A szerzett trombotikus trombocitopéniás purpura patogenezisében szerepet játszó genetikai és immunológiai tényezők vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Sinkovits György

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:
Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:
Dr. Kálmánné Dr. Istenes Ildikó, PhD, egyetemi tanársegéd
Dr. Sándor Noémi, PhD, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Arató András, az MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Kádár János, az orvostudomány kandidátusa, főorvos
Dr. Müller Judit, PhD, egyetemi docens

Budapest
2019

1. BEVEZETÉS

1.1. A trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP)

A trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) a trombotikus mikroangiopátiák (TMA) csoportjába tartozó kórkép, azaz a betegség lényegét a kiserek (arteriolák és kapillárisok) vérrögképződéssel járó elváltozása képezi. A trombocita-trombusok képződése szöveti ischaemiát, illetve a vérlemezkék felhasználódása révén trombocitopéniát eredményez, a sérült, betrombotizált kisereken áthaladó vörösvértestek károsodása pedig ún. fragmentociták keletkezéséhez és hemolitikus anémia kialakulásához vezet.

A TTP esetében a mikroangiopátia bármely szervet érintheti, ezért az ischaemia okozta tünetek megjelenése változatos. Neurológiai tünetek az esetek akár 80%-ában előfordulhatnak, súlyosságuk az enyhe fejfájástól és zavartságtól a fokális elváltozásokra utaló tüneteken (hemiparézis, afázia, látászavar) és epilepsziás görcsökön át a kómáig terjed. A gasztrointesztinális, kardiális, illetve vesekárosodásra utaló tünetek szintén gyakoriak, de a dialízist igénylő súlyos veseelégtelenség viszonylag ritka.

A TTP epizodikus, shubokban zajló betegség. Az epizód sikeres kezelését követően, a kiváltó faktorok megszűnte után a betegek tartósan remisszióban maradhatnak. A remisszió elérését követően a betegek közel harmada esik át újabb akut epizódokon, ezeket relapszusnak nevezzük.

A TTP esetében a TMA hátterében az ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13) enzim deficienciája áll. Az ADAMTS13 funkciója a von Willebrand-faktor (VWF) ultranagy formájának (ULVWF) elhasítása kisebb, a vérplazmában normál körülmények között megtalálható, a véralvadás folyamatában szerepet játszó oligomer formákra. Mivel az ULVWF a kiserekben normális körülmények között is előforduló nyíróerők mellett is képes vérlemezkék megkötésére, ezért a hasítás elmaradása miatti tartós jelenlétük az endotélsejtek felszínén, illetve a keringésben a vérlemezkék kitapadását és aggregációját, végső soron trombotikus mikroangiopátia kialakulását eredményezheti.

Az ADAMTS13-deficiencia hátterében a TTP ritkább, örökletes formájában az *ADAMTS13* gén mindkét allélját érintő mutációk, a TTP-s esetek hozzávetőlegesen 95%-át kitevő szerzett formában pedig az ADAMTS13 enzim ellen termelődő autoantitestek állnak.

1.2. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz szerzett TTP-ben

Szerzett TTP-ben az ADAMTS13 elleni autoantitestek jelentős része az enzim aktivitását közvetlenül blokkolni képes gátló autoantitest (inhibitor), de ismertek nem gátló autoantitestek is, amelyek feltehetően az ADAMTS13 keringésből történő eltávolításának fokozásán keresztül járulhatnak hozzá annak deficienciájához.

A gátló autoantitestek döntő többsége az enzim spacer doménjének egy meghatározott epitópja ellen irányul, de a szerzett TTP-s betegek túlnyomó része több domén ellen (a spacer mellett elsősorban a C-terminális trombospondin-szerű és CUB doménok ellen) irányuló autoantitesteket is termel.

Bár a szerzett TTP-s betegek kisebb hányadában előfordulhatnak IgM vagy IgA osztályba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek is, túlnyomó részük az IgG osztályba tartozik. Az IgG osztályú autoantitestek elsősorban az IgG1 és IgG4 alosztályokba tartoznak.

Amíg az IgG1 alosztályba tartozó autoantitestek hatékonyan képesek kötődni a fehérvérsejtek Fc-receptoraihoz, illetve aktiválni a komplementrendszert, addig az IgG4 autoantitestek nem rendelkeznek e tulajdonságokkal, ráadásul funkcionális monovalenciájuknak köszönhetően immunkomplexek képződésére is kevésbé hajlamosak. A fenti különbségek befolyásolhatják az ADAMTS13 enzim keringésből történő eltávolításának hatékonyságát. Az ADAMTS13-ellenes autoantitestek alosztályeloszlásának és az ADAMTS13-gátló hatásának kapcsolatát azonban nagyobb beteganyagon eddig még nem vizsgálták.

