

Új megfigyelések a dermatitis herpetiformis patomechanizmusában

Doktori tézisek

Dr. Görög Anna

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kárpáti Sarolta, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szalai Zsuzsanna, PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Mihály Emese, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Domján Gyula, PhD, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kulka Janina, PhD, egyetemi tanár
Dr. Kinyó Ágnes, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2017

Bevezetés

Több, mint százharminc év telt el azóta, hogy Louis Adolphus Duhring (University of Pennsylvania, Philadelphia, Egyesült Államok) dermatitis herpetiformis (DH) néven, valószínűleg egyéb hólyagos betegségeket is beleértve, leírta a dermatitis herpetiformist. Azt, hogy eltér a klasszikus bullosisoktól (valódi hólyag ritkán látható), később Louis-Anne-Jean Brocq (Hôpital Sant-Louis, Párizs, Franciaország) figyelte meg, ezért Duhring-Brocq, vagy Brocq–Duhring kórképnek is nevezik. A DH tényleges verifikációja és diagnózisa az immunfluoreszcens diagnosztikai sajátosságok, a dermális papillában szemcsés IgA csapadék kimutatásától számítható (Van der Meer, 1969). Az intenzív kutatásoknak köszönhetően ma már tudjuk, hogy a DH látens cöliákiához társuló, környezeti antigén indukálta, ún. gluténszenzitív autoimmun kórkép. Az elmúlt évtizedekben a kórkép megértésében jelentős lépés volt a transzglutamináz (TG) 2 mellett a DH-ra jellemző TG3 elleni autoantitestek kimutatása (Sárdy, 2002), ugyanakkor a bőrbetegség néhány sajátossága még ma is nehezen értelmezhető. Munkacsoportunk célul tűzte ki a DH pathomechanizmusának további vizsgálatát. A dolgozatban a keringő TG3 – immunglobulin A (IgA) immunkomplex vizsgálatok, valamint a fibrinolitikus potenciál és fibrinszerkezet vizsgálata során szerzett eredményeinket ismertetem.

Az immunkomplex elmélet háttere dermatitis herpetiformisban

Bár régóta feltételezik és számos adat utal arra, hogy a DH egy immunkomplex betegség, meggyőzően sem keringő immunkomplexeket, sem az új adatok birtokában TG3-IgA immunkomplexeket eddig nem sikerült azonosítani. A klasszikus autoimmun bullosisokkal ellentétben, ahol a bőrben lerakódó és a keringő antitestek antigénje megegyezik, DH-ban az IgA antitestek nem kötődnek a papilláris dermis strukturális elemeihez, ami arra utal, hogy a dermisben lévő IgA-TG3 aggregátumok valójában immunkomplexek. Az IgA depozitumok, vagy „DH testek” ultrastrukturális vizsgálattal az ECM mentén rendszertelen elhelyezkedést mutató, amorf, elektrondenz képletek. Kettős immunfluoreszcenciával az IgA a papilláris dermis csúcsán és a dermális érfalakban is kolokalizálódik a TG3-mal.

Néhány panaszmentes bőrbeteg vesebiopsziás mintájában IgA immunkomplexeket mutattak ki, melyek sem klinikai tünetet, sem szövettanilag verifikálható nephropathiát nem okoztak. Igen ritkán beszámoltak DH-hoz társuló IgA nephropathiáról is. A TG3 az egészséges bőrben elsősorban a hám fiziológiásan leváló felső rétegeiben, a stratum granulosum és a stratum

corneum területén expresszáldódik, míg a basalis sejtsorokban és a papillaris dermisben nem, így a dermális TG3-IgA depozitum epidermális eredete kérdéses. Ezen adatok támogatják azt a hipotézist, hogy DH-ban IgA immunkomplexek vannak a keringésben, melyek fennakadhatnak a bőr és más szervek mikrocirkulációs rendszereiben. Miután humán vékonybélben TG3 proteint eddig nem sikerült kimutatni, a dermális TG3 egyéb extracutan eredete valószínűsíthető.

