibrinolitikus rendszer változásait finom felbontásban követhettük nyomon az ödéma kialakulását megelőző tünetmentes állapottól, az ödémás roham kialakulásán, lefolyásán keresztül annak spontán elmúlásáig. Ehhez hasonló vizsgálat a korábbiakban nem történt. *Reshef és munkatársai* olyan nyomonkövetést végeztek, melyben ödémás rohamok alatt, akut kezelésre alkalmazott rekombináns humán C1-INH készítmény (rhC1INH, conestat alfa, Ruconest®) beadását megelőzően vettek vérmintát a betegektől, majd a gyógyszer beadását követő 2. órában, és végül 7 nap elteltével. A mintákban meghatározták a D-dimer koncentrációját. Ezen vizsgálat célja azonban nem az ödéma patomechanizmusának megértése, megfigyelése volt, hanem a rhC1-INH biztonságos használatának vizsgálata (156), ugyanis a D-dimer emelkedett szintjét az orvosi gyakorlatban érelzáródással járó állapotokkal (trombózis, tüdőembólia) hozzák összefüggésbe, bár egyes nem patológiás állapotokban is emelkedhet a szintje (226).

A nyomonkövetéses vizsgálat során a C1-INH-HAE beteg kezdeti tünetmentes állapotában mért FXIIa és FXIa szinthez képest az egész megfigyelési időszakban alacsonyabb értékeket mértünk, és egyik paraméter szintje sem mutatott egyirányba mutató változást. Az F1+2 és TAT-komplex teljesen hasonló kinetikát mutatott a megfigyelési időszakban, az ödémás rohamot megelőző prodromális periódusban végig az egészséges kontroll egyénben mért értékekkel megegyező szinten voltak, ugyanakkor az ödémás roham kialakulásának kezdetével egyidőben mindkét paraméter szintje ugrásszerűen megemelkedett, és magasan is maradt. Az ödémás tünetek javulása során kezdett el szintjük csökkenni az ödémás tüneteket megelőző szintre. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a koagulációs rendszer aktiválódása az ödéma kialakulásával párhuzamosan megy végbe és az, hogy a FXIIa és FXIa szint esetében nem kaptunk

jelentősebb változást a megfigyelési időszakban, azt sugallhatja, hogy az aktiválódás valószínűleg a TF útvonalon keresztül következik be. Érdekes módon, a fibrinogén szint a betegben a prodromális tünetek alatt emelkedik egészen a normál tartomány felső határa fölé, és az ödémás tünetek kialakulásával szintje csökkenésnek indul és eléri a tünetmentes állapotban mért értéket. Az, hogy a rohamot megelőzően emelkedett a fibrinogén szint, felveti a lehetőségét annak, hogy a fibrinogént, mint prediktív biomarkert vegyük számításba az ödémás rohamok előrejelzésében.

A plazminogén kinetikájában minimális fluktuációt láhattunk a megfigyelési időszakban, nagyobb eltérést nem tapasztaltunk sem az egészséges kontrollban mért értékekhez képest, sem a beteg állapotának különböző periódusai között. Ez összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy a 39 C1-INH-HAE beteg tünetmentes és rohamok során levett vérmintájában sem különböztek a plazminogén szintek, és az egészséges kontroll csoporthoz képest sem volt eltérés.

A D-dimer kinetikája nagyon jól korrelált az ödémás tünetekkel, ugyanis sem tünetmentes állapotban, sem a prodromális tünetek alatt nem tér el a szintje az egészséges kontrollban mért szintektől, így a folyamatban lévő ödémás rohamok biomarkere lehet.

Az egészséges kontroll egyénben, az eddig sorolt valamennyi paraméter esetében a 24-órás periódus alatt mért hasonló, stabil szintek arra utalnak, hogy a betegben a megfigyelési idő alatt tapasztalt változások nem az adott paraméterre jellemző napi (cirkadián) ritmus következményei.

A PAI-1 meghatározása során jellegzetes és hasonló mintázatot tapasztaltunk mind a C1-INH-HAE betegben, mind az egészséges kontroll egyénben. Ez a jellegzetes mintázat a PAI-1 cirkadián ritmusára utal, melyet korábbi tanulmányokban már közöltek (227, 228). Ezáltal nagyon nehéz lenne megállapítani, mely eltérések adódnak az ödéma lefolyása következtében. A PAI-1 esetében kapott ellentmondó eredmények tünetmentes és rohamos vérmintákban mért értékek összehasonlítása során valószínűsíthetően a cirkadián ritmusnak tulajdoníthatók.

Bár az ödémás rohamok nagy variabilitást mutatnak még az egyes betegeken belül is, ugyanakkor egy ilyen kivételesen részletes roham nyomkövetés által új információkkal bővíthetjük a patomechanizmusról eddig alkotott elképzeléseinket, s az

itt megfigyelt jellegzetességek megerősítése révén a későbbiekben akár az orvosi gyakorlatban is felhasználható potenciális biomarkerek beazonosítására is sor kerülhet.

6.2. Neutrofil granulociták vizsgálata C1-INH-HAE-ban

Vizsgálatunk során megerősítettük, hogy C1-INH-HAE ödémás rohamok során a hemokoncentrációt is figyelembe véve a neutrofil granulocita szám emelkedett. Továbbá munkánk során először mutattuk be, hogy a C1-INH-HAE betegekben a neutrofil granulocita szám már tünetmentes állapotban is magasabb, mint az egészséges kontroll csoportban. Ezen érdekes megfigyelésünket azóta nagyobb esetszám bevonásával (114 C1-INH-HAE beteg tünetmentes minta illetve 210 egészséges kontroll minta) is megerősítettük. Az, hogy ennek háttérében milyen mechanizmus áll pontosan nem ismert, mindenesetre egy 2016-ban megjelent tanulmányban C1-INH-HAE betegek tünetmentes vérmintáiban az egészséges kontroll csoporthoz képest magasabb GM-CSF szintet tapasztaltak, és még magasabb szintet a betegek ödémás rohama során vett vérmintákban (229). A GM-CSF meghosszabbítja a keringésben a granulociták élettartamát, valamint fokozza a granulociták csontvelőből történő kiszabadulását a keringésbe (174, 230), ezáltal magyarázhatja a tapasztalt emelkedett neutrofil sejtszámot.

Az ödémás rohamok során emelkedett - a neutrofil granulociták granulumaikból felszabaduló - NE, MPO és PTX3 fehérjeszint alapján a sejtek aktiválódására következtethetünk. Úgy tűnik, hogy a granulociták aktivációja valóban az ödéma kialakulásával kapcsolatos, mert tünetmentes állapotban a megemelkedett sejtszám mellett nem figyeltünk meg emelkedett enzim (NE, MPO) kibocsátást a sejtekből az egészséges kontrollokban mért értékekhez képest.

Az ödémás rohamok során bekövetkező neutrofil granulociták aktivációjára nem csak az emelkedett NE és MPO szintek alapján következtethetünk, hanem erre utal az is, hogy a neutrofil granulocita szám és a NE, valamint az MPO szintje ödémás rohamok során vett mintákban (és csak ekkor, tünetmentes állapotban és egészséges egyéneknél nem) pozitívan korrelált egymással, valamint a NE szint és a MPO szintje még erősebb összefüggést mutatott egymással. Ezek az összefüggések, valamint a rohamok során megemelkedett PTX3 szintje a NET kifejeződésére is utalhatnak. Bár a NET hálózatos struktúrájának fő komponensei DNS és hisztonok, a NE és MPO is esszenciálisak a

NET kialakulásában – bármelyik enzim deficienciája sikertelen NET képződéshez vezet –, és részt vesznek a patogének degradálásában (204, 231).

A TNF- α és IL-8 is potenciális aktivátorai a neutrofil sejtek funkcióinak (189, 232, 233). Eredményeink alapján az ödémás rohamok során emelkedett mind az IL-8, mind a TNF- α szintje, a betegek tünetmentes állapotában vett mintáiban mért szintekhez képest. Érdekes továbbá, hogy a betegek tünetmentes mintáiban mért TNF- α szint alacsonyabbnak adódott az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Ezt a megfigyelésünket azóta több beteg és egészséges kontroll egyén bevonásával is megerősítettük, ám ennek jelentőségét egyelőre nem tudjuk. Az irodalomban ezen citokinekre vonatkozóan eddig kevés eredmény, információ jelent meg C1-INH-HAE-ban. Ezekben a vizsgálatokban az esetszám kicsi volt, többnyire nem ugyanannak a betegnek a tünetmentes és ödémás rohamok során levett mintáját hasonlították össze, és szérumból mintát használtak (229, 234-236), ami a legkevésbé megfelelő mintatípus citokinek mérésére. Összehasonlító vizsgálatok alapján az EDTA-plazma a legmegfelelőbb mintatípus citokinek mérésére, mert stabilabb, mint a lítium heparinos, ammónium heparinos és szérumból minták (237, 238).

A TNF- α és IL-8 emelkedett szintje ödémás rohamban összefüggésben állhat a neutrofil sejtek aktiválódásával. Egyrészt mindkét citokin aktivátor hatással van a neutrofil sejtekre, másrészt az aktivált neutrofilek is képesek ezen citokinek termelésére (239).

A CRP szintre vonatkozólag érdekes megfigyelést tettük, a C1-INH-HAE betegek tünetmentes állapotában magasabb CRP szintet mértünk, mint az egészséges kontroll csoportban, és további emelkedést tapasztaltunk ugyanazon C1-INH-HAE betegekben ödémás rohamok során. Megfigyeléseink megerősítettek egy korábban megjelent tanulmányt (240). Szükséges lenne a tünetmentes állapotban megemelkedett CRP szint hátterében álló folyamatok vizsgálatára. *Hoffmann és munkatársai* a C1-INH-HAE tünetmentes állapotban nem régen leírt IL-17 emelkedésével hozták összefüggésbe, mivel az IL-17 fokozza a CRP expresszióját hepatocitákban és simaizomsejtekben, így magyarázata lehet a CRP szint emelkedésének (236, 240).