Az ADAMTS13-ellenes autoantitestek kialakulásának pontos mechanizmusa egyelőre ismeretlen. Eddigi ismereteink alapján bizonyos genetikai tényezők befolyásolhatják az autoantitestek keletkezésének, és ezáltal a szerzett TTP kialakulásának rizikóját.

Korábbi asszociációs vizsgálatok eredményei alapján a HLA-DRB1*11 és az ezzel kapcsoltan öröklődő DQB1*0301 allélok aránya magasabb, a DRB1*04 és az ezzel kapcsolt DRB4 aránya pedig alacsonyabb a nyugat-európai szerzett TTP-s betegek körében az egészséges populációhoz viszonyítva. Mivel azonban az egyes DR és DQ allélok egymással, illetve az immunrendszer egyéb fehérjéit kódoló génekkel kapcsoltan, haplotípusok formájában öröklődnek, ezért egyes DR, illetve DQ allélok gyakoriságának változása nem feltétlenül az általuk kódolt fehérjének, hanem a HLA-DR-DQ haplotípus bármely elemének rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő hatására utalhat.

Mindazonáltal az asszociációs vizsgálatok során feltehetően rizikófokozó hatásúként azonosított HLA-DR11 molekulának a szerzett TTP patogenezisében játszott szerepét további molekuláris vizsgálatok eredményei alátámasztották.

További, potenciálisan rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő allélok azonosítása ezekhez hasonló funkcionális megerősítő vizsgálatok előtt nyithatja meg az utat.

Mivel egy asszociációs vizsgálat elsősorban a populációban gyakoribb haplotípusok vizsgálatára alkalmas, ezért eltérő populációk vizsgálata más-más haplotípusok esetleges rizikófokozó- vagy rizikócsökkentő szerepére deríthet fényt.

Ismert, hogy a szerzett TTP jóval gyakrabban érint nőket, mint férfiakat, a női nem rizikófokozó hatásának oka azonban egyelőre ismeretlen. Egyes autoimmun betegségekben azt figyelték meg, hogy a két nem tagjaiban eltérő HLA-DR, illetve DQ allélok hordozása korrelált a betegség kialakulásának kockázatával. Az egyes HLA-DR-DQ-haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulására gyakorolt hatását nemek szerinti bontásban még nem vizsgálták.

A *PTPN22* (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) gén egy, a limfociták jelátvitelét reguláló fehérjét (Lyp) kódol. A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmusa számos autoimmun betegség kialakulására hajlamosít. Egy korábbi vizsgálat során nem találtak összefüggést a fenti polimorfizmus hordozása és a szerzett TTP kialakulásának kockázata között. Mivel azonban a polimorfizmus gyakorisága nagy regionális különbségeket mutat, más, a mutációt nagyobb arányban hordozó populációk vizsgálata eddig rejtett asszociációkra deríthet fényt. Továbbá állatkísérletek eredményei alapján

feltételezhető, hogy a genetikai háttér (pl. HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása) befolyásolhatja a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus hatását.

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek keletkezése mellett szintén keveset tudunk az autoantitest-válasz időbeli változásairól. Pedig a relapszusok és azok kezelése során – illetve az antigén tartós jelenléte miatt akár remisszió alatt is – az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz bizonyos változásokon mehet keresztül, amely érintheti az autoantitestek mennyiségét, alosztályeloszlását, affinitását és – ezeken keresztül – gátló hatásuk erősségét is.

A fentieken túl megválaszolandó kérdés az is, hogy a betegségre hajlamosító genetikai faktorok hordozása az autoantitestek kialakulásának esélyén kívül vajon az autoantitest-válasz bizonyos mennyiségi vagy minőségi jellemzőire is hatással van-e.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A szerzett TTP kialakulásának kockázatát befolyásoló genetikai tényezők vizsgálata

Első vizsgálatunkban azt a célt tűztük ki, hogy:

1. Megvizsgáljuk az egyes HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára gyakorolt hatását.

   Ennek érdekében meghatároztuk és összehasonlítottuk az egyes HLA-DR-DQ haplotípusokat hordozó egyének arányát magyar szerzett TTP-s betegek és egészséges magyar kontrollszemélyek egy-egy csoportjában.

2. Megvizsgáljuk az egyes HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára gyakorolt hatását külön a nők, illetve a férfiak körében.

   E célból az 1. pontban leírt összehasonlításokat nemek szerinti bontásban is elvégeztük.

3. Megvizsgáljuk a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmusnak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára gyakorolt hatását a magyar populációban.

   Ehhez a ritka c.1858T allélt hordozó szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollszemélyek arányát állapítottuk meg és hasonlítottuk össze.