A fibrinogén-fibrin-fibrinolízis vizsgálatok háttere

Régóta ismert, hogy DH-ban a kóros IgA mellett extravascularis fibrinogén, fibrin és fibronectin is megjelenik a papillaris dermisben. Kimutatták, hogy a dermális IgA-TG3 csapadékban a TG3 megőrzi enzimátikus aktivitását és fibrinogént köt, mely az IgA-TG3 lokalizációjával megegyezik és hasonló intenzitású festődést mutat. A kórkép klinikai sajátossága, hogy a betegekben akrálsan, a kézujjakon, esetenként a talpon, leukocytoclasticus vasculitis jellegű petechiák, purpurák jelenhetnek meg. Kutatócsoportunk a közelmúltban publikálta, hogy kezeletlen betegeknél igen magas a cryofibrinogénémia előfordulása, ami gluténmentes diéta (GMD) és/vagy dapson terápia mellett jelentősen csökken, vagy megszűnik. Előzetes adataink szerint a dapson csökkentette a cryofibrinogén mennyiségét, de ennek verifikációja és hatásmechanizmusának vizsgálata nem történt meg.

Leírták, hogy in vivo tünetes DH-s beteg autológ szérumának subcután bevitele a bőrön az injekció helyén a DH-ra jellemző tüneteket provokál, míg az antifibrinolitikus hatású ϵ -aminokapronsavval előkezelt plazma már nem. Beszámoltak a heparin kezelés hatásosságáról súlyos kórfarmákban - olyan DH-s betegekben, akik a szulfonszármazékokat nem tolerálták-, de a terápiás hatás mögötti mechanizmus ismeretlen maradt. Miután az általunk megfigyelt cryofibrinogénémia kóros jelenség, és hőmérsékletdependens, keringő fibrinogénhez kapcsolható, feltételeztük, hogy a fibrinogén-fibrin-fibrinolízis rendszerének módosulása is szerepet játszik a DH patomechanizmusában. Miután elsősorban a plazma lehet a dermális IgA-TG3 csapadék mellett lerakódó fibrinogén forrása DH-ban, célul tűztük ki a betegek plazma mintájában a fibrinogén funkcionális vizsgálatát.

Célkitűzések

1. A bevezetésben részletezett klinikai és immunológiai jellemzők miatt azt feltételezzük, hogy a DH egy immunkomplex betegség. Célul tűztük ki keringő TG3-IgA immunkomplexek kimutatását egy erre a célra általunk kifejlesztett szendvics ELISA technika segítségével.
2. Vizsgáltuk, hogy a keringő TG3-IgA immunkomplex és az anti-TG3 IgA ellenanyag szintek között van-e kapcsolat. Célunk volt, hogy a keringő TG3-IgA immunkomplexek glutén dependenciáját vizsgáljuk. Retrospektív vizsgálat során kezeletlen, majd szigorú GMD alatt tünetmentes DH páciensek keringő TG3-IgA immunkomplex szintjét vizsgáltuk.
3. A bevezetésben ismertetett adatok alapján feltételezhető a fibrinogén-fibrin-fibrinolízis rendszer patológiája DH esetében. Célul tűztük ki DH-s páciensek fibrin képző és fibrinolitikus kapacitásának elemzését.
4. Célul tűztük ki a fibrinháló szerkezeti vizsgálatát. Arra kerestük a választ, hogy az esetleges fibrinolitikus eltérések kapcsolatban állnak-e a fibrinháló szerkezeti változásaival.
5. Kíváncsiak voltunk, hogy a DH tüneti kezeléseként alkalmazott dapson in vitro hatással van-e a fibrinolitikus paraméterekre, valamint a fibrin szerkezetére.

Módszerek

A DH diagnosztikája

A DH diagnózisa a klinikai tüneteken, a bőr szövettani és direkt immunfluoreszcens vizsgálatán, valamint az anti-TG2 IgA, IgG ELISA és/vagy EMA teszteken alapult. Minden páciens esetében elvégeztük az anti-TG3 IgA ELISA vizsgálatot is.

Szövettani és immunfluoreszcens (IF) vizsgálatok

A rutin hisztológiai vizsgálatot a SE Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Szövettani Laboratóriumában, a direkt (immunhisztológia) IF vizsgálatokat a Klinika IF laboratóriumában végeztük, az EMA vizsgálata indirekt immunfluoreszcenciával történt (ImmuGlo IMMCO Diagnostics, Buffalo, NY).