Annak ellenére, hogy a neutrofil granulociták gyulladásozó sejtek, nem kaptunk szignifikáns összefüggést a neutrofil granulocita szám, valamint a TNF- α és CRP szintek között.

A komplementrendszer a veleszületett immunitás elsődleges védelmi vonala, mely elősegíti a szervezetbe került kórokozók, testidegen anyagok elpusztítását, eliminációját a szervezetből, opsonikus-, litikus-, gyulladásos-, és immunregulációs aktivitása által (241). A C5a komplement anafilatoxin erős kemoattraktánsa a neutrofil granulocitáknak és mediátora a neutrofil granulociták adhéziójának (242, 243). Egy másik komplement fehérje a H faktor, mely a neutrofil granulociták felszínén lévő C3b receptorokhoz kötődve regulálja a sejtek aktivációját, adhézióját (217). Mivel sem a C5a, sem a H faktor szintek esetében nem tapasztaltunk különbséget a C1-INH-HAE betegek és egészségesek között, sem ugyanazon betegek tünetmentes és ödémás rohamok során vett mintái között, ezért a neutrofil granulociták aktivációja valószínűleg nem a komplementrendszer ezen faktorainak hatására következik be.

A dolgozatomban vizsgált C1-INH-HAE betegünk spontán lefolyású ödémás rohamának nyomonkövetése során megfigyelhettük, hogy a neutrofil granulocita szám a tünetmentes, alapviziten mért szinthez képest az ödéma kialakulásának kezdete után emelkedik meg kiugróan, majd az ödémás tünetek teljes elmúlására szintje az ödéma kialakulását megelőző szintre csökken. Az aktivációs marker enzimek (NE, MPO) szintjei nagymértékben fluktuálnak a megfigyelési időszakban, az egészséges kontroll egyénekben mért viszonylag stabil szintekkel összehasonlítva, vagyis a 6-óránkénti mintavétel lehet, hogy nem elég finom felbontás ahhoz, hogy ezen enzimek kinetikáját pontosan megfigyelhessük ödémás rohamok során. A PTX3 esetében azonban a tünetmentes és prodromális periódusban mért nagyjából megegyező szintekhez képest az ödémás roham kialakulásával párhuzamosan a PTX3 szint emelkedését tapasztaltuk, majd az ödémás tünetek teljes elmúlására szintje újra a kezdeti, tünetmentes állapotban mért értékkel egy szintre került.

Az ödémás roham alatt végbemenő szisztémás folyamatok rávilágítanak arra, hogy bár az ödéma lokálisan alakul ki, mégis az egész szervezetet érintő folyamatok játszanak benne szerepet. A neutrofil granulociták a felszínükön végbemenő folyamatok, valamint az általuk kibocsátott anyagok révén hozzájárulhatnak olyan plazma enzim kaszkádrendszerek - elsősorban a kontakt-kininrendszer - aktiválásához, amely a bradikinin képződés révén az ödémás roham kialakulásához vezetnek.

Mivel a neutrofil granulociták aktivációja fontos új színtere lehet a C1-INH-HAE pathomechanizmusának, további kutatásokat tervezünk az aktiválódás körülményeinek tisztázására, ok-okozati kapcsolatok feltárására. Ezen vizsgálatokra egyik témavezetőm 2017. decemberi indulással 4 éves időtartamra kapott kutatási támogatást az Országos Tudományos Kutatási Alap(OTKA)-tól.

6.3. A C1-INH hiány közvetlen következményeinek vizsgálata egy C1-INH-HAE ödémás roham lefolyásának nyomonkövetése során.

Munkánk során elsőként követtünk nyomon egy spontán lefolyású C1-INH-HAE ödémás rohamot, az ödémás tüneteket megelőző, tünetmentes állapotból kiindulva, az ödémás roham kialakulásán, lefolyásán keresztül, egészen a tünetek teljes elmúlásáig. A nyomonkövetés kiterjedt a tünetek időben nagyfelbontású leírására és súlyosságának pontosítására, valamint rendszeres vérvételekre a vizsgálat teljes ideje alatt. Mivel az ödémás rohamot prodromális tünetek előzték meg, ezért tanulmányunk egyedülálló abban is, hogy a prodromális és ödémás tünetek és súlyosságuk is külön-külön leírásra került. Ily módon nagy időbeli felbontással tárhattuk fel az ödémás roham patofiziológiáját, a megfigyelési idő alatt mért paraméterek elemzése által, a háttérben zajló klinikai történések összefüggésében. Tanulmányunk értékét emeli, hogy nemben és korban egyeztetett kontroll személytől egy napon át, ugyanazon időpontokban vérmintákat vettünk.

C1-INH-HAE-ban eddig csak farmakokinetikai és farmakodinamikai nyomonkövetéses vizsgálatok történtek, melyek nem a spontán lefolyású roham kinetikájának megértésére irányultak (244-246).

Keveset tudunk arról, hogy mi lehet a prodromális tünetek jelentősége, azonban eredményeink azt sugallják, hogy már a prodromális tünetek megjelenésével elindulhat az ödéma kialakulásához vezető folyamat. Erre a klasszikus út paramétereinek szintjében bekövetkező változások (C1-INH csökkenés, C1 szubkomponensek, C4 csökken és C4a emelkedés) utalnak. Esetünkben a prodromális tünetek maximális súlyossága egybeesett a legsúlyosabb ödémás tünetekkel, az egybeesés fontossága még nem világos, több eset leírásával lehetne tisztázni, mivel szegényes az erre vonatkozó, eddig megjelent irodalom.

Bár kézenfekvőnek tűnik, hogy egy C1-INH hiányon alapuló kórképben a C1-INH szintje összefüggést mutat a klinikai tünetekkel (93, 94), kérdés, hogy a roham kezdetét lehetne-e prediktálni a C1-INH szint mérésével. Eddig mindössze egy korábbi tanulmányban foglalkoztak ezzel a kérdéssel. *Spath és munkatársai* teoretikusan, ödémás roham után közvetlenül levett minták vizsgálatával 0,035 g/l kritikus koncentrációt jelöltek meg, ami alatt a rohamok kialakulásának esélye a legnagyobb (247). Úgy tűnik, hogy a tünetek kialakulásában a C1-INH szint valóban kritikus tényező. Esetünkben a C1-INH koncentráció és funkcionális aktivitás folyamatos csökkenése előzte meg az ödémás tünetek kialakulását, a fenti becslés megállhatja a helyét, mivel az ödémás tünetek megjelenésekor mi 0,033 g/l C1-INH koncentrációt mértünk.

Ugyanakkor feltehetően nincs összefüggés az ödémás roham spontán elmúlása és a C1-INH koncentráció/funkcionális aktivitás között, mivel esetünkben a C1-INH szint a tünetek elmúlása után sem emelkedett, sőt minimális szinten maradt. Ez arra utal, hogy az ödémás tünetek javulásában és spontán elmúlásában más faktoroknak, nem a C1-INH-nak lehet szerepe.

A C1-inhibitor szabályozás hiányát a C1s-nek a C4-re gyakorolt hatásával is mérhetjük. A C4 szint C1-INH-HAE betegek tünetmentes állapotában általában a normál tartomány alatt mérhető, és szintjében a rohamok során további csökkenést írtak le (248, 249). Korábbi tanulmányok már utaltak arra, hogy C1-INH-HAE rohamban a klasszikus út aktiválódik (96, 250). Először figyeltük meg egy ödémás roham lefolyása során, hogy a C4 aktiválódása már a prodromális tünetek megjelenésekor is észlehető. A C4 szint a roham alatt folyamatosan és fokozatosan, a mérési tartomány alsó határa alá csökkent. A C1-inhibitor szinttel összhangban, a C4 szintjében sem tapasztaltunk emelkedést a tünetek javulása során, valamint a teljes megszűnést követően sem. Ugyanakkor a C4 hasítási terméke, a C4a szintje már a prodromális tünetek alatt jelentősen megemelkedett, és magas maradt a tünetek maximális súlyosságának eléréséig. Amennyiben ezt az eredményt meg tudnánk erősíteni további esetekkel, a C4a jó prediktív biomarkere lehetne az ödémás rohamok kialakulásának. Eddig tudomásunk szerint nincs olyan biomarker, ami előre jelezné az ödémás roham kialakulását (224). Továbbá egy friss tanulmányban a C4a két potenciális receptorát azonosították, a proteáz-aktiválta receptor (PAR)-1 illetve PAR-4-et, melyeket a C4a dózis-függően

tudott stimulálni, míg a C3a és C5a nem. Eredményeik alapján a C4a növeli az endotél sejtek permeabilitását PAR-1 mediált szignalizáción keresztül (251). Figyelembevétel eredményüket elmondhatjuk, hogy valószínűleg a C4a nem csak prediktív biomarkere lehet az ödémás rohamnak, de közvetlenül hozzájárulhat annak kialakulásához.

A C3 és terminális szakasz vizsgálatát azért tartottuk fontosnak, mert tisztázni szeretnénk volna, hogy a C1-INH reguláció zavarának hatásai a komplement kaskád mely lépéséig terjednek ki. Összefüggést feltételezünk az ödémás tünetek változásai és a C1-INH-HAE betegeknél mért C3 szintekben megfigyelt változások között, ugyanis az egészséges kontroll egyénben a 24 órás megfigyelési időszak alatt gyakorlatilag nem változott a C3 szintje, így a betegünk esetében tapasztalt változások nem a C3 esetleges cirkadián ritmusának következményei. Korábban a C1-INH-HAE betegek tünetmentes és ödémás rohamok alatt levett mintáinak összehasonlításakor nem tapasztaltak különbséget a C3 szintekben (96), ugyanakkor nyomonkövetésünk során a C3 szintjének csökkenését tapasztaltuk az ödémás tünetek javulásakor. Mivel a korábbi tanulmányokban a roham alatti egyszeri vérvétel feltehetően a legsúlyosabb ödémás tünetek alatt történt (általában az akut kezelés alkalmazása előtt), talán ezért nem tudták detektálni a C3 szintjének roham alatti csökkenését.