4. Megvizsgáljuk, hogy hogyan befolyásolja a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus hordozása a HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára kifejtett hatását.

   Ennek érdekében összehasonlítottuk a szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollszemélyek arányát a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus, valamint a rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása alapján képzett csoportokban.

2.2. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz jellemzőinek vizsgálata

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek túlnyomó része az IgG osztályba tartozik, IgG izotípusú ADAMTS13-ellenes autoantitestek gyakorlatilag minden szerzett TTP-s betegben kimutathatóak a betegség akut szakában, illetve a betegek egy részében remisszióban is.

Ennek megfelelően második vizsgálatunkban azt a célt tűztük ki, hogy:

1. Meghatározzuk és összehasonlítsuk az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációját, alosztályeloszlását és gátló hatását szerzett TTP-s betegek különböző stádiumokban – az első akut epizód során, relapszusban és remisszióban – vett mintáiban.
2. Megvizsgáljuk az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alosztályeloszlásának szerepét az ADAMTS13-gátló hatás kifejtésében.

   Ennek érdekében egyrészt megvizsgáltuk az egyes IgG alosztályokba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek koncentrációjának kapcsolatát az ADAMTS13-gátlás erősségével, másrészt közvetlenül összehasonlítottuk eltérő alosztályeloszlású de azonos ADAMTS13 elleni autoantitest-koncentrációjú hígított betegminták gátló hatását.
3. Megvizsgáljuk a HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása és az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz jellemzői közötti kapcsolatot.

   E célból összevetettük az ADAMTS13 elleni IgG autoantitesteknek a rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusokat hordozó, illetve nem hordozó TTP-s betegek csoportjaiban mért koncentrációját és alosztályeloszlását.

3. MÓDSZEREK

3.1. Beteg- és mintabeválasztási kritériumok

3.1.1. A TTP-HUS regiszter

Laboratóriumunkban 2007 augusztusa óta zajlik trombotikus mikroangiopátiák differenciáldiagnosztikája. A diagnosztikus mérések elvégzése céljából laboratóriumunkba érkezett mintákat ez idő óta tároljuk, a vizsgált betegek és mintáik adatait pedig egy regiszterben (TTP-HUS regiszter) rögzítjük.

A szerzett TTP diagnózisát az alábbi kritériumok alapján állítottuk fel: (1) trombocitopénia (150 G/L alatti trombocitaszám), (2) mikroangiopátiás hemolitikus anémia (csökkent hemoglobinszint, emelkedett LDH, negatív Coombs-teszt, fragmentociták a perifériás vérkenetben), (3) deficiens ADAMTS13-aktivitás (<10% az alább részletezett FRET esszével meghatározva), (4) kimutatható ADAMTS13-inhibitorok (funkcionális, keveréses vizsgálattal) vagy ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek (ELISA módszerrel).

A dolgozat alapját képező kutatásokba a regiszterünkben szereplő szerzett TTP-s betegeket válogattuk be az alábbi kritériumok alapján.

3.1.2. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus szerepének vizsgálatába bevont betegek és kontrollszemélyek

A HLA-DR-DQ haplotípusok és a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus vizsgálatába a regiszterünkben 2015 júliusában szereplő 84 szerzett TTP-s beteg közül azokat vontuk be, akiktől rendelkezésünkre állt a genetikai vizsgálatra alkalmas minta (76 fő). Egy beteget zártunk ki délkelet-ázsiai származása és az ezzel járó eltérő genetikai háttér miatt; a vizsgálatba beválasztott 75 beteg mindegyike Magyarországról (73 fő) illetve szomszédos európai országból (2 fő) származott.

Kontrollként 204 egészséges személy (csontvelő-transzplantáció előtt álló gyermekek szülei (106 fő), illetve családvizsgálatban részt vevő szülők (98 fő)) adatai szolgáltak. A HLA-DR eredmény az összes kontroll (204 fő) esetében elérhető volt, a HLA-DQ eredmény pedig a betegek egy alcsoportjában (162 fő) volt ismert. A *PTPN22*-polimorfizmus vizsgálatához 169 kontrollszemély esetén rendelkeztünk a szükséges mintával.

3.1.3. Az ADAMTS13-ellenes autoantitestek alosztályeloszlásának és gátló hatásának vizsgálatába bevont betegek és minták

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek alosztályeloszlásának és gátló hatásának vizsgálatát 81 szerzett TTP-s beteg összesen 101 ADAMTS13-ellenes IgG-re pozitív mintájában végeztük el. A regiszterünkben 2017 márciusában szereplő 113 szerzett TTP-s beteg összes ADAMTS13-deficiens (és néhány nem deficiens) mintájában elvégeztük az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek meghatározását, amely 109 betegminta esetében bizonyult pozitívnak. Ez utóbbi minták közül 101 esetében volt elvégezhető az alosztályeloszlás meghatározása.