Anti-TG2 és anti-TG3 IgA ELISA

A TG2 IgA (Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany), illetve a TG3 IgA antitestek kimutatása (Immundiagnostik, Bensheim, Germany) az Egyetem Központi Laboratóriumában, illetve a Klinika Genetika Laboratóriumában történtek.

Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA vizsgálat

Betegek és módszer

35 kezeletlen DH-s beteget és 40 nem és életkor szerint választott kontroll személyt vontunk be a vizsgálatba; 16 egészséges felnőttet, 12 pemphigus vulgarisban (PV) és 12 szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő pácienset.

1. A szérum és plazma minták összehasonlító vizsgálata

8 kezeletlen DH-s beteg és 7 egészséges kontroll személy egyazon időpontban levett plazma és szérum mintáját hasonlítottuk össze.

2. BSA blokkolás hatásának vizsgálata

6 kezeletlen DH-s páciens és 6 egészséges kontroll személy savóit vizsgáltuk párhuzamosan BSA blokkolással, és BSA blokkolás nélkül.

3. A glutén mentes diéta hatásának vizsgálata

10 DH-s beteget vizsgáltunk kezeletlen állapotban, és GMD után, tünetmentes állapotban (GMD átlagos időtartama 5,8 év).

Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA

A keringő TG3-IgA immunkomplexek kimutatásához saját fejlesztésű szemikvantitatív szendvics ELISA technikát alkalmaztunk, melynek módszerét publikáltuk és a dolgozatban bemutattuk. A lemezeket anti-humán TG3 antitesttel inkubáltuk (Zone et al., 2011), az immunkomplexeket peroxidázzal konjugált anti-humán IgA antitesttel detektáltuk. Az ELISA vizsgálatok eredményeit triplikátumok átlagából kaptuk. Az ELISA abszorbancia értékek az immunkomplex szinteket jelölik.

Statisztikai elemzés

A statisztikai számításokat Statistica 8.0 szoftverrel (Statsoft Inc, Tulsa, OK) végeztük. Az adatok eloszlásának vizsgálata Shapiro-Wilk teszttel történt. Az adatokat medián értékekkel és a hozzá tartozó interkvartilis tartománnyal [IQR] jelöltük. A csoportok közötti különbségeket Mann–Whitney U teszt, Wilcoxon teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével elemeztük. A post-hoc elemzéseket multiple comparisons of mean ranks for all groups és Tukey tesztekkel végeztük. A $p \leq 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A fibrinolízis és a fibrin szerkezetének vizsgálata

Betegek és módszer

23 DH-s beteg és 12 egészséges kontroll személy friss plazmájában és szérumában a szöveti plazminogén aktivátor (tPA) indukálta fibrinolízis-időt (globális fibrinolitikus potenciál indikátora) és az alvadék maximális turbiditását (a fibrin szerkezet indikátora) mértük spektrofotométer segítségével 340 nm-en 37 °C-on. A beteg csoport és a kontroll csoport fibrinogén szintje a normál tartományba esett. A kontroll személyek egészséges felnőttek,

akik véralvadást befolyásoló gyógyszerkészítményt nem szedtek. A DH-s betegeket a következő csoportokba soroltuk: 7/23 kezeletlen, tünetes páciens, 5/23 dapsonnal kezelt (3/5 intermittáló GMD-t is folytatott), 11/23 szigorú GMD mellett. A dapson kezelést azoknál a pácienseknél kezdtük el, akik gyors javulást szerettek volna, vagy más intézményekben kezdték el náluk a terápiát.

A vizsgálati eredményeket külön vizsgálatként 5 pemphigus vulgarisban (PV) szenvedő páciens és 7 egészséges kontroll személy eredményeivel hasonlítottuk össze.

A dapson hatásának in vitro vizsgálatához két kezeletlen DH-s páciens és két egészséges kontroll személyt vontunk be.

A t-PA-katalizált turbidimetriás fibrinolízis vizsgálat és a dapson in vitro hatása

Kolev és munkatársai által leírt módszert használtuk. A plazma rögök kialakítása trombin, szöveti plazminogén aktivátor (tPA) (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany) hozzáadásával történt Ca tartalmú pufferben.