Vizsgálatunk során továbbá azt találtuk, hogy a C3 szintben bekövetkezett csökkenés az ödémás roham során nem járt együtt a C3a szintjének emelkedésével, valamint a C5a és TCC komplement aktivációs termékek szintjében sem figyeltünk meg jelentős emelkedést. Mivel a betegeknél mért komplement aktivációs termékek szintjei minden esetben az egészséges kontrollban mért értékek alatt maradtak, ezek alapján úgy tűnik, hogy a komplementrendszer klasszikus útvonalának aktivációja a C3 szintjén megáll, további komplement aktiváció nem mutatható ki. Eredményünket az irodalomban megjelent tünetmentes és rohamos minták összehasonlításából kapott eredmények, valamint a neutrofil aktivációs projektünk keretében kapott C3a és C5a-ra vonatkozó eredmények is alátámasztják (96, 252). Bár a dolgozatban bemutatott eredmények alapján látható, hogy az egyes ödémás rohamok még egyetlen beteg esetében is eltérhetnek egymástól, ami korlátozza az általános következtetések levonását egyetlen roham nyomonkövetéséből, azonban megfigyeléseink kiinduló pontjai lehetnek további ödémás rohamok tanulmányozásának, és alapul szolgálhatnak ilyen vizsgálatok tervezéséhez.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

1. Megerősítettük a koagulációs- és fibrinolitikus rendszerek ödémás rohamok során végbemenő aktiválódását az irodalomban eddig megjelent publikációkhoz képest nagyobb esetszámú betegcsoport bevonásával, valamint ugyanazon betegektől származó tünetmentes és roham alatti vérminták összehasonlítása alapján. Megállapításunkat a rohamok során tapasztalt emelkedett FXIIa, F1+2, TAT-komplex, D-dimer szintekre valamint csökkent PI és APTI-re alapozzuk (11.1.1.). A betegek tünetmentes állapotában az ödémás rohamokhoz képest kisebb mértékű, de egészségesekben tapasztaltakhoz képest magasabb prokoaguláns és fibrinolitikus aktivitást figyeltünk meg (11.1.1.). Egy beteg 96-órás nyomonkövetése alapján arra következtethünk, hogy az ödéma kialakulásával párhuzamosan következik be ezen rendszerek aktiválódása, mivel a prodromális tünetek alatt minden paraméter – a fibrinogént leszámítva - stabilan az egészséges kontrollban mért szinten volt (*publikálása folyamatban*).

2. Az ödémás rohamok rendkívül nagy változatosságot mutatnak, nemcsak az egyes betegek vonatkozásában, de még az egy beteghez tartozó ödémás rohamok tekintetében is. Itt nemcsak a szemmel is látható klinikai tünetek és azok súlyosságának változatosságára gondolunk, hanem a plazmaenzimrendszerek aktiváltságára és egyes paramétereinek szintjeinek fluktuálására a különböző ödémás rohamok között. Először vizsgáltuk, hogy az egy, vagy több lokalizációt érintő ödémás rohamok befolyásolják-e a plazmaenzimrendszerek paramétereinek szintjét, és azt tapasztaltuk, hogy a több lokalizációt érintő ödémás rohamok során fokozottabb mértékben aktiválódik a koagulációs és fibrinolitikus rendszer is (11.1.1.).

3. Vizsgálatunk során nagyobb esetszám vizsgálatával, figyelembe véve a hemokoncentráció mértékét, megerősítettük, hogy a neutrofil granulocita szám emelkedett a C1-INH-HAE ödémás rohamok során ugyanazon betegek tünetmentes állapotban mért értékéhez képest (11.1.2). Továbbá azt is kimutattuk, hogy C1-INH-HAE betegekben már alaptól, tünetmentes állapotban emelkedett a neutrofil granulocita szám, az egészséges kontroll egyénekhez képest (11.1.2). A neutrofil granulociták

száma ugyanakkor az ödémás roham kialakulásával egyidőben, párhuzamosan emelkedik meg kiugróan, azt nem előzi meg (*publikálása folyamatban*).

4. Elsőként vizsgáltuk ugyanazon C1-INH-HAE betegek tünetmentes és rohamok során vett mintáiban a rohamok során fellépő neutrofil granulocita aktiváció lehetőségét. Az ödémás rohamok során emelkedett NE, MPO és PTX3 szintek alapján a neutrofil granulociták aktiválódására következtetünk C1-INH-HAE ödémás rohamok során. Megállapításunkat erősíti, hogy a neutrofil granulocita szám erős pozitív korrelációt mutatott a NE-zal, valamint szintén pozitív összefüggést a MPO-zal. A két aktivációs marker egymással is erős pozitív összefüggést mutatott. Ezen összefüggéseket sem a betegek tünetmentes állapotában, sem egészséges kontroll egyénekből vett mintákban nem tapasztaltuk (*11.1.2*).

5. Elsőként sikerült egy spontán lefolyású ödémás roham kialakulását, lefolyását és elmúlását nyomonkövetnünk egy C1-INH-HAE beteg esetében. A C1-INH szint csökkenése és az ödémás tünetek kialakulása között összefüggést tapasztaltunk, ugyanakkor úgy tűnik az ödémás tünetek spontán elmúlásának háttérében más faktoroknak lehet szerepe, nem a C1-INH-nak (*11.1.3*).

6. A prodromális periódus vizsgálatára a korábbiakban nem került sor. Vizsgálatunk során elsőként tudtuk megfigyelni egy C1-INH-HAE ödémás roham nyomonkövetése kapcsán, és megállapíthatjuk, hogy már a prodromális tünetek megjelenésével elindulhat az ödéma kialakulásához vezető folyamat. Erre a klasszikus út paramétereinek szintjében bekövetkező változások (C1-INH csökkenés, C1 szubkomponensek, C4 csökkenés és C4a emelkedés) utalnak. A C4a emelkedése a prodromális periódusban prediktív biomarkere lehet az ödémás rohamok kialakulásának (*11.1.3*).

7. Az ödémás roham nyomonkövetése során megfigyelt csökkenő C4, valamint az emelkedett C4a szintből a komplementrendszer klasszikus útvonalának aktiválódására következtetünk, ugyanakkor mivel a C3a, C5a és TCC aktivációs termékek szintjei nem mutattak emelkedést a megfigyelési időszak során, és szintjük végig az egészséges kontrollban mért szintek alatt maradt, arra következtetünk, hogy az aktiválódás a C3 szintjén megáll, és további aktiváció a terminális úton nem figyelhető meg (*11.1.3*).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditár angioödéma (C1-INH-HAE) egy örökletes, ritka betegség. A betegség és az ödémás rohamok háttérben zajló biológiai folyamatok a mai napig nincsenek teljesen feltárva.

Munkánkban az ödémás rohamok patomechanizmusának pontosabb megismerését tűztük ki célul, egyrészt vizsgáltuk a komplement, koagulációs és fibrinolitikus rendszerek, valamint a neutrofil granulociták aktiváltságát, és összefüggéseiket a klinikai tünetekkel. A két tanulmányhoz összesen 43 beteg 87 ödémás rohama során levett vérmintáját vizsgáltunk. Először követtük nyomon a tünetek regisztrálásával és rendszeres vérmintavétellel egy ödémás roham klinikai lefolyását egy C1-INH-HAE betegünk esetében a rohamot megelőző tünetmentes állapottól az ödéma teljes elmúlásáig.

A rohamok során tapasztalt emelkedett FXIIa, F1+2, TAT-komplex, D-dimer szintek, és a csökkent PI és APTI idők alapján megerősítettük a koagulációs és fibrinolitikus rendszereknek a vérkeringésben is kimutatható aktiválódását. Nyomonkövetéses vizsgálatunk alapján úgy tűnik, hogy ezen rendszerek szisztémás aktiválódása nem előzi meg az ödémás tünetek megjelenését, hanem annak kialakulásával párhuzamosan megy végbe. A neutrofil granulocita szám emelkedésének megerősítése mellett, az ödémás rohamok során emelkedett NE, MPO és PTX3 szintek alapján a neutrofil granulociták aktiválódására következtetünk, mely megállapításunkat támogatja, hogy csak az ödémás rohamok során mutatott a NE és MPO pozitív korrelációt a neutrofil granulocita számmal és egymás szintjével. Eredményeink alapján az általunk vizsgált plazmaenzimrendszerek és neutrofil granulociták aktiválódásuk révén hozzájárulhatnak az ödémás rohamok kialakulásához és/vagy az ödémás tünetek fennállásához. Az ödémás roham nyomonkövetése alapján megállapíthatjuk, hogy a C1-INH szint csökkenése összefüggésben állhat az ödémás tünetek kialakulásával, míg a tünetek elmúlásában valószínűsíthetően nem a C1-INH-nak van szerepe. Úgy gondoljuk, hogy a prodromális tünetek során a szervezetben aktív folyamatok zajlanak, melyeket legmarkánsabban az emelkedett C4a szintje jelez. A C4a prediktív biomarkere lehet az ödéma kialakulásának. A C1-INH hiányában a komplementrendszer klasszikus útjának aktiválódása jellemző, ami a C3 szintjén megáll, a terminális útra nem terjed ki.

9. SUMMARY

Hereditary angioedema with C1-INH deficiency (C1-INH-HAE) is a rare disease of autosomal inheritance. The biological background of the disease and of the edematous attacks is not completely understood.