A 101 vizsgált minta közül 97 minta esetén végeztük el az inhibitorok meghatározását keveréses vizsgálattal. Az autoantitestek fajlagos gátló hatását azokban az akut mintákban vizsgáltuk, amelyekben az IgG4 aránya 70% feletti (19 minta) vagy 30% alatti (16 minta) volt, illetve az összes elérhető remissziós mintában (14 minta).

3.2. Alkalmazott módszerek

3.2.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok meghatározása

A HLA-DRB1 és HLA-DQB1 allélok alacsony felbontású meghatározását az Országos Vérellátó Szolgálat Transzplantációs Immungenetikai Laboratóriumában végezték szekvenciaspecifikus oligonukleotid- hibridizációs módszerrel.

A HLA-DR-DQ haplotípusokat a családvizsgálatban szereplő 98 kontroll esetében a szegregáció alapján határoztuk meg, a további kontrollok és a szerzett TTP-s betegek esetében pedig a Phase (v2.1) szoftver segítségével prediktáltuk.

3.2.2. A *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusának vizsgálata

A *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusát az érintett DNS szakasz polimeráz láncreakcióval (PCR) történő megsokszorozását követően RFLP (restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus) módszerrel vizsgáltuk.

3.2.3. Az ADAMTS13-aktivitás és ADAMTS13-gátló hatás meghatározása

Az ADAMTS13-enzimaktivitás meghatározása fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) elven történt, kinetikus módszerrel, a FRETS-VWF73 szubsztrát (Peptides International Inc., Louisville, KY, USA) alkalmazásával.

A minták ADAMTS13-aktivitását egy 100% névleges ADAMTS13-aktivitású poolozott normál citrátos plazmamintáéhoz viszonyítottuk.

Az ADAMTS13-gátló hatás erősségét funkcionális, ún. keveréses vizsgálattal vizsgáltuk. A vizsgálandó betegmintákat az aktivitásmérést megelőzően poolozott normál citrátos plazmamintával 1:1 arányban összekevertük, majd 37°C-on 2 órán keresztül rázóasztalon inkubáltuk. A kevert minták aktivitását a fent ismertetett FRET-módszerrel határoztuk meg. Minél alacsonyabb volt a kevert minta aktivitása, annál erősebb ADAMTS13-gátlást tükrözött: a kevert minta 40% fölötti aktivitásából érdemi gátlás hiányára, 0%-hoz közeli aktivitásából pedig igen erős ADAMTS13-gátlásra következtettünk.
A fajlagos (adott autoantitest-koncentrációra vonatkoztatott) gátláserősség vizsgálata a fentiekhez hasonlóan zajlott, de a választott mintákat a keveréses vizsgálat elvégzése előtt, az ADAMTS13-ellenes IgG koncentrációjuk ismeretében pH 7,4-es kémhatású PBS oldatban olyan mértékben hígítottuk, hogy a hígított betegminták ADAMTS13-ellenes IgG koncentrációja azonos, 25 U/mL-es legyen.

3.2.4. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjának és alosztályeloszlásának meghatározása

Az IgG osztályú ADAMTS13-ellenes autoantitestek koncentrációját antigénkötésük alapján, ELISA módszerrel határoztuk meg, a gyári Technozym ADAMTS13-Inh® kit (Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria) segítségével. A gyártó ajánlása alapján a 15 U/mL feletti antitestkoncentrációkat tekintettük pozitívnak.
Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alosztályeloszlását egy házilag beállított ELISA-módszerrel határoztuk meg. Az esszé során a betegmintákat rekombináns ADAMTS13-mal fedett lemezekben inkubáljuk, majd alosztályspecifikus másodlagos antitestek segítségével hívtuk elő. Egy másik lemez alosztályonként 2-2 oszlopát ismert koncentrációjú és alosztályú humán IgG antitestekkel fedtük, majd blokkolást követően ezeket a vizsgált mintákkal megegyező módon jelöltük az adott alosztályra specifikus másodlagos antitestekkel. Az így előállított kalibrátorokra illesztett standardgörbék segítségével határoztuk meg az adott alosztályba tartozó lekötődött ADAMTS13-specifikus IgG mennyiségét. Az egy mintából lekötődött, különböző alosztályba tartozó autoantitestek aránya alapján következtettünk a mintában található autoantitestek alosztályeloszlására. Az alosztályok arányát a minta (gyári ELISA-kittel meghatározott) ADAMTS13-ellenes IgG-koncentrációjával megszorozva kaptuk meg az egyes IgG-alosztályokba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek abszolút koncentrációját.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus rizikómódosító szerepének vizsgálata szerzett TTP-ben

