

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Szerológiai tényezők szerepe a krónikus májbetegségek
progressziójának előrejelzésében

Dr. Pályu Eszter

Témavezető: Dr. Tornai István



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
A TUDOMÁNYOS MUNKA ÖSSZEFOGLALÁSA	5
SUMMARY	6
BEVEZETÉS	7
CÉLKITŰZÉSEK	13
BETEGEK	14
PSC-s betegcsoport	14
Májcirrózisos betegcsoport	17
MÓDSZEREK	19
Laboratóriumi módszerek	19
Statistikai elemzés	23
ETIKAI ENGEDÉLYEK	23
EREDMÉNYEK	24
A bél barrier funkció biomarkerei PSC-ben és ezek összefüggése a PSC klinikai és laboratóriumi jellemzőivel	24
A bél sérülés markereinek jelentősége a progresszív betegséglefolyás kockázatának vonatkozásában PSC-ben	27
A bakteriális transzlokáció és enterocita károsodás markereinek szerepe a progresszív betegséglefolyás kockázatának vonatkozásában PSC-ben	29
A cirrózisos betegek általános jellemzői	30
VWF:Ag és funkcionális aktivitási szintjei	31
VWF multimer analízis	33
ADAMTS13 aktivitás és antigén szintek	36
Vérlemezke adhéziós teszt	39
Trombin generációs teszt	39
A VWF:CB, ADAMTS13 aktivitás és a CRP szint túléléssel való összefüggése	40
MEGBESZÉLÉS	42
ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	49
IRODALOMJEGYZÉK	50
TÁRGYSZAVAK	57
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	58
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	59

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAA: anti-F-aktin antitest

ACCA: anti-chitobiozid szénhidrát antitest

ACLF: krónikus májbetegségre rakódott akut májelégtelenség

AD: akut dekompenzáció

ADAMTS13: “a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, member 13”

AGA: anti-gliadin antitest

AIH: autoimmun hepatitisz

ALCA: anti-laminaribiozid szénhidrát antitest

ALP: alkalikus foszfatáz

ALT: alanin aminotranszferáz

AMCA: anti-mannobiozid szénhidrát antitest

APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő

ASCA: anti-Saccharomyces cerevisiae antitest

AST: aszpartát aminotranszferáz

AUC: görbe alatti terület

CD: Crohn-betegség

CI: megbízhatósági tartomány

CPA: Cone and Plate Analizátor

CRP: C-reaktív protein

DAB: 3,3'-diaminobenzidin

ELISA: enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat

EMA: anti-endomiziális antitest

EndoCAb: endotoxin mag IgA antitest

ERCP: endoszkópos retrograde kolangiopankreatográfia

F-aktin: filamentózus aktin

FCN: fikolinok

FRET: Fluoreszcein Rezonancia Energia Transzfer

GGT: γ -glutamil transzferáz

GI: gasztrointesztinális

HC: egészséges kontroll egyének

HE: hepatikus encefalopátia

HMWM: nagy molekulásúlyú multimer

HR: kockázati hányados

IBD: gyulladásos bélbetegségek

I-FABP: intesztinális zsírsav-kötő fehérje

Ig: immunoglobulin

IIF: indirekt immunofluoreszcens teszt

IMWM: közepes molekulásúlyú multimer

INR: nemzetközi standardizált ráta

IQR: interkvartilis tartomány

LBP: LPS kötő fehérje

LMWM: kis molekulásúlyú multimer

LPS: lipopoliszacharid

MASP: mannóz-kötő lektin asszociált szerin proteázok

MBL: mannóz-kötő lektin

MELD: "Model for End-stage Liver Disease"

MRCP: mágneses rezonancia kolangiopankreatográfia

MWM: - molekulasúlyú multimer

NAFLD: nem alkoholos zsírmáj

NASH: nem alkoholos szteatohepatitisz

OD: optikai denzitás

OLTx: ortotopikus májátültetés

OMP: külső membrán fehérje

P-ANCA: perinukleáris anti-neutrofil citoplazmatikus antitest

PBC: primer biliáris kolangitisz

PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat

PBS-T: Tween-20 tartalmú PBS

PCT: prokalcitonin

PI: protrombin idő

PPP: trombocita szegény plazma

PRP: trombocita dús plazma

PSC: primer szklerotizáló kolangitisz

ROC: „receiver operating characteristic”

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SMA: simaizom sejt elleni antitest

ST: stabil cirrózis

TF: szöveti faktor

TGA: trombin generációs teszt

TTP: trombotikus trombocitopénias purpura

UC: colitis ulcerosa

ULMWM: ultra-nagy molekulasúlyú multimer

VWF: von Willebrand faktor

VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén

VWF:CB: kollagén kötő aktivitás

VWFpp: VWF propeptid

VWF:RCo: risztocetin kofaktor aktivitás

WHO: Egészségügyi Világszervezet

A TUDOMÁNYOS MUNKA ÖSSZEFOGLALÁSA

A krónikus májbetegségek, éveken keresztül fennállva, májcirrózishoz vezetnek. A kórlefolyás rendkívül heterogén, nem könnyű a prognózis előrejelzése sem a bevezető krónikus betegség, sem pedig a már kialakult cirrózis stádiumában. Munkánkban két betegcsoportban vizsgáltuk néhány lehetséges prognosztikai marker jelentőségét. Primer szklerotizáló kolangitiszben szenvedő gyermek és felnőtt betegekben vizsgáltuk a bélbarrier kóros működését jelző szerológiai markerek jelenlétét és ezek összefüggését a betegség kimenetelével. A másik betegcsoportba már cirrózisban szenvedő betegek kerültek, akikben a hemosztázis rendszer egyensúlyi állapotát, annak összefüggését a zajló gyulladásos folyamatokkal és ezek együttes hatását a kimenetelre vizsgáltuk.

A citoskeletális filamentózus (F) aktin fehérjék ellen kialakuló IgA izotípusú antitestválasz primer szklerotizáló kolangitiszben (PSC) a progresszív betegségelfolyás újonnan azonosított, a betegsúlyosságtól független szerológiai markerének bizonyult, és egyben a betegség patogenezisében kulcsfontosságú bél-máj kölcsönhatás új aspektusait tárta fel.

Cirrózisban jól elkülöníthetők a stabil (ST) és akut dekompenzált (AD) betegek közötti lényeges különbségek a hemosztázis rendszerben. A von Willebrand faktor (VWF) szintje a betegség súlyosságával ismert módon arányosan növekszik. A korábbi adatokkal ellentétben a VWF kollagén kötő aktivitása (VWF:CB) is arányosan emelkedik az előrehaladott betegségben, és a túlélés vonatkozásában az egyik legjobb markernek bizonyult. A VWF multimer szerkezetében is markáns változások voltak észlelhetők. ST cirrózisban a kis molekulású multimer (LMWM) aránya növekedett meg a nagyok (HMWM) rovására. Ugyanakkor az AD betegek felében, normálisan nem észlelhető ultranagy multimer (ULMWM) is megjelentek, melyre magyarázatul szolgál a párhuzamosan észlelt alacsony VWF hasító proteáz, az ADAMTS13 aktivitás. Az alacsony ADAMTS13 pedig összefüggést mutatott a betegekben észlelt gyulladás, legtöbbször bakteriális infekció jelenlétével. Kontroll vérlemezkék adhézója egyértelmű fokozódást mutatott a cirrózisos plazmák jelenlétében, a legmagasabb értékek ULMWM jelenlétében voltak elérhetők. A legsúlyosabb betegekben a magas VWF szintek és a megjelenő ultranagy multimer együttesen fokozott protrombotikus hajlamot eredményezhetnek és szerepet játszhatnak a betegség progressziójában is.

SUMMARY

Chronic liver diseases, as they persist for years, lead to cirrhosis. The clinical course is heterogeneous and prediction of prognosis is difficult both at the beginning of the disease and in the stage of cirrhosis. We investigated the probable prognostic value of different serologic markers in 2 different groups of patients. We assayed the sera of adult and pediatric patients with primary sclerosing cholangitis (PSC) for the presence of a panel of serologic markers that reflect gut barrier dysfunction and the possible connection of these markers with the disease course. We also investigated the balance of hemostatic system, its relation with the ongoing inflammatory processes and their possible effect on the disease progression.

In PSC, IgA isotype antibodies against cytoskeletal filamentous (F) actin proteins proved to be a novel serological marker for prediction of the progressive disease course as well as it shows a new aspect of gut-liver interaction playing a key role in the pathogenesis of the disease.

In cirrhosis there are marked differences in the hemostatic system between stable (ST) and acutely decompensated (AD) patients. Level of von Willebrand factor (VWF) is elevated parallel with the severity of the disease. In contrast to previous studies, the VWF collagen binding capacity (VWF:CB) shows similar results and could be a reliable prognostic marker of survival. We also could demonstrate significant changes in the multimeric structure of VWF. Namely, there was a decrease in high (HMWM) and an increase in low molecular weight multimer (LMWM) ratios in the majority of ST cirrhosis. However, in half of the AD patients, ultra-large molecular weight multimers (ULMWM) were found, which are not found in controls. The presence of ULMWM in AD patients was associated with low ADAMTS13 activity and high CRP level mostly due to bacterial infection. Adhesion of normal platelets showed a stepwise increase in the presence of cirrhotic plasmas, reaching the highest level in AD patients with ULMWM. The high VWF levels together with the presence of ULMWM can lead to a prothrombotic tendency in the most severe cirrhotic patients and can play a role in the progression of the disease.

BEVEZETÉS

A "krónikus májbetegség" gyűjtőnév alatt a máj szerkezeti elemeinek a károsodásával járó megbetegedések összességét értjük. A májszövet gyulladásával, szövetelhalással, majd regenerációval jellemezhető folyamat, mely az idő előrehaladtával fibrózishoz, majd cirrózishoz vezet. Ez utóbbi a betegségek végstádiumának tekinthető. Egy 2014-ben publikált tanulmány szerint, mely 187 ország halálozási adatait dolgozta fel az 1980 és 2010 közötti időszakra vonatkozóan, 2010-ben világszerte több mint egymillió haláleset történt a májcirrózis következtében, mely az összhálózás 1,95%-át teszi ki [1]. Ezzel a halálokok között a 12. helyet foglalja el [2]. Ugyanakkor a vizsgált 30 év alatt, 2010-re a májcirrózis 100.000 lakosra vonatkoztatott, életkor szerint illesztett halálozás a 20-ról 15,8 halálesetre javult, ami 21,6%-os csökkenést jelent [1]. Európában az életkorra korrigált halálozási mutatók jelentős különbséget mutatnak a kelet- és nyugat-európai országokban. Példaként említve, Magyarországon, Moldovában és Romániában, a cirrózis halálozása az 1990-es évek közepén volt a legmagasabb, azóta csökkenést mutat, de 2010-ben továbbra is a felső 10%-ban van a globális adatokat tekintve. Ezzel ellentétben, Olaszországban, Németországban és Spanyolországban jelentősen javultak a halálozási mutatók, 2010-ben a világ legalacsonyabb harmadához tartoztak [3].

Hazánkban a KSH jelenleg elérhető legfrissebb (2016-os) adatai szerint a májbetegségek okozta halálozási adatok évek óta csökkenő tendenciát mutatnak ugyan, de a rangsorban még mindig a 6. helyet foglalják el. Az 1990-es években 6-8000 haláleset történt évente, mely 2016-ra 3-4000 közé csökkent. Nemek szerint felosztva ez a halálok férfiaknál átlagosan 2,5-szer gyakoribb, mint nőknél [4].

Krónikus májbetegség, végül cirrózis kialakulásához vezethetnek a rendszeres, túlzott mértékű alkoholfogyasztás, a krónikus vírus hepatitiszek (B, D és C), a különböző anyagcserebetegségek (Wilson-kór, hemokromatózis), a keringési zavarok (portális véna trombózis, Budd-Chiari-szindróma, jobb szívfél elégtelenség), a nem alkoholos zsírmáj (NAFLD), illetve -steatohepatitisz (NASH), az autoimmun májbetegségek (autoimmun hepatitisz [AIH], primer biliáris kolangitisz [PBC] és primer szklerotizáló kolangitisz [PSC]), az elhúzódó epepangással járó állapotok. Továbbá egyes gyógyszereknek, toxikus anyagoknak is szerepet tulajdonítanak. Hazai és nemzetközi viszonylatban is a túlzott alkoholfogyasztás a felelős leggyakrabban a májcirrózis kialakulásáért és az ebből adódó

halálozás 50%-áért [5], azonban egyre nő az elhízás és így a NAFLD/NASH kóroki szerepe [6].

A károsító tényezők hatására évtizedek alatt a hepatociták elhalnak, a máj kötőszövetesen átépül, azonban még kialakult cirrózis esetén is, a máj jelentős tartalékainak köszönhetően, a beteg évekig tünetmentes maradhat. Ezt az állapotot stabil, vagy kompenzált cirrózisként nevezzük (ST). A betegség súlyosságának megítélésére leggyakrabban a Child-Pugh- illetve a MELD (Model for End-stage Liver Disease) pontrendszert használjuk [7, 8]. A folyamat progressziója során, annak bármely stádiumában jelentkezhetnek szövődmények: felső tápcsatornai vérzés (leggyakrabban nyelőcső visszértágulatok repedéséből), hasvíz - ascites megjelenése, hepatikus encefalopátia, bakteriális fertőzések illetve ezek kombinációja. Az így kialakuló állapotot a májcirrózis akut dekompenzációjának (AD) nevezzük [9], mely akár súlyos, életet veszélyeztető is lehet, és általában intézeti és nagyon gyakran intenzív ellátást igényel. Ezen felül az AD-hoz egy vagy több, extrahepatikus szerv elégtelensége is társulhat, mely krónikus májbetegségre rakódott akut májelégtelenség (acute-on-chronic liver failure, [ACLF]) néven használatos, és tovább rontja a májelégtelen beteg állapotát, valamint jelentősen növeli a rövid távú halálozást [9]. A különböző provokáló tényezők közül leggyakoribb a bakteriális fertőzés, mely önmagában négyszeresére növeli a cirrózisos betegek halálozását, a májbetegség súlyosságától függetlenül [10]. Emellett további ok lehet a nagy mennyiségű alkohol fogyasztása, a gasztrointesztinális vérzés, valamint az akut kapuvéna trombózis.

A nemzetközi és hazai irodalomban, többek között saját munkacsoportunk által is, számos olyan kutatási eredmény ismert, mely a rövidtávú halálozás előrejelzésében használható biomarkereket fedezett fel cirrózisos betegekben. A makrofág aktiváció markerei, mint például a szolubilis CD163 emelkedett szintje összefüggést mutatott a májbetegség súlyosságával bakteriális fertőzés miatt kezelt betegekben, illetve a 28 napos halálozás független előrejelzőjének bizonyult [11], míg a mannóz receptor a 6 hónapos mortalitás előrejelzését javította [12]. A preszepszin, bár a súlyos fertőzés igazolására a procalcitoninhoz (PCT) hasonlóan jó, az adatok alapján a rövidtávú halálozás becslésére nem tűnik alkalmasnak [13].

A bakteriális fertőzések előrejelzésére vonatkozóan is történtek kutatások. A lektin-komplement útvonal vizsgált molekuláinak (mannóz-kötő lektin [MBL] és fikolinok [FCN-2,

FCN-3], valamint a mannóz-kötő lektin asszociált szerin proteázok [MASP]) csökkent szintje esetén fokozódott a bakteriális fertőzésekre való hajlam [14, 15].

A PSC egy krónikus, epepangással járó májbetegség, melyre folyamatos, progresszív epeúti gyulladás, valamint fibrózis jellemző, és végül másodlagos cirrózishoz vezet. A betegek kb. 60%-a férfi, az átlagéletkor a diagnóziskor 41 év [16]. Az incidencia évente 0-1,3 eset/100.000 fő, a prevalencia 0-16,2 eset/100.000 fő [17]. A betegség klinikai megjelenése és progressziója változatos, fokozott az epeúti karcinóma kialakulásának kockázata. A diagnózist követő várható élettartam 9-17 év. Oki terápia egyelőre nem áll rendelkezésre, döntően már csak a szövödményeket (epeúti elzáródás, epeúti gyulladás, szepszis) tudjuk kezelni. Egyedüli gyógyító eljárás jelenleg a májátültetés, azonban a betegség ezt követően is, az esetek kb. 25%-ában visszatérhet [18]. Eddig nem azonosítottak olyan megbízható biomarkert, mely képes lenne megjósolni a progresszió sebességét. Következésképpen, a PSC miatt kezelt betegek rizikóbecslése nem megfelelő [19].

A PSC etiológiája még nem ismert teljes egészében, azonban patogenezisében a bélrendszer és a máj kölcsönhatását feltételezik, ezt számos klinikai bizonyíték támasztja alá [20]. Egyrészt, szoros összefüggés van a betegség és a gyulladásos bélbetegségek (IBD) között, a betegek közel 80%-ánál mindkét betegség jelen van [21]. Másrészt, az egyidejűleg IBD-s és PSC-s betegek esetén, a transzplantáció körüli magas IBD aktivitás esetén magasabb [22], míg a májátültetést megelőzően elvégzett colectomia esetén jelentősen alacsonyabb a PSC kiújulásának aránya [23]. A kutatási eredmények is a gyulladt, áteresztő bél szerepét támogatják a későbbi epeúti gyulladásban [24, 25]. A PSC-ben szenvedő betegek fokozott immunválasszal reagálnak az intesztinális endotoxinokra, az ismételt expozíció hatására viszont tolerancia nem alakul ki [26, 27]. Az elhúzódó és aktív bélgyulladás hatására károsodik a bélnyálkahártya barrier funkciója, ezáltal lehetővé téve a kolangiociták későbbi endotoxin expozícióját. A szétváló tight junction-ök miatt a kolangiociták különböző kémiai anyagok, például epesavak hatásának lesznek kitéve, melyek sérülést és gyulladást okozhatnak [21]. Állatmodellekben a kolangiociták tight junction-jeinek szétválása fontos lépés a PSC kialakulásában [28, 29].

Bizonyos betegségekben már ismertek olyan szerológiai markerek, melyek alapján a betegek csoportosíthatók a várható betegséglefolyás szerint. A "hagyományos" szerológiai markerek – mint például az élesztőgomba *Saccharomyces cerevisiae* falában lévő mannán ellen termelődő antitest (anti-*Saccharomyces cerevisiae* [ASCA]), a perinukleáris, "atípusos"

anti-neutrofil citoplazmatikus antitest (P-ANCA) és az *Escherichia coli* külső membránjában található porin C transzporterfehérje ellen termelődő anti-OMP antitest – IBD-ben, elsősorban Crohn-betegségben jól alkalmazhatók a betegség súlyosságának becslésében, hiszen jelenlétük összefügg az agresszívabb betegségfolyással [30, 31] és a sebészi beavatkozás fokozott kockázatával [32, 33]. Ugyanezen antitestek cirrózisos betegekben a súlyos bakteriális fertőzések fokozott kockázatával voltak összefüggésbe hozhatók [34, 35].