Our aim was to unravel the pathomechanism of these attacks. Therefore, we investigated the activation of the complement-, coagulation, and fibrinolytic systems, as well as of neutrophil granulocytes and then, we explored their correlations with the clinical symptoms. In our two studies, we analysed 87 blood samples obtained during edematous attacks from 43 C1-INH-HAE patients. Furthermore, we studied the kinetics of an attack for the first time, starting from the symptom-free period until the complete resolution of symptoms. During the monitoring period, blood samples were obtained every 6 hours.

We confirmed the systemic activation of the coagulation and of the fibrinolytic systems during edematous attacks. This is evidenced by the elevated levels of FXIIa, F1+2, TAT-complex, D-dimer, as well as by the shortened PT and aPTT found in C1-INH-HAE patients. According to our follow-up study, it appears that the activation of these systems does not precede the onset of edematous attacks, but occurs concomitantly with their development. In addition to confirming the elevation of neutrophil granulocyte count, we detected neutrophil activation during edematous attacks, as shown by the elevated levels of NE, MPO, and PTX3. Neutrophil activation is further suggested by the positive correlation of NE and of MPO level with NGC, as well as of NE level with the level of MPO. Based on our results, we propose that the activation of plasma enzyme systems and of neutrophil granulocytes may contribute to the development and/or influence the course of edematous attacks. Monitoring of the course of an attack revealed that the decrease of C1-INH level is a critical factor in the onset of symptoms; however, their spontaneous resolution may depend on other factor(s). Our findings suggest that the process leading to edema formation might begin as early as upon the onset of prodromal symptoms, which was indicated by elevated C4a level, primarily. C4a could become a predictive biomarker of edematous attacks. In the lack of C1-INH, activation of the classical complement pathway stops at the level of C3, and does not involve the terminal pathway.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Longhurst H, Cicardi M. (2012) Hereditary angio-oedema. *Lancet*. 379: 474-81.
2. Rosen FS, Pensky J, Donaldson V, Charache P. (1965) Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetic Variants. *Science*. 148: 957-8.
3. Kaplan AP. (2014) Bradykinin-mediated diseases. *Chem Immunol Allergy*. 100: 140-7.
4. Agostoni A, Cicardi M. (1992) Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)*. 71: 206-15.
5. Bork K, Staubach P, Eckardt AJ, Hardt J. (2006) Symptoms, course, and complications of abdominal attacks in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Am J Gastroenterol*. 101: 619-27.
6. Bork K, Hardt J, Witzke G. (2012) Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 130: 692-7.
7. Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J. (2006) Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med*. 119: 267-74.
8. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, Caballero T, Farkas H, Grumach A, Kaplan AP, Riedl MA, Triggiani M, Zanichelli A, Zuraw B. (2014) Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 69: 602-16.
9. Zotter Z, Csuka D, Szabo E, Czaller I, Nebenfuhrer Z, Temesszentandras G, Fust G, Varga L, Farkas H. (2014) The influence of trigger factors on hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 9: 44.
10. Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, Bucher C, Castaldo AJ, Cicardi M, Davis AE, De Carolis C, Drouet C, Duponchel C, Farkas H, Fay K, Fekete B, Fischer B, Fontana L, Fust G, Giacomelli R, Groner A, Hack CE, Harmat G, Jakenfelds J, Juers M, Kalmar L, Kaposi PN, Karadi I, Kitzinger A, Kollar T, Kreuz W, Lakatos P, Longhurst HJ, Lopez-Trascasa M, Martinez-Saguer I, Monnier N, Nagy I, Nemeth E, Nielsen EW, Nuijens JH, O'Grady C, Pappalardo E, Penna V, Perricone C, Perricone R, Rauch U, Roche O, Rusicke E, Spath PJ, Szendei G, Takacs E, Tordai A, Truedsson L, Varga L, Visy B, Williams K, Zanichelli A, Zingale L. (2004) Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of

the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 114: S51-131.

11. Farkas H, Fust G, Fekete B, Karadi I, Varga L. (2001) Eradication of *Helicobacter pylori* and improvement of hereditary angioneurotic oedema. *Lancet.* 358: 1695-6.
12. Bouillet L. (2010) Hereditary angioedema in women. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 6: 17.
13. Caballero T, Maurer M, Longhurst HJ, Aberer W, Bouillet L, Fabien V. (2016) Triggers and Prodromal Symptoms of Angioedema Attacks in Patients With Hereditary Angioedema. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 26: 383-6.
14. Magerl M, Doumoulakis G, Kalkounou I, Weller K, Church MK, Kreuz W, Maurer M. (2014) Characterization of prodromal symptoms in a large population of patients with hereditary angio-oedema. *Clin Exp Dermatol.* 39: 298-303.
15. Kemp JG, Craig TJ. (2009) Variability of prodromal signs and symptoms associated with hereditary angioedema attacks: a literature review. *Allergy Asthma Proc.* 30: 493-9.
16. Prematta MJ, Kemp JG, Gibbs JG, Mende C, Rhoads C, Craig TJ. (2009) Frequency, timing, and type of prodromal symptoms associated with hereditary angioedema attacks. *Allergy Asthma Proc.* 30: 506-11.
17. Reshef A, Prematta MJ, Craig TJ. (2013) Signs and symptoms preceding acute attacks of hereditary angioedema: results of three recent surveys. *Allergy Asthma Proc.* 34: 261-6.
18. Farkas H, Harmat G, Fay A, Fekete B, Karadi I, Visy B, Varga L. (2001) Erythema marginatum preceding an acute oedematous attack of hereditary angioneurotic oedema. *Acta Derm Venereol.* 81: 376-7.
19. Zuraw BL. (2008) Clinical practice. Hereditary angioedema. *N Engl J Med.* 359: 1027-36.
20. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, Aygoeren-Pursun E, Craig T, Binkley K, Hebert J, Ritchie B, Bouillet L, Betschel S, Cogar D, Dean J, Devaraj R, Hamed A, Kamra P, Keith PK, Lacuesta G, Leith E, Lyons H, Mace S, Mako B, Neurath D, Poon MC, Rivard GE, Schellenberg R, Rowan D, Rowe A, Stark D, Sur S, Tsai E, Warrington R, Wasserman S, Ameratunga R, Bernstein J,

- Bjorkander J, Brosz K, Brosz J, Bygum A, Caballero T, Frank M, Fust G, Harmat G, Kanani A, Kreuz W, Levi M, Li H, Martinez-Saguer I, Moldovan D, Nagy I, Nielsen EW, Nordenfelt P, Reshef A, Rusicke E, Smith-Foltz S, Spath P, Varga L, Xiang ZY. (2010) 2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 6: 24.
21. Jackson J, Sim RB, Whelan A, Feighery C. (1986) An IgG autoantibody which inactivates C1-inhibitor. *Nature.* 323: 722-4.
22. Kalmar L, Hegedus T, Farkas H, Nagy M, Tordai A. (2005) HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum Mutat.* 25: 1-5.
23. Prada AE, Zahedi K, Davis AE, 3rd. (1998) Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology.* 199: 377-88.
24. Zeerleder S. (2011) C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin Thromb Hemost.* 37: 362-74.
25. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 276: 33293-6.
26. Ricklin D, Lambris JD. (2007) Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 25: 1265-75.
27. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 6: 132-42.
28. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. (2015) Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol.* 6: 257.
29. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. (2004) Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* 25: 368-73.
30. Ziccardi RJ, Cooper NR. (1976) Activation of C1r by proteolytic cleavage. *J Immunol.* 116: 504-9.
31. Reid KB, Porter RR. (1981) The proteolytic activation systems of complement. *Annu Rev Biochem.* 50: 433-64.

32. Takahashi M, Iwaki D, Kanno K, Ishida Y, Xiong J, Matsushita M, Endo Y, Miura S, Ishii N, Sugamura K, Fujita T. (2008) Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J Immunol.* 180: 6132-8.
33. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol.* 165: 2637-42.
34. Heja D, Kocsis A, Dobo J, Szilagyi K, Szasz R, Zavodszky P, Pal G, Gal P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 10498-503.
35. Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP. (2008) Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement. *J Biol Chem.* 283: 7853-63.
36. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, Skjoedt MO. (2016) A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev.* 274: 74-97.
37. Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Lynch NJ, Schwaeble WJ, Matsushita M, Okabe M, Fujita T. (2006) Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *J Immunol.* 177: 8626-32.
38. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S. (2009) MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol.* 183: 7371-8.
39. Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang SJ, Motomura W, Yoshizaki T, Fukuda M, Koyama S, Fukuzawa J, Fukuoh A, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N. (2006) Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol.* 50: 1001-13.
40. Ma YJ, Skjoedt MO, Garred P. (2013) Collectin-11/MASP complex formation triggers activation of the lectin complement pathway--the fifth lectin pathway initiation complex. *J Innate Immun.* 5: 242-50.

41. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt MO, Nielsen O, Hartshorn K, Jorgensen TJ, Skjodt K, Holmskov U. (2010) Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol.* 185: 6096-104.
42. Henriksen ML, Brandt J, Andrieu JP, Nielsen C, Jensen PH, Holmskov U, Jorgensen TJ, Palarasah Y, Thielens NM, Hansen S. (2013) Heteromeric complexes of native collectin kidney 1 and collectin liver 1 are found in the circulation with MASPs and activate the complement system. *J Immunol.* 191: 6117-27.
43. Lachmann PJ, Hughes-Jones NC. (1984) Initiation of complement activation. *Springer Semin Immunopathol.* 7: 143-62.
44. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med.* 154: 856-67.
45. Oroszlan G, Kortvely E, Szakacs D, Kocsis A, Dammeier S, Zeck A, Ueffing M, Zavodszky P, Pal G, Gal P, Dobo J. (2016) MASP-1 and MASP-2 Do Not Activate Pro-Factor D in Resting Human Blood, whereas MASP-3 Is a Potential Activator: Kinetic Analysis Involving Specific MASP-1 and MASP-2 Inhibitors. *J Immunol.* 196: 857-65.
46. Fearon DT, Austen KF, Ruddy S. (1973) Formation of a hemolytically active cellular intermediate by the interaction between properdin factors B and D and the activated third component of complement. *J Exp Med.* 138: 1305-13.
47. Fearon DT, Austen KF. (1975) Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.* 142: 856-63.
48. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. (2007) Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol.* 179: 2600-8.
49. Kimura Y, Miwa T, Zhou L, Song WC. (2008) Activator-specific requirement of properdin in the initiation and amplification of the alternative pathway complement. *Blood.* 111: 732-40.
50. Xu W, Berger SP, Trouw LA, de Boer HC, Schlagwein N, Mutsaers C, Daha MR, van Kooten C. (2008) Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells

independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. *J Immunol.* 180: 7613-21.

