

Doktori (PhD) értekezés tézisei

SZEROLÓGIAI TÉNYEZŐK SZEREPE A KRÓNIKUS
MÁJBETEGSÉGEK PROGRESSZIÓJÁNAK ELŐREJELZÉSÉBEN

Dr. Pályu Eszter

Témavezető: Dr. Tornai István



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2018

SZEROLÓGIAI TÉNYEZŐK SZEREPE A KRÓNIKUS MÁJBETEGSÉGEK PROGRESSZIÓJÁNAK ELŐREJELZÉSÉBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Klinikai orvostudományok
tudományágban

Írta: Dr. Pályu Eszter okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Tornai István, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora Dr. Lengyel Gabriella, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem FOK, Fogászati Klinika, 228. tanterem
2019. január 31. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Werling Klára, PhD
Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora Dr. Lengyel Gabriella, PhD Dr. Werling Klára, PhD Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme
2019. január 31. 13 óra

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 2010-ben világszerte több mint egymillió haláleset történt a májcirrózis következtében, mely az összhalálozás 1,95%-át teszi ki.

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.

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 (portalis 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, azonban egyre nő az elhízás és így a NAFLD/NASH kóroki szerepe.

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 cirrózisnak nevezzük (ST). A betegség súlyosságának megítélésére leggyakrabban a Child-Pugh- illetve a MELD (Model for End-stage Liver Disease) pontrendszert használjuk. A folyamat progressziója során, annak bármely stádiumában jelentkezhetnek szövődmények: felső tápcsatornai vérzés (leggyakrabban nyelőcső visszértágulatok repedéséből), hasvíz - ascites megjelenése, hepatikus enkefalopátia, bakteriális fertőzések illetve ezek kombinációja. Az így kialakuló állapotot a májcirrózis akut dekompenzációjának (AD) nevezzük, 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. A különböző provokáló tényezők közül leggyakoribb a bakteriális fertőzés, mely önmagában négyszeresére növeli a cirrózisos betegek halálozását.

A PSC egy krónikus, epepangással járó májbetegség, melyre folyamatos, progresszív epeúti gyulladás, valamint fibrózis jellemző, és végül másodlagos cirrózishoz vezet. A betegség klinikai megjelenése és progressziója változatos, fokozott az epeúti karcinóma kialakulásának kockázata. Egyedüli gyógyító eljárás jelenleg a májátültetés. Eddig nem azonosítottak olyan megbízható biomarkert, mely képes lenne megjósolni a progresszió sebességét. Következésképpen, a PSC miatt kezelt betegek rizikóbecslése nem megfelelő.

A PSC etiológiája még nem ismert teljes egészében, azonban patogenezisében a bélrendszer és a máj kölcsönhatását feltételezik, ezt számos klinikai bizonyíték támasztja alá. Egyrészt, szoros összefüggés van a betegség és a gyulladásos bélbetegségek (IBD) között, a betegek közel 80%-ánál mindkét betegség jelen van. Másrészt, az egyidejűleg IBD-s és PSC-s betegek esetén, a transzplantáció körüli magas IBD aktivitás esetén magasabb, míg a májátültetést megelőzően elvégzett colectomia esetén jelentősen alacsonyabb a PSC kiújulásának aránya. A kutatási eredmények is a gyulladt, áteresztő bél szerepét támogatják a későbbi epeúti gyulladásban. A PSC-ben szenvedő betegek fokozott immunválasszal reagálnak az intesztinális endotoxinokra, az ismételt expozíció hatására viszont tolerancia nem alakul ki. 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. Állatmodellekben a kolangiociták tight junction-jeinek szétválása fontos lépés a PSC kialakulásában.

Nemrégiben a bélnyálkahártya barrier funkcióját megbízhatóan jelző biomarkereket azonosítottak. Az enterocita integritásra vonatkozóan, egy enterocitában található citoplazmatikus fehérjéről, az intesztinális zsírsav-kötő proteinnről (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. Az intracelluláris citoskeletális aktin filamentumok ellen termelődő anti-F-aktin IgA antitestek (AAA IgA) jelenléte szorosan összefüggött a cöliákiás

betegek totális vagy szubtotális vékonybél atrófiát mutató szövettani leleteivel. Az anti-gliadin IgA antitestek (AGA IgA) a májcirrózisos betegekben és szignifikáns portális hipertenzióban észlelt megnövekedett intesztinális permeabilitással társultak.

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. Májcirrózisos betegekben az észlelt megnyúlt alvadási paraméterek (protrombin idő [PI], 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. A cirrózisos betegekben észlelhető megváltozott, instabilabb különféle provokáló tényezők hatására könnyen elbillenhet vérzékenység vagy trombózishajlam irányába egyaránt. Provokáló faktorok lehetnek az endotél funkciózavar, a portális hipertenzió, a bakteriális fertőzések és a veseelégtelenség.

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 HMWM tekinthető a hemosztázis szempontjából legaktívabb multimernek.