Az újabb típusú anti-mikrobiális, ún. glikán-elleni antitestek a mikroorganizmusok sejtfelszíni oligoszaharid alkotóelemei ellen termelődnek, ezek az anti-mannobiozid-, anti-chitobiozid- és az anti-laminaribiozid szénhidrát antitestek (AMCA, ACCA, ALCA). Jól használhatók a Crohn-betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC) differenciáldiagnosztikájában és a szövődényes betegségfolyás előrejelzésében [36-38]. Az akut fázis fehérje lipopoliszacharid-kötő protein (LBP) szintje a Crohn-betegség aktivitásával függ össze és a betegség egy éven belüli várható fellángolásának független előrejelzője [39].

Nemrégiben a bélnyálkahártya barrier funkcióját megbízhatóan jelző biomarkereket azonosítottak. Az enterocita integritásra vonatkozóan, egy enterocitában található citoplazmatikus fehérjéről, az intesztinális zsírsav-kötő proteinről (intestinal fatty acid-binding protein [I-FABP]), mint az enterocita károsodás markeréről számoltak be, mely gyulladás, bélhámsejt sérülés esetén a szisztémás keringésbe kerül, ezáltal a “bél troponinjának” tekinthető [40]. Az intracelluláris citoskeletális aktin filamentumok ellen termelődő anti-F-aktin IgA antitestek (AAA IgA) jelenléte szorosan összefüggött a cöliákias betegek totális vagy szubtotális vékonybél atrófiát mutató szövettani leleteivel [41]. Az anti-gliadin IgA antitestek (AGA IgA) a májcirrózisos betegekben és szignifikáns portális hipertenzióban észlelt megnövekedett intesztinális permeabilitással társultak [42].

Ezen antitestek lehetséges szerepét azonban PSC-ben még nem vizsgálták.

A máj kiemelt szerepet játszik a hemosztázisban az általa termelt alvadási faktorok, prokoaguláns és antikoaguláns fehérjék révén. A hemosztázis ismert módon nagyon komplex rendszer, melyben szerepet játszanak az alvadási rendszer fehérjéi, a vérlemezkék és a fő adhezív fehérje a von Willebrand faktor (VWF), de fontos említeni a fibrinolitikus rendszert és az érendotélt is. Májcirrózisos betegekben az észlelt megnyúlt alvadási paraméterek (protrombin idő [PT], nemzetközi standardizált ráta [INR], aktivált parciális tromboplastin

idő [APTI]) ellenére mégsem tapasztalható kifejezett vérzékenység, ugyanis a csökkent szintetikus kapacitás mind a pro-, mind az antikoagulánsokat érinti. Több kutatás is igazolta, hogy a cirrózisos betegek plazmájában ugyanannyi trombin képződik, mint egészségesekben [43, 44], sőt, egyes tanulmányok fokozott trombin képződést mutattak ki [45-47].

Az elsődleges hemosztázist tekintve trombocitopénia és trombocitopátia figyelhető meg. Előbbi hátterében a fokozott vérlemezke lebontás vagy a lépben és májban történő fokozott szekvesztráció, illetve a csökkent képzés egyaránt áll [48], míg az utóbbinál a károsodott tromboxán A₂ képződés, a csökkent raktározási képesség, a sérült vérlemezke glikoprotein Ib állhatnak [49]. Ugyanakkor a VWF és vele együtt a VIII. faktor szintje emelkedett cirrózisban [50, 51], utóbbinak a szintje pedig összefügg a betegség súlyosságával [52, 53]. Az áramlási viszonyok között végzett trombocita adhézión vizsgálatok igazolták, hogy az emelkedett VWF szint a vérlemezke rendellenességeket, elsősorban az alacsony vérlemezke számot kompenzálhatja [50, 54]. Több vizsgálat igazolta, hogy a fibrinolitikus rendszerben is egy új egyensúlyi helyzet észlelhető [55, 56].

Tehát cirrózisos betegekben, az egészséges egyénekhez képest egy jelentősen megváltozott, egyensúlyra törekvő, de valószínűleg lényegesen instabilabb állapot alakul ki, mely a hemosztázis rendszer minden paraméterét érinti. A különféle provokáló tényezők hatására pedig könnyen elbillenhet vérzékenység vagy trombózishajlam irányába egyaránt [57-59]. Provokáló faktorok lehetnek az endotél funkciózavar, a portális hipertenzió, a bakteriális fertőzések és a veseelégtelenség [60-64].

Egyes tanulmányokban szoros összefüggést találtak a magas VWF szint, a portális hipertenzió és a mortalitás között [65, 66].

A VWF egy nagy, multimerszerkezetű fehérje, mely központi szerepet játszik a vérlemezke adhézióban és az elsődleges hemosztázisban. Az endotélsejtekben és a megakariocitákban képződik, kiindulásként monomer formában. Poszttranszlációs módosulásokat követően nyeri el végleges formáját, kis- (LMWM), közepes- (IMWM), nagy- (HMWM) és ultra-nagy molekulásúlyú multimerekként (ULMWM). A képződött VWF 95%-a folyamatosan szekretálódik a plazmába, míg a megmaradt, döntően ULMWM, az endotélsejtek Weibel-Palade testecskéiben, illetve a megakariociták α -granulumaiban tárolódik. A tárolt ULMWM érfalsérülés és nagy nyírófeszültség hatására kiválasztódik a plazmába, ahol röviddel ezután egy hasító proteáz hatására kisebb, de még mindig nagy

molekulasúlyú multimerekké bomlik. A HMWM tekinthető a hemosztázis szempontjából legaktívabb multimernek [67].

A VWF aktivitását a VWF-hasító proteáz ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, member 13) szabályozza, mivel a VWF vérlemezkék irányában történő reaktivitását befolyásolja annak multimer mérete [68]. Öröklött, vagy szerzett ADAMTS13 deficienciában szenvedő betegekben ultra-nagy VWF multimerek észlelhetők a keringésben, mivel az enzimdefektus következtében a lebontás folyamata jelentősen lelassul. Ennek eredménye a trombotikus mikroangiopátiával jellemzett kórkép, a trombotikus trombocitopénias purpura (TTP)[69]. Az ADAMTS13-mat a máj stellát sejtjei termelik [70, 71], melyek májcirrózisban aktiválódnak [72]. Korábban különböző ADAMTS13 aktivitási és antigén szinteket mértek májcirrózisban szenvedő betegekben. *Manucci és mtsai.* [73] illetve *Feys és mtsai.* [74] kimutatták, hogy az ADAMTS13 aktivitása szignifikánsan csökkent előrehaladott májbetegségben, *Lisman és munkacsoportja* viszont nem talált összefüggést az ADAMTS13 szint és a májbetegség súlyossága között [50].

Előrehaladott cirrózisban, elsősorban az alvadási rendszer paramétereinek vizsgálata során, egyértelmű protrombotikus tendencia lehetőségét vetették fel. A háttérben álló endotél funkciózavar, szisztémás gyulladás és bakteriális fertőzések együttesen komoly szerepet játszhatnak a cirrózis rosszabbodásában [75-79]. Mivel az akut fázis reakciót kiváltó bakteriális fertőzések gyakoriak cirrótikus betegeinkben [11, 13, 14, 78], és a VWF is egy akut fázis fehérje, ezért fontos a szisztémás gyulladás és a VWF paramétereinek közötti összefüggés vizsgálata is. A korábbi hemosztázis vizsgálatok során szinte kizárólag a Child-Pugh stádiumbeosztást alkalmazták a betegek csoportosítására. Az utóbbi időben előtérbe kerülő stabil és AD cirrózis csoportosításhoz kapcsolódóan azonban, a VWF paraméterek jellemzőire, mint például az antigén szint (VWF:Ag), funkcionális aktivitás, multimer szerkezet, valamint az ADAMTS13 szintekre érdemben nincs adat.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során gyermek- és felnőtt PSC-s betegcsoportban, a bél barrier diszfunkcióját jelző szerológiai markerek előfordulási gyakoriságát akartuk vizsgálni. Célul tűztük ki ezen markerek összefüggésének vizsgálatát a betegség klinikai, illetve laboratóriumi jellemzőivel, valamint a PSC hosszútávú betegségfolyásával. Emellett terveink között szerepelt annak vizsgálata, hogy a bélkárosodás markerei összefüggésben vannak-e a bakteriális fertőzés markereivel és a nyálkahártya immunreakcióképességével.

Célul tűztük ki a VWF nagyon részletes kvantitatív paramétereinek és az óriás molekula multimer szerkezetének, illetve az ADAMTS13 antigén szint és aktivitás vizsgálatát stabil és AD miatt kórházban kezelt cirrótikus betegekben. Továbbá vérlemezke adhéziós vizsgálatot és trombin generációs teszt végzését is terveztük a betegek plazmájából. Munkánk során szeretnénk tisztázni, hogy az AD események és a leggyakrabban a háttérben álló szisztémás gyulladás milyen hatással van a VWF paraméterekre és az ADAMTS13 aktivitásra cirrótikus betegekben. Adatokat akartunk nyerni, hogy a koagulációs oldalon már igazolt protrombotikus állapothoz a vérlemezke-VWF rendszer is hozzájárul-e? Ezekben a betegekben, ugyanis ez is szerepet játszhat a cirrózis progressziójában. Végezetül azt is vizsgáltuk, hogy ezen hemosztázis paraméterek és a szisztémás gyulladást képviselő C-reaktív protein (CRP) milyen befolyással vannak a túlélésre.

BETEGEK

PSC-s betegcsoport

2006. január és 2007. december között 67, jól jellemzett, felnőtt és gyermek PSC-s beteget válogattunk be magyar hepatológiai centrumokból (Magyar Autoimmun Májbetegség Kutatócsoport) (felnőtt: 56 [férfi/nő: 40/16], medián életkor beválogatáskor: 29 év [IQR: 19-37], medián betegség időtartam: 6 év [3-12]; gyermekek: 11 [férfi/nő: 8/3], medián életkor a beválogatáskor: 10 év [IQR: 6-12], betegség időtartam: 5 [1-7]).

A vizsgálatba minden olyan felnőtt és gyermek beteget beválasztottunk, akiknél a diagnosztikus kritériumok alapján PSC igazolódott. A PSC diagnózisának felállítása klinikai, biokémiai, szerológiai és kolangiográfiás vizsgálatok (mágneses rezonancia kolangiopankreatográfia [MRCP] vagy endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfia [ERCP]), vagy, amennyiben szükséges volt, szövettani vizsgálat alapján történt [80]. Azon betegek, akiknél egyidejűleg malignus betegség is fennállt, kizárásra kerültek. A beválasztást megelőző időszakra vonatkozóan áttekintettük a betegek egészségügyi dokumentációját és a klinikai adatokat egységes formátumban rögzítettük. Meghatároztuk a beteg életkorát a diagnózis felállításkor, a betegség időtartamát, a PSC típusát – nagy, vagy kis epeutakat érinti-e –, egyidejűleg fennálló IBD-t és annak típusát, overlap szindróma fennállását, cirrózissal és portális hipertenzióval összefüggő szövődmények jelenlétét (pl. ascites, encefalopátia, nyelöcső varixok vagy varixvérzés), megelőző ortotopikus májátültetést (OLTx), rögzítettük a társbetegségeket és a gyógyszeres kezelésre vonatkozó adatokat (pl. urzodeoxikólsav, szteroid, immunszuppresszív és/vagy biológiai kezelés). A beválasztáskor meghatároztuk a módosított Mayo kockázati pontszámot [81] és standard protokollokat használva, rutin laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk.

A 67 betegből 55 volt bevonható a prospektív követéses vizsgálatba, mely 2015. december 1-jéig tartott. A tervezett, valamint soron kívüli kontroll vizitek és kórházi bennfekvések során a kezelőorvosok rögzítették a laboratóriumi adatokat, a képalkotó és endoszkópos leleteket, a gyógyszeres kezelést, a szövődmények dátumát és típusát (cirrózis, colorektális daganat, biliaris traktus daganata: epeúti karcinoma, epehólyag daganat vagy epeúti gyulladás). Az összegyűjtött adatokat egy adatbázisban tároltuk, majd a vizsgálat lezárását követően előre meghatározott szempontok szerint kiértékeltek. Kedvezőtlen kimenetelnek a májátültetést és/vagy a májbetegséggel összefüggő halálozást (kemény

végpont) tekintettük. Mindkettőt egyenlő végpontként vettük figyelembe, mivel a progresszív fibrózis eredményeképpen kialakuló végstádiumú májbetegséget jelzik. Egy adott beteg követését abban az esetben állítottuk le, ha a betegről további adat nem volt elérhető vagy kedvezőtlen esemény következett be. Azon eseteket, ahol nem máj eredetű halálozás történt, a halál bekövetkeztekor cenzoráltuk. A beválasztástól számított medián követési idő 2646 (IQR: 401-3130) nap volt.

Kontroll csoportként 153 egészséges, nem és életkor szerint illesztett egyént, valamint gasztrointesztinális kontroll csoportként 172, nem PSC-s betegből álló colitis ulcerosás betegcsoportot (férfi/nő: 79/93, medián életkor: 34 [IQR: 23-44] év) [82] választottunk.

A betegek beválasztáskori klinikai jellemzőit az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat. A PSC-s betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői

	PSC-s betegek (n=67)
Életkor a diagnózis idején (évek) ^a	25 (17 - 36)
Betegség időtartama (évek) ^a	6 (3 - 10)
Gyermekek, n (%)	10 (14,5)
Férfi nem, n (%)	49 (71,0)
Cirrózis, n (%)	14 (20,3)
Korábbi májátültetés, n (%)	4 (5,8)
IBD, n (%)	52 (75,4)
Crohn-betegség, n (%)	17 (32,7)
Colitis ulcerosa, n (%)	35 (67,3)
Overlap szindróma, n (%)	9 (13,0)
Kis epeutakat érintő PSC, n (%)	5 (7,2)
Cöliákia, n (%)	1 (1,5)
Szérum bilirubin (μmol/l) ^a	15 (11 - 22)
AST (U/l) ^a	41 (28 – 66)
ALT (U/l) ^a	52 (26 - 99)
GGT (U/l) ^a	152 (60 - 310)
ALP (U/l) ^a	524 (307 - 822)
Szérum albumin (g/l) ^a	44 (40 - 47)
INR ^a	1,0 (1,0 – 1,2)
Vérlemezke szám (G/l) ^a	252 (173 - 319)
Mayo kockázati pontszám ^a	-0,595 (-1,194 – 0,102)
Atípusos P-ANCA IgG, n (%)	57 (85,1)
EMA IgA, n (%)	1 (1,5)
EMA IgG, n (%)	1 (1,5)

^amedián, interkvartilis tartomány; IBD: gyulladásos bélbetegségek, AST: aszpartát aminotranszferáz, ALT: alanin aminotranszferáz, GGT: γ-glutamil transzferáz, ALP: alkalikus foszfatáz, INR: nemzetközi normalizált ráta, P-ANCA: perinukleáris anti-neutrofil citoplazmatikus antitest, EMA: anti-endomiziális antitest. n (%): a vizsgált paraméter tekintetében érintett betegek abszolút száma és a vizsgált betegcsoporton belüli előfordulása százalékban kifejezve.

Májcirrózisos betegcsoport

A tanulmányba 153, jól jellemzett, különböző eredetű májcirrózisos beteget választottunk be 2006. január és 2017. december között a Gasztroenterológiai Tanszékünk járó- és fekvő betegei közül (nő/férfi: 75/78, medián életkor 56 [IQR: 24-80] év).

Egyedüli beválasztási kritérium a cirrózis megléte volt, az etiológiától függetlenül. A diagnózis klinikai, biokémiai és képalkotó vizsgálatokon, valamint – amennyiben rendelkezésre állt – a májbiopszia szövettani eredményén alapult. A cirrózis etiológiája alkoholos májbetegség (n=106), krónikus B vagy C vírus hepatitisz (n=34) és egyéb ok, például PBC, AIH vagy kriptogén cirrózis (n=13) volt. A kohorsz 99 stabil járóbetegből és 54, AD epizód miatt hospitalizált egyénből állt. AD-nak tekintettük az ascites hirtelen fokozódását, a felső tápcsatornai (GI) vérzést, a hepatikus encefalopátiát (HE) vagy a bakteriális fertőzést. Az AD csoporton belül, azon eseteket, ahol ACLF alakult ki, retrospektíven elemeztük a CANONIC tanulmányban megállapított kritériumok alapján [9]. A hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegeket kizártuk, mivel ez befolyásolhatja a VWF:Ag és ADAMTS13 szinteket [83, 84]. Kizártuk továbbá azon betegeket is, akik a beválasztást megelőző 2 hétben aszpirint vagy bármilyen nem szteroid gyulladáscsökkentőt szedtek, illetve friss fagyasztott plazmát, vérátömlesztést vagy vérlemezke koncentrátumot kaptak.

A kontroll csoport 92 egészséges, nem és életkor szerint egyező önkéntesből állt [férfi/nő: 45/52, medián életkor a beválasztáskor: 50,5 év (IQR: 31,75-64)].

A betegek beválogatáskori klinikai jellemzőit az **2. táblázat**ban részletezzük.

2. táblázat. A májcirrózisos betegek epidemiológiai, klinikai és laboratóriumi jellemzői

		ST betegek n=99	AD betegek n=54	p-érték
Nem (férfi/nő)		47/52	31/23	0,240
Életkor (évek) ^a		57 (24-75)	57 (33-80)	0,698
Etiológia, n (%)	Alkohol	63 (63,6)	43 (79,6)	0,099
	Vírus	27 (27,3)	7 (13,0)	
	Egyéb	9 (9,1)	4 (7,4)	
Child-Pugh stádium, n (%)	A	51 (51,5)	6 (11,1)	<0,001
	B	43 (43,4)	24 (44,4)	
	C	5 (5,1)	24 (44,4)	
MELD pontszám		12 (9-14)	16 (12-23)	<0,001
Fehérvérsejt szám (G/l) ^a		5,3 (4,2-6,8)	7,1 (4,6-11,0)	0,003
Vérlemezke szám (G/l) ^a		112 (70-161)	108 (71-165)	0,924
Szérum nátrium (mmol/l) ^a		141 (138-143)	138 (134-141)	0,001
Szérum kreatinin (μmol/l) ^a		64 (54-84)	75 (50-133)	0,122
C-reaktív protein (mg/l) ^a		3,8 (1,5-9,0)	18,1 (6,0-48,5)	<0,001
Szérum bilirubin (μmol/l) ^a		31 (19-50)	61 (31-179)	<0,001
AST (U/l) ^a		51 (33-83)	67 (45-125)	0,002
ALT (U/l) ^a		33 (21-57)	31 (21-58)	0,887
Szérum albumin (g/l) ^a		37 (33-41)	28,5 (24-32)	<0,001
INR ^a		1,1 (1,2-1,3)	1,4 (1,2-1,7)	<0,001
Ascites jelenléte, n (%)		41 (41,4)	38 (70,0)	0,001
Akutan dekompenzált betegek, n (%)	Feszülő ascites megjelenése		25 (46,3)	n.a.
	Felső GI vérzés		17 (31,5)	n.a.
	HE		11 (20,4)	n.a.
	Bakteriális fertőzés		30 (55,6)	n.a.
6 hónapos halálozás, n (%)		4 (4,0)	17 (31,5)	<0,001

^a medián, interkvartilis tartomány; MELD: Model for End-stage Liver Disease), AST: aszpartát aminotranszferáz, ALT: alanin aminotranszferáz, INR: nemzetközi normalizált ráta, GI: gasztrointesztinális, HE: hepatikus encefalopátia. n.a.: nem alkalmazható. n (%): a vizsgált paraméter tekintetében érintett betegek abszolút száma és a vizsgált betegcsoporton belüli előfordulása százalékban kifejezve.