51. Cortes C, Ohtola JA, Saggi G, Ferreira VP. (2012) Local release of properdin in the cellular microenvironment: role in pattern recognition and amplification of the alternative pathway of complement. *Front Immunol.* 3: 412.

52. Saggi G, Cortes C, Emch HN, Ramirez G, Worth RG, Ferreira VP. (2013) Identification of a novel mode of complement activation on stimulated platelets mediated by properdin and C3(H₂O). *J Immunol.* 190: 6457-67.

53. Stahl AL, Vaziri-Sani F, Heinen S, Kristoffersson AC, Gydell KH, Raafat R, Gutierrez A, Beringer O, Zipfel PF, 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.

54. Devine DV, Siegel RS, Rosse WF. (1987) Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo. *J Clin Invest.* 79: 131-7.

55. Volanakis JE. (1990) Participation of C3 and its ligands in complement activation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 153: 1-21.

56. Langer F, Spath B, Fischer C, Stolz M, Ayuk FA, Kroger N, Bokemeyer C, Ruf W. (2013) Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood.* 121: 2324-35.

57. Conway EM. (2015) Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *J Thromb Haemost.* 13 Suppl 1: S121-32.

58. Hausman MS, Snyderman R, Mergenhagen SE. (1972) Humoral mediators of chemotaxis of mononuclear leukocytes. *J Infect Dis.* 125: 595-602.

59. Chenoweth DE, Hugli TE. (1980) Human C5a and C5a analogs as probes of the neutrophil C5a receptor. *Mol Immunol.* 17: 151-61.

60. Johnson AR, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ. (1975) Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology.* 28: 1067-80.

61. Jose PJ, Forrest MJ, Williams TJ. (1981) Human C5a des Arg increases vascular permeability. *J Immunol.* 127: 2376-80.

62. Hugli TE. (1978) Chemical aspects of the serum anaphylatoxins. *Contemp Top Mol Immunol.* 7: 181-214.

63. Fernandez HN, Henson PM, Otani A, Hugli TE. (1978) Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J Immunol.* 120: 109-15.
64. Meuer S, Ecker U, Hadding U, Bitter-Suermann D. (1981) Platelet-serotonin release by C3a and C5a: two independent pathways of activation. *J Immunol.* 126: 1506-9.
65. Raedler H, Vieyra MB, Leisman S, Lakhani P, Kwan W, Yang M, Johnson K, Faas SJ, Tamburini P, Heeger PS. (2011) Anti-complement component C5 mAb synergizes with CTLA4Ig to inhibit alloreactive T cells and prolong cardiac allograft survival in mice. *Am J Transplant.* 11: 1397-406.
66. Lalli PN, Strainic MG, Yang M, Lin F, Medof ME, Heeger PS. (2008) Locally produced C5a binds to T cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. *Blood.* 112: 1759-66.
67. Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS, Medof ME. (2008) Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity.* 28: 425-35.
68. Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J. (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol.* 46: 2753-66.
69. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT. (2010) The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res.* 59: 897-905.
70. Shinjyo N, Stahlberg A, Dragunow M, Pekny M, Pekna M. (2009) Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells.* 27: 2824-32.
71. Jalili A, Shirvaikar N, Marquez-Curtis L, Qiu Y, Korol C, Lee H, Turner AR, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. (2010) Fifth complement cascade protein (C5) cleavage fragments disrupt the SDF-1/CXCR4 axis: further evidence that innate immunity orchestrates the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol.* 38: 321-32.

72. Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. (2003) The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med.* 198: 913-23.
73. Gorski JP, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ. (1979) C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76: 5299-302.
74. Barnum SR. (2015) C4a: An Anaphylatoxin in Name Only. *J Innate Immun.* 7: 333-9.
75. Pasupuleti M, Walse B, Nordahl EA, Morgelin M, Malmsten M, Schmidtchen A. (2007) Preservation of antimicrobial properties of complement peptide C3a, from invertebrates to humans. *J Biol Chem.* 282: 2520-8.
76. Nordahl EA, Rydengard V, Nyberg P, Nitsche DP, Morgelin M, Malmsten M, Bjorck L, Schmidtchen A. (2004) Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 16879-84.
77. Parej K, Dobo J, Zavodszky P, Gal P. (2013) The control of the complement lectin pathway activation revisited: both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while alpha2-macroglobulin is not. *Mol Immunol.* 54: 415-22.
78. Zipfel PF, Skerka C. (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 9: 729-40.
79. Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. (1978) Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J Exp Med.* 148: 1044-51.
80. Davis AE, 3rd, Harrison RA. (1982) Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry.* 21: 5745-9.
81. Roversi P, Johnson S, Caesar JJ, McLean F, Leath KJ, Tsiftoglou SA, Morgan BP, Harris CL, Sim RB, Lea SM. (2011) Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 12839-44.
82. Kim DD, Song WC. (2006) Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol.* 118: 127-36.
83. Wiesmann C, Katschke KJ, Yin J, Helmy KY, Steffek M, Fairbrother WJ, McCallum SA, Embuscado L, DeForge L, Hass PE, van Lookeren Campagne M. (2006) Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation. *Nature.* 444: 217-20.

84. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 11: 785-97.
85. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, Fukuda A, Imai M, Okada H. (2002) CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol.* 539: 537-45.
86. McDonald JF, Nelsestuen GL. (1997) Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: characterization of its impact on C9 polymerization. *Biochemistry.* 36: 7464-73.
87. Milis L, Morris CA, Sheehan MC, Charlesworth JA, Pussell BA. (1993) Vitronectin-mediated inhibition of complement: evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. *Clin Exp Immunol.* 92: 114-9.
88. Wat JM, Foley JH, Krisinger MJ, Ocariza LM, Lei V, Wasney GA, Lameignere E, Strynadka NC, Smith SA, Morrissey JH, Conway EM. (2014) Polyphosphate suppresses complement via the terminal pathway. *Blood.* 123: 768-76.
89. Zhang Q, Li Y, Tang CM. (2010) The role of the exopolyphosphatase PPX in avoidance by *Neisseria meningitidis* of complement-mediated killing. *J Biol Chem.* 285: 34259-68.
90. Schneider MC, Exley RM, Chan H, Feavers I, Kang YH, Sim RB, Tang CM. (2006) Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol.* 176: 7566-75.
91. van Geffen M, Cugno M, Lap P, Loof A, Cicardi M, van Heerde W. (2012) Alterations of coagulation and fibrinolysis in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Immunol.* 167: 472-8.
92. Zotter Z, Nagy Z, Patocs A, Csuka D, Veszeli N, Kohalmi KV, Farkas H. (2017) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 12: 5.
93. Kelemen Z, Moldovan D, Mihaly E, Visy B, Szeplaki G, Csuka D, Fust G, Farkas H, Varga L. (2010) Baseline level of functional C1-inhibitor correlates with disease severity scores in hereditary angioedema. *Clin Immunol.* 134: 354-8.
94. Csuka D, Fust G, Farkas H, Varga L. (2011) Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clin Immunol.* 139: 85-93.

95. Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M. (1993) Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *J Lab Clin Med.* 121: 38-43.
96. Nielsen EW, Johansen HT, Hogasen K, Wuillemin W, Hack CE, Mollnes TE. (1996) Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during attacks of hereditary angioedema. *Scand J Immunol.* 44: 185-92.
97. Csuka D, Munthe-Fog L, Hein E, Zotter Z, Prohaszka Z, Farkas H, Varga L, Garred P. (2014) Activation of the ficolin-lectin pathway during attacks of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 134: 1388-93 e1.
98. Colman RW, Schmaier AH. (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood.* 90: 3819-43.
99. Stavrou E, Schmaier AH. (2010) Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res.* 125: 210-5.
100. Bjorkqvist J, Nickel KF, Stavrou E, Renne T. (2014) In vivo activation and functions of the protease factor XII. *Thromb Haemost.* 112: 868-75.
101. Long AT, Kenne E, Jung R, Fuchs TA, Renne T. (2016) Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost.* 14: 427-37.
102. Weidmann H, Heikaus L, Long AT, Naudin C, Schluter H, Renne T. (2017) The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. *Biochim Biophys Acta.* 1864: 2118-27.
103. DeLa Cadena RA, Wyshock EG, Kunapuli SP, Schultze RL, Miller M, Walz DA, Colman RW. (1994) Platelet thrombospondin interactions with human high and low molecular weight kininogens. *Thromb Haemost.* 72: 125-31.
104. Bjorkqvist J, Jamsa A, Renne T. (2013) Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. *Thromb Haemost.* 110: 399-407.
105. Maas C, Oschatz C, Renne T. (2011) The plasma contact system 2.0. *Semin Thromb Hemost.* 37: 375-81.

