A thromboticus microangiopathia vizsgálata allogén vérképző őssejt-átültetés után

Doktori tézisek

Dr. Horváth Orsolya

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:
Dr. Kriván Gergely, PhD, egyetemi docens
Hivatalos bírálók:
Dr. Farkas Henriette, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD, laboratóriumi vezető

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Horváth Csaba, az MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Garami Miklós, PhD, egyetemi docens
Dr. Fogarasi András, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest
2018

1. BEVEZETÉS

Az őssejt-transzplantációhoz társult thromboticus microangiopathia (TA-TMA) felismerése és kezelése nagy kihívást jelent őssejt-transzplantáció (tx) után. Microangiopathiás hemolitikus anaemiával, más okkal nem magyarázható thrombocytopeniával, emelkedett laktát dehidrogenázzal (LDH) és megnövekedett transzfúziós igénnyel jár, a perifériás kenetben schistocyták észlelhetőek. Azonban a TA-TMA jelei és tünetei nagyon hasonlóak a többi őssejt-transzplantáció után jelentkező szövődményhez, mint az akut graft-versus-host betegség (GVHD), fertőzések, graftelégtelenség, immun-mediált thrombocytopenia, venokklúzív betegség, relapszus, és gyógyszermellékhatások, például magas vérnyomás és akut veseelégtelenség. Az egységes elfogadott kritériumrendszer hiánya miatt a TA-TMA incidenciája nagyon különböző (0,5%-63,6%) az egyes közleményekben. A különböző incidenciákhoz hozzájárulhatnak a kondícionáló kezelésekben bekövetkezett változások és a szövettani mintavétel nehézségei a transzplantáción átesett betegekben.

Az endothelialis károsodás szerepet játszik a TA-TMA patogenezisében, azonban csak részben magyarázza meg a szövődmény hátterét. A legfrissebb eredmények szerint a TA-TMA kialakulásában a komplementrendszer alternatív út diszregulációjának is szerepe lehet. A kiterjedt komplement aktiváció (melyet az emelkedett C3a és C5a anaphylatoxin szintek, és a terminális komplement aktivációs komplex (sc5b-9) jeleznek) aktiválják többek között a vérlemezkéket, a granulocytákat, az endotheliális sejteket és a koagulációs kaszkádot, ezáltal sejtkárosodához és thromboticus microangiopathiahoz vezetnek. Jodele és mtsai eredményei alapján a TA-TMA diagnózisakor igazolt komplement aktiváció (emelkedett sC5b-9 szintek) esetén rosszabb a betegek prognózisa. Azonban más vizsgálatok nem állnak még rendelkezésre, amelyek prospektíven a komplementaktiváció szerepét és a komplementprofil változásait vizsgálták volna az őssejt-transzplantáció során.

A komplementgátló kezelésekkel kedvező eredményeket értek el a TMA-k, köztük az atípusos hemolitikus uraemiás szindróma kezelésében. Miután az

alternatív komplement út szerepét igazolták a TA-TMA kialakulásában, megjelentek az első bíztató eredmények a humán monoklonális anti-C5 antitesttel, az eculizumabbal kapcsolatban TA-TMA-ban is. Az ígéretes kezelési lehetőségek tovább hangsúlyozzák azt a klinikai igényt, hogy a TA-TMA időben való felismeréséhez megfelelő prediktív tényezők álljanak rendelkezésre. Az eddig használt diagnosztikus kritériumrendszerek olyan hematológiai és vesekárosodást jelző klinikai paramétereket vesznek alapul, melyek már egy zajló, szervkárosodással járó folyamatot jeleznek. A diagnosztikus kritériumok legfrissebb módosítása azonban a komplement aktivációs markerek vizsgálatával, és a magas vérnyomás és proteinuria figyelembevételével a kialakuló TA-TMA korábbi klinikai diagnózisát teszik lehetővé. Azonban jelenlegi ismereteink szerint csak néhány kutatás vizsgálta a biomarkerek potenciális szerepét a TA-TMA kialakulásában vérképző őssejt-átültetés után. Ilyen potenciális biomarkerek lehetnek a szolúbilis adhéziós molekula-, szérum neutrophil extracellularis csapda (trap)- és a komplement aktivációs termékek szintjei.

A kutatómunkám célkitűzéseinek meghatározásához a TA-TMA diagnosztikus kritériumrendszerében bekövetkezett legújabb változásokat, az alternatív komplementút diszregulációjának lehetséges szerepét vettük alapul. Kutatásunk irányát meghatározták a terminális komplement aktivációs marker és a magas rizikójú TA-TMA jelentkezése között felismert legújabb összefüggések, és az első anti-C5 komplementgátló kezelésekkel elért ígéretes eredmények. Kutatómunkám fő irányának a potenciális prediktív értékű komplement biomarkerek keresését választottuk allogén vérképző őssejt-átültetés után.