MÓDSZEREK

Laboratóriumi módszerek

A vérvételt követően a citráttal alvadásgátolt vérmintákat (3,2 %-os nátrium-citrát [9:1, v/v]) kétszer centrifugáltuk (2000g, 15 perc), majd a felülúszókat egyenlő adagokban gyorsfagyasztottuk és felhasználásig -70 °C fokon tároltuk.

A bél barrier funkció szerológiai markereinek, a lipopoliszacharid (LPS) terheltség és az anti-mikrobiális antitestek meghatározásához kereskedelmi forgalomban kapható enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatot (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay [ELISA]) használtunk a gyártó használati utasítása szerint. Az egyes markerek pozitív cut-off értékét vagy a gyártó javaslata alapján, vagy az egészséges kontrollok 95 percentilis értékében határoztuk meg, az abszolút értékeket átlagoltuk.

A bél barrier funkció megítélésére az AAA és az AGA elleni IgA illetve IgG típusú antitestek (QUANTA Lite[®]; INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) kimutathatóságát vizsgáltuk, valamint meghatároztuk az I-FABP (Hycult Biotechnology, Uden, Hollandia) szintjét is. A pozitív cut-off érték az AAA és az AGA mindkét típusa esetén 35 és 25 U volt.

Megmértük a LPS expozíció markereként jellemzett LBP szintjét és vizsgáltuk az endotoxin mag IgA antigén (EndoCAb IgA) (Hycult Biotechnology, Uden, Hollandia) jelenlétét. A pozitív cut-off érték az EndoCAb IgA esetén 195 U/ml volt.

Az anti-mikrobiális antitestek közül az anti-OMP Plus antitestet (QUANTA Lite[®], Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA) vizsgáltuk. Ez a teszt antigénként egy Gram-pozitív illetve egy Gram-negatív bélbaktériumból származó fehérjét használ, és ezen fehérjék ellen termelt IgA antitestet mutatja ki. A felhasznált bélbaktériumok egyike sem tartozik a Proteobaktériumok törzsébe, melynek az Escherichia coli is a tagja. A pozitív cut-off érték a gyártó ajánlásának megfelelően 25 U volt.

Az autoimmun májbetegségek és a cöliákia elkülönítő diagnosztikájának részeként vizsgáltuk az atípusos P-ANCA és az endomízium elleni antitesteket (EMA), kereskedelmi forgalomban elérhető indirekt immunofluoreszcens teszt (IIF) segítségével, a gyártó útmutatása szerint. Az atípusos P-ANCA (IgA és IgG) és EMA (IgA és IgG) antitesteket az IIF (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Németország) speciális fluoreszcens mintázata esetén tekintettük pozitívnak, $\geq 1:32$ vagy 1:10 hígításnál, a gyártó

ajánlása szerint [35, 82].

A C-reaktív protein (CRP) szintjét az Integra 700 automata rendszerrel (Roche, Basel, Svájc) határoztuk meg. Cut-off értéknek a 10 mg/l értéket használtuk, mivel korábban ez bizonyult az infekciómentes túlélés legpontosabb előrejelzőjének [78].

A VWF:Ag szint méréséhez ELISA-t alkalmaztunk, VWF elleni poliklonális antitestet használva a lefedéshez és ennek torna peroxidázzal jelölt termékét a detektáláshoz (Dako, Glostrup, Dánia) [85].

A VWF-kollagén kötő aktivitást (VWF:CB) szintén ELISA módszerrel, az alábbiaknak megfelelően határoztuk meg. A fedéshez humán, III. típusú kollagént (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk, 20 µg/ml nátrium foszfáttal puffert (PBS), 7,4 pH-jú sóoldatban, melyet 3% (w/v)-os kazein tartalmú PBS-sel blokkoltunk 30 percig szobahőmérsékleten. A következő lépés 0,1%-os Tween-20 tartalmú PBS-sel (PBS-T) történő mosás volt. A lemezeket ezt követően szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 órán át az egyes lyukakhoz hozzáadott 100 µl, PBS-T-vel hígított (1:1000 hígítás) plazmával. A kollagénhez kötött VWF mennyiségét a VWF:Ag méréshez is használt, torna peroxidázzal fedett VWF elleni poliklonális antitesttel (Dako) állapítottuk meg, az antitesttel történő inkubáció 1 órán át történt. Peroxidáz szubsztrát, majd 2 M H₂SO₄ hozzáadásával leállítottuk a reakciót, az optikai denzitást (OD) pedig Infinite 200 M olvasóval (Tecan TradingAG, Männedorf, Svájc) mértük le. A VWF:Ag és VWF:CB méréseket párhuzamosan végeztük ugyanazon plazmahígításokat használva. A módszerek kalibrálásához a WHO 2. Nemzetközi Standard von Willebrand Faktor Koncentrátumot (NIBSC kód: 09/182) használtuk (NIBSC, UK) [86].

A VWF risztocetin kofaktor aktivitás (VWF:RCo) liofilizált vérlemezkéket tartalmazó Risztocetin reagenssel (Helena BioSciences, Sunderland, UK) határoztuk meg Chrono-Log 810-CA lumiaggregométerben (Chrono-log, Havertown, PA, USA).

A VWF propeptid (VWFpp) szintet ELISA kit segítségével mértük meg CLB-Pro 35 és CLB-Pro 14.3 egér antitest pár klónokat (Cell Sciences, Canton, MA, USA) használva, a gyártó utasítása szerint.

Az ADAMTS13 aktivitást Fluoreszcein Rezonancia Energia Transzfer (FRET) analízissel állapítottuk meg [87], TECHNOZYME[®] ADAMTS-13 kitet (Technoclone, Vienna, Ausztria) használva, a gyártó utasítása szerint.

Az ADAMTS13 antigén szinteket ELISA-val mértük meg, ahogyan azt korábban *Feys és mtsai.* publikálták [74]. A poolozott normál plazmában lévő ADAMTS13 antigén szintet vettük 100%-nak.

A VWF multimeranalízisét *Udvardy és mtsai.* által használt módszer szerint végeztük [88]. A VWF multimereket nátrium-dodecilszulfát (SDS) 0,8%-os és 0,65%-os agaróz gélelektroforézissel választottuk szét, melyet Western-blot követett. A sávokat torma peroxidázzal jelölt, VWF elleni poliklonális antitesttel (DakoCytomation, Glostrup, Dánia) és 3,3'-diaminobenzidin szubsztráttal (DAB) (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Németország) tettük láthatóvá. Az első 5 sávot kis-, a 6-10 közöttieket közepes-, a 10 fölöttieket, beleértve azt a részt is, ahol a VWF már nem képez sávokat, nagy MWM-eknek tekintettük, ahogyan azt korábban ismertették [67]. A 0,8%-os agaróz géleken a sávokat GS-800 kalibrált denzitométerrel digitalizáltuk és a denzitométer QuantityOne szoftverével dolgoztuk fel (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). A sávok három csoportjának arányát a görbe alatti területből (Area Under the Curve, [AUC]) számolva kaptuk. Az AUC összértéke minden esetben 1,0 volt. Minden egyes multimer csoportban, a kis-, közepes- és nagy MWM-ek relatív arányát megszorozva a teljes VWF:Ag szinttel, meghatároztuk a VWF abszolút mennyiségét. Továbbá, a HMWM-en belül minden mintát vizuálisan is elemeztünk a 0,65%-os agaróz géleken az ULMWM-ek jelenlétére vonatkozóan, mivel azt találtuk, hogy ez még megbízhatóbb, mint a 0,8%-os agaróz gél. ULMWM-ként definiáltuk azon nagy molekulásúlyú multimer sávokat, amelyek nem láthatók a kontrollokban [67].

A plazma vérlemezke adhéziós képességének méréséhez 10 ST, 10 AD beteg és 10 kontroll egyén plazmáját vizsgáltuk áramlási viszonyok között, helyreállított vért használva [89]. A helyreállított vér sejtes elemei egészséges, O-ás vércsoportú donorokból származtak. Az adhéziós vizsgálat a vérvételt követő 2 órán belül megtörtént. A még nem bevont polisztirol felszínre történő vérlemezke adhéziót Impact-R un. Cone and Plate Analizátorral (CPA, DiaMed, Svájc) végeztük [90]. A vérlemezke adhézió mennyiségi meghatározásához savi foszfataz próbát használtunk [91]. A módszer részletei a következők: a citrátos vért lecentrifugáltuk, hogy trombocita dús plazmát kapjunk (platelet rich plasma [PRP], 150g, 10 perc, 25°C). Mind a szeparált PRP-t, mind a vér megmaradt frakcióját tovább centrifugáltuk, hogy trombocita szegény plazmát (platelet poor plasma [PPP]) nyerjünk (2000g, 10 perc, 25°C). A PPP eltávolítását követően, a sejtes elemeket 0,0129 M nátrium citrátot, 0,005 M D-glükózt és 40 g/l marha szérum albumint (szuszpenziós puffer [SP]) tartalmazó HEPES pufferelt sóban, az eredeti vértérfogatra hígítottuk. Minden egyes kísérlethez egyenlő

adagokat pipettáztunk az Eppendorf csövekbe, hogy a 0,14 ml végső volumenű helyreállított vérben elérjük a 200 G/l vérlemezke számot és a 0,37 hematokrit értéket. Egy mosási lépést követően (centrifugálás 2000g, 10 perc, 25°C), a felülszót eltávolítottuk és a sejteket 0,14 ml volumenre hígítottuk különböző citrátikus vagy kontroll plazmával. A reagenseket a Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Németország) cégtől vásároltuk. Az adhéziohoz ebből a helyreállított vérből 0,13 ml-t pipettáztunk a csövekbe és 1800/s nyíró sebességnek tettük ki 2,5 percig. A CPA minden csövét 5 alkalommal finoman kimostuk PBS-el, hogy eltávolítsuk a nem kötődött vérlemezkéket és a vér minden egyéb elemét. A lekötődött vérlemezkéket 0,2 ml, savi foszfátáz szubsztrát tartalmú lízis pufferrel lizáltuk, mely az alábbi összetevőkből állt: 0,1 M citrát-foszfát puffer (pH 5,4), 0,1 % Triton X-100, 0,01 M p-nitrofenol foszfát. A csöveket 37°C-os nedves kamrában, 1 órán keresztül inkubáltuk, folyamatos forgatás közben. Az enzimreakció leállításához ezen keverékből 0,15 ml-t adtunk 0,05 ml 2N NaOH-hoz egy 96 lyukú lemezre. A kapott színt 405/545 nm-en olvastuk be, a kötődött vérlemezkek számát pedig a standard görbe segítségével számoltuk ki, melyet párhuzamosan készítettünk az eredeti vérlemezke oldat felhasználásával. Az adhéziora vonatkozó, ún. intra-assay variációs együttható 12% volt.

A trombin generációs teszthez (TGA) a citrátos vérmintákat a vérvételt követően lecentrifugáltuk (3200g, 20°C, 15 perc). A plazmát összegyűjtöttük és újra lecentrifugáltuk (3200g, 10 perc), majd a felülszót egyenlő adagokban tároltuk -70°C-on. A vizsgálatot 3 héten belül elvégeztük. Az egyes adagokat 37°C-os vízfürdőben felolvasztottuk, 5 másodpercig összekevertük, ezt követően pedig azonnal 96 lyukú lemezre helyeztük (Greiner GmbH, Németország). A TGA-t Technothrombin TGA kittel végeztük, fluoreszcens szubsztráttal és C reagenssel (50 pM szöveti faktor [tissue factor, TF] és foszfolipid kis koncentrációban), a gyártó útmutatása szerint. Az olvasót, a lemezt a plazmával és a reagens/szubsztrát keveréket 37°C-ra melegítettük, majd 0,04 ml plazmához 0,06 ml reagens/szubsztát keveréket adtunk. Az enzimreakciót a TF indította be 5 pM végső koncentrációnál, az eredményt pedig egy BIOTEK Flx800 olvasóval kaptuk meg. A fluoriméterrel mért relatív fluoreszcens egységeket csúcs trombin koncentrációba alakítottuk át (nM). A referencia görbét a WHO trombin referencia készítményével szemben kalibrált trombin standard segítségével készítettük. A TGA lemezeket, az olvasót és szoftvert a Technoclone GmbH-től szereztük be.

Statisztikai elemzés

A változókat Shapiro-Wilk W teszttel vizsgáltuk. A folyamatos változókat medián formában (interquartilis tartomány [IQR], 25-75 percentilis tartomány) összegeztük. A kategorikus változók összehasonlításához Fisher-féle tesztet vagy χ^2 próbát alkalmaztunk, szükség esetén Yates-féle korrekcióval. A folyamatos változókat Mann-Whitney U teszttel vagy Kruskal-Wallis H teszttel hasonlítottuk össze Dunn-féle többszörös összehasonlító post hoc analízissel. A változók közötti összefüggések meghatározásához Spearman-féle nonparametrikus rangkorrelációs tesztet alkalmaztunk. Annak megítélésére, hogy a túlélők és nem-túlélők milyen pontosan különíthetők el egymástól, a ROC (Receiver Operating Characteristic) görbét használtuk. Meghatároztuk a görbe alatti területet és a hozzá tartozó 95%-os megbízhatósági tartományt (confidence interval [CI]), valamint Youden-index segítségével azt a küszöbértéket, mely a legpontosabban képes elkülöníteni a vizsgálati csoportokat egymástól. A májcirrózisos betegeknél a 6 hónapos túlélés kumulatív valószínűségének becslésére illetve a PSC-s betegcsoportban a szerológiai antitestek és a kedvezőtlen betegségkimenetel (OLTx és/vagy májbetegséggel összefüggő halálozás) közötti összefüggés meghatározásához Kaplan-Meier analízist használtunk. A megfigyelt túlélésbeli különbségeket log-rank teszttel határoztuk meg. A kategorikus változók illetve szerológiai antitestek és a követési idő alatti kedvezőtlen betegségkimenetel összefüggését egyváltozós Cox-regresszióval vizsgáltuk. A Mayo kockázati pontszám pontosításához többváltozós analíziseket illetve PSC fennállása esetén lineáris regressziót végeztünk. Az összefüggéseket kockázati hányados (hazard ratio [HR]) formájában, 95%-os CI-mal adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a 0,05 alatti kétoldalas valószínűségi értéket tekintettük. Az adatok statisztikai elemzéséhez és grafikus ábrázolásához az SPSS Statistics (V.22.0/24.0, IBM, Armonk, NY, USA) és a Prism (V.6, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) programokat használtuk.

ETIKAI ENGEDÉLYEK

A vizsgálati protokollokat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Nemzeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (DEOEC-RKEB/IKEB 5306-9/2011, 3515-2011, 3885/2012/EKU [60/PI/2012], 3880/2012/EKU [59/PI/2012]) elfogadta. A betegek előzetesen megfelelő tájékoztatást kaptak a vizsgálatok természetéről, majd az adott tanulmányban való részvételhez írásos beleegyezésüket adták.

EREDMÉNYEK

A bél barrier funkció biomarkerei PSC-ben és ezek összefüggése a PSC klinikai és laboratóriumi jellemzőivel

Az AAA és AGA IgA és IgG izotípusok gyakoriságát PSC-ben illetve egészséges véradókat és colitis ulcerosás, de nem PSC-s betegeket magában foglaló kontroll csoportokban a **3. táblázat**ban összesítettük. Az AAA és AGA IgA vagy IgG izotípus a PSC-s betegek 40,3%-ában (27/67) és 22,4%-ában (15/67) volt pozitív. Az antitest prevalencia szignifikánsan magasabb volt, mind a colitis ulcerosás betegekhez (14,7% [25/170], $p < 0,001$ az AAA és 11,6% [20/172], $p = 0,042$ az AGA esetében), mind az egészséges kontrollokhoz (6,2% [7/113], $p < 0,001$ az AAA és 7,2% [11/153], $p = 0,003$ az AGA esetén) viszonyítva. Az AGA pozitivitás főleg IgG izotípusú (9% vs. 20,9%) volt, míg az AAA esetén IgA és IgG izotípus egyaránt előfordult (28,4% vs. 25,4%) és nem volt szignifikáns átfedés az adott antitest IgA és IgG szubtypusai között. Hasonlóan, az AAA és AGA között sem volt megfigyelhető szignifikáns átfedés. Ezen antitestek bármelyik típusára pozitív PSC-s betegek csupán 10,4%-a (7/67) rendelkezett mind AAA (IgA vagy IgG), mind AGA (IgA vagy IgG) antitestekkel is.

3. táblázat. A bél sérülés biomarkereinek pozitivitása PSC-s betegekben illetve az egészséges és beteg kontroll csoportokban

	PSC (n=67)		UC (n=172)			HC (n=153)		
	%	n	%	n	p-érték*	%	n	p-érték*
AAA								
IgA	28,4%	19	11,2%	19	0,003	4,4%	5	<0,001
IgG	25,4%	17	4,1%	7	<0,001	2,7%	3	<0,001
IgA vagy IgG	40,3%	27	14,7%	25	<0,001	6,2%	7	<0,001
IgA és IgG	13,4%	9	0,6%	1	<0,001	0,9%	1	0,001
AGA								
IgA	9,0%	6	3,5%	6	0,101	2,6%	4	0,071
IgG	20,9%	14	8,7%	15	0,014	5,9%	9	0,002
IgA vagy IgG	22,4%	15	11,6%	20	0,042	7,2%	11	0,003
IgA és IgG	7,5%	5	0,6%	1	0,007	1,3%	2	0,029

PSC: primer szlerotizáló kolangitisz, UC: colitis ulcerosa, HC: egészséges kontroll, AAA: anti-F-aktin antitest, AGA: anti-gliadin antitest. n: a vizsgált paraméter tekintetében érintett betegek abszolút száma, %: az érintett antitestre pozitív betegek előfordulása a vizsgált betegcsoporton belül százalékban kifejezve.

AAA IgA/G-t 170 UC-s betegnél és 113 egészséges kontroll egyénél mértük meg.

* A p-értékek a PSC és az adott kontroll csoport közötti összehasonlításra vonatkoznak.

Az antitest státuszuk alapján elemeztük a PSC-s betegek klinikai és laboratóriumi jellemzőit és az eredményeket a **4-5. táblázatban** foglaltuk össze.