106. Bernardo MM, Day DE, Halvorson HR, Olson ST, Shore JD. (1993) Surface-independent acceleration of factor XII activation by zinc ions. II. Direct binding and fluorescence studies. *J Biol Chem.* 268: 12477-83.
107. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. (2012) Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 209: 819-35.
108. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Gunther A, Engelmann B, Preissner KT. (2007) Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 6388-93.
109. Maas C, Govers-Riemslog JW, Bouma B, Schiks B, Hazenberg BP, Lokhorst HM, Hammarstrom P, ten Cate H, de Groot PG, Bouma BN, Gebbink MF. (2008) Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest.* 118: 3208-18.
110. Zamolodchikov D, Chen ZL, Conti BA, Renne T, Strickland S. (2015) Activation of the factor XII-driven contact system in Alzheimer's disease patient and mouse model plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112: 4068-73.
111. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 903-8.
112. Renne T, Gailani D, Meijers JC, Muller-Esterl W. (2002) Characterization of the H-kininogen-binding site on factor XI: a comparison of factor XI and plasma prekallikrein. *J Biol Chem.* 277: 4892-9.
113. Renne T, Dedio J, Meijers JC, Chung D, Muller-Esterl W. (1999) Mapping of the discontinuous H-kininogen binding site of plasma prekallikrein. Evidence for a critical role of apple domain-2. *J Biol Chem.* 274: 25777-84.

114. Cochrane CG, Revak SD, Wuepper KD. (1973) Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med.* 138: 1564-83.
115. Schmaier AH, McCrae KR. (2007) The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost.* 5: 2323-9.
116. Schmaier AH, Kuo A, Lundberg D, Murray S, Cines DB. (1988) The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem.* 263: 16327-33.
117. van Iwaarden F, de Groot PG, Bouma BN. (1988) The binding of high molecular weight kininogen to cultured human endothelial cells. *J Biol Chem.* 263: 4698-703.
118. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 524-6.
119. Hong SL. (1980) Effect of bradykinin and thrombin on prostacyclin synthesis in endothelial cells from calf and pig aorta and human umbilical cord vein. *Thromb Res.* 18: 787-95.
120. Smith D, Gilbert M, Owen WG. (1985) Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents. *Blood.* 66: 835-9.
121. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. (2002) Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator. *J Biol Chem.* 277: 17962-9.
122. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. (2004) Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein. *Blood.* 103: 4554-61.
123. Joseph K, Tholanikunnel BG, Bygum A, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. (2013) Factor XII-independent activation of the bradykinin-forming cascade: Implications for the pathogenesis of hereditary angioedema types I and II. *J Allergy Clin Immunol.* 132: 470-5.
124. Margolius HS. (1998) Tissue kallikreins structure, regulation, and participation in mammalian physiology and disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 16: 337-49.
125. Kaplan AP, Ghebrehiwet B. (2010) The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol.* 47: 2161-9.
126. Joseph K, Tuscano TB, Kaplan AP. (2008) Studies of the mechanisms of bradykinin generation in hereditary angioedema plasma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 101: 279-86.

127. Joseph K, Tholanikunnel TE, Kaplan AP. (2010) Treatment of episodes of hereditary angioedema with C1 inhibitor: serial assessment of observed abnormalities of the plasma bradykinin-forming pathway and fibrinolysis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 104: 50-4.
128. Cugno M, Cicardi M, Coppola R, Agostoni A. (1996) Activation of factor XII and cleavage of high molecular weight kininogen during acute attacks in hereditary and acquired C1-inhibitor deficiencies. *Immunopharmacology.* 33: 361-4.
129. Suffritti C, Zanichelli A, Maggioni L, Bonanni E, Cugno M, Cicardi M. (2014) High-molecular-weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin-mediated angioedema due to hereditary C1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Allergy.* 44: 1503-14.
130. Konings J, Cugno M, Suffritti C, Ten Cate H, Cicardi M, Govers-Riemslog JW. (2013) Ongoing contact activation in patients with hereditary angioedema. *PLoS One.* 8: e74043.
131. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. (1998) Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet.* 351: 1693-7.
132. Shoemaker LR, Schurman SJ, Donaldson VH, Davis AE, 3rd. (1994) Hereditary angioneurotic oedema: characterization of plasma kinin and vascular permeability-enhancing activities. *Clin Exp Immunol.* 95: 22-8.
133. Cugno M, Nussberger J, Cicardi M, Agostoni A. (2003) Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol.* 3: 311-7.
134. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. (1987) Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest.* 79: 124-30.
135. van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, Hack CE, Sauerwein HP, Rosenberg RD, ten Cate JW. (1990) Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med.* 322: 1622-7.
136. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. (1984) Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med.* 160: 618-23.

137. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati MB, Semeraro N. (1983) Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest.* 71: 1893-6.
138. Rivers RP, Cattermole HE, Wright I. (1992) The expression of surface tissue factor apoprotein by blood monocytes in the course of infections in early infancy. *Pediatr Res.* 31: 567-73.
139. Nemerson Y, Bach R. (1982) Tissue factor revisited. *Prog Hemost Thromb.* 6: 237-61.
140. Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. (1979) The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem.* 254: 10952-62.
141. Walker CP, Royston D. (2002) Thrombin generation and its inhibition: a review of the scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies. *Br J Anaesth.* 88: 848-63.
142. Monroe DM, Mackman N, Hoffman M. (2010) Wound healing in hemophilia B mice and low tissue factor mice. *Thromb Res.* 125 Suppl 1: S74-7.
143. Mackman N. (2004) Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 1015-22.
144. Ratnoff OD, Davie EW, Mallett DL. (1961) Studies on the action of Hageman factor: evidence that activated Hageman factor in turn activates plasma thromboplastin antecedent. *J Clin Invest.* 40: 803-19.
145. Smith SB, Gailani D. (2008) Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa. *Expert Rev Hematol.* 1: 87-98.
146. Hougie C, Denson KW, Biggs R. (1967) A study of the reaction product of factor 8 and factor IX by gel filtration. *Thromb Diath Haemorrh.* 18: 211-22.
147. Hemker HC, Kahn MJ. (1967) Reaction sequence of blood coagulation. *Nature.* 215: 1201-2.
148. Caccia S, Castelli R, Maiocchi D, Bergamaschini L, Cugno M. (2011) Interaction of C1 inhibitor with thrombin on the endothelial surface. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 22: 571-5.
149. Brass EP, Forman WB, Edwards RV, Lindan O. (1976) Fibrin formation: the role of the fibrinogen-fibrin monomer complex. *Thromb Haemost.* 36: 37-48.

150. Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. (2012) Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res.* 129: 382-7.
151. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 129: 307-21.
152. Chapin JC, Hajjar KA. (2015) Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 29: 17-24.
153. Minai K, Matsumoto T, Horie H, Ohira N, Takashima H, Yokohama H, Kinoshita M. (2001) Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol.* 37: 1565-70.
154. Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A. (1997) Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood.* 89: 3213-8.
155. Cugno M, Zanichelli A, Bellatorre AG, Griffini S, Cicardi M. (2009) Plasma biomarkers of acute attacks in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergy.* 64: 254-7.
156. Reshef A, Zanichelli A, Longhurst H, Relan A, Hack CE. (2015) Elevated D-dimers in attacks of hereditary angioedema are not associated with increased thrombotic risk. *Allergy.* 70: 506-13.
157. Brown NJ, Gainer JV, Stein CM, Vaughan DE. (1999) Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension.* 33: 1431-5.
158. Goldsmith GH, Jr., Saito H, Ratnoff OS. (1978) The activation of plasminogen by Hageman factor (Factor XII) and Hageman factor fragments. *J Clin Invest.* 62: 54-60.
159. Ghebrehiwet B, Randazzo BP, Dunn JT, Silverberg M, Kaplan AP. (1983) Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Clin Invest.* 71: 1450-6.
160. Kleniewski J, Donaldson VH. (1987) Comparison of human high molecular weight kininogen digestion by plasma kallikrein and by plasmin. A revised method of purification of high molecular weight kininogen. *J Lab Clin Med.* 109: 469-79.
161. Hiemstra PS, Daha MR, Bouma BN. (1985) Activation of factor B of the complement system by kallikrein and its light chain. *Thromb Res.* 38: 491-503.

162. Polley MJ, Nachman RL. (1979) Human complement in thrombin-mediated platelet function: uptake of the C5b-9 complex. *J Exp Med.* 150: 633-45.
163. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA. (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 12: 682-7.
164. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Bruckner UB, Nilsson B, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. (2010) Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol.* 185: 5628-36.
165. Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. (1997) C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost.* 77: 394-8.
166. Howes JM, Richardson VR, Smith KA, Schroeder V, Somani R, Shore A, Hess K, Ajjan R, Pease RJ, Keen JN, Standeven KF, Carter AM. (2012) Complement C3 is a novel plasma clot component with anti-fibrinolytic properties. *Diab Vasc Dis Res.* 9: 216-25.
167. Jenny L, Dobo J, Gal P, Schroeder V. (2015) MASP-1 of the complement system promotes clotting via prothrombin activation. *Mol Immunol.* 65: 398-405.
168. Pagowska-Klimek I, Cedzynski M. (2014) Mannan-binding lectin in cardiovascular disease. *Biomed Res Int.* 2014: 616817.
169. Dobo J, Major B, Kekesi KA, Szabo I, Megyeri M, Hajela K, Juhasz G, Zavodszky P, Gal P. (2011) Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PLoS One.* 6: e20036.
170. Kaufmann SH. (2008) Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol.* 9: 705-12.
171. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. (1994) Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood.* 84: 1737-46.

172. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 22: 285-94.
173. Nauseef WM, Borregaard N. (2014) Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 15: 602-11.
174. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 80: 2012-20.
175. Lee A, Whyte MK, Haslett C. (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 54: 283-8.
176. Kolaczowska E, Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 13: 159-75.
177. Schramm R, Thorlacius H. (2004) Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflamm Res*. 53: 644-52.
178. Timar CI, Lorincz AM, Ligeti E. (2013) Changing world of neutrophils. *Pflugers Arch*. 465: 1521-33.
179. Segal AW. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 23: 197-223.
180. Le Cabec V, Cowland JB, Calafat J, Borregaard N. (1996) Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 6454-7.
181. Borregaard N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 33: 657-70.
182. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*. 28: 340-5.
183. Kawabata K, Hagio T, Matsuoka S. (2002) The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur J Pharmacol*. 451: 1-10.
184. Havemann K, Gramse M. (1984) Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes. *Adv Exp Med Biol*. 167: 1-20.

185. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. (1998) Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol.* 275: H385-92.
186. Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, Cantin A, McCulloch CA, Shannon PT, Downey GP. (2001) Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281: G705-17.
187. Abe H, Okajima K, Okabe H, Takatsuki K, Binder BR. (1994) Granulocyte proteases and hydrogen peroxide synergistically inactivate thrombomodulin of endothelial cells in vitro. *J Lab Clin Med.* 123: 874-81.
188. Okada Y, Watanabe S, Nakanishi I, Kishi J, Hayakawa T, Watorek W, Travis J, Nagase H. (1988) Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Lett.* 229: 157-60.
189. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, Dikshit M. (2012) Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One.* 7: e48111.
190. Owen CA, Campbell EJ. (1999) The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol.* 65: 137-50.
191. Klebanoff SJ. (1999) Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 111: 383-9.
192. Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol.* 154: 4157-65.
193. Joiner KA, Ganz T, Albert J, Rotrosen D. (1989) The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J Cell Biol.* 109: 2771-82.
194. Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D, Quinn MT, Parkos CA, Livesey S, Linner J. (1990) Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J Clin Invest.* 85: 821-35.
195. Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, Barbosa E, Callejo S, Gajate C, Fabra A. (1997) Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem J.* 327 (Pt 3): 917-23.

196. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. (1993) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest.* 92: 1467-76.
197. Sengelov H, Kjeldsen L, Kroeze W, Berger M, Borregaard N. (1994) Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J Immunol.* 153: 804-10.
198. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R. (1995) Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol.* 155: 2085-95.
199. Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, Diamond MS, Springer TA, Anderson HC, Kishimoto TK, Bainton DF. (1994) Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 56: 80-7.
200. Brinkmann V, Zychlinsky A. (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 198: 773-83.
201. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176: 231-41.
202. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. (2014) A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 8: 883-96.
203. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. (2015) The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules.* 5: 702-23.
204. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191: 677-91.
205. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30: 513-21.

206. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303: 1532-5.
207. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Fremaux I, Doni A, Moalli F, Garlanda C, Romani L, Gascan H, Bellocchio S, Bozza S, Cassatella MA, Jeannin P, Mantovani A. (2007) The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med*. 204: 793-804.
208. Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. (2008) Structural recognition and functional activation of Fc γ R by innate pentraxins. *Nature*. 456: 989-92.
209. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, Romani L, Mantovani A, Garlanda C. (2010) Role of complement and Fc γ receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood*. 116: 5170-80.
210. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, Cuccovillo I, Bastone A, Gobbi M, Valentino S, Doni A, Garlanda C, Danese S, Salvatori G, Sassano M, Evangelista V, Rossi B, Zenaro E, Constantin G, Laudanna C, Bottazzi B, Mantovani A. (2010) Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol*. 11: 328-34.
211. Koruth JS, Eckardt AJ, Levey JM. (2005) Hereditary angioedema involving the colon: endoscopic appearance and review of GI manifestations. *Gastrointest Endosc*. 61: 907-11.
212. Kodama J, Uchida K, Yoshimura S, Katayama Y, Kushiro H, Yutani C, Funahashi S, Takamiya O, Matsumoto Y, Ando Y, et al. (1984) Studies of four Japanese families with hereditary angioneurotic edema: simultaneous activation of plasma protease systems and exogenous triggering stimuli. *Blut*. 49: 405-18.
213. Goti F, Melcher GA, Spath P, Wuthrich B. (1998) [Hereditary angioedema. A rare cause of acute abdominal pain with ascites]. *Dtsch Med Wochenschr*. 123: 1166-71.
214. Cohen N, Sharon A, Golik A, Zaidenstein R, Modai D. (1993) Hereditary angioneurotic edema with severe hypovolemic shock. *J Clin Gastroenterol*. 16: 237-9.

215. Zotter Z, Csuka D, Varga L, Füst G, Farkas H. (2010) WBC elevation and the resulting neutrophilia characterize hereditary angioedema attacks. *Angioedema*. 1.
216. Wachtfogel YT, Kucich U, James HL, Scott CF, Schapira M, Zimmerman M, Cohen AB, Colman RW. (1983) Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation. *J Clin Invest*. 72: 1672-7.
217. Losse J, Zipfel PF, Jozsi M. (2010) Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity. *J Immunol*. 184: 912-21.
218. de Agostini A, Patston PA, Marottoli V, Carrel S, Harpel PC, Schapira M. (1988) A common neoepitope is created when the reactive center of C1-inhibitor is cleaved by plasma kallikrein, activated factor XII fragment, C1 esterase, or neutrophil elastase. *J Clin Invest*. 82: 700-5.
219. Oehmcke S, Morgelin M, Herwald H. (2009) Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun*. 1: 225-30.
220. Henderson LM, Figueroa CD, Muller-Esterl W, Bhoola KD. (1994) Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood*. 84: 474-82.
221. Kohler PF, Muller-Eberhard HJ. (1967) Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of healthy adults. *J Immunol*. 99: 1211-6.
222. Reber G, Boehlen F. (2008) [Seventy years later: prothrombin time revisited]. *Rev Med Suisse*. 4: 350-3.
223. Clauss A. (1957) [Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen]. *Acta Haematol*. 17: 237-46.
224. Farkas H, Veszeli N, Kajdacs E, Cervenak L, Varga L. (2016) "Nuts and Bolts" of Laboratory Evaluation of Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol*. 51: 140-51.
225. Bork K, Witzke G. (2016) Shortened Activated Partial Thromboplastin Time May Help in Diagnosing Hereditary and Acquired Angioedema. *Int Arch Allergy Immunol*. 170: 101-7.
226. Bates SM. (2012) D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost*. 38: 673-82.

227. Angleton P, Chandler WL, Schmer G. (1989) Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation*. 79: 101-6.
228. Scheer FA, Shea SA. (2014) Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle. *Blood*. 123: 590-3.
229. Salemi M, Mandala V, Muggeo V, Misiano G, Milano S, Colonna-Romano G, Arcolego F, Cillari E. (2016) Growth factors and IL-17 in hereditary angioedema. *Clin Exp Med*. 16: 213-8.
230. Dale DC, Liles WC, Llewellyn C, Price TH. (1998) Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil kinetics and function in normal human volunteers. *Am J Hematol*. 57: 7-15.
231. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 117: 953-9.
232. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 55: 97-179.
233. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. (2003) The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res*. 34: 597-627.
234. Lopez-Lera A, Cabo FS, Garrido S, Dopazo A, Lopez-Trascasa M. (2013) Disease-modifying factors in hereditary angioedema: an RNA expression-based screening. *Orphanet J Rare Dis*. 8: 77.
235. Demirturk M, Gelincik A, Cinar S, Kilercik M, Onay-Ucar E, Colakoglu B, Arda N, Buyukozturk S, Deniz G. (2014) Increased eNOS levels in hereditary angioedema. *Int Immunopharmacol*. 20: 264-8.
236. Arcolego F, Salemi M, La Porta A, Selvaggio V, Mandala V, Muggeo V, Misiano G, Milano S, Romano GC, Cillari E. (2014) Upregulation of cytokines and IL-17 in patients with hereditary angioedema. *Clin Chem Lab Med*. 52: e91-3.
237. Riches P, Gooding R, Millar BC, Rowbottom AW. (1992) Influence of collection and separation of blood samples on plasma IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations. *J Immunol Methods*. 153: 125-31.

238. Friebe A, Volk HD. (2008) Stability of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, and interleukin 8 in blood samples of patients with systemic immune activation. *Arch Pathol Lab Med.* 132: 1802-6.
239. Cassatella MA. (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 16: 21-6.
240. Hofman ZL, Relan A, Hack CE. (2014) C-reactive protein levels in hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol.* 177: 280-6.
241. Walport MJ. (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 344: 1058-66.
242. Ehrenguber MU, Geiser T, Deranleau DA. (1994) Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett.* 346: 181-4.
243. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, Videm V, Lappegard KT, Kohl J, Lambris JD. (2002) Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood.* 100: 1869-77.
244. Kusuma A, Relan A, Knulst AC, Moldovan D, Zuraw B, Cicardi M, Levy RJ, Nuijens JH, Hack CE. (2012) Clinical impact of peripheral attacks in hereditary angioedema patients. *Am J Med.* 125: 937 e17-24.
245. Farrell C, Hayes S, Relan A, van Amersfoort ES, Pijpstra R, Hack CE. (2013) Population pharmacokinetics of recombinant human C1 inhibitor in patients with hereditary angioedema. *Br J Clin Pharmacol.* 76: 897-907.
246. van Doorn MB, Burggraaf J, van Dam T, Eerenberg A, Levi M, Hack CE, Schoemaker RC, Cohen AF, Nuijens J. (2005) A phase I study of recombinant human C1 inhibitor in asymptomatic patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 116: 876-83.
247. Spath PJ, Wuthrich B, Butler R. (1984) Quantification of C1-inhibitor functional activities by immunodiffusion assay in plasma of patients with hereditary angioedema--evidence of a functionally critical level of C1-inhibitor concentration. *Complement.* 1: 147-59.
248. Donaldson VH, Rosen FS. (1964) Action of Complement in Hereditary Angioneurotic Edema: The Role of C'1-Esterase. *J Clin Invest.* 43: 2204-13.