4.1.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok hatása a szerzett TTP rizikójára

A DRB1*11-DQB1*03 és a DRB1*15-DQB1*06 haplotípusokat hordozó egyének aránya magasabbnak (56,0% vs. 27,2%, illetve 25,3% vs. 11,7%), a DRB1*07-DQB1*02 és a DRB1*13-DQB1*06 haplotípusokat hordozóké pedig alacsonyabbnak (6,7% vs. 21,6%, illetve 4,0% vs. 13,6%) bizonyult a szerzett TTP-s betegek csoportjában (75 fő, medián életkor 41 év, nők aránya 80,0%) az egészséges kontrollok csoportjához (162 fő, 57 év, 53,1% nő) képest.

Ez arra utal, hogy a DRB1*11-DQB1*03, illetve a DRB1*15-DQB1*06 haplotípusok hordozása fokozza (esélyhányados (OR) 3,41 (1,93-6,05) és 2,55 (1,26-5,18)), míg a DRB1*07-DQB1*02, illetve a DRB1*13-DQB1*06 haplotípusok hordozása csökkenti (OR 0,26 (0,10-0,69) és 0,27 (0,08-0,92)) a szerzett TTP kialakulásának kockázatát.

4.1.2. A HLA-DR-DQ haplotípusok rizikómódosító hatása nőkben

A szerzett TTP-s nőbetegek (60 fő) és az egészséges nők csoportjának (86 fő) összehasonlítása alapján ugyanazok a haplotípusok bizonyultak rizikófokozó és rizikócsökkentő hatásúnak, mint a teljes betegcsoportban, ráadásul az összefüggések az alacsonyabb elemszám ellenére még kifejezettebbek voltak.

A DRB1*11-DQB1*03 és a DRB1*15-DQB1*06 haplotípusokat hordozó egyének aránya ugyanis jóval magasabb (61,7% vs. 26,7%, illetve 30,0% vs. 12,8%), míg a DRB1*07-DQB1*02 és a DRB1*13-DQB1*06 haplotípusokat hordozóké pedig jóval alacsonyabb (5,0% vs. 22,1%, illetve 1,7% vs. 14,0%) volt a szerzett TTP-s nőbetegek csoportjában az egészséges nők csoportjához képest. Az esélyhányados a DRB1*11-DQB1*03 haplotípus esetében 4,41-nek (2,17–8,93), a DRB1*15-DQB1*06 esetében 2,92-nek (1,26–6,77), a DRB1*07-DQB1*02 esetében 0,19-nek (0,05–0,66), a DRB1*13-DQB1*06 esetében pedig 0,10-nek (0,01–0,83) adódott.

A férfi TTP-s betegek száma (15 fő) túl alacsony volt statisztikai vizsgálatok elvégzéséhez, illetve következtetések levonásához.

4.1.3. A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus hatása a szerzett TTP rizikójára

A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus ritka c.1858T allélját hordozó szerzett TTP-s betegek aránya (20,1%) nem különbözött az allélt hordozó, a polimorfizmus tekintetében vizsgált egészséges kontrollszemélyek (169 fő, 56 év, 59,2% nő) arányától (21,3%). A fenti megállapítások egyaránt igazak a nemek szerint kettébontott csoportokra is.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus összességében nem befolyásolja a szerzett TTP kialakulásának kockázatát.

4.1.4. A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus és a HLA-DR-DQ haplotípusok interakcióinak hatása a szerzett TTP rizikójára

A *PTPN22* c.1858T ritka allélt és a DRB1*15-DQB1*06 haplotípust egyaránt hordozó egyének között a szerzett TTP-s betegek aránya (80,0%) szignifikánsan (p=0,007) magasabb volt a ritka allélt hordozó, de a haplotípust nem hordozó egyénekhez képest (26,7%), míg a másik két, a c.1858T allélt nem hordozó csoport között a különbség nem volt szignifikáns. Másrészt a ritka allélt nem hordozó, de a DRB1*07-DRB1*02 haplotípust hordozó egyének körében a szerzett TTP-s betegek aránya (7,7%) szignifikánsan (p=0,001) alacsonyabb volt a ritka allélt és a haplotípust sem hordozó egyének csoportjához képest (40,4%), míg a ritka allélt hordozó csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget.

Eredményeink arra utalnak, hogy a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus rizikófokozó hatása csak a ritka *PTPN22* c.1858T allélt hordozó egyénekben, míg a DRB1*07-DQB1*02 haplotípus rizikócsökkentő hatása csak a ritka allélt nem hordozó egyénekben érvényesül.