4. táblázat. A bél sérülés biomarkereinek (AAA) és a PSC-s betegek beválasztáskori betegség- és laboratóriumi jellemzőinek összefüggése

	AAA IgA			AAA IgG		
	Negatív (n=48)	Pozitív (n=19)	p-érték	Negatív (n=50)	Pozitív (n=17)	p- érték
% (n)						
Férfi nem	72,9% (35)	68,4% (13)	0,713	76,0% (38)	58,8% (10)	0,175
Cirrózis fennállása	16,7% (8)	26,3% (5)	0,368	18,0% (9)	23,5% (4)	0,618
IBD fennállása	75% (36)	78,9% (15)	0,733	80,0% (40)	64,7% (11)	0,201
Medián, IQR						
Életkor a diagnóziskor (évek)	23 (17 - 33)	26 (18 - 37)	0,713	25 (17 - 37)	20 (11 - 31)	0,220
Betegség élettartam (évek)	6 (3 - 8)	7 (2 - 12)	0,240	6 (4 - 10)	6 (1 - 9)	0,219
Szérum bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	15 (11 - 20)	14 (11 - 37)	0,704	15 (11 - 20)	13 (10 - 22)	0,705
AST (U/l)	35 (25 - 56)	55 (37 - 94)	0,006	36 (27 - 56)	44 (34 - 85)	0,182
ALT (U/l)	46 (21 - 92)	65 (45 - 165)	0,030	50 (25 - 97)	55 (32 - 165)	0,532
GGT (U/l)	142 (45 - 269)	193 (112 - 478)	0,041	153 (63 - 305)	153 (60 - 420)	0,748
ALP (U/l)	406 (253 - 643)	1198 (595 - 1766)	<0,001	469 (268 - 734)	715 (507 - 1496)	0,040
Szérum albumin (g/l)	44 (42 - 46)	39 (38 - 47)	0,020	44 (40 - 46)	43 (39 - 47)	0,442
Vérlemezke szám (G/l)	238 (181 - 292)	315 (162 - 494)	0,212	235 (175 - 274)	320 (162 - 466)	0,066
Mayo kockázati pontszám	-0,834 (-1,378 - -0,131)	0,021 (-0,554 - 1,248)	0,016	-0,62 (-1,142 - 0,102)	-0,226 (-1,578 - 0,292)	0,623

AAA: anti-F-aktin antitest, AGA: anti-gliadin antitest, IBD: gyulladásos bélbetegségek, IQR: interkvartilis tartomány AST: aszpartát aminotranszferáz, ALT: alanin aminotranszferáz, GGT: γ -glutamil transzferáz, ALP: alkalikus foszfatáz. n: a vizsgált paraméter tekintetében érintett betegek abszolút száma, %: az érintett antitestre pozitív betegek előfordulása a vizsgált betegcsoporton belül százalékban kifejezve.

5. táblázat. A bél sérülés biomarkereinek (AGA) és a PSC-s betegek beválasztáskori betegség- és laboratóriumi jellemzőinek összefüggése

	AGA IgA			AGA IgG		
	Negatív (n=61)	Pozitív (n=6)	p- érték	Negatív (n=53)	Pozitív (n=14)	p- érték
% (n)						
Férfi nem	72,1% (44)	66,7% (4)	0,777	69,8% (37)	78,6% (11)	0,518
Cirrózis fennállása	18% (11)	33,3% (2)	0,366	18,9% (10)	21,4% (3)	0,829
IBD fennállása	77% (47)	66,7% (4)	0,569	75,5% (40)	78,6% (11)	0,809
Medián, IQR						
Életkor a diagnóziskor (évek)	23 (17 - 35)	23 (18 - 29)	0,925	23 (17 - 37)	22 (17 - 29)	0,502
Betegség élettartam (évek)	6 (3 - 9)	9 (1 - 12)	0,76	6 (3 - 8)	6 (2 - 17)	0,506
Szérum bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	14 (10 - 22)	17 (16 - 21)	0,216	15 (11 - 23)	17 (12 - 20)	0,813
AST (U/l)	39 (28 - 61)	41 (34 - 48)	0,861	42 (28 - 61)	35 (25 - 55)	0,524
ALT (U/l)	52 (25 - 100)	44 (37 - 52)	0,294	54 (32 - 111)	42 (24 - 65)	0,188
GGT (U/l)	154 (60 - 310)	140 (93 - 305)	0,943	160 (54 - 310)	126 (88 - 305)	0,895
ALP (U/l)	524 (312 - 784)	1204 (307 - 1299)	0,336	507 (326 - 746)	652 (268 - 1204)	0,394
Szérum albumin (g/l)	44 (40 - 47)	39 (39 - 42)	0,21	44 (40 - 46)	43 (39 - 47)	0,726
Vérlemezke szám (G/l)	248 (165 - 316)	274 (232 - 494)	0,292	253 (165 - 316)	241 (187 - 356)	0,751
Mayo kockázati pontszám	-0,595 (-1,194 - 0,102)	0,021 (-0,843 - 1,327)	0,429	-0,579 (-1,102 - 0,174)	-0,651 (-1,194 - 0,021)	0,762

AAA: anti-F-aktin antitest, AGA: anti-gliadin antitest, IBD: gyulladásos bélbetegségek, IQR: interkvartilis tartomány AST: aszpartát aminotranszferáz, ALT: alanin aminotranszferáz, GGT: γ -glutamil transzferáz, ALP: alkalikus foszfatáz. n: a vizsgált paraméter tekintetében érintett betegek abszolút száma, %: az érintett antitestre pozitív betegek előfordulása a vizsgált betegcsoporton belül százalékban kifejezve.

Az immunoglobulin szubtypusok szerinti AAA antitest státusz nem függött össze a nemmel, a fiatal életkorban történő diagnózissal, a cirrózis jelenlétével, vagy együttesen fennálló IBD-vel. A biokémiai laboratóriumi paraméterek értéke és a Mayo kockázati pontszám alapján azonban IgA izotípusú AAA jelenlétében szignifikánsan magasabb volt a súlyosabb betegség fennállása. IgG izotípusú AAA esetében csak egy összefüggésről tudunk beszámolni, mégpedig az ALP medián szintje az antitest pozitív esetekben szignifikánsan magasabb volt az antitest negatív esetekhez viszonyítva (715 vs. 493 U/L, $p=0,048$). A különböző AGA izotípusok nem mutattak összefüggést a súlyosabb fenotípusú PSC klinikai vagy laboratóriumi jellemzőivel.

Az AAA IgG jelenléte magasabb volt az átfedő AIH-es betegekben (55,6% [5/9] vs. 20,7% [12/58], $p=0,040$), mint akiknél ez nem állt fenn. Ezzel szemben, az AAA IgA gyakorisága nem különbözött a két csoportban (33,3% [3/9] vs. 27,6% [16/58], $p=0,706$).

A bél sérülés markereinek jelentősége a progresszív betegség lefolyás kockázatának vonatkozásában PSC-ben

A követéses időszak alatt vastagbélrák 2 betegnél, epeúti daganat 1 betegnél alakult ki. 9 betegnek volt legalább egy alkalommal kolangitiszes epizódja. 7 beteg esett át májtranszplantáción. 5 beteg hunyt el májbetegség okozta szövődmények miatt. Kemény végpont (májátültetés és/vagy máj eredetű halálozás) 9 betegnél fordult elő. Egy beteg akut miokardiális infarktus következtében hunyt el, ezt az esetet a halál időpontjában cenzoráltuk.

Elemeztük a klinikai változók és az AAA illetve az AGA különböző izotípusai közötti összefüggést.

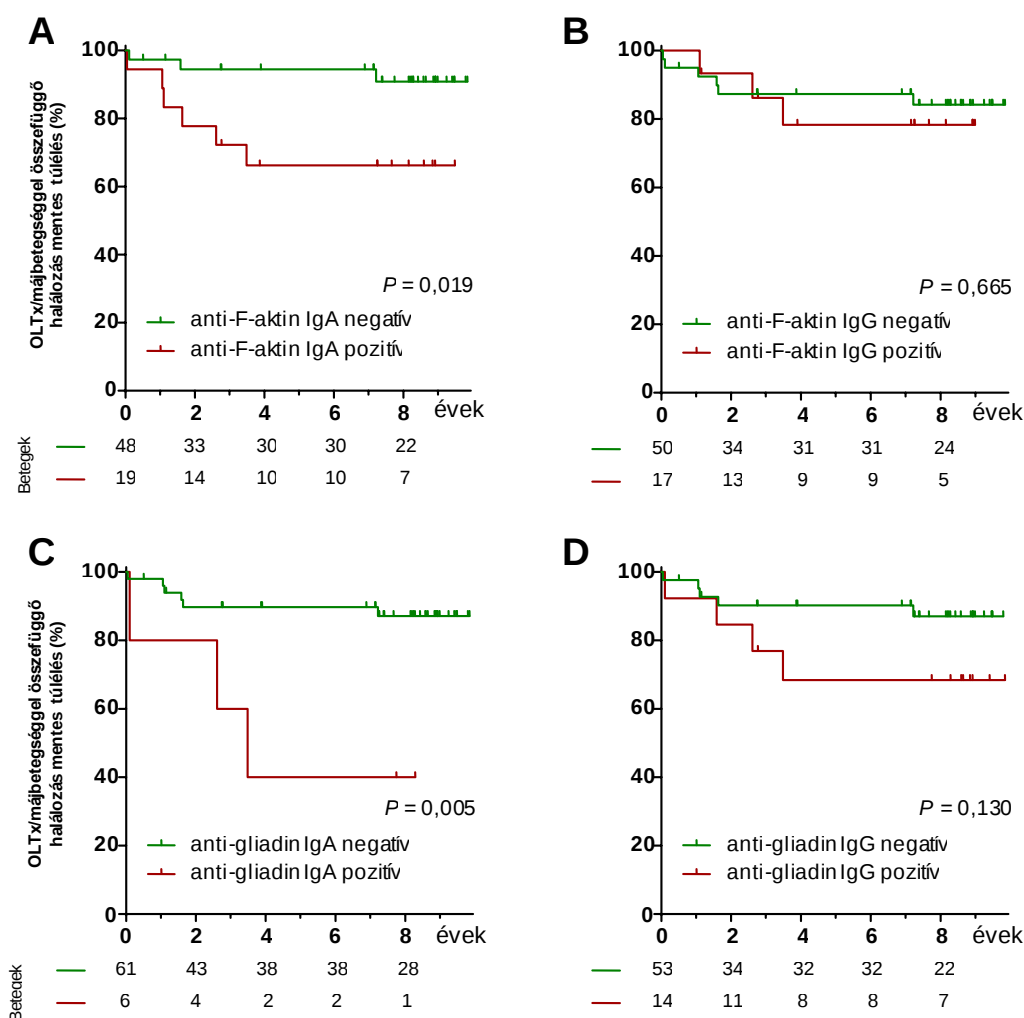
Kaplan-Meier analízis során, a májátültetésig és/vagy máj eredetű halálozásig eltelt medián idő 578 nap (IQR: 212-1112) volt. A gyorsabb betegség lefolyás szignifikáns összefüggést mutatott a cirrózis meglétével és a magasabb Mayo kockázati pontszámmal ($p\text{LogRank}=0,040$ és $<0,001$), a nemmel ($p=0,547$), a diagnóziskori életkorral ($p=0,845$), a betegség lokalizációjával ($p=0,548$) vagy egyidejűleg fennálló IBD-vel ($p=0,762$) azonban nem.

Az AAA és AGA IgA izotípus pozitivitása ($p\text{LogRank}=0,019$ és $0,005$) előrevetítette a májátültetést és/vagy a májjal összefüggő halálozást (**1. ábra**), ezen antitestek IgG izotípusa ($p\text{LogRank}=0,665$ és $0,130$) viszont nem. Ennek megfelelően, az egyváltozós Cox regressziós

analízis szerint az AAA IgA és az AGA IgA pozitívitas a kedvezőtlen betegség kimenetel prediktora (HR: 4,54 [1,14-18,18], $p=0,032$ és 5,83 [1,45-23,41], $p=0,013$). További elemzés során az AAA és az AGA IgA a cirrózis meglétéhez való igazítást követően is a betegségprogresszió szignifikáns prediktora maradt (HR: 5,15 [1,27-20,86], $p=0,022$ és 5,07 [1,25-20,54], $p=0,023$). Kissé gyengébb statisztikai szignifikanciával, de hasonló eredmények voltak megfigyelhetők az AAA IgA pozitívitas esetén is (HR: 4,24 [0,99-18,21], $p=0,052$), azonban a Mayo kockázati pontszámhoz való igazítást követően a szignifikáns összefüggés eltűnt az AGA IgA pozitívitas esetében (3,67 [0,88-15,30], $p=0,074$).

1. ábra. Progresszív betegséglefolyás, primer szklerotizáló kolangitiszben (PSC) a különböző, bél károsodással összefüggő szerológiai antitestek jelenlétének függvényében.

Az anti-F-Aktin IgA (A) vagy anti-gliadin IgA (C) pozitívitas mutató betegeknél magasabb volt a betegségprogresszió (=májátültetés szükségessége és/vagy halál) kumulatív valószínűsége, mint az antitestekre negatív betegeknél. Ezen antitestek IgG izotípusai nem mutattak összefüggést a progresszív betegséglefolyással (B,D).



A bakteriális transzlokáció és enterocita károsodás markereinek szerepe a progresszív betegséglefolyás kockázatának vonatkozásában PSC-ben

Következő lépésként, a bakteriális transzlokáció és enterocita károsodás különböző szerológiai markereit vizsgáltuk. Azon betegeknek, akiknél AAA IgA pozitívítás volt kimutatható, szignifikánsan magasabb EndoCAb IgA titerük (medián [IQR]: 123 [93-215] vs. 58 [40-92] U, $p < 0,001$) volt, gyakoribb volt az anti-OMP Plus IgA antitest előfordulása (36,8% vs. 10,6%, $p = 0,012$), és szignifikánsan magasabb az enterocita károsodás marker I-FABP szintje is (medián [IQR]: 365 [203-1079] vs. 166 [90-365] pg/mL, $p = 0,011$). Az LBP azonban nem különbözött az AAA IgA pozitív és negatív betegekben. Az AAA IgG illetve az AGA bármelyik izotípusa esetén egyéb, statisztikailag szignifikáns összefüggést nem találtunk (összefoglalva a 6-7. táblázatban).

6. táblázat. A bakteriális transzlokáció és enterocita károsodás markereinek szérum szintje az AAA státuszának függvényében

	AAA IgA			AAA IgG		
	Negatív (n=48)	Pozitív (n=19)	p- érték	Negatív (n=50)	Pozitív (n=17)	p- érték
Median, IQR						
LBP (µg/L)	7132 (5150 - 9806)	7374 (4348 - 12100)	0,931	7377 (5795 - 9880)	6847 (3828 - 13300)	0,852
EndoCAb IgA (U)	58 (40 - 92)	123 (93 - 215)	<0,001	68 (49 - 97)	113 (52 - 150)	0,195
OMP Plus IgA (U)	10,6% (5)	36,8% (7)	0,012	22% (11)	6,3% (1)	0,155
I-FABP (pg/mL)	166 (90 - 365)	365 (203 - 1079)	0,011	199 (143 - 513)	300 (90 - 365)	0,794

LBP: lipopoliszacharid (LPS)-kötő fehérje, EndoCAb: endotoxin mag antitest, I-FABP: intesztinális zsírsav-kötő fehérje, IQR: interkvartilis tartomány. n: a vizsgált paraméter tekintetében érintett betegek abszolút száma.

7. táblázat. A bakteriális transzlokáció és enterocita károsodás markereinek szérumszintje az AGA státuszának függvényében

	AGA IgA			AGA IgG		
	Negatív (n=61)	Pozitív (n=6)	p- érték	Negatív (n=53)	Pozitív (n=14)	p- érték
Median, IQR						
LBP (µg/L)	6959 (5044 - 9806)	11450 (5836 - 15200)	0,239	6959 (4951 - 9806)	8090 (6077 - 12700)	0,274
EndoCAb IgA (U)	70 (43 - 106)	134 (66 - 241)	0,079	70 (43 - 112)	94 (52 - 150)	0,301
OMP Plus IgA (U)	20% (12)	0% (0)	0,226	21,2% (11)	7,1% (1)	0,228
I-FABP (pg/mL)	216 (99 - 443)	342 (143 - 942)	0,642	195 (99 - 379)	342 (179 - 1020)	0,092

LBP: lipopoliszacharid (LPS)-kötő fehérje, EndoCAb: endotoxin mag antitest, I-FABP: intesztinális zsírsav-kötő fehérje, IQR: interkvartilis tartomány. n: a vizsgált paraméter tekintetében érintett betegek abszolút száma.

A cirrózisos betegek általános jellemzői

A bevásztott 99 ST beteg közül, 51 Child-Pugh A stádiumú, 43 Child-Pugh B és 5 Child-Pugh C stádiumú volt. A bevásztás időpontjában 10 betegnél stabil krónikus veseelégtelenség volt ismert, 135-329 µmol/l közötti kreatinin szinttel. Az 54 AD beteg többségének előrehaladott cirrózisa volt, Child-Pugh B/C stádium. Hat betegnél azonban csak Child-Pugh A cirrózis volt ismert, de mindegyikükön felső GI vérzés volt észlelhető. Az 54 AD beteg közül 30 betegnél jelentkezett bakteriális fertőzés. Közülük 17 betegnek feszülő ascitese volt, HE-t 5 betegnél észleltünk, felső GI vérzés pedig 5 betegben jelentkezett. A 24 AD betegből, akiknek nem volt bakteriális fertőzése, 12 betegnél felső GI vérzés, 8 betegnél feszülő ascites, 6 betegnél HE volt az AD vezető oka. Az 54 AD beteg közül 28 esetben

egynél több esemény is volt egyidejűleg. ACLF-t 17 betegnél észleltünk, 10 betegben 1. stádiumú, 5 betegben 2. stádiumú, 2 betegben 3. stádiumú volt.

VWF:Ag és funkcionális aktivitási szintjei

Cirrózisban a VWF:Ag, VWF:RCo szint és a VWF:CB aktivitás magasabb volt az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (**2A-C. ábra**). Az AD betegeknek a ST betegekhez képest még magasabb értékei voltak (VWF:Ag %_{AD vs. ST}: 371 [275-513] vs. 269 [228-323], $p=0,003$; VWF:RCo %_{AD vs. ST}: 180 [148-294] vs. 148 [128-192], $p=0,035$ és VWF:CB_{AD vs. ST}: 335 [245-405] vs. 201 [156-269], $p=0,001$).

Noha a VWF mindkét típusú funkcionális aktivitása fokozott volt mindkét betegcsoportban, nem érték el a VWF:Ag szintjét. A VWF:RCo/VWF:Ag arány a kontroll csoportban 0,84 (0,72-0,98) volt, míg a cirrótikus csoportokban alacsonyabb, ST betegekben 0,55 (0,48-0,70), AD betegekben 0,53 (0,41-0,72) volt (**2E. ábra**). A VWF:CB/VWF:Ag arány szintén csökkent volt a két cirrótikus csoportban. ST betegekben 0,79 (0,65-0,93), AD betegekben 0,83 (0,73-0,93), míg a kontrollokban 0,92 (0,85-1,00) értéket kaptunk (**2F. ábra**).