A VWF és vele együtt a VIII. faktor szintje emelkedett cirrózisban, utóbbinak a szintje pedig összefügg a betegség súlyosságával. Egyes tanulmányokban szoros összefüggést találtak a magas VWF szint, a portális hipertenzió és a mortalitás között. Az emelkedett VWF szint egyes tanulmányok szerint a cirrózisos betegekben gyakran észlelhető vérlemezke rendellenességeket (trombocitopénia, trombocitopátia) kompenzálhatja.

A VWF aktivitását a VWF-hasító proteáz ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, member 13) szabályozza, mivel a VWF vérlemezkek irányában történő reaktivitását befolyásolja annak multimer mérete. 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). Az ADAMTS13-mat a máj stellát sejtjei termelik, melyek májcirrózisban aktiválódnak. Korábban különböző ADAMTS13 aktivitási és antigén szinteket mértek májcirrózisban szenvedő betegekben. *Manucci és mtsai.* illetve *Feys és mtsai.* kimutatták, hogy az ADAMTS13 aktivitása szignifikánsan csökkent előrehaladott májbetegségben, *Lisman és munkacsoportja* viszont nem talált összefüggést az ADAMTS13 szint és a májbetegség súlyossága között.

Előrehaladott cirrózisban egyértelmű protrombotikus tendencia lehetőségét vetették fel. A háttérben álló endotél funkciózavar, szisztémás gyulladás és bakteriális fertőzések együttesen komoly szerepet játszhatnak a cirrózis rosszabbodásában. A VWF paraméterek jellemzőire, mint például az antigén szint (VWF:Ag), funkcionális aktivitás, multimer szerkezet, valamint az ADAMTS13 szintekre érdemben nincs adat stabil és akutan dekompenzált betegek vonatkozásába. Mivel az akut fázis reakciót kiváltó bakteriális fertőzések gyakoriak cirrótikus betegeinkben, és a VWF is egy akut fázis fehérje, ezért fontos a szisztémás gyulladás és a VWF paraméterei közötti összefüggés vizsgálata is.

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 vértelmezke 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 vértelmezke-VWF rendszer is hozzájárul-e? Ezekben a betegekben, ugyanis ez is szerepet játszhat a cirrótis 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. 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, enkefalopátia, 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 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] választottunk.

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. A hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegeket kizártuk, mivel ez befolyásolhatja a VWF:Ag és ADAMTS13 szinteket. 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 (IQR: 31,75-64) év].

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.

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.

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).

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 puffertelt (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).

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. A poolozott normál plazmában lévő ADAMTS13 antigén szintet vettük 100%-nak.

A VWF multimeranalízisét *Udvardy és mtsai.* által használt módszer szerint végeztük. A VWF multimereket nátrium-dodecil-szulfát (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. 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.

A plazma vérlemezke adhéziós képességének méréséhez 10 ST, 10 AD beteg és 10 kontroll egyén plazmáját vizsgáltuk áramlási viszonyok között, helyreállított vért használva. 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 poliszitirén felszínre történő vérlemezke adhéziót Impact-R un. Cone and Plate Analizátorral (CPA, DiaMed, Svájc) végeztük. A vérlemezke adhézió mennyiségi meghatározásához savi foszfátáz próbát használtunk. 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 érdekében, hogy a különböző diagnosztikai tesztek hasznosságát megítéljük abból a szempontból, hogy a túlélők és nem túlélők között milyen mértékben képesek differenciálni, ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist végeztünk. 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. 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. Többváltozós analízist végeztünk, melynek során a Mayo kockázati pontszámra vagy a cirrózis meglétére adjusztáltuk az eredményeket. 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 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 pozitívítás 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.

Az antitest státuszuk alapján elemezve a PSC-s betegek klinikai és laboratóriumi jellemzőit, megállapítottuk, hogy 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 betegséglefolyás 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 betegségelfolyás 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, 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 pozitivitás 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 pozititás 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 pozititás esetében (3,67 [0,88-15,30], $p=0,074$).

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

Következő lépésként, a bakteriális transzlokáció és enterocita károsodás különböző szerológiai markereit vizsgáltuk. Azon betegeknek, akiknél AAA IgA pozititás 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.

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 $\mu\text{mol/l}$ 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. Az AD betegeknek a ST betegekhez képest még magasabb értékei voltak (VWF:Ag % $_{AD \text{ vs. } ST}$: 371 [275-513] vs. 269 [228-323], $p=0,003$; VWF:RCo % $_{AD \text{ vs. } ST}$: 180 [148-294] vs. 148 [128-192], $p=0,035$ és VWF:CB $_{AD \text{ vs. } ST}$: 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. 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.

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. 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]%) ($p=0,013$).

VWF multimer analízis

A VWF SDS agaróz elektroforetikus mintázat vizuális elemzése alapján 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, és a teljes AUC-ból meghatároztuk az LMWM, IMWM és HMWM relatív arányát. A mintákat tovább elemeztük az ULMWM jelenlétére vonatkozóan.