249. Bergamaschini L, Miedico A, Cicardi M, Coppola R, Faioni EN, Agostoni A. (1999) Consumption of C4b-binding protein (C4BP) during in vivo activation of the classical complement pathway. *Clin Exp Immunol.* 116: 220-4.
250. Cugno M, Nuijens J, Hack E, Eerenberg A, Frangi D, Agostoni A, Cicardi M. (1990) Plasma levels of C1- inhibitor complexes and cleaved C1- inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest.* 85: 1215-20.
251. Wang H, Ricklin D, Lambris JD. (2017) Complement-activation fragment C4a mediates effector functions by binding as untethered agonist to protease-activated receptors 1 and 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: 10948-53.
252. Veszeli N, Csuka D, Zotter Z, Imreh E, Jozsi M, Benedek S, Varga L, Farkas H. (2015) Neutrophil activation during attacks in patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 10: 156.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. Csuka D*, Veszeli N*, Imreh É, Zotter Z, Skopál J, Prohászka Z, Varga L, Farkas H. Comprehensive study into the activation of the plasma enzyme systems during attacks of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. (2015)
Orphanet J Rare Dis. 2015 Oct 9;10:132. IF:3,290
*Megosztott első-szerzősség

2. Veszeli N, Csuka D, Zotter Z, Imreh É, Józsi M, Benedek S, Varga L, Farkas H. Neutrophil activation during attacks in patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. (2015)
Orphanet J Rare Dis. 2015 Dec 10;10:156. IF:3,290

3. Veszeli N, Kőhalmi KV, Kajdácsi E, Gulyás D, Temesszentandrás G, Cervenak L, Farkas H, Varga L. Complete kinetic follow-up of symptoms and complement parameters during a hereditary angioedema attack. (2017)
Allergy. DOI: 10.1111/all.13327 IF:7,361*
**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el*

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **12,29**.

11.2. A disszertációtól független publikációk

1. Veszeli N, Füst G, Csuka D, Trauninger A, Bors L, Rozsa C, Nagy Z, Jobbágy Z, Eizler K, Prohászka Z, Varga L, Illes Z. A systematic analysis of the complement pathways in patients with neuromyelitis optica indicates alteration but no activation during remission. (2014)
Mol Immunol. 2014 Feb;57(2):200-9. IF:2,973

2. Farkas H, Csuka D, Veszeli N, Zotter Z, Szabó E, Varga L. Home treatment of attacks with conestat alfa in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. (2014)
Allergy Asthma Proc. 2014 May-Jun;35(3):255-9. IF:3,061

3. Zotter Z, Veszeli N, Csuka D, Varga L, Farkas H. Frequency of the virilising effects of attenuated androgens reported by women with hereditary angioedema. (2014)
Orphanet J Rare Dis. 2014 Dec 5;9:205. IF:3,358

4. Farkas H, Veszeli N, Csuka D, Temesszentandrás G, Tóth F, Kőszegi L, Varga L. Management of pregnancies in a hereditary angioedema patient after treatment with attenuated androgens since childhood. (2015)
J Obstet Gynaecol. 2015 Jan;35(1):89-90. IF:0,611

5. Farkas H, Kőhalmi KV, Veszeli N, Zotter Z, Várnai K, Varga L. Risk of thromboembolism in patients with hereditary angioedema treated with plasma-derived C1-inhibitor. (2016)
Allergy Asthma Proc. 2016 Mar-Apr;37(2):164-70. IF:2,614

6. Kőhalmi KV, Veszeli N, Zotter Z, Csuka D, Benedek S, Imreh É, Varga L, Farkas H. The effect of long-term danazol treatment on haematological parameters in hereditary angioedema. (2016)
Orphanet J Rare Dis. 2016 Feb 25;11:18. IF:3,478

7. Farkas H, Kőhalmi KV, Veszeli N, Tóth F, Varga L. First report of icatibant treatment in a pregnant patient with hereditary angioedema. (2016)
J Obstet Gynaecol Res. 2016 Aug;42(8):1026-8. IF:1,099

8. Farkas H, Veszeli N, Kajdácsi E, Cervenak L, Varga L. "Nuts and Bolts" of Laboratory Evaluation of Angioedema. (2016)
Clin Rev Allergy Immunol. 2016 Oct;51(2):140-51.
A folyóirat impakt faktora a megjelenés évében 5,263, mely a közlemény típusa (Folyóiratcikk/Összefoglaló cikk/Tudományos) miatt nem kerül feltüntetésre

9. Veszeli Nóra, Kőhalmi Kinga Viktória. A hereditár angioödéma gyermekkori sajátosságai, diagnosztikája és korszerű kezelése.
Gyermekegyorvos továbbképzés. 2016. XV. évfolyam 2.szám IF:-

10. Czaller I, Csuka D, Zotter Z, Veszeli N, Takács E, Imreh É, Varga L, Farkas H. Thyroid hormones and complement parameters in hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency. (2016)
Ann Allergy Asthma Immunol. 2016 Aug;117(2):175-9. IF:3,728
11. Zotter Z, Veszeli N, Kóhalmi KV, Varga L, Imreh É, Kovács G, Nallbani M, Farkas H. Bacteriuria increases the risk of edematous attacks in hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency. (2016)
Allergy. 2016 Dec;71(12):1791-1793. IF:7,361
12. Zotter Z, Nagy Z, Patócs A, Csuka D, Veszeli N, Kóhalmi KV, Farkas H. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency. (2017)
Orphanet J Rare Dis. 2017 Jan 10;12(1):5. IF:3,478*
**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el*
13. Engel-Yeger B, Farkas H, Kivity S, Veszeli N, Kóhalmi KV, Kessel A. Health-related quality of life among children with hereditary angioedema. (2017)
Pediatr Allergy Immunol. 2017 Jun;28(4):370-376. IF:3,775*
**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el*
14. Csuka D, Veszeli N, Varga L, Prohászka Z, Farkas H. The role of the complement system in hereditary angioedema. (2017)
Mol Immunol. 2017 Sep;89:59-68.
A folyóirat impakt faktora a megjelenés évében 3,236, mely a közlemény típusa (Folyóiratcikk/Összefoglaló cikk/Tudományos) miatt nem kerül feltüntetésre
15. Kessel A, Farkas H, Kivity S, Veszeli N, Kóhalmi KV, Engel-Yeger B. The relationship between anxiety and quality of life in children with hereditary angioedema. (2017)
Pediatr Allergy Immunol. 2017 Jul 10. IF:3,775*

**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el*

16. Kőhalmi KV, Veszeli N, Luczay A, Varga L, Farkas H. A danazolkezelés hatása C1-inhibitor-hiány okozta hereditár angiooedémás gyermekek növekedésére. (2017) Orv Hetil. 2017 Aug;158(32):1269-1276. IF:0,349*

**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el*

17. Hofman ZLM, de Maat S, Suffritti C, Zanichelli A, van Doorn C, Sebastian SAE, Veszeli N, Csuka D, Renné T, Pasterkamp G, Cicardi M, Farkas H, Hack CE, Maas C. Cleaved kininogen as a biomarker for bradykinin release in hereditary angioedema. (2017)

J Allergy Clin Immunol. 2017 Aug 4. pii: S0091-6749(17)31268-X. IF:13,081*

**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el*

A disszertáció témájától független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor:
52,74.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetem és hálám Témavezetőimnek, Prof. Dr. Farkas Henriettenek és Dr. Varga Liliannak. Köszönöm, hogy lehetőséget kaptam a kutatási projekteken való részvételre, folyamatos szakmai és emberi támogatásukat, sok iránymutató tanácsukat, valamint a rengeteg lehetőséget, hogy részt vehettem hazai és nemzetközi konferenciákon. Megismertették velem a kutatói munka szépségeit, rámutattak a kutatói munka fontosságára és segítettek a kutatói gondolkodás elsajátításában.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Prohászka Zoltánnak a lehetőséget, hogy PhD munkámat a Kutatólaboratóriumban végezhettem.

Hálával tartozom Karádi István és Masszi Tamás Professzor Uraknak, hogy munkámat a Semmelweis Egyetem III. Számú Belgyógyászati Klinikán végezhettem.

Köszönöm együttműködésüket kollaborációs partnereinknek, Prof. Dr. Gál Péternek, Dr. Dobó Józsefnek, Dr. Várnai Katalinnak, Dr. Temesszentandrásí Györgynek, Dr. Imreh Évának, Dr. Walentin Szilviának, Dr. Skopál Juditnak, Dr. Józsi Mihálynak és az Immunogenes Kft.-nek.

Külön köszönettel tartozom Dr. Csuka Dorottyának, Dr. Cervenak Lászlónak, Dr. Kőhalmi Kinga Viktóriának és Dr. Kajdácsi Erikának sok hasznos tanácsaikért, építő jellegű kritikájukért.

Köszönöm Dr. Szilágyi Ágnes, házi opponensemnek a dolgozatom alapos átnézését és értékelését.

Hálásan köszönöm Dóczy Andrásné Mártinak, Szendrei Zsuzsinak és Kertész Lászlóné Erának a laborban nyújtott türelmükért és segítőkészségükért.

Szeretném megköszönni Holeczky Rudolfné Magdinak kedvességét és segítségét a hivatalos ügyek lebonyolításában.

Továbbá köszönöm a labor többi jelenlegi és volt munkatársának a jó hangulatban eltöltött munkanapokat, kedvességüket és szakmai segítségüket, így: Bali Juditnak, Mező Blankának, Dr. Garam Nórának, Dr. Trojnar Eszternek, Szabó Edinának, Takács Beának, Nagy-Debreczeni Mártinak, Dr. Makó Verának, Dr. Sinkovits Györgynek, Dr. Mikes Bálintnak, Schwaner Endrének, Koncz Annának, Gulyás Dominiknak, Németh Zsuzsinak, Dr. Czaller Ibolyának és Dr. Zotter Zsuzsannának.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm türelmüket, kitartó támogatásukat, mindig lelkesítő, ösztönző szavaikat szüleimnek és testvéremnek, valamint férjemnek és családjának.