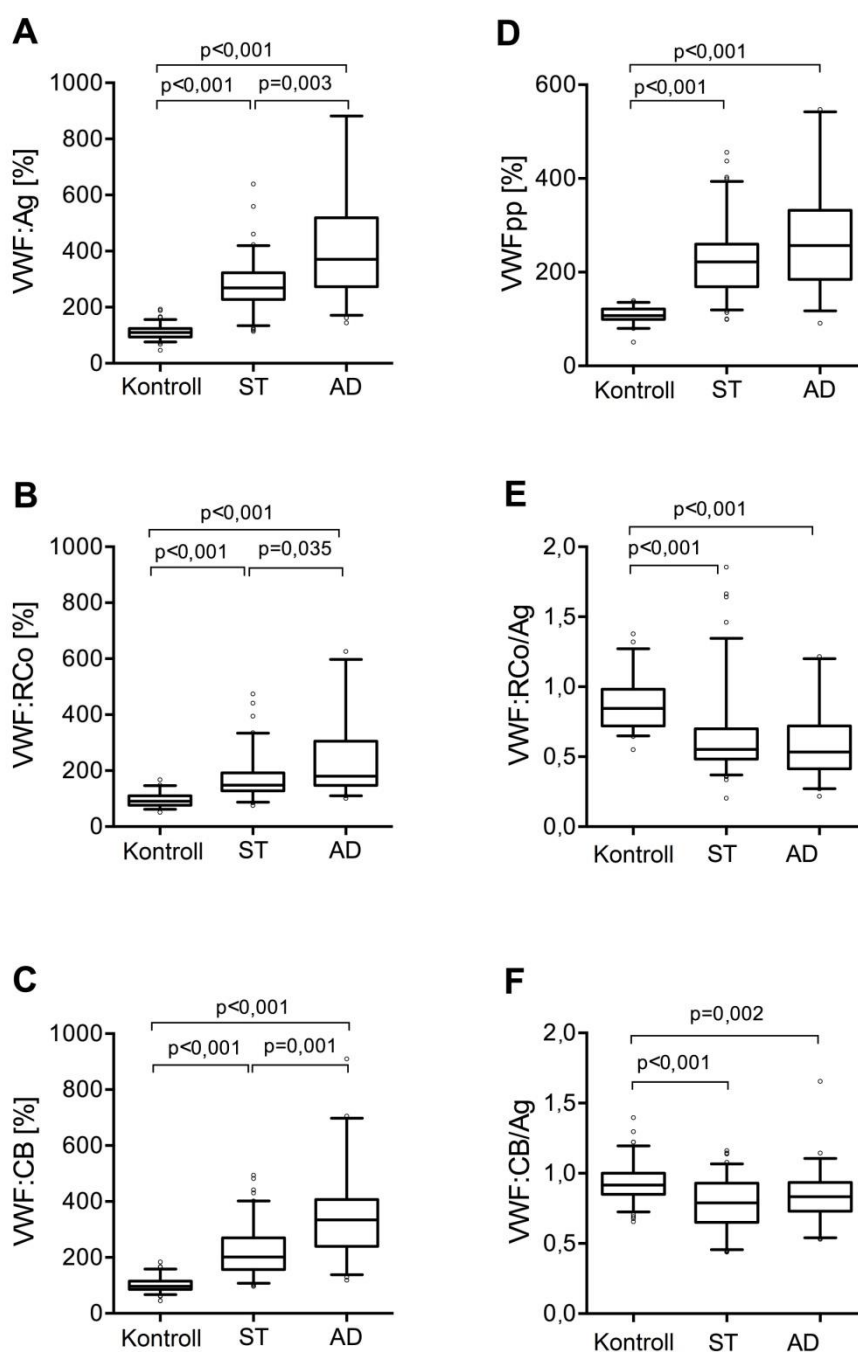
Májcirrózisban mérsékelt korrelációt találtunk a VWF:Ag és VWF:RCo ($r=0,521$, $p<0,001$), míg erős korrelációt a VWF:Ag és VWF:CB ($r=0,835$, $p<0,001$) illetve a VWF:CB és VWF:RCo ($r=0,619$, $p<0,001$) között.

A VWFpp szintje mindkét cirrótikus csoportban magasabb volt a kontroll csoporthoz képest (**2D. ábra**). A ST csoportban 222 (169-260)%-os, az AD betegekben 257 (196-323)%-os, míg a kontrollokban 108 (99-121)%-os értékeket mértünk.

A VWF:Ag szintek az AD csoporton belül szignifikánsan különböztek azon betegek között, akiknél ACLF is jelen volt (475 [355-649]%), mint akiknél nem (350 [266-446]%) ($p=0,013$).

2. ábra. A plazma VWF:Ag, VWFpp szintjei és a VWF funkcionális aktivitása cirrózisban

Stabil (ST) és akut dekompenzált (AD) cirrótikus betegek, valamint egészséges kontrollok plazmájában mért VWF:Ag (A), VWF:RCo (B), VWF:CB (C), VWFpp (D), VWF:RCo/VWF:Ag (E) és VWF:CB/VWF:Ag (F) szinteket ábrázoltuk. A VWF:Ag, VWFpp és a VWF aktivitási szinteket a poolozott normál plazma százalékában fejeztük ki. A vízszintes vonalak a medián, a dobozok a 25 és 75 percentilis, a függőleges vonalak az 5 és 95 percentilis értékeket jelölik. A p-értékeket Kruskal-Wallis H tesztel számítottuk ki Dunn-féle többszörös összehasonlító post hoc analízissel.

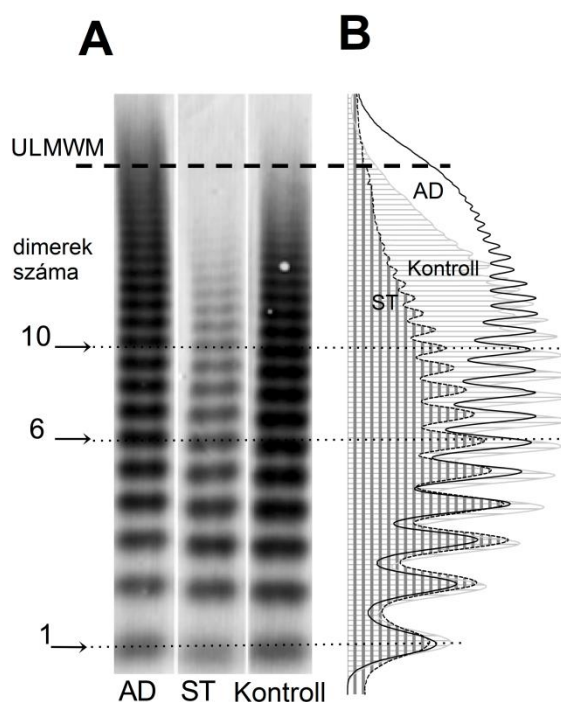


VWF multimer analízis

A VWF SDS agaróz elektroforetikus mintázata és az ezekhez tartozó, ST és AD betegektől illetve kontroll egyénektől származó plazma minták denzitometriás görbéi a **3. ábrán** láthatók. A vizuális elemzés alapján (**3A. ábra**) ULMWM jelenléte 39 (25,5%) cirrótikus betegben volt kimutatható. A betegek többsége az AD csoportban volt (25/54, 46,3%), míg 14/99 (14%) a ST csoportban. Ezt követően elvégeztük a denzitometriás görbék számítógépes elemzését (**3B. ábra**), és a teljes AUC-ból meghatároztuk az LMWM, IMWM és HMWM relatív arányát. A mintákat tovább elemeztük az ULMWM jelenlétére vonatkozóan.

3. ábra. A VWF multimer mintázata 0,8%-os agaróz gélben történő szeparálást követően illetve a hozzájuk tartozó denzitometriás görbék

A: Akutan dekompenzált (AD), stabil (ST) cirrótikus beteg és egészséges kontroll egyén típusos plazma mintája. Az ultra-nagy molekulásúlyú multimerek (ULMWM) jelenléte jól látható az AD beteg mintájában. A ST beteg és az egészséges kontroll mintájában nem látható ULMWM. A pontozott vonalak jelzik azt a kritikus szeparációs határt, mely alapján a különböző multimerek elkülöníthetők egymástól: #1=1 dimer; #6=6 dimer, #10=10 dimer. Kevesebb, mint 6 dimerből kis molekulásúlyú (LMWM), 6-10 dimer között közepes molekulásúlyú (IMWM), 10 dimer fölött nagy molekulásúlyú multimerek (HMWM) képződnek, beleértve az ULMWM-et is. Az **ábra B** részén a különböző elektroforetikus sávokhoz tartozó denzitometriás görbék láthatók az **A** ábrán leírt elnevezéseknek megfelelően.



Az LMWM-ek aránya (**4A. ábra**) a kontrollokban 0,28 (0,25-0,31), míg a ST és az AD betegekben ez az arány az ULMWM jelenlététől függetlenül magasabb volt. Azon ST és AD betegek mintáiban, ahol nem volt ULMWM, 0,38 (0,35-0,42) és 0,39 (0,32-0,46) LMWM-t mértünk. ULMWM-el rendelkező betegekben, az LMWM aránya 0,32-re (0,26-0,36) csökkent ST és 0,32-re (0,29-0,36) AD betegekben, de mindkét arány magasabb maradt a kontroll csoporthoz képest ($p=0,018$ és $p<0,001$).

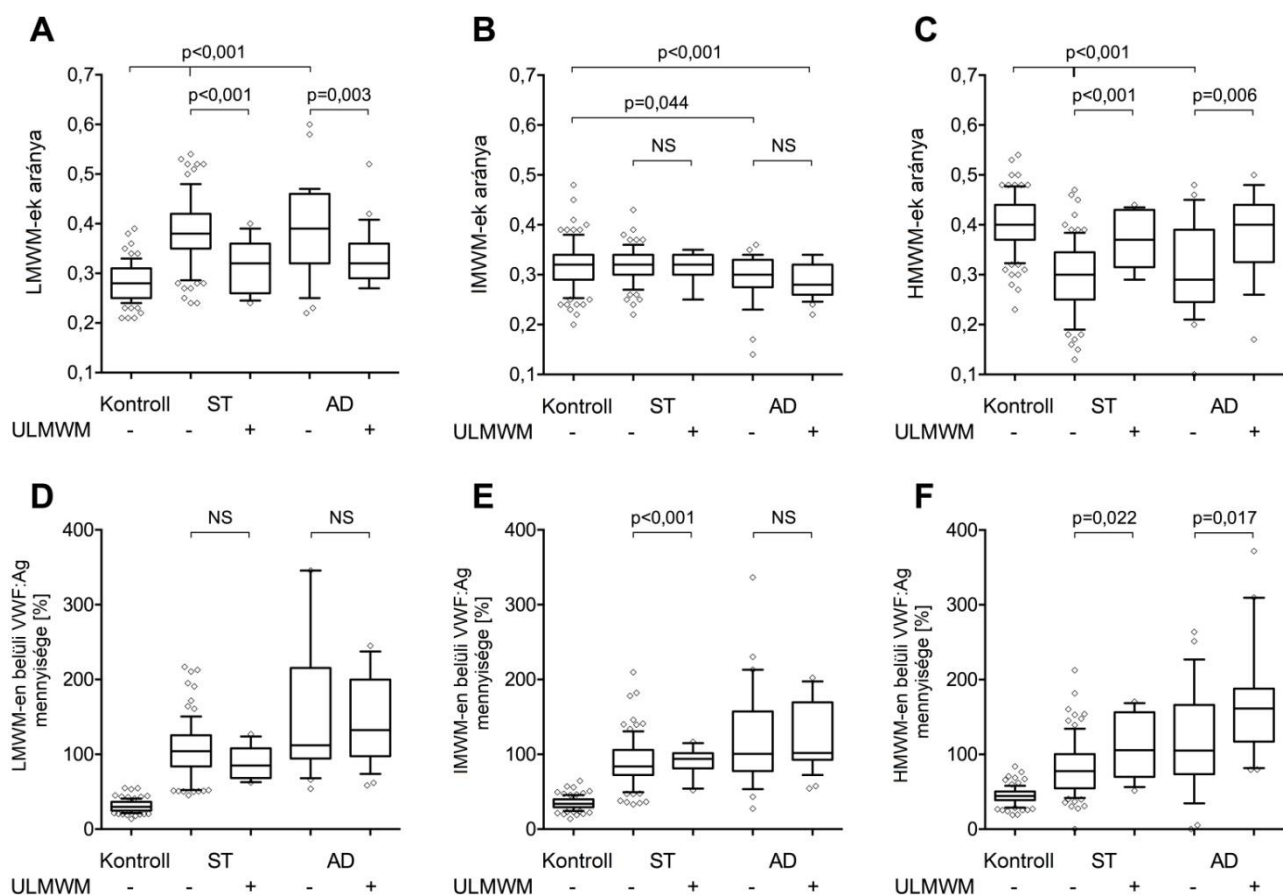
A IMWM aránya (**4B. ábra**) nem mutatott különbséget a kontroll és ST csoport között. Az AD betegekben azonban, mind ULMWM jelenlétében, mind ennek hiányában, az arányok szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontroll vagy ST csoporthoz viszonyítva.

A HMWM-en belüli multimer eloszlást vizsgálva (**4C. ábra**), kontrollokban 0,4 (0,37-0,44), míg az ULMWM-el nem rendelkező ST és AD betegekben csupán 0,30 (0,25-0,34) és 0,29 (0,24-0,39) arányokat mértünk. Figyelemre méltó, hogy mind ST, mind AD betegekben, ULMWM jelenlétében a HMWM-ek aránya magasabb volt és a kontroll csoportéhoz hasonló lett, 0,37 (0,31-0,43) és 0,40 (0,32-0,44).

A multimerek különböző frakcióiban mért VWF abszolút mennyiségét a **4D-E. ábra** mutatja. Kiemelendő, hogy a HMWM csoportban, ULMWM jelenlétében szignifikánsan magasabb VWF:Ag mennyiséget mértünk mind a ST, mind az AD csoportban.

4. ábra. Az LMWM, IMWM és HMWM-ek aránya és a hozzájuk tartozó abszolút VWF mennyiségek minden multimer csoportban

Az első 5 sávhoz (LMWM) [A], a 6-10 dimerből álló IMWM-hez (B) és a több, mint 10 dimerből álló HMWM-hez (C) tartozó görbe alatti területek (AUC) aránya. HMWM esetén azon területek is ide tartoznak, ahol a VWF már nem képez sávokat. Az ábra D-E-F része az LMWM, IMWM és HMWM csoportokon belüli VWF abszolút mennyiségét mutatja. A ST és AD betegeket az ULMWM jelenléte vagy hiánya alapján csoportosítottuk. A vízszintes vonalak a medián, a dobozok a 25 és 75 percentilis, a függőleges vonalak az 5 és 95 percentilis értékeket jelölik. A p-értékeket Kruskal-Wallis H tesztel számítottuk ki Dunn-féle többszörös összehasonlító post hoc analízissel.



ADAMTS13 aktivitás és antigén szintek

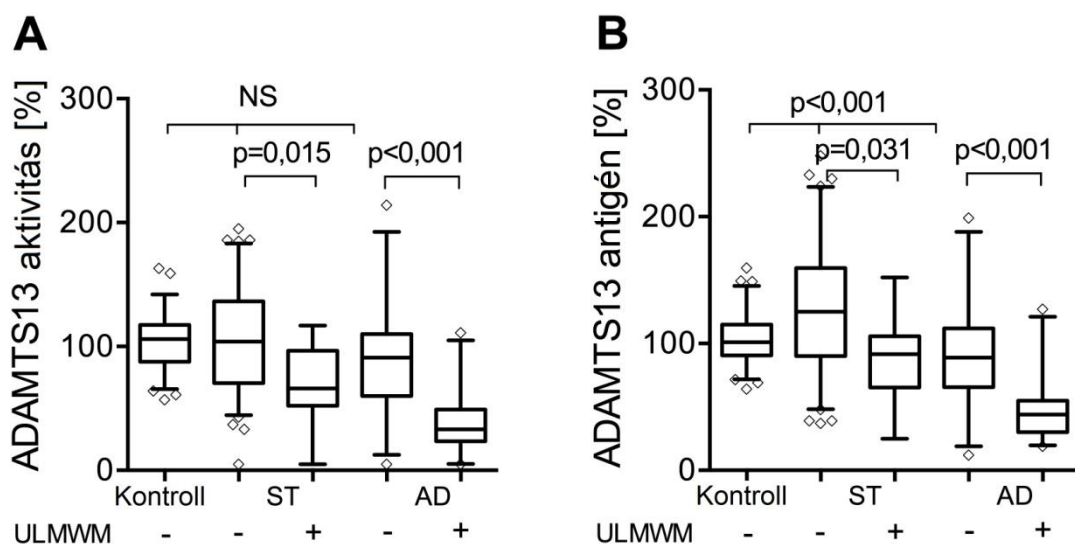
AD betegekben az ADAMTS13 aktivitás alacsonyabb volt a stabil cirrózis betegekhez és az egészséges kontroll egyénekhez viszonyítva (57 [29-94] vs. 98 [67-132] és 106 [67-117]%, $p < 0,001$ mindkét esetben).

Hasonlóan alacsony ADAMTS13 antigén szinteket mértünk az AD betegekben a stabil betegekhez és a kontroll egyénekhez képest (66 [43-101] vs. 120 [89-155] és 101 [91-115]%, $p < 0,001$ mindkét esetben).

Az ULMWM jelenlététől függően tovább elemeztük az ADAMTS13 aktivitást és antigén szinteket mindkét cirrótikus csoportban (**5. ábra**). Azon betegekben, akikben nem volt ULMWM, az ADAMTS13 aktivitási szintek nem különböztek a kontrollokhoz képest, ST betegekben 104 (71-137)%-ot, AD betegekben 91 (60-110)%-ot mértünk. Az ULMWM-el rendelkező betegekben az értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollokhoz és az ULMWM-el nem rendelkező betegekhez képest. ST betegekben 65 (51-99)%-ot, AD-ban 33 (24-49)%-ot észleltünk. Hasonló eltéréseket figyeltünk meg az ADAMTS13 antigén szintek esetén is, kivéve, hogy az ULMWM-el nem rendelkező ST betegekben az antigén szint magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Az antigén szintek mindkét ULMWM-el rendelkező csoportban szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint azon betegekben, akiknél nem volt észlelhető ULMWM. Az AD csoportban az ADAMTS13 aktivitás szintje ACLF esetén, vagy annak hiányában 49 (29-68)% és 70 (44-107)% volt ($p = 0,171$).

5. ábra. Egészséges kontrollok, stabil (ST) és akutan dekompenzált (AD) betegek plazmájában mért ADAMTS13 aktivitás (A) és antigén szintek (B), az ULMWM jelenléte szerint csoportosítva

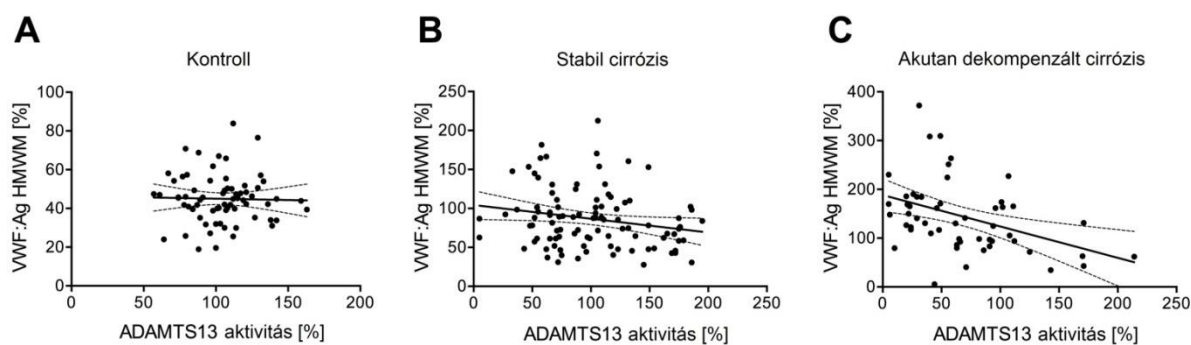
Az ADAMTS13 aktivitást és antigén szinteket a poolozott normál plazmával kapott eredmények százalékában fejeztük ki. A vízszintes vonalak a medián, a dobozok a 25 és 75 percentilis, a függőleges vonalak az 5 és 95 percentilis értékeket jelölik. A p-értékeket Kruskal-Wallis H tesztel számítottuk ki Dunn-féle többszörös összehasonlító post hoc analízissel.