4.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjának, alosztályeloszlásának és gátló hatásának vizsgálata

4.2.1. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása a szerzett TTP egyes stádiumaiban

A vizsgálatba bevont 81 beteg (medián életkor 38 év, 76,5% nő) 101 vizsgált mintájában (80 akut és 21 remissziós minta) az ADAMTS13-ellenes IgG koncentrációja (medián, interkvartilis tartomány) 66,0 (35,6-158,0) U/mL volt.

Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek elsősorban az IgG4 és IgG1 alosztályba tartoztak. Az IgG4 medián aránya 66,0% (34,5%-76,0%), az IgG1-é 32,0% (24,0-51,5%), az IgG3 és IgG2 medián aránya pedig egyaránt 0,0% (0,0-

5,5%, illetve 0,0-2,5%) volt. A minták 70,3%-ában az IgG4, 27,7%-ában az IgG1, 2,0%-ában pedig az IgG3 volt a domináns (legnagyobb arányban jelen lévő) alosztály. A minták 96,0%-a tartalmazott IgG4, 93,1%-a IgG1, 50,5%-a IgG3, 40,6%-a pedig IgG2 alosztályú ADAMTS13 elleni autoantitesteket. Mind a négy alosztály a minták 23,8%-ában fordult elő együtt, 36,6% tartalmazott három, 35,6% pedig kettő különböző alosztályt, csupán 4,0% tartalmazott kizárólag egyféle alosztályba tartozó autoantitesteket.

Az első akut szakból (57 minta 57 betegtől, medián életkor 41 év, 73,7% nő), illetve relapszusból (15 minta 15 betegtől, 35 év, 80,0% nő) származó független minták összehasonlítása alapján az IgG1 és IgG3 szintje (35,7 (17,5-96,6) vs. 12,8 (6,0-19,9), illetve 1,6 (0,0-8,2) vs. 0,0 (0,0-0,1) U/mL) és aránya (42,0% (30,6%-68,8%) vs. 24,3% (21,0%-28,8%), illetve 2,2% (0,0%-9,7%) vs. 0,0% (0,0%-0,2%)) magasabb, az IgG4 aránya pedig alacsonyabb (49,7% (14,0%-68,3%) vs. 73,6% (65,0%-78,4%)) az első akut szak során a relapszushoz képest.
Amíg az első akut shub során vett minták közel felében (47,4%) az ADAMTS13 elleni IgG1 mennyisége volt a legmagasabb, addig az összes relapszus során vett mintában az IgG4 volt a domináns alosztály. A független minták mellett a több mintával rendelkező betegek valamennyi relapszusból származó mintájában az IgG4 bizonyult domináns alosztálynak.
Az első akut shubot követő remisszióban vett független minták (9 minta 9 betegtől, 34 év, 88,9% nő) 80,0%-ában, illetve a relapszust követő remisszióban vett minták (8 minta 8 betegtől, 34 év, 100% nő) 100%-ában szintén az IgG4 volt a domináns alosztály.

4.2.2. Az ADAMTS13-gátlás és összefüggése az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek szintjével és alosztályeloszlásával

Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek összkoncentrációja korrelált az ADAMTS13-gátlás erősségét jelző mutatóval, vagyis fordított korrelációt mutatott a normál citrátos mintával 1:1 arányban kevert és 37°C-on két órán át inkubált betegminták ADAMTS13-aktivitásával ($r= -0,326$; $p=0,011$).
Ennél erősebb korrelációt találtunk a kevert minták aktivitása, illetve az IgG4 alosztályba tartozó autoantitestek koncentrációja között ($r= -0,473$; $p<0,0001$).
Az IgG1, IgG2, illetve IgG3 alosztályú ADAMTS13-ellenes autoantitestek szintje és az ADAMTS13-gátlás erősségét jelző mutató között viszont nem találtunk szignifikáns összefüggést.

Az IgG4 alosztályt magas (70% feletti), illetve alacsony (30% alatti) arányban tartalmazó, illetve eltérő stádiumokból származó minták fajlagos (azonos autoantitest-koncentrációra vonatkoztatott) gátló hatásának vizsgálatához 35 akut szakból és 14 remisszióból származó mintát a normál citrátos plazmával történő keverést és inkubációt megelőzően azonos, 25 U/mL-es ADAMTS13-ellenes IgG koncentrációjúra hígítottunk.
Az IgG4 alosztályú autoantitesteket nagy arányban tartalmazó minták (19 minta, 8 első akut shubból, 11 relapszusból) gátló hatása erősebbnek bizonyult az IgG4-et alacsony arányban tartalmazó mintákéhoz (16 minta, mind első akut shubból) képest.
Az IgG4 alosztályt alacsony arányban tartalmazó minták mindegyike az első akut shubból származott. Az eltérő betegségstádiumokból származó, IgG4-et magas arányban tartalmazó minták fajlagos gátló hatása között nem találtunk különbséget.