A szérum lízis vizsgálatánál az említetteken kívül fibrinogént adtunk (2 mg/ml, humán, plazminogén mentes, Calbiochem, LaJolla, CA) a mintákhoz. A plazma és szérum mintákat párhuzamosan vettük le, és fagyasztás nélkül, egy órán belül felhasználtuk a cryoprecipitáció elkerülése miatt. A rögképződés és oldódás folyamatát 340 nm-en (A_{340}) 37 °C-on Zenyth 200 spektrofotométer segítségével elemeztük (Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Austria). A lízis-idő, amit a maximális turbiditás felével definiáltunk, a fibrinolitikus aktivitást jellemző kvantitatív paraméter. A maximális turbiditás (A_{340max}) a fibrin szerkezetének indikátora. A nagyobb turbiditás vastagabb fibrin átmérőt és nagyobb pórusú fibrinhálót jelent. Összehasonlítottuk a beteg és az egészséges csoport lízis-idejét és maximális turbiditását plazmában (fibrinogén dús minták) és szérumban (a beteg fibrinogénjétől mentes, de normál humán fibrinogénnel kiegészített minták) egyaránt.

A dapson hatásának in vitro vizsgálatokor a dapsont terápiás koncentrációban 30 perccel a turbidimetriás lízis vizsgálat előtt közvetlenül a frissen levett plazma mintákhoz adtuk.

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A lízis görbék alapján (A_{340max} értékek) a fibrin szerkezeti vizsgálatához 3 reprezentatív DH-s plazma mintát (P1, P2, P3) és egy egészséges kontroll mintát (átlagos kontroll turbiditás értékkel) választottunk ki. P1 a legmagasabb A_{340max} értéket mutatta, anti-TG2 és anti-TG3 IgA ELISA pozitív, kezeletlen, P2 a legalacsonyabb A_{340max} értéket mutató, anti-TG2 és anti-

TG3 IgA ELISA negatív, dapson kezelés alatt álló diétázó beteg, P3 átlagos $A_{340\max}$ értéket mutató, anti-TG2 IgA ELISA negatív, anti-TG3 IgA ELISA pozitív, dapsonnal kezelt DH-s beteg.

További két kezeletlen, anti-TG2 és TG3 IgA ELISA pozitív DH-s páciens (P22, P23) és két egészséges személy fibrin szerkezetét is vizsgáltuk plazmában in vitro dapson hozzáadása előtt és után.

A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóközpontjának Nanokémiai és Katalízis Intézetében a gyártó szoftverével végeztük (EVO40 Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany). Különböző nagyításokban digitális fotókat készítettünk, így vizsgálhatóvá vált a fibrinháló szerkezete.

A fibrinháló szerkezeti vizsgálata

A kiválasztott minták esetében a SEM felvételek segítségével meghatároztuk a válogatott fibrinszálak átmérőjét egy, a Semmelweis Egyetem Biokémiai Intézetben kidolgozott algoritmus alapján Statistical Toolbox v.7.0 of Matlab 7.10.0.499 (R2010a) szoftver segítségével (The Mathworks, Natick, MA). Az átmérők meghatározásához egy 10-15 egyenlően felosztott horizontális vonalból álló hálót rajzoltunk a kép fölé, és minden fibrinszálat bevontunk a vizsgálatba, amiket kereszteztünk. Az átmérőket manuálisan mértük mindegyik SEM felvételen 300 fibrinszálon, mintánként három SEM felvételen.

Statisztikai elemzés

A lízis vizsgálat paramétereinek elemzését Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük (Statistical Toolbox 7.3 Matlab). A fibrinszálak átmérőjének eloszlását egy, már korábban leírt algoritmus segítségével elemeztük. A különböző mintákra legjobban illeszkedő eloszlásokat Kuiper-teszt segítségével hasonlítottuk össze, és a p -értékeket Monte Carlo eljárással számoltuk. Amikor két eloszlás között statisztikailag szignifikáns különbséget állapítottunk meg, akkor a kvantilis és a variancia számszerű értékeit is statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. A szignifikancia szintet minden esetben $p < ,005$ -nál definiáltuk.