Elemeztük továbbá a HMWM-en belüli VWF:Ag mennyiség és az ADAMTS13 aktivitás közötti összefüggést a ST és az AD betegekben illetve a kontroll csoportban. Amint az a **6. ábrán** is látható, AD betegekben ezen paraméterek között negatív korrelációt találtunk (Spearman $r=-0,43$, $p=0,01$), mégpedig azt, hogy minél alacsonyabb az ADAMTS13 aktivitás, annál magasabb VWF:Ag szintet mértünk a HMWM-en belül. ST betegekben (Spearman $r=-0,18$, $p=0,073$) és a kontrollokban, azonban nem volt szignifikáns összefüggés (Spearman $r=-0,043$, $p=0,722$).

6. ábra. Lineáris regressziós vonal és a VWF HMWM mennyisége és az ADAMTS13 aktivitás közötti korreláció

A HMWM VWF:Ag szinteket egészséges kontrollok (A) (Spearman $r=-0,043$, $p=0,722$, $n=70$), stabil cirrózisos betegek (B) (Spearman $r=-0,18$, $p=0,073$, $n=98$), és akutan dekompenzált betegek (C) (Spearman $r=-0,43$, $p=0,01$, $n=54$) plazmájának ADAMTS13 aktivitásához viszonyítottuk.



Ezt követően megvizsgáltuk az ADAMTS13 aktivitás és a CRP által reprezentált szisztémás gyulladás közötti kapcsolatot minden AD betegben. Az 50%-nál alacsonyabb ADAMTS13 aktivitással (ROC analízissel és Youden index-szel számítva) rendelkező betegeknek magasabb CRP szintjük volt, mint az 50%-nál magasabb ADAMTS13 szinttel rendelkezőknek (29,8 [6,6-97,4] vs. 10,9 [7,1-34,5] mg/l; $p=0,048$). Ezzel összhangban, az ULMWM-el rendelkező AD betegekben a CRP szintje magasabb volt, mint az ULMWM-el nem rendelkezőkben (22,96 [7,1-83,6] vs. 10,9 [4,8-36,8] mg/l; $p=0,078$).

Vérlemezke adhéziós teszt

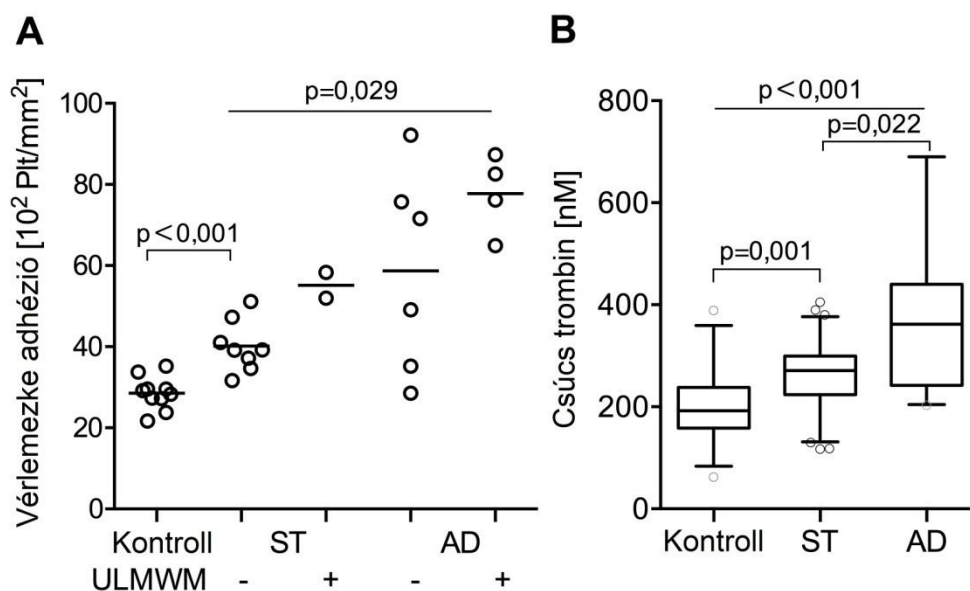
Amint azt a **7A. ábra** mutatja, az ULMWM-el rendelkező AD betegek plazmája a normál vérlemezkek adhézióját kifejezetten fokozta. A VWF:Ag szint 106 (86-120)% volt a kontrollokban, 309 (279-327)% a ST betegekben és 356 (265-384)% az AD betegekben. A VWF:Ag szintek cirrótikus betegekben ULMWM hiányában (n=14) illetve jelenlétében (n=6) 305 (261-348)% és 340 (298-384)% voltak. A VWF:Ag szintekben nem volt szignifikáns különbség.

Trombin generációs teszt

Ahogy az a **7B. ábrán** látható, a csúcs trombin koncentráció a kontrollokhöz viszonyítva mindkét cirrótikus csoportban emelkedett volt. A kontrollokban 192 (158-238) nM (n=31), a ST betegekben 271 (223-293) nM (n=62), míg az AD betegekben 362 (242-440) nM (n=27) volt.

7. ábra. Normál vérlemezkek adhéziója egészséges kontrollok, stabil (ST) és akutan dekompenzált (AD) cirrótikus betegek plazmájának jelenlétében

A cirrótikus betegek plazmájának vérlemezke adhéziós aktivitását helyreállított vért használva vizsgáltuk, 1800/s sebességen, 2,5 percig, ún. Cone and Plate Analizátort (CPA) használva (DiaMed Impact-R). Tíz SC, 10 AD beteget és 10 kontrollt választottunk ki. A kötődő vérlemezkek számát savi foszfatáz aktivitással határoztuk meg. A cirrótikus mintákat az ULMWM-ek jelenléte vagy hiánya szerint csoportosítottuk. A vízszintes vonalak a median értékeket jelölik. A p-értékeket Mann-Whitney és Kruskal-Wallis H teszttel határoztuk meg.

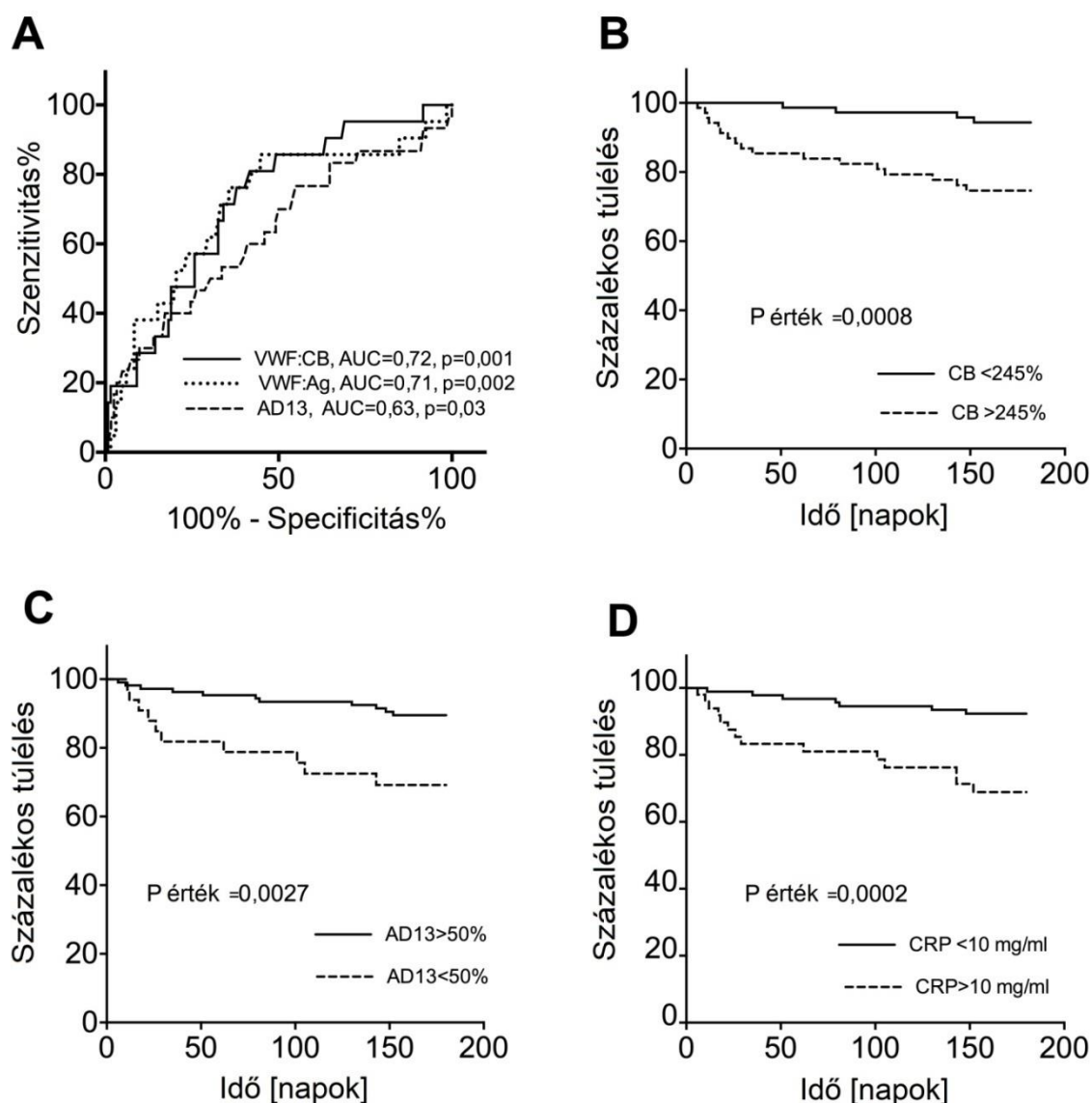


A VWF:CB, ADAMTS13 aktivitás és a CRP szint túléléssel való összefüggése

A ST betegcsoportban 99 beteg közül 4, míg az AD csoportban 54 beteg közül 17 hunyt el. A halál oka minden esetben a májbetegséggel összefüggő volt: 3 betegnél GI vérzés, 11 beteg esetén fertőzés, míg 7 betegben hepatorenalis szindróma. A ROC görbe alatti területek alapján a 6 hónapos túlélés **(8A. ábra)** 0,708 (95% CI 0,629-0,778) volt a VWF:Ag szint, 0,717 (95% CI 0,639-0,787) a VWF:CB szint és 0,612 (95% CI 0,530-0,690) az ADAMTS13 aktivitás esetén. A 6 hónapos túlélést becsülő optimális cut-off értékek a Youden index szerint VWF:CB aktivitás esetén >245% (szenzitivitás: 80,95%, specificitás: 58,33%), míg az ADAMTS13 aktivitás esetén <50% volt (szenzitivitás: 47,62%, specificitás: 82,44%). A 245%-nál nagyobb VWF:CB aktivitású, vagy 50%-nál kisebb ADAMTS13 aktivitású, vagy a 10 mg/l-nél nagyobb CRP szinttel rendelkező betegeknek szignifikánsan rosszabb volt a 6 hónapos túlélése. Szám szerint, a 6 hónapos túlélés 74,6% vs. 94,4% volt a VWF:CB aktivitás **(8B. ábra)**, 69,2% vs. 89,5% az ADAMTS13 aktivitás **(8C. ábra)** és 68,9% vs. 92,3% a CRP szint **(8D. ábra)** tekintetében. Az AD csoporton belül a 6 hónapos túlélés 60,1% vs. 80,8% volt a VWF:CB aktivitás, 57,2% vs. 72,0% az ADAMTS13 aktivitás és 55,7% vs. 78,6% a CRP szint esetén. Az AD csoporton belül ezen túlélési mutatók nagy számbeli különbségeket mutattak, azonban a betegek alacsony száma miatt az adatok statisztikailag nem szignifikánsak.

8. ábra. A cirrózisos betegek túlélése

A 6 hónapos túlélés becslésére vonatkozó "Receiver Operating Characteristics" (ROC) görbék a VWF:Ag (pontosított vonal), a VWF:CB (folyamatos vonal) és az ADAMTS13 aktivitás (szaggatott vonal) esetén, a legjobbnak a VWF:CB AUC görbét mutatva (A). A Kaplan-Meier görbék szerint magasabb a 6 hónapos túlélés <245% VWF:CB (B), >50% ADAMTS13 aktivitás (C) vagy <10 mg/L CRP szint esetén (D).



MEGBESZÉLÉS

Munkánk során krónikus májbetegekben vizsgáltunk olyan különböző laborparamétereket, szerológiai markereket, melyek a későbbiekben alkalmasak lehetnek a betegségprogresszió előrejelzésére.

A bél-máj kölcsönhatás fontosságát a PSC patogenezisében már számos klinikai és kísérleti lelet igazolta, ahogyan azt már korábban összefoglaltuk [20]. Tudomásunk szerint, ez az első olyan kutatás, mely ezen szerológiai markerekkel összefüggő betegségkimenetelt vizsgálja PSC-ben [92].

A citoszkeleton fehérje F-aktin, a simaizom sejt elleni antitestek (SMA) specifikus célpontja AIH-ben [93] és több, mint 10 évig az IgG izotípusú AAA tesztelés – immunfluoreszcens technikával vagy ELISA-val – a betegség diagnosztikájának része volt [94]. Ezen antitest megnövekedett jelenléte más autoimmun betegségben (pl. cöliákia vagy kötőszöveti betegség) is megfigyelhető [95]. Tudomásunk szerint, azonban eddig egy tanulmány sem vizsgálta az AAA-k előfordulási gyakoriságát és izotípus jellemzőit PSC-ben.

Jelen tanulmányban, első alkalommal mutattuk ki, hogy a fokozott AAA képződés a PSC jellemzője, függetlenül az átfedő AIH-től. PSC-s betegeink negyede mutatott AAA pozitivitást, ami szignifikánsan magasabb volt az UC-s betegekhez és az egészséges kontrollokhoz képest. A rutin laboratóriumi gyakorlattal ellentétben, az AAA-t az anti-IgG mellett másodlagos anti-IgA antitesttel mutattuk ki. Ez a megközelítés a betegség klinikai jellemzői és az AAA izotípus függő kapcsolatát tárta fel. Az IgA típusú AAA jelenléte a Mayo kockázati pontszám és a különböző biokémiai paraméterek alapján súlyosabb betegséget jelzett a kiinduláskor, az IgG típus viszont nem. Ezzel egyezően, korábbi tanulmányok cöliákiában arról számoltak be, hogy az IgA izotípusú AAA jelenléte szorosan összefüggött a bélnyálkahártya aktív szöveti károsodásának mértékével. Ugyanakkor, a gluténmentes diéta bevezetését követően, az AAA IgA pozitívitas a nyálkahártya gyógyulással párhuzamosan eltűnt. Azon esetekben azonban, ahol a gluténmentes diéta ellenére is perzisztált a bélnyálkahártya sérülés, az AAA IgA antitest pozitívitas is megmaradt [96].

Megfigyeléseink szerint az AAA IgA pozitívitas jelenlétében gyorsabb volt a betegséglefordulás a követési idő alatt, a cirrózis meglétére vagy a Mayo kockázati pontszámra

való korrigálást követően is.

Annak mechanizmusa továbbra sem tisztázott, hogy az F-aktinnal szembeni immuntolerancia károsodása hogyan függ össze a fokozott májfibrózis kialakulásával, és így a betegségprogresszióval. Tanulmányunkban, az AAA IgA pozitivitást mutató betegek fokozott nyálkahártya immunválaszt mutattak a mikrobiális antigénekre, például az endotoxinra (EndoCAb IgA) és a bakteriális proteinekre (anti-OMP Plus IgA). Ez az immunválasz, úgy tűnik, csak a bélnyálkahártyára korlátozódik, anélkül, hogy szisztémás reakcióhoz vezetne, ugyanis a szérumban LBP koncentráció, a szisztémás LPS expozíció szerológiai markere, hasonló volt az AAA IgA pozitív és negatív esetekben. Ezen eredmény összhangban van a korábbi tanulmányok megállapításaival. A portális vénás bakteriémia nem gyakori PSC-ben. Viszont, a biliaris epiteliális sejtek endotoxin expozíciója az enterociták és kolangiociták tight junctioninak bomlásához vezet TLR4 mediálta jelátvitellel, mely állatmodellekben a PSC patogenezisének egyik fontos lépése [21, 97]. Azon megfigyelésünk, hogy az I-FABP szérumszintje szignifikánsan magasabb volt az AAA IgA pozitív betegek csoportjában az AAA IgA negatívakhoz képest, összhangban van az előbb említett irodalmi adatokkal. Az I-FABP az enterocita károsodás specifikus markerének tekinthető, mivel kizárólag az enterociták termelik és sejtkárosodással járó gyulladásos folyamatok során felszabadulva a szisztémás keringésbe kerül.

Az autoantitestek PSC-ben általában nem patogének, ezért nem valószínű, hogy a biliaris sérülés súlyosságát humoralis faktorok irányítanák. Az AAA termelődése azonban tükrözheti a limfociták környező szövet- és/vagy sejttermelésekre adott fokozott immunválaszt. Megemlítendő, hogy az AAA nem szervspecifikus, ugyanis a PSC-n kívül számos egyéb, korábban említett immunmediált betegségben is jelen van. Az IgG izotípusú AAA összefüggést mutatott a betegség aktivitással és a kedvezőtlen betegség kimenetellel AIH-ben [98, 99]. A *Czaja és mtsai.* által végzett tanulmányban, az egészséges egyénekhez képest az AAA tekintetében szeropozitív betegek általában HLA-DR3 pozitívak, míg a szeronegatív betegek inkább HLA-DR4 pozitívak voltak. Ugyanezen tanulmányban az AAA HLA-B8 pozitivitással is társult [99]. *Wiencke és mtsai.* szintén bizonyították, hogy PSC-ben a HLA-DR3 és -B8 progresszív betegségfolyással társul [100]. A HLA-DR4 pozitív betegeknél viszont nem észlelhető felgyorsult betegségprogresszió, valamint a betegség kiújulásának is kisebb az esélye májátültetést követően [101, 102]. Ezen korábbi eredményeket alapul véve azt feltételezzük, hogy PSC-ben az AAA IgA képződés egy olyan fenotípust tükrözhet, mely meghatározott immunológiai szereppel és súlyosabb gyulladásos

folyamatokra való genetikai fogékonysággal bír, hasonlóan, mint AIH-ben. Tovább támogatja ezt a feltevést egy közelmúltbeli beszámoló, mely ezen autoantitestek, mint például atípusos P-ANCA, és a HLA státusz összefüggéséről ír PSC-ben [103]. Az AAA IgA-pozitivitás és az agresszívabb HLA genotípus közötti feltételezett szero-genotípus kapcsolat tisztázására további kutatások szükségesek.