4.2.3. A HLA-DR-DQ haplotípusok és az autoantitest-válasz összefüggései

Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja magasabb volt az első vizsgálatunk alapján rizikócsökkentő haplotípusokat (DRB1*07-DQB1*02, illetve DRB1*13-DQB1*06) hordozó betegek (9 fő) első elérhető akut mintájában a rizikócsökkentő haplotípusokat nem hordozó betegek (61 fő) akut mintáihoz képest (280,4 (142,8–687,0) vs. 65,7 (42,1–111,4) U/mL, p = 0,0003).
A rizikófokozó haplotípusokat (DRB1*11-DQB1*03, illetve DRB1*15-DQB1*06) hordozó (47 fő), illetve nem hordozó (23 fő) betegekben az ADAMTS13-ellenes autoantitestek koncentrációja nem különbözött.
Az autoantitestek alosztályeloszlása nem tért el a rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő haplotípusok hordozása alapján képzett csoportokban.

A fentieken túl azt tapasztaltuk, hogy a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozó betegek relapszusban vett mintáiban alacsonyabb volt az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja az első akut epizódban vett mintáikhoz képest (42,3 (31,0–67,4) vs. 67,1 (43,6–152,0) U/mL, p = 0,0291). Hasonló tendencia a rizikócsökkentő haplotípust hordozó betegek esetében nem volt megfigyelhető.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat főbb megállapításai a következők:

5.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok, a nem és a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus hatása a szerzett TTP kialakulásának kockázatra

1. Megerősítettük a DRB1*11-DQB1*03 haplotípus rizikófokozó szerepét, továbbá megállapítottuk, hogy ezen felül a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus hordozása növeli, a DRB1*07-DQB1*02 és DRB1*13-DQB1*06 haplotípusok hordozása pedig csökkenti a szerzett TTP kialakulásának kockázatát.
2. Megállapítottuk, hogy az 1. pontban ismertetett összefüggések a nők körében különösen erősek, az alacsonyabb elemszám ellenére is.
3. Nagyobb beteganyagon megerősítettük a korábbi megfigyelést, miszerint a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmust hordozók gyakorisága nem tér el a szerzett TTP-s betegek és az egészséges kontrollszemélyek csoportjában.
4. Megállapítottuk, hogy a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus befolyásolja egyes HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulására gyakorolt rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő hatását.

   A DRB1*15-DQB1*06 haplotípus rizikófokozó hatása csak a ritka *PTPN22* c.1858T allélt hordozók körében, a DRB1*07-DQB1*02 haplotípus rizikócsökkentő hatása pedig a c.1858T allélt nem hordozók körében bizonyult szignifikánsnak.

5.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja, alosztályeloszlása és gátló hatása a szerzett TTP különböző stádiumaiban

1a. Vizsgálatunk eredményei alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, hogy szerzett TTP-ben az ADAMTS13 elleni IgG izotípusú autoantitestek elsősorban az IgG4 és IgG1 alosztályokba tartoznak. A minták döntő többségében többféle alosztályba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek egyidejű jelenléte igazolható.

1b. Megállapítottuk, hogy az egyes IgG alosztályokba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek aránya a betegség lefolyása során jellegzetes változásokat mutat.

Az első akut epizódhoz képest relapszusban az IgG4 alosztályú autoantitestek aránya magasabb, míg az IgG1 és IgG3 alosztályú autoantitestek aránya és koncentrációja pedig alacsonyabb.

Ezen felül a független minták összehasonlítása, illetve a több mintával rendelkező betegek eredményei egyaránt arra utalnak, hogy a relapszusban, illetve relapszust követő remisszióban vett minták mindegyikében az IgG4 a domináns alosztály.

2. Megállapítottuk, hogy az IgG4 alosztályú ADAMTS13-ellenes autoantitesteket magasabb arányban tartalmazó minták ADAMTS13-gátló hatása erősebb a többi mintához viszonyítva.

Elsőként vizsgáltuk szisztematikusan, nagyobb esetszámú TTP-s betegcsoportban az ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek alosztályeloszlásának kapcsolatát az ADAMTS13-gátlás erősségével Megállapításunkat a következő két, egymást alátámasztó eredményünkre alapozzuk. Egyrészt az IgG alosztályok közül egyedül az IgG4 alosztályú autoantitestek koncentrációja korrelált az ADAMTS13-gátlás erősségét jelző mutatóval. Másrészt az IgG4-domináns minták azonos ADAMTS13-ellenes IgG-koncentrációra vonatkoztatott gátlóképessége erősebbnek bizonyult az IgG1-domináns mintáénál.