Eredmények

Keringő humán TG3-IgA immunkomplex ELISA

DH-s betegek vérmintáiban keringő TG3-IgA immunkomplexeket tudtunk kimutatni az erre a célra általunk kifejlesztett ELISA technika segítségével.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a DH csoport és az egészséges kontroll csoport plazmában és szérumban mért immunkomplex szintjei között. A DH csoport immunkomplex szintje plazmában ($p=0,0124$) és szérumban ($p=0,0145$) is szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges kontroll csoporté.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a párhuzamosan vizsgált BSA-val blokkolt és BSA-val nem blokkolt kezeletlen DH-s betegek ($p=0,3137$), sem az egészséges kontroll csoportok ($p=0,9984$) között (Tukey teszt). A DH csoport immunkomplex értékei BSA blokkolással ($p=0,0001$) és BSA blokkolás nélkül is ($p=0,0004$) szignifikánsan magasabbak voltak, mint az egészséges kontroll csoporté.

A kezeletlen DH, valamint a három kontroll csoport (egészséges, PV, SLE) TG3-IgA immunkomplex értékei szignifikáns különbséget mutattak ($p<0,01$, Kruskal-Wallis teszt). Post hoc teszttel a kezeletlen DH csoport szignifikánsan nagyobb keringő TG3-IgA immunkomplex szintet mutatott, mint az egészséges kontroll csoport, a PV csoport és az SLE csoport ($p<0,01$). Az egészséges kontroll, a PV és az SLE csoportok TG3 immunkomplex értékei között (A_{450}) nem találtunk szignifikáns különbséget ($p>0,5$) (multiple comparisons of mean ranks for all groups).

Mind a TG3 ellenanyagok, mind a TG3-IgA immunkomplexek jellemzőek voltak kezeletlen DH-s betegekre, de a két érték nem korrelált. A kezeletlen DH-s betegcsoportban a TG3-IgA immunkomplex szintjei nem mutattak különbséget az anti-humán TG3 IgA ELISA pozitív ($n=22$) és negatív/szürke zóna ($n=13$) betegek között ($p=0,3747$, Mann-Whitney U teszt). A TG3 IgA ellenanyag szint és a keringő TG3-IgA immunkomplex szint között nem találtunk szignifikáns korrelációt sem a kezeletlen DH csoportban ($p=0,7222$, Spearman-féle korrelációs teszt), sem a diétázó csoportban ($p=0,4775$).

A kezeletlen DH-s páciensek keringő TG3-IgA immunkomplex értékei szignifikánsan csökkentek GMD alatt, remisszióban ($p=0,0050$, Wilcoxon teszt). Néhány tünetmentes diétázó páciensnél azt tapasztaltuk, hogy a TG3 immunkomplexek nem tűntek el teljesen a keringésből.

A fibrinolízis és a fibrin szerkezetének vizsgálata

A t-PA-katalizált turbidimetriás fibrinolízis vizsgálat és a dapson in vitro hatása

Vizsgálatunk során szisztémás tényezőket kerestünk, amelyek a DH-s betegek fibrinolitikus potenciálját befolyásolják, ezért a betegek plazmájából alvadékokat képeztünk és tPA-val indukáltuk oldásukat.

A plazma lízis görbék alapján a beteg csoport lízis ideje megnyúlt, a maximális turbiditás meghaladja a kontroll csoport értékeit. A lízis görbék alapján kiválasztottuk az alvadék fibrinszerkezetének további ultrastrukturális vizsgálatához a legmagasabb (P1), a legalacsonyabb (P2) és a kontroll csoport átlagához hasonló $A_{340\max}$ értéket mutató páciens (P3).

In vitro humán fibrinogénnel szubsztituált szérum minták esetében a lefutási kinetikák közötti különbségek eltűntek, a kontroll csoport lízis ideje és maximális turbiditása helyenként meghaladta a beteg csoportét.

A statisztikai elemzés során a következő eredményeket kaptuk:

A plazmában mért lízis idő szignifikánsan hosszabb a kezeletlen ($n=7$) és a teljes ($n=23$) DH csoportban, mint az egészséges kontroll csoportban ($p=0,026$, $p=0,004$).

A teljes és kezeletlen DH csoport plazmában mért $A_{340\max}$ értéke szignifikánsan nagyobb volt, mint az egészséges kontroll csoportban ($p=0,0009$, $p=0,001$).