Tanulmányunkban, az AGA előfordulása szignifikánsan magasabb volt a PSC-ben szenvedő betegekben az UC-s betegekhez illetve az egészséges kontroll egyénekhez viszonyítva. Az AGA IgG/IgA gyakorisága megfelel *Sjöberg és mtsai.* eredményeinek (22,4% vs. 24%) [104]. Ettől eltérően, tanulmányunkban csak az IgG izotípus volt gyakoribb, az IgA nem. Az AGA gyakrabban fordul elő különféle betegségekben, mint például cöliákia, neurodegeneratív betegségek, szisztémás lupusz eritematózus és autoimmun májbetegségek [105-107]. A kutatók ezen antitestek képződését a bél lumenéből a bélnyálkahártyába történő fokozott peptid felvételnek tulajdonítják, az AGA-t pedig egy élelmi peptiddel szemben kialakult, nem specifikus immunreakció markerének tekintik. *Reiberger és mtsai.* az AGA meglepően magas gyakoriságáról (~60%) számoltak be döntően alkoholos eredetű májcirrózisos betegekben [42]. Az AGA pozitív betegekben emelkedett portalis vénás nyomást és bél áteresztőképességet mértek, utóbbit szukróz-laktulóz-mannitol tesztel határozták meg. Ugyanakkor, egy 22 PSC-s beteget vizsgáló svéd tanulmányban nem tudtak megváltozott bélpermeabilitást kimutatni [108]. Egyes szerzők szerint a PSC-ben észlelhető bél áteresztőképesség inkább immunológiai barrier működési zavarnak tekinthető [27, 109]. Kohorszunkban összefüggést találtunk az IgA típusú AGA és a felgyorsult betegségprogresszió között, azonban a pozitív esetek alacsony száma miatt ezen eredményeket körültekintéssel kell értelmezni, mivel ez esetben nagyobb az esélye a fals pozitív leleteknek. Egy francia kutatócsoport kimutatta, hogy az AGA IgA elősegítette a gliadin peptidek CD71-en keresztüli fokozott transzportját a bél lumenéből a bélnyálkahártyába. Ezen emésztetlen, toxikus peptid pedig a szubepithelialis térben intesztinális gyulladást képes fenntartani [110], mindezek magyarázatot adhat a fentiekre. Megjegyzendő, tanulmányunk főként kutatási jellegű volt és nem tartalmazott kísérleti módszereket, mely pontos magyarázatot adhatna a betegségprogresszió fokozott kockázatára a specifikus antitestek jelenlétében.

Részletesen elemeztük a VWF-t és az ADAMTS13-at májcirrózisos betegeinkben, mely tudomásunk szerint az eddig publikált egyik legnagyobb esetszámú betegcsoport. Vizsgálatainkkal eddig tisztázatlan kérdésekre kerestük a válaszokat. Egyrészt, hogyan

befolyásolja az AD és a szisztémás gyulladás cirrózisos betegekben a VWF paramétereket, beleértve a multimerek eloszlását, valamint az ADAMTS13 aktivitást, a stabil betegekhez képest; másrészt kimutatható-e protrombotikus állapot ezekben a betegekben?

Régóta ismert, hogy cirrózisos betegekben jelentősen emelkedett a VWF:Ag szintje [111, 112]. Számos korábbi tanulmány igazolta, hogy a VWF:Ag szintje a betegség súlyosságával arányos, a legmagasabb szintet a Child C stádiumú betegekben elérve. A VWF vérlemezke glikoprotein Ib kötő funkcionális kapacitása, mely a VWF:RCo aktivitással mérhető, szintén jelentős mértékben fokozott, bár nem olyan mértékben, mint a VWF:Ag szint [50, 113].

Elsőként mutattuk viszont ki, hogy a VWF:CB aktivitás, mely a VWF kollagénhez való kötődési kapacitását méri, a VWF:RCo aktivitásnál is magasabb. Eredményünk némiképp ellentmond annak, amit *Lisman és mtsai.* korábban publikáltak. Megfigyeléseik szerint, a VWF:CB minden májbeteg csoportban alacsonyabb volt a kontrollokhoz képest [50, 114, 115], noha ezen aktivitás a VWF:RCo-nál érzékenyebb a nagy multimerek jelenlétére [116]. Véleményünk szerint ez az általuk és az általunk végzett számítások közötti lényeges különbségből adódhat. Mi a VWF:CB és a VWF:Ag méréseket egymással párhuzamosan végeztük, ugyanazon mintahígításokból. *Lisman és mtsai.* egyforma VWF:Ag mennyiséget használtak (a poolozott normál plazma VWF mennyiségének 5%-a és 2,5%-a) a VWF:CB meghatározáshoz. Az általuk kapott adatok minden publikációjukban inkább a VWF:CB/VWF:Ag arányt tükrözik, mely a mi méréseink szerint is csökkent mértékű. Ráadásul ők mutatták ki, hogy mind a cirrózisban, mind az akut májelégtelenségben szenvedő betegektől származó plazma fokozott vérlemezke adhéziót váltott ki a kollagén felszínen, mely pontosan a jól működő VWF:CB aktivitást támasztja alá. Ezen, áramlási körülmények között végzett adhéziós vizsgálatok is tovább erősítik a mi adataink helyességét.

A VWF:RCo és VWF:CB, VWF:Ag-hez viszonyított, relatív csökkenése alapján felmerül a VWF multimer szerkezetének szignifikáns, minőségi változása. Munkánk során valóban ki tudtunk mutatni két jelentős változást a VWF multimer szerkezetében. A cirrótikus betegek döntő többségében, ahol ULMWM nem volt jelen, az LMWM-ek relatív aránya növekedett, míg a hemosztázis szempontjából legaktívabb HMWM aránya csökkent, azaz, a HMWM-től a LMWM-ek irányába történő arány eltolódás volt megfigyelhető. A LMWM frakción belül a VWF abszolút mennyisége háromszoros, a HMWM frakción belül pedig csak kétszeres emelkedést mutatott, a kontrollokhoz viszonyítva. A másik fő változást az AD

betegek közel 50%-ában észleltük, ahol ULMWM volt kimutatható. Ezen betegekben a HMWM frakción belüli VWF:Ag relatív aránya és az abszolút mennyisége is sokkal magasabb volt azon AD betegekhez képest, akikben nem detektáltunk ULMWM-et. Továbbá, alacsonyabb ADAMTS13 aktivitást és antigén szintet is mértünk. Ezzel ellentétben, azon betegekben, akiknél ULMWM nem volt kimutatható, az ADAMTS13 szintek a kontroll csoporthoz hasonlóak voltak. Ezért, az előrehaladott májcirrózisos betegcsoportban, azt feltételezzük, hogy első lépésként az ADAMTS13 csökkenése következik be, az AD esemény és az emelkedett CRP által jelzett szisztémás gyulladás hatására. Az AD betegek között az ACLF csoport egy még súlyosabb állapotot képvisel, ebben az alcsoportban találtuk a legmagasabb VWF:Ag és a legalacsonyabb ADAMTS13 szintet. Hasonló eredményre jutottak más szerzők is a közelmúltban [117].

A VWF multimer szerkezet ezen összetett módosulása háttérében alapvetően két fő mechanizmus lehetősége rajzolódik ki. Először is felvetődik egy ADAMTS13-tól független VWF módosulás lehetősége azon stabil cirrótikus betegekben, akikben az ADAMTS13 szint normális és ULMWM nem észlelhető. Ezen betegekben a VWF multimerek lebontása egyéb fehérjebontó enzimek, például plazmin [118] vagy egyéb szerin proteázok [119] révén történhet, emiatt növekszik meg az LMWM aránya. Másrészt viszont, az előrehaladott cirrótikus betegekben, az észlelhető ADAMTS13 alacsony szint következtében jelennek meg az ULMWM-ek. Az elvégzett vérlemezke adhéziós kísérlet igazolta, hogy az ULMWM-et tartalmazó cirrótikus plazmák hatására tovább fokozódik az adhézió az ULMWM nélküli plazmákhoz viszonyítva, az egyébként azonos mennyiségű VWF antigén szint ellenére. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a legsúlyosabb cirrótikus betegekben kialakulhat olyan protrombotikus állapot, ami bizonyos tekintetben hasonló mint TTP esetén [69]. A fertőzések, valamint a szisztémás gyulladás feltételezhetően protrombotikus hajlamot okoznak cirrótikus betegekben [77, 79, 120-122] és megfigyeléseink során mi is ezen korábbi tanulmányokhoz hasonló eredményre jutottunk. Az ADAMTS13-at a máj stellát sejtei termelik [70], melyekről ismert, hogy aktiválódnak májcirrózisban [72]. Azt feltételezzük, hogy akut dekompenzációban az ADAMTS13 szintézise csökkent, ugyanis a gyulladásos citokinek gátolják a stellát sejtek ADAMTS13 termelését [123]. Továbbá, mivel az ADAMTS13 fél-életideje körülbelül 2-3 nap [124], az ULMWM néhány napon belül megjelenhet a keringésben. AD betegekben az igen alacsony ADAMTS13 aktivitás és az ULMWM jelenléte együttesen egy már szignifikánsan előrehaladott betegség stádiumot képvisel. Ezen adatok alapján elképzelhető, hogy a VWF multimer elemzése és az

ADAMTS13 aktivitás mérése, bár nem rutin tesztek, alkalmasak lehetnének azon betegek azonosítására, akiknél protrombotikus hajlam áll fenn. Mivel standardizált ADAMTS13 aktivitás mérési lehetőség, WHO nemzetközi standardok és megfelelő minőségellenőrzés egyaránt rendelkezésre áll, javasoljuk elsősorban azokban a centrumokban, ahol a legsúlyosabb májbetegek ellátása történik, hogy legalább ADAMTS13 szint mérési lehetőség álljon rendelkezésre. Ezt ugyanis egyszerűbb kivitelezni, mint a VWF multimer analízist.

A betegség súlyosságát jól jelzik a betegek kedvezőtlen 6 hónapos túlélési adatai. A magasabb VWF:CB aktivitás (>245%), az emelkedett CRP (>10 ml/l), valamint az alacsony ADAMTS13 aktivitás (<50%) mind a teljes betegcsoportban, mind az AD betegcsoporton belül magasabb halálozással függött össze. A szisztémás gyulladás és a véralvadási rendszer együttes aktivációja szerepet játszhat a betegségprogresszióban és felveti a trombózis profilaxis szükségességét ezen betegekben. *Villa és mtsai.* kimutatták, hogy az alacsony molekulásúlyú heparin alkalmazása képes volt megelőzni a portalis véna trombózis kialakulását és késleltetni az akut dekompenzációt [122]. A vérlemezke működést gátló kezeléssel jelenleg nem áll rendelkezésre még hasonló adat.

Az irodalomban eltérő eredmények olvashatók a VWF multimer szerkezete, valamint az ADAMTS13 szintek tekintetében a Child-Pugh pontrendszer szerint csoportosított cirrótikus betegekben. *Lisman és mtsai.* a kontrollokhoz viszonyítva kevesebb HMWM-t és igen változó ADAMTS13 szinteket mutattak ki [50]. *Uemura és mtsai.* egyedülként kategorizálták a betegeket a három különböző multimer szerkezet alapján [113]. Az első csoportban az LMWM-ek mennyisége volt fokozott, a második csoportban a normál multimer szerkezetű esetek voltak, míg a harmadikban ULMWM-ek voltak jelen. Vizsgálataik során negatív összefüggést találtak az ADAMTS13 szintek és a cirrózis súlyossága között és felvetették a fokozott intrahepatikus mikrotrombus képződés lehetőségét. Azonban a japán betegek több mint 50%-a (59/109) májsejt karcinómában is szenvedett, mely szignifikánsan növelte a betegcsoportjuk heterogenitását. *Reuken és mtsai.* tanulmányukban a szisztémás gyulladás, többnyire bakteriális fertőzés, VWF-ra gyakorolt hatását vizsgálták [121]. Mind a VWF, mind az ADAMTS13 szintek nagyon hasonlóak voltak az általunk kapott eredményekhez, de VWF multimer szerkezet változást nem tudtak kimutatni. Azonban ők a vizsgálataik során 1,6%-os SDS-agaróz gélelektroforézist használtak. Ennek következtében, a nagy multimerek dúsító gélből az elválasztó gélbe történő vándorlása valószínűleg kevésbé volt teljes, mint az általunk használt 0,65 és 0,8%-os agaróz gél esetén, amely ezért a VWF multimer szerkezet változás, különösen az ULMWM, azonosítására érzékenyebbnek tűnik.

Összefoglalva, arról számoltunk be, hogy az F-aktin elleni antitestek gyakoriak PSC-s betegekben. Ezen antitest IgA izotípusának jelenléte összefüggött a nyálkahártya különböző mikrobiális antigénekre és enterocita károsodás jelenlétére adott fokozott immunválaszával. Továbbá, az AAA IgA azonosította a betegek azon alcsoportját, akiknél a felgyorsult betegségprogresszió fokozott kockázata áll fenn. Ezen eredmények további bizonyítékkal szolgálnak a bél-máj kölcsönhatás fontosságára PSC-ben. Amennyiben ezeket nagy létszámú betegből álló vizsgálatban is megerősítik, az IgA izotípusú AAA a PSC-s betegek szerológiai kockázatbesorolásában használható biomarker lehetne.

Elsőként bizonyítottuk, hogy a VWF:CB aktivitás egyenértékű a VWF:RCo vizsgálattal cirrózisban. Továbbá mennyiségileg sikerült kimutatnunk, hogy a LMWM aránya szignifikánsan emelkedett stabil cirrótikus betegekben. Ezen kívül, a legsúlyosabb cirrótikus betegcsoportban, AD-ban szignifikánsan csökkent ADAMTS13 aktivitást találtunk, ULMWM jelenlétével együtt, melyek a trombotikus mikroangiopátiák jelzői, és közreműködhetnek a betegség rosszabbodásában.

ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- PSC-ben a progresszív betegséglefolyás előrejelzésére alkalmas új szerológiai markert azonosítottunk az anti-F-aktin antitest formájában. Emellett vizsgálataink a betegség patogenezisében kulcsfontosságú bél-máj kölcsönhatás új aspektusait tárta fel.
- Cirrótisos betegekben igazoltuk, hogy a korábbi adatokkal ellentétben a VWF:CB is arányosan emelkedik az előrehaladott betegségben.
- A VWF:CB a túlélés vonatkozásában az egyik legjobb markernek bizonyult.
- ST cirrótisban a kis molekulásúlyú multimerek (LMWM) aránya megnövekedett a nagyok (HMWM) rovására.
- Az AD betegek azon részében, ahol alacsony ADAMTS13 aktivitást mértünk, ultranagy multimereket (ULMWM) jelenlétét tudtuk kimutatni. Ebben a betegcsoportban a magas VWF szintek és a megjelenő ultranagy multimerek együttesen fokozott protrombotikus hajlamot eredményezhetnek és szerepet játszhatnak a betegség progressziójában is.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Mokdad, A.A., et al., Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. 2014. **12**(1): p. 145.
2. Lozano, R., et al., Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2095-2128.
3. Zatoński, W.A., et al., Liver Cirrhosis Mortality in Europe, with Special Attention to Central and Eastern Europe. *European Addiction Research*, 2010. **16**(4): p. 193-201.
4. Központi Statisztikai Hivatal. Halálozások a gyakoribb halálokok szerint (1990–2012) Available from: http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html.
5. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2014. Available from: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/.
6. Younossi, Z.M., et al., Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016. **64**(1): p. 73-84.
7. Pugh, R.N., et al., Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 1973. **60**(8): p. 646-9.
8. Kamath, P.S. and W.R. Kim, The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*, 2007. **45**(3): p. 797-805.
9. Moreau, R., et al., Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*, 2013. **144**(7): p. 1426-37, 1437.e1-9.
10. Arvaniti, V., et al., Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*, 2010. **139**(4): p. 1246-56, 1256.e1-5.
11. Tornai, T., et al., Macrophage activation marker, soluble CD163, is an independent predictor of short-term mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection. *Liver Int*, 2016. **36**(11): p. 1628-1638.
12. Gronbaek, H., et al., Macrophage activation markers predict mortality in patients with liver cirrhosis without or with acute-on-chronic liver failure (ACLF). *J Hepatol*, 2016. **64**(4): p. 813-22.
13. Papp, M., et al., Presepsin teardown - pitfalls of biomarkers in the diagnosis and prognosis of bacterial infection in cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(41): p. 9172-9185.
14. Foldi, I., et al., Lectin-complement pathway molecules are decreased in patients with cirrhosis and constitute the risk of bacterial infections. *Liver Int*, 2017. **37**(7): p. 1023-1031.
15. Altorjay, I., et al., Mannose-binding lectin deficiency confers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis. *J Hepatol*, 2010. **53**(3): p. 484-91.
16. Molodecky, N.A., et al., Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*, 2011. **53**(5): p. 1590-9.
17. Boonstra, K., U. Beuers, and C.Y. Ponsioen, Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *J Hepatol*, 2012. **56**(5): p. 1181-8.
18. Fosby, B., T.H. Karlsen, and E. Melum, Recurrence and rejection in liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(1): p. 1-15.