3. Összefüggést találtunk a HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása, illetve az ADAMTS13 elleni autoantitestválasz egyes jellemzői között.

Elsőként vizsgáltuk meg a HLA-DR-DQ haplotípusok hordozásának és az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz egyes jellemzőinek kapcsolatát.

Eredményeink arra utalnak, hogy az autoantitestek koncentrációja magasabb a rizikócsökkentő haplotípusokat (DRB1*07-DQB1*02 és DRB1*13-DQB1*06) hordozó betegek körében az azokat nem hordozó betegekhez képest.

Emellett azt figyeltük meg, hogy a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozó betegek körében az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja a relapszus során vett mintákban alacsonyabb az első akut epizód során vett mintákhoz képest.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Sinkovits G, Szilágyi Á, Farkas P, Inotai D, Szilvási A, Tordai A, Rázsó K, Réti M, Prohászka Z.
The role of human leukocyte antigen DRB1-DQB1 haplotypes in the susceptibility to acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. HUMAN IMMUNOLOGY 78:(2) pp. 80-87. (2017)

IF: 1,994

Sinkovits G, Szilágyi Á, Farkas P, Inotai D, Szilvási A, Tordai A, Rázsó K, Réti M, Prohászka Z.
Concentration and subclass distribution of anti-ADAMTS13 IgG autoantibodies in different stages of acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 9:1646. (2018)

IF: 4,716

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített IF: 6,710.

6.2. A disszertációtól független publikációk

Sinkovits G, Prohászka Z.
A komplementrendszer szerepe a thromboticus microangiopathiák patogenezisében.
ORVOSKÉPZÉS 88:(2) pp. 331-337. (2013) (összefoglaló cikk)

IF: -

Mikes B, **Sinkovits G**, Farkas P, Csuka D, Schlammadinger Á, Rázsó K, Demeter J, Domján G, Réti M, Prohászka Z.
Elevated plasma neutrophil elastase concentration is associated with disease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura.
THROMBOSIS RESEARCH 133:(4) pp. 616-621. (2014)

IF: 2,447

Mikes B, **Sinkovits G**, Farkas P, Csuka D, Rázsó K, Réti M, Radványi G, Demeter J, Prohászka Z.
Carboxiterminal pro-endothelin-1 as an endothelial cell biomarker in thrombotic thrombocytopenic purpura.
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 115:(5) pp. 1034-1043. (2016)

IF: 5,627

Leffler J, Prohaszka Z, Mikes B, **Sinkovits G**, Ciacma K, Farkas P, Réti M, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Martin M, Blom AM.
Decreased neutrophil extracellular trap degradation in Shiga toxin-associated haemolytic uraemic syndrome.
JOURNAL OF INNATE IMMUNITY 9:(1) pp. 12-21. (2017)

IF: 3,837

Farkas P, Csuka D, Mikes B, **Sinkovits G**, Réti M, Németh E, Rácz K, Madách K, Gergely M, Demeter J, Prohászka Z.
Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies.
IMMUNOBIOLOGY 222:(2) pp. 119-127. (2017)

IF: 2,873

Garam N, Maláti É, **Sinkovits G**, Gombos T, Szederjesi A, Barabás L, Gráf L, Kocsis J, Prohászka Z.
Platelet count, ADAMTS13 activity, von Willebrand factor level and survival in patients with colorectal cancer: 5-year follow-up study.
THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 118:(1) pp. 123-131. (2018)

IF: 4,733

Horváth O, Kállay K, Csuka D, Mező B, **Sinkovits G**, Kassa C, Stréhn A, Csordás K, Sinkó J, Prohászka Z, Kriván G.
Early increase in complement terminal pathway activation marker sC5b-9 is predictive for the development of thrombotic microangiopathy after stem cell transplantation.
BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION 24(5):989-996. (2018)

IF: 3,599

Trojnár E, Szilágyi Á, Mikes B, Csuka D, **Sinkovits G**, Prohászka Z.
Role of complement in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies.
MAGAZINE OF EUROPEAN MEDICAL ONCOLOGY 11:3 pp. 227-234. (2018) (összefoglaló cikk)

IF: -

Trojnár E, Józsi M, Szabó Z, Réti M, Farkas P, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Garam N, Mikes B, **Sinkovits G**, Mező B, Csuka D, Prohászka Z.
Elevated systemic pentraxin-3 is associated with complement consumption in the acute phase of thrombotic microangiopathies.
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 10:240. (2019)

IF: 4,716*

A disszertációtól független publikációkra vonatkozó összesített IF: 27,832.

A megjelölt folyóiratok összesített impakt faktora: 34,542.