2. CÉLKITŰZÉS

Ph.D. munkám célkitűzései az alábbi három pontban foglalhatóak össze:

1) Célul tűztük ki a TA-TMA-s betegek definiálását öt különböző diagnosztikus kritériumrendszer segítségével, és összehasonlítottuk a TA-TMA aktivitását jelző

paraméterek változásait a különböző TA-TMA betegcsoportokban.

2) Vizsgáltuk a komplementrendszer aktivitásának longitudinális változásait őssejt-transzplantáció során egy prospektív kohorsz gyermek betegcsoportban.

3) Célul tűztük ki a komplementprofil változásainak prediktív tényezőként való értékelését TA-TMA-ban.

3. MÓDSZEREK

Betegek, minta- és adatgyűjtés

Negyven gyermeknél történt allogén vérképző őssejt-átültetés malignus (n=20) és nem malignus (n=20) indikációk miatt Budapest Gyermekhematológiai és Őssejt-transzplantációs Osztályán 2013 novembere és 2015 júniusa között. A prospektív, konszekutív kohorsz vizsgálat beválasztási kritériumainak harminchárom gyermek felelt meg, akiknél további adatgyűjtést és komplement méréseket végeztünk. A kizárási kritériumok a 10 kg alatti testtömeg (5 beteg került

kizárásra) és a korai halálozás (<30 nappal tx után, 2 beteg került kizárásra) voltak.

A mintákat egy előre meghatározott séma szerint gyűjtöttük, a kondícionáló kezelés előtt, és a +28, +56. és +100. tx utáni napokon. Ha transzplantáció után szövődmény jelentkezett, nem történt újabb mintavétel. A mintagyűjtés a Helsinki Deklaráció elveinek megfelelően, tájékozott beleegyezést követően történt, vizsgálatunkat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük.

Komlement, és egyéb laboratóriumi és klinikai paraméterek meghatározása

A transzplantáció előre meghatározott időpontjaiban mértük a komplement utak aktivitását, a komplement komponensek és aktivációs termékek szintjeit, a szolúbilis terminális komplement aktivációs komplex (sC5b-9) szintjét és az ADAMTS13 aktivitást.

Monitoroztuk az alábbi TA-TMA aktivitását jelző paraméterek változásait: LDH, thrombocytopenia, anaemia, Coombs-teszt, kreatinin és haptoglobin szintek,

fragmentocyták (vérkép automatával meghatározva), magas vérnyomás, proteinuria.

Az őssejt-transzplantáció utáni szövődmények definíciója

A graft-versus-host betegséget (GVHD) a Glucksberg kritériumok segítségével határoztuk meg, és hetente polimeráz láncreakcióval monitoroztuk a vírus reaktivációkat (Epstein-Bar vírus, cytomegalovírus, adenovírus). Öt különböző TA-TMA diagnosztikus kritériumrendszer alapján soroltuk be a betegeinket: (1) az Amerikai Csontvelő-transzplantációs Társaság (ASBMT), (2) a Nemzetközi Munkacsoport klinikai kritériumai (IWG) (3) Cho és mtsai diagnosztikus kritériumai, (4) City of Hope diagnosztikus kritériumai, és (5) Jodele és mtsai diagnosztikus kritériumai alapján. A TA-TMA diagnózisának azt a transzplantáció utáni napot tekintettük, amikor Jodele és mtsai diagnosztikus kritériumait a betegek teljesítették.

Statisztikai módszerek

A legtöbb változó nem követte a normál eloszlást, ezért nem paraméteres teszteket használtunk a csoportok összehasonlítására. A TA-TMA eseménymentes

túlélésének becsléséhez a Kaplan-Meier módszert alkalmaztuk, és log-rank teszttel hasonlítottuk össze a túlélési görbéket. Kétoldalas p-értékeket számoltunk, és az eredményt 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak ($p<0,05$). A számításokat a Statistica 8.0 és a GraphPad Prism 6.03 statisztikai szoftverek segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK

Demográfiai eredmények

Prospektíven harminc-három (9,6 ± 4,4 év) gyermeket vizsgáltunk, akik malignus (n=17) és nem malignus indikáció (n=16) miatt estek át allogén őssejt-tx-en. A betegek többsége (24/33) treosulfan alapú kondícionáló kezelésben részesült. A betegek legnagyobb hányada idegen donortól származó humán leukocyta antigén- identikus (76%) csontvelői graftot (70%) kapott. A vírusreaktiváció volt a leggyakoribb transzplantációs szövődmény (15/33 eset) betegcsoportunkban. Emellett egy betegnél primer cytomegalovírus, 1 betegnél primer Epstein-Barr vírus fertőzést észleltünk. Grade I-II akut GVHD 11/33 (33%) betegnél jelentkezett.