19. Lazaridis, K.N. and N.F. LaRusso, Primary Sclerosing Cholangitis. *N Engl J Med*, 2016. **375**(12): p. 1161-70.
20. Eksteen, B., The Gut-Liver Axis in Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin Liver Dis*, 2016. **20**(1): p. 1-14.
21. Eaton, J.E., et al., Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology*, 2013. **145**(3): p. 521-36.
22. Joshi, D., et al., The impact of inflammatory bowel disease post-liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Liver Int*, 2013. **33**(1): p. 53-61.
23. Alabraba, E., et al., A re-evaluation of the risk factors for the recurrence of primary sclerosing cholangitis in liver allografts. *Liver Transpl*, 2009. **15**(3): p. 330-40.
24. Lichtman, S.N., et al., Hepatic injury associated with small bowel bacterial overgrowth in rats is prevented by metronidazole and tetracycline. *Gastroenterology*, 1991. **100**(2): p. 513-9.
25. Yamada, S., et al., Small duct cholangitis induced by N-formyl L-methionine L-leucine L-tyrosine in rats. *J Gastroenterol*, 1994. **29**(5): p. 631-6.
26. Medvedev, A.E., et al., Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J Endotoxin Res*, 2006. **12**(3): p. 133-50.
27. Mueller, T., et al., Enhanced innate immune responsiveness and intolerance to intestinal endotoxins in human biliary epithelial cells contributes to chronic cholangitis. *Liver Int*, 2011. **31**(10): p. 1574-88.
28. Fickert, P., et al., Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *Am J Pathol*, 2006. **168**(2): p. 410-22.
29. Fickert, P., et al., Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 261-74.
30. Arnott, I.D.R., et al., Sero-Reactivity to Microbial Components in Crohn's Disease Is Associated with Disease Severity and Progression, but not NOD2/CARD15 Genotype. *The American Journal Of Gastroenterology*, 2004. **99**: p. 2376.
31. Papp, M., et al., Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2007. **13**(8): p. 984-992.
32. Forcione, D.G., et al., Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut*, 2004. **53**(8): p. 1117-22.
33. Zholudev, A., et al., Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(11): p. 2235-41.
34. Papp, M., et al., Presence of anti-microbial antibodies in liver cirrhosis--a tell-tale sign of compromised immunity? *PLoS One*, 2010. **5**(9): p. e12957.
35. Papp, M., et al., High prevalence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is associated with increased risk of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol*, 2013. **59**(3): p. 457-66.
36. Dotan, I., et al., Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2006. **131**(2): p. 366-78.
37. Ferrante, M., et al., New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut*, 2007. **56**(10): p. 1394-403.
38. Papp, M., et al., New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and

- NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Am J Gastroenterol*, 2008. **103**(3): p. 665-81.
39. Lakatos, P.L., et al., Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(3): p. 767-77.
 40. Piton, G. and G. Capellier, Biomarkers of gut barrier failure in the ICU. *Curr Opin Crit Care*, 2016. **22**(2): p. 152-60.
 41. Schirru, E., et al., Anti-actin IgA antibodies identify celiac disease patients with a Marsh 3 intestinal damage among subjects with moderate anti-TG2 levels. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 630463.
 42. Reiberger, T., et al., Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol*, 2013. **58**(5): p. 911-21.
 43. Tripodi, A., et al., Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology*, 2006. **44**(2): p. 440-5.
 44. Tripodi, A., et al., Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*, 2005. **41**(3): p. 553-8.
 45. Gatt, A., et al., Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(9): p. 1994-2000.
 46. Youngwon, N., et al., Coagulation proteins influencing global coagulation assays in cirrhosis: hypercoagulability in cirrhosis assessed by thrombomodulin-induced thrombin generation assay. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 856754.
 47. Groeneveld, D., R.J. Porte, and T. Lisman, Thrombomodulin-modified thrombin generation testing detects a hypercoagulable state in patients with cirrhosis regardless of the exact experimental conditions. *Thromb Res*, 2014. **134**(3): p. 753-6.
 48. Peck-Radosavljevic, M., Thrombocytopenia in chronic liver disease. *Liver Int*, 2017. **37**(6): p. 778-793.
 49. Tripodi, A., Hemostasis abnormalities in liver cirrhosis: myth or reality? *Pol Arch Med Wewn*, 2008. **118**(7-8): p. 445-8.
 50. Lisman, T., et al., Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology*, 2006. **44**(1): p. 53-61.
 51. Tripodi, A., et al., An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology*, 2009. **137**(6): p. 2105-11.
 52. Tripodi, A., Liver Disease and Hemostatic (Dys)function. *Semin Thromb Hemost*, 2015. **41**(5): p. 462-7.
 53. Lisman, T. and R.J. Porte, Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood*, 2010. **116**(6): p. 878-85.
 54. Wannhoff, A., et al., Effects of increased von Willebrand factor levels on primary hemostasis in thrombocytopenic patients with liver cirrhosis. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e112583.
 55. Leebeek, F.W., et al., A shift in balance between profibrinolytic and antifibrinolytic factors causes enhanced fibrinolysis in cirrhosis. *Gastroenterology*, 1991. **101**(5): p. 1382-90.
 56. Lisman, T., et al., Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology*, 2001. **121**(1): p. 131-9.
 57. Tripodi, A. and P.M. Mannucci, The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med*, 2011. **365**(2): p. 147-56.

58. Lisman, T. and R.J. Porte, Pathogenesis, prevention, and management of bleeding and thrombosis in patients with liver diseases. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 2017. **1**(2): p. 150-161.
59. Tripodi, A., Hemostasis abnormalities in cirrhosis. *Curr Opin Hematol*, 2015. **22**(5): p. 406-12.
60. Caldwell, S.H., et al., Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management. *Hepatology*, 2006. **44**(4): p. 1039-46.
61. de Franchis, R., Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol*, 2010. **53**(4): p. 762-8.
62. Garcia-Tsao, G. and J. Bosch, Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med*, 2010. **362**(9): p. 823-32.
63. Montalto, P., et al., Bacterial infection in cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study. *J Hepatol*, 2002. **37**(4): p. 463-70.
64. Noris, M. and G. Remuzzi, Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies? *Blood*, 1999. **94**(8): p. 2569-74.
65. La Mura, V., et al., Von Willebrand factor levels predict clinical outcome in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gut*, 2011. **60**(8): p. 1133-8.
66. Ferlitsch, M., et al., von Willebrand factor as new noninvasive predictor of portal hypertension, decompensation and mortality in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, 2012. **56**(4): p. 1439-47.
67. Stocksclaeder, M., R. Schneppenheim, and U. Budde, Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2014. **25**(3): p. 206-16.
68. Fujikawa, K., et al., Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*, 2001. **98**(6): p. 1662-6.
69. Sadler, J.E., Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2008. **112**(1): p. 11-8.
70. Uemura, M., et al., Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 922-4.
71. Zhou, W., et al., ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest*, 2005. **85**(6): p. 780-8.
72. Atzori, L., G. Poli, and A. Perra, Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(8-9): p. 1639-42.
73. Mannucci, P.M., et al., Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2730-5.
74. Feys, H.B., et al., ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol*, 2007. **138**(4): p. 534-40.
75. Anstee, Q.M., A. Dhar, and M.R. Thursz, The role of hypercoagulability in liver fibrogenesis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011. **35**(8-9): p. 526-33.
76. Di Martino, V., et al., New prognostic markers in liver cirrhosis. *World J Hepatol*, 2015. **7**(9): p. 1244-50.
77. Kalambokis, G.N., et al., von Willebrand factor and procoagulant imbalance predict outcome in patients with cirrhosis and thrombocytopenia. *J Hepatol*, 2016. **65**(5): p. 921-928.
78. Papp, M., et al., Acute phase proteins in the diagnosis and prediction of cirrhosis associated bacterial infections. *Liver Int*, 2012. **32**(4): p. 603-11.

79. Raparelli, V., et al., Low-grade endotoxemia and platelet activation in cirrhosis. *Hepatology*, 2017. **65**(2): p. 571-581.
80. Martins, E.B. and R.W. Chapman, Sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol*, 2001. **17**(5): p. 458-62.
81. Kim, W.R., et al., A revised natural history model for primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc*, 2000. **75**(7): p. 688-94.
82. Papp, M., et al., Rediscovery of the Anti-Pancreatic Antibodies and Evaluation of their Prognostic Value in a Prospective Clinical Cohort of Crohn's Patients: The Importance of Specific Target Antigens [GP2 and CUZD1]. *J Crohns Colitis*, 2015. **9**(8): p. 659-68.
83. Ikeda, H., et al., Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011. **20**(10): p. 2204-11.
84. Liu, Y., et al., The role of von Willebrand factor as a biomarker of tumor development in hepatitis B virus-associated human hepatocellular carcinoma: a quantitative proteomic based study. *J Proteomics*, 2014. **106**: p. 99-112.
85. Cejka, J., Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen. *Clin Chem*, 1982. **28**(6): p. 1356-8.
86. Mendelbom Raviv, S., et al., Coating conditions matter to collagen matrix formation regarding von Willebrand factor and platelet binding. *Thromb Res*, 2012. **129**(4): p. e29-35.
87. Kokame, K., et al., FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*, 2005. **129**(1): p. 93-100.
88. Udvardy, M.L., K. Szekeres-Csiki, and J. Harsfalvi, Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter (M(MW)) to describe the degree of multimerisation. *Thromb Haemost*, 2009. **102**(2): p. 412-7.
89. Pereboom, I.T., et al., No evidence for systemic platelet activation during or after orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl*, 2009. **15**(8): p. 956-62.
90. Shenkman, B., et al., Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by the cone and plate(let) analyzer: role of platelet activation, fibrinogen and von Willebrand factor. *Thromb Res*, 2000. **99**(4): p. 353-61.
91. Vanickova, M., J. Suttner, and J.E. Dyr, The adhesion of blood platelets on fibrinogen surface: comparison of two biochemical microplate assays. *Platelets*, 2006. **17**(7): p. 470-6.
92. Infantino, M., et al., Anti-gliadin antibodies in non-celiac gluten sensitivity. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2017. **63**(1): p. 1-4.
93. Gabbiani, G., et al., Human smooth muscle autoantibody. Its identification as antiactin antibody and a study of its binding to "nonmuscular" cells. *Am J Pathol*, 1973. **72**(3): p. 473-88.
94. Hennes, E.M., et al., Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 2008. **48**(1): p. 169-76.
95. Chretien-Leprince, P., et al., Diagnostic value of anti-F-actin antibodies in a French multicenter study. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1050**: p. 266-73.
96. Clemente, M.G., et al., Enterocyte actin autoantibody detection: a new diagnostic tool in celiac disease diagnosis: results of a multicenter study. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(8): p. 1551-6.
97. Guo, S., et al., Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol*, 2013. **182**(2): p. 375-87.

98. Couto, C.A., et al., Antismooth muscle and antiactin antibodies are indirect markers of histological and biochemical activity of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 2014. **59**(2): p. 592-600.
99. Czaja, A.J., et al., Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 1996. **24**(5): p. 1068-73.
100. Wiencke, K., et al., Primary sclerosing cholangitis is associated to an extended B8-DR3 haplotype including particular MICA and MICB alleles. *Hepatology*, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 625-30.
101. Boberg, K.M., et al., The HLA-DR3,DQ2 heterozygous genotype is associated with an accelerated progression of primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol*, 2001. **36**(8): p. 886-90.
102. Bowlus, C.L., et al., Primary sclerosing cholangitis in genetically diverse populations listed for liver transplantation: unique clinical and human leukocyte antigen associations. *Liver Transpl*, 2010. **16**(11): p. 1324-30.
103. Hov, J.R., et al., Antineutrophil antibodies define clinical and genetic subgroups in primary sclerosing cholangitis. *Liver Int*, 2017. **37**(3): p. 458-465.
104. Sjoberg, K., S. Lindgren, and S. Eriksson, Frequent occurrence of non-specific gliadin antibodies in chronic liver disease. Endomysial but not gliadin antibodies predict coeliac disease in patients with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol*, 1997. **32**(11): p. 1162-7.
105. Chatzicostas, C., et al., Primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis are not associated with coeliac disease in Crete. *BMC Gastroenterol*, 2002. **2**: p. 5.
106. Reichelt, K.L. and D. Jensen, IgA antibodies against gliadin and gluten in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 2004. **110**(4): p. 239-41.
107. Rensch, M.J., et al., The prevalence of celiac disease autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(4): p. 1113-5.
108. Bjornsson, E., et al., Intestinal permeability and bacterial growth of the small bowel in patients with primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol*, 2005. **40**(9): p. 1090-4.
109. Terjung, B., et al., p-ANCA in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut*, 2010. **59**(6): p. 808-16.
110. Matysiak-Budnik, T., et al., Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med*, 2008. **205**(1): p. 143-54.
111. Ferro, D., et al., High plasma levels of von Willebrand factor as a marker of endothelial perturbation in cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology*, 1996. **23**(6): p. 1377-83.
112. Tornai, I., et al., Endothelium releases more von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator upon venous occlusion in patients with liver cirrhosis than in normals. *Haemostasis*, 1993. **23**(1): p. 58-64.
113. Uemura, M., et al., Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost*, 2008. **99**(6): p. 1019-29.
114. Hugenholtz, G.C., et al., An unbalance between von Willebrand factor and ADAMTS13 in acute liver failure: implications for hemostasis and clinical outcome. *Hepatology*, 2013. **58**(2): p. 752-61.
115. Pereboom, I.T., et al., Development of a severe von Willebrand factor/ADAMTS13 dysbalance during orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant*, 2009. **9**(5): p. 1189-96.

116. Favalaro, E.J., et al., Differential sensitivity of von Willebrand factor (VWF) 'activity' assays to large and small VWF molecular weight forms: a cross-laboratory study comparing ristocetin cofactor, collagen-binding and mAb-based assays. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(6): p. 1043-54.
117. Fisher, C., et al., Balanced haemostasis with both hypo- and hyper-coagulable features in critically ill patients with acute-on-chronic-liver failure. *J Crit Care*, 2018. **43**: p. 54-60.
118. Federici, A.B., et al., Degradation of von Willebrand factor in patients with acquired clinical conditions in which there is heightened proteolysis. *Blood*, 1993. **81**(3): p. 720-5.
119. Lancellotti, S., et al., Oxidized von Willebrand factor is efficiently cleaved by serine proteases from primary granules of leukocytes: divergence from ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(8): p. 1620-7.
120. Carnevale, R., et al., Gut-derived endotoxin stimulates factor VIII secretion from endothelial cells. Implications for hypercoagulability in cirrhosis. *J Hepatol*, 2017. **67**(5): p. 950-956.
121. Reuken, P.A., et al., Imbalance of von Willebrand factor and its cleaving protease ADAMTS13 during systemic inflammation superimposed on advanced cirrhosis. *Liver Int*, 2015. **35**(1): p. 37-45.
122. Villa, E., et al., Enoxaparin prevents portal vein thrombosis and liver decompensation in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology*, 2012. **143**(5): p. 1253-1260.e4.
123. Kleinegris, M.C., et al., Cirrhosis patients have a coagulopathy that is associated with decreased clot formation capacity. *J Thromb Haemost*, 2014. **12**(10): p. 1647-57.
124. Cao, W.J., et al., Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(7): p. 1233-5.

TÁRGYSZAVAK

primer sclerotizáló cholangitis, bél barrier dysfunctio, intestinalis zsírsav-kötő protein, anti-F-aktin antitest, anti-gliadin antitest, cirrhosis, akut dekompenzáció, szisztémás gyulladás, von Willebrand multimerek, thrombotikus microangiopathia

KEYWORDS

Primary sclerosing cholangitis, gut barrier dysfunction, intestinal fatty acid-binding protein, anti-F-actin antibody, anti-gliadin antibody, cirrhosis, acut decompensation, systemic inflammation, von Willebrand factor multimers, thrombotic microangiopathy

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm **Dr. Márton Ildikó Professzor Asszonynak**, hogy a Fogorvostudományi Doktori Iskola keretein belül lehetőséget biztosított számomra a tudományos munkám elvégzéséhez.

Nagyon köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Tornai István Tanár Úrnak**, hogy tanítványául fogadott, szakmai észrevételeivel, tanácsaival segített, hogy ez a PhD munka létrejöheszen. Rezidens éveim alatt megtanította az osztályos munka fortélyait és azóta is mindig számíthatok a segítségére. Szakmai tudása, a betegek iránti őszinte odaadása, munkabírása egyaránt követendő példaként szolgál számomra.

Hálásan köszönöm **Dr. Papp Mária Tanárnőnek**, hogy ötödéves egyetemista koromban szárnyai alá vett, a klinikai- és a kutatómunkámat szakmai észrevételeivel segíti és hogy azóta is a Gasztroenterológiai Kutatócsoportjának tagja lehetek. Töretlen lelkesedése, munkabírása, a család és a munka bámulatos összeegyeztetése példaértékű számomra.

Nekik köszönhetően magával ragadott a hepatológia és a kutatómunka világa és azóta sem ereszt.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Altorjay István Professzor Úrnak**, hogy a Gasztroenterológiai Tanszék munkatársa lehetek, szakmai fejlődésemet elősegíti és a kutatómunkámhoz lehetőséget biztosított.

Köszönöm szerzőtársaimnak, külön kiemelve, **Dr. Hársfalvi Jolán Tanárnőnek**, a von Willebrand faktorról kapcsolatos kutatásban és a cikk megírásában nyújtott segítségét, jótanácsait. Köszönöm **Dr. Tornai Tamásnak** az eredmények statisztikai elemzésében nyújtott segítségét.

Köszönöm a **Gasztroenterológiai Tanszék** munkatársainak támogató hozzáállását, mellyel nagyban hozzájárultak gyakorlati és elméleti tudásom bővítéséhez.

Köszönöm **Fábián Mária** és **Tömöri Jánosné Éva** asszisztensnőknek a laboratóriumi munkában nyújtott segítségüket.

Végül, de nem utolsósorban, hálásan köszönöm a **Családomnak**, férjemnek, Attilának, kislányomnak, Nórinak, szüleimnek és húgomnak a sok-sok szeretetet, támogatást, bátorítást, amellyel világéletemben körülvettek. Köszönöm, hogy az idáig vezető úton is mellettem álltak, türelemmel, önzetlen lemondással, a mindennapi teendőkben tevőlegesen részt vállalva segítettek, hogy ez a munka létrejöheszen.



Nyilvántartási szám: DEENK/310/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pályu Eszter
Neptun kód: CSA4UZ
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pályu, E.**, Hársfalvi, J., Tornai, T., Papp, M., Udvardy, M., Szekeres-Csiki, K., Pataki, L., Vanhoorelbeke, K., Feys, H. B., Deckmyn, H., Tornai, I.: Major changes of von Willebrand factor multimer distribution in cirrhotic patients with stable disease or acute decompensation. *Thromb. Haemost.* 118 (8), 1397-1408, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1661393>
IF: 4.952 (2017)
2. Tornai, T., **Pályu, E.**, Vitális, Z., Tornai, I., Tornai, D., Antal-Szalmás, P., Norman, G. L., Shums, Z., Veres, G., Dezsőfi, A., Pár, G., Pár, A., Orosz, P., Szalay, F., Lakatos, P. L., Papp, M.: Gut barrier failure biomarkers are associated with poor disease outcome in patients with primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol.* 23 (29), 5412-5421, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i29.5412>
IF: 3.3

További közlemények

3. Sipeki, N., Dávida, L., **Pályu, E.**, Altörjay, I., Hársfalvi, J., Antal-Szalmás, P., Szabó, Z., Veres, G., Shums, Z., Norman, G. L., Lakatos, P. L., Papp, M.: Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 21 (22), 6952-6964, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i22.6952>
IF: 2.787
4. Lakatos, P. L., Sipeki, N., Kovács, G., **Pályu, E.**, Norman, G. L., Shums, Z., Golovics, P. A., Lovász, B. D., Antal-Szalmás, P., Papp, M.: Risk matrix for prediction of disease progression in a referral cohort of patients with Crohn's disease. *J. Crohns. Colitis.* 9 (10), 891-898, 2015.
IF: 6.585





5. Vítális, Z., Altorjay, I., Tornai, I., Palatka, K., Kacska, S., **Pályu, E.**, Tornai, D., Udvardy, M., Hársfalvi, J., Dinya, T., Veres, G., Lakatos, P. L., Papp, M.: Phenotypic polymorphism of haptoglobin: a novel risk factor for the development of infection in liver cirrhosis.
Hum. Immunol. 72 (4), 348-354, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2011.01.008>
IF: 2.837
6. Lakatos, P. L., Kiss, L. S., Palatka, K., Altorjay, I., Antal-Szalmás, P., **Pályu, E.**, Udvardy, M., Molnár, T., Farkas, K., Veres, G., Hársfalvi, J., Papp, J., Papp, M.: Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease.
Inflamm. Bowel Dis. 17 (3), 767-777, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21402>
IF: 4.855
7. Papp, M., Földi, I., Altorjay, I., **Pályu, E.**, Udvardy, M., Tumpek, J., Sipka, S., Korponay-Szabó, I., Nemes, É., Veres, G., Dinya, T., Tordai, A., Andrikovics, H., Norman, G. L., Lakatos, P. L.: Anti-microbial antibodies in celiac disease: trick or treat?
World J. Gastroenterol. 15 (31), 3891-3900, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.1515.383891>
IF: 2.092

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,408

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,252**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.09.19.