A humán fibrinogénnel kiegészített szérumban sem a lízis idő, sem a turbiditás értékek között nem találtunk különbséget a kezeletlen és a teljes DH csoportok, valamint az egészséges kontroll csoport között (lízis idő $p=0,1168$, $p=0,731$, $A_{340\max}$ $p=0,1698$, $p=0,4501$). A kezeletlen és a teljes DH csoport lízis ideje rövidebb, a maximális turbiditása kisebb volt,

mint az egészséges kontroll csoporté. A különbséget a szérum keletkezése során eltávolított fibrinogén, valamint a hozzá kötődő anyagok okozhatják.

A dapson kezelés alatt álló DH csoport esetében a plazmában mért lízis idő szignifikánsan rövidebb ($p=0,01$), a maximális turbiditás szignifikánsan alacsonyabb ($p=0,02$) volt, mint a kezeletlen DH csoport esetében. A dapson kezelés hatására a fibrinolitikus potenciál paraméterei az egészséges kontroll csoport irányába változtak.

Figyelemre méltó, hogy a GMD javította a fibrinolitikus paramétereket DH-s páciensek esetében, de a statisztikai különbségek továbbra is fennálltak a diétázó csoport és az egészséges kontroll csoport között a plazmában mért lízis idő ($p=0,023$) és a maximális turbiditás tekintetében ($p=0,001$).

A dapson plazmában észlelt hatása eltűnt a szérumok esetében, ahol normál humán fibrinogénnel helyettesítettük a mintákból a szérum képződése során kicsapódó fibrinogént.

Mérsékelten (5-10%), de statisztikailag szignifikánsan csökkent a lízis idő, valamint a maximális turbiditás kezeletlen DH-s páciensek plazmájában, amikor a dapsont terápiás dózisban közvetlenül a plazmákhoz adtuk fél órával a turbidimetriás lízis vizsgálatot megelőzően ($p<0,05$).

Egy különálló kontroll kísérletben pemphigus vulgaris betegek ($n=5$) eredményeit hasonlítottuk össze egészséges kontroll személyekével ($n=7$). A plazmában mért lízis idő, és a maximális turbiditás esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a PV csoport és az egészséges kontroll csoport között. Exogén humán fibrinogén hozzáadását követően a szérumok esetében a lízis idő és a maximális turbiditás értékek szintén nem különböztek szignifikánsan az egészséges kontroll csoporttól.

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A plazma alvadékok esetében a tPA-indukált lízis vizsgálatok során észlelt magasabb maximális turbiditás értékek (A_{340max}) vagy az eltérő fibrinogén koncentrációnak, vagy a megváltozott fibrin szerkezetnek tulajdoníthatóak. Mivel a vizsgált plazma minták fibrinogén koncentrációja a normál tartományon belül volt (1,5-4,5 g/l), pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk a fibrinszerkezet közvetlen vizsgálatához. A plazma lízis görbék

alapján összesen három beteg (P1-3) és egy egészséges kontroll mintát választottunk ki. P1 beteg a legnagyobb maximális abszorbanciát mutatta, P2 a legalacsonyabb, P3 görbéje pedig a kontrollok között található.

A különbségek már a pásztázó elektronmikroszkópos fotókon is láthatóak voltak. A legmagasabb abszorbanciájú kezeletlen anti-TG2, anti-TG3 IgA ELISA pozitív P1 beteg fibrin szerkezete szövevényesebb, a fibrin szálak átmérője vastagabb volt, mint az egészséges kontroll személyé. Az anti-TG2, anti-TG3 IgA ELISA negatív, dapson terápia és GMD alatt álló P2 beteg esetében a fibrinszálak átmérője vékonyabb volt, a fibrin szerkezet lazább volt, pórusai nagyobbak voltak, mint a P1 beteg, vagy az egészséges kontroll esetében.

A fibrinhálók látható szerkezeti különbségeit a plazma fibrinszálak átmérőjének további vizsgálatával számszerűen is alátámasztottuk. A kezeletlen P1 beteg esetében a fibrinszálak átmérőjének medián értéke szignifikánsan nagyobb volt, mint az egészséges személynél mért medián érték ($p < 0,001$). A plazma fibrinszálak a dapsonnal kezelt betegek esetében akár GMD alatt is álltak (P2), akár nem (P3), vagy még vékonyabbak voltak (P2), vagy megegyeztek (P3) a kontroll személynél vizsgált fibrinszálak átmérőivel.