A TA-TMA diagnózisa

Az öt különböző TA-TMA diagnosztikus kritériumrendszer segítségével 2/33 TA-TMA-s esetet definiáltunk az ASBMT, 7/33 esetet az IWG, 7/33 esetet Cho és mtsai kritériumai alapján, 3/33 esetet a City of Hope definíciója, és 10/33 TA-TMA esetet Jodele és mtsai diagnosztikus kritériumai alapján. A TA-TMA incidenciája egy 6%-tól (2/33) 30% -os (10/33) skálán változott a különböző diagnosztikus kritériumrendszertől függően. Tízből hét beteget legalább 3 diagnosztikus kritériumrendszer alapján a TA-TMA betegcsoportba definiáltunk. Minden TA-TMA-s beteg teljesítette Jodele és mtsai kritériumait, aki bármelyik másik kritériumrendszer szerint TA-TMA betegcsoportba tartozott. Három betegnek mindvégig normál haptoglobin szintje és normál vesefunkciója (nem duplázódott meg a szérum kreatinin a kiindulási szinthez képest) volt, és csak Jodele és mtsai és/vagy a City of Hope definíciója alapján tartozott TA-TMA betegcsoportba. A csökkentett toxicitású kondícionáló kezelés után a Grade I-II GVHD és a TA-TMA incidenciája majdnem azonos volt betegcsoportunkban.

A TA-TMA-s betegek klinikai jellemzői

Jellemzően a TA-TMA graft-versus host betegség és/vagy vírus reaktiváció után jelentkezett. A TA-TMA kialakulását 3/10 esetben GVHD, 2/10 esetben vírusreaktiváció, és 4/10 esetben vírusreaktiváció és GVHD is megelőzte. A csökkentett toxicitású kondícionáló kezelés után a betegek nagy részénél a TA-TMA egy enyhe, önkorlátozó formában zajlott, szervkárosodásra utaló jelek nélkül, és calcineurin inhibitorok elhagyása vagy váltása után a betegek nagy részénél a TA-TMA oldódott.

A komplementrendszer aktivitának longitudinális elemzése az őssejt-transzplantáció utáni első 100 napban

A terminális komplement aktivációs komplex volt az egyetlen komplement paraméter, amely longitudinális vizsgálata során szignifikáns változásokat találtunk. TA-TMA betegcsoportban a sC5b-9 szintek a kiindulási szinthez képest megemelkedtek, a csúcsértékeket a +28. napon mértük. A kiindulási sC5b-9 szintekben nem volt különbség a később TA-TMA-s betegek (208 (166- 271) ng/mL, medián (interkvartilis tartomány)) értékei, és

azon betegek értékei között, akiknél nem alakult ki később TA-TMA (200 (144-266) ng/mL), azonban a +28. napon szignifikáns különbség volt megfigyelhető (411 (337-471) ng/mL versus 201 (185-290) ng/mL, p=0,004). Továbbá mind a 10/10 később TA-TMA-s betegnél korai sC5b-9 szint emelkedést detektáltunk, szemben a nem TA-TMA-s betegcsoportban 9/23 betegnél volt korai sC5b-9 emelkedés (p=0,031). Nem volt szignifikáns összefüggés a TA-TMA kialakulása és a klasszikus és alternatív út aktivitásának változásai, valamint a C3, C4, C4d, és C3a koncentrációk és az ADAMTS13 aktivitás változásai között.

Következő lépésként a korai sC5b-9 szint emelkedés, valamint a megtapadással és transzplantációval összefüggő szövődmények kapcsolatát vizsgáltuk. A korai sC5b-9 szint emelkedés alapján soroltuk be betegeinket. A TA-TMA egyértelmű és figyelemre méltó összefüggést mutatott a terminális komplement aktivációs komplex korai emelkedésével. A korai sC5b-9 emelkedést mutató betegcsoportban (n=19), 10/19 betegnél alakult ki később TA-TMA, míg nem definiáltunk később TA-TMA-t, ha a sC5b-9 szint a

kiindulási szintről a +28. napra nem emelkedett (10/19 versus 0/14, p=0,001).

A +28. nap előtt diagnosztizált magas vérnyomás volt az egyetlen olyan TA-TMA aktivitását jelző paraméter, amely szignifikáns összefüggést mutatott a sC5b-9 szint korai emelkedésével (p=0,027), míg a csökkent haptoglobin szintekkel egy tendenciaszerű összefüggést figyeltünk meg (p=0,098).

Utolsó lépésként elemeztük, hogy a korai sC5b-9 szint emelkedés igazolása hogyan