Az LMWM-ek aránya 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 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, 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 HMWM csoportban, ULMWM jelenlétében szignifikánsan magasabb VWF:Ag mennyiséget mértünk mind a ST, mind az AD csoportban.

ADAMTS13 aktivitás és antigén szintek

AD betegekben az ADAMTS13 aktivitás alacsonyabb volt a stabil cirrózisos 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. 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 ($p = 0,171$).

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. 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 $r = -0,043$, $p = 0,722$).

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

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

Trombin generációs teszt kivitelezése során a csúcs trombin koncentráció a kontrollokhoz 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.

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 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, 69,2% vs. 89,5% az ADAMTS13 aktivitás és 68,9% vs. 92,3% a CRP szint

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.

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. Tudomásunk szerint, ez az első olyan kutatás, mely ezen szerológiai markerekkel összefüggő betegségekimenetelt vizsgálja PSC-ben.

A citoszkeleton fehérje F-aktin, a simaizom sejt elleni antitestek (SMA) specifikus célpontja AIH-ben és több, mint 10 évig az IgG izotípusú AAA tesztelés – immunfluoreszcens technikával vagy ELISA-val – a betegség diagnosztikájának része volt. Ezen antitest megnövekedett jelenléte más autoimmun betegségben (pl. cöliákia vagy kötőszöveti betegség) is megfigyelhető. 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.

Megfigyeléseink szerint az AAA IgA pozitívitas jelenlétében gyorsabb volt a betegségfolyás 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. 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. 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. *Wiencke és mtsai.* szintén bizonyították, hogy PSC-ben a HLA-DR3 és -B8 progresszív betegségfolyással társul. A HLA-DR4 pozitív betegeknél viszont nem észlelhető felgyorsult betegségprogresszió, valamint a betegség kiújulásának is kisebb az esélye májátültetést követően. 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 támogathatja ezt a feltevést egy közelmúltbeli beszámoló, mely ezen autoantitestek, mint például atípusos P-ANCA, és a HLA státusz összefüggéséről ír PSC-ben. 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%). Ettől eltérően, tanulmányunkban csak az IgG izotípus volt gyakoribb, az IgA nem. Az AGA gyakrabban fordul elő különféle betegségekből, mint például cöliákia, neurodegeneratív betegségek, szisztémás lupusz eritematózus és autoimmun májbetegségek. 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. Az AGA pozitív betegekben emelkedett portális vénás nyomást és bél átteresztőképességet mértek, utóbbit szukróz-laktulóz-mannitol teszttel határozták meg. Ugyanakkor, egy 22 PSC-s beteget vizsgáló svéd tanulmányban nem tudtak megváltozott bélpermeabilitást kimutatni. Egyes szerzők szerint a PSC-ben észlelhető bél átteresztőképesség inkább immunológiai barrier működési zavarnak tekinthető. 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, 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. 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.

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, noha ezen aktivitás a VWF:RCo-nál érzékenyebb a nagy multimerek jelenlétére. 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.

A VWF multimer szerkezet ezen összetett módosulása háttérben 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 vagy egyéb szerin proteázok 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 adhézíós kísérlet igazolta, hogy az ULMWM-et tartalmazó cirrótikus plazmák hatására tovább fokozódik az adhézíó 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. A fertőzések, valamint a szisztémás gyulladás feltételezhetően protrombotikus hajlamot okoznak cirrótikus betegekben és megfigyeléseink során mi is ezen korábbi tanulmányokhoz hasonló eredményre jutottunk.

Az ADAMTS13-at a máj stellát sejtei termelik, melyekről ismert, hogy aktiválódnak májcirrózisban. Azt feltételezzük, hogy akut dekompenzációban az ADAMTS13 szintézise csökkent, ugyanis a gyulladásos citokinek gátolják a stellát sejtek ADAMTS13 termelését. Továbbá, mivel az ADAMTS13 fél-életideje körülbelül 2-3 nap, 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

egyenként rendelkezésre áll, javasoljuk elsősorban azokban a centrumokban, ahol a legsúlyosabb májbetegség 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 betegeknél. *Villa és mtsai.* kimutatták, hogy az alacsony molekulásúlyú heparin alkalmazása képes volt megelőzni a portális véna trombózis kialakulását és késleltetni az akut dekompenzációt. 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 betegeknél. *Lisman és mtsai.* a kontrollokhoz viszonyítva kevesebb HMWM-t és igen változó ADAMTS13 szinteket mutattak ki. *Uemura és mtsai.* egyedülként kategorizálták a betegeket a három különböző multimer szerkezet alapján. 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. 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 betegeknél. 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.

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 létrejöhesen. 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 világeletemben körülvettek. Köszönöm, hogy az idáig vezető úton is mellettem álltak, türelemmel, önzetlen lemondással, a mindennapi teendőkben tevélegesen részt vállalva segítettek, hogy ez a munka létrejöhesen.



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. Vitális, 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.09.19.