A megfigyelt különbség megerősítéséhez egy külön vizsgálat során további két kezeletlen DH-s beteg és 2 egészséges személy fibrinszálainak átmérőit vizsgáltuk. Az újabb vizsgálat megerősítette a korábban észlelt fibrinszál vastagodást a kezeletlen DH-s betegek esetében.

A dapson fibrin szerkezetre gyakorolt közvetlen hatásának vizsgálatához 30 perccel az alvasztás előtt a plazma mintákat 5 $\mu\text{g/ml}$ dapsonnal inkubáltuk a terápiás koncentráció eléréséhez. A DH-s betegek és az egészséges személyek esetében is szignifikánsan csökkent a fibrinszálak átmérőinek medián értéke ($p < 0,05$).

Következtetések

- 1.** Elsőként azonosítottunk keringő TG3-IgA immunkomplexeket egy saját fejlesztésű szemikvantitatív ELISA módszer segítségével DH-ban, ami alátámasztja a hipotézisünket, mely szerint a DH egy immunkomplex betegség, ahol a keringő, majd a dermális papillák csúcsán precipitálódó TG3-IgA immunkomplexek felelősek a bőrtünetek kialakításáért.
- 2.** Vizsgálataink során igazoltuk, hogy az anti-TG3 IgA ellenanyag szintek és a keringő TG3-IgA immunkomplex értékek nem mutatnak szignifikáns korrelációt sem a kezeletlen DH csoportban, sem GMD alatt, értékük ugyanannál a betegnél különböző lehet. A keringő TG3-IgA immunkomplex mennyisége szignifikánsan csökken remisszióban, GMD mellett, és szintje glutén dependensen változik. A TG3-IgA immunkomplexek jelen lehetnek a keringésben olyan esetben is, amikor keringő TG3 ellenanyag nem mutatható ki.
- 3.** Kezeletlen DH-s betegek plazma alvadékaiban a tPA-indukálta lízis szignifikánsan lassabb volt egészséges kontroll csoporthoz képest, azaz csökkent fibrinolitikus potenciált, gátolt szisztémás fibrinolízist igazoltunk.
- 4.** A csökkent fibrinolitikus potenciál legalább részben a pásztázó elektronmikroszkópiával igazolt megváltozott fibrin szerkezetre vezethető vissza.
- 5.** A dapson in vitro kis mértékben, de szignifikánsan javította a fibrinolitikus potenciált és a fibrin szerkezetét, hatására az egészségesekhez hasonló értékeket kaptunk. Ez a hatás hozzájárulhat a terápiás hatékonyságához.

Saját közlemények

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Görög A, Németh K, Kolev K, Zone JJ, Mayer B, Silló P, Bognár P, Kárpáti S. (2016) Circulating Transglutaminase 3-Immunglobulin A Immune Complexes in Dermatitis Herpetiformis. *J Invest Dermatol.* 136: 1729-1731.

IF:6,915

Görög A, Németh K, Szabó L, Mayer B, Silló P, Kolev K, Kárpáti S. (2016) Decreased fibrinolytic potential and morphological changes of fibrin structure in dermatitis herpetiformis. *J Dermatol Sci.* 84: 17-23.

IF:3,739

A disszertációtól független publikációk

Tukaj S, **Gorog A**, Kleszczyński K, Zillikens D, Kárpáti S, Kasperkiewicz M. (2016) Autoimmunity to heat shock proteins and vitamin D status in patients with celiac disease without associated dermatitis herpetiformis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.10.002. [Epub ahead of print]

IF:3,985

Kasperkiewicz M, Tukaj S, Gembicki AJ, Silló P, **Gorog A**, Zillikens D, Kárpáti S. (2014) Evidence for a role of autoantibodies to heat shock protein 60, 70, and 90 in patients with dermatitis herpetiformis. *Cell Stress Chaperones*, 19: 837-843.

IF:3,163

Orbán Annamária, **Görög Anna**, Silló Pálma, Kuroli Enikő, Hársing Judit, Kárpáti Sarolta. (2014) Gyermekkori lichen sclerosus et atrophicus, alopecia totalis és autoimmun thyreoiditis együttes előfordulása. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle.* 90: 55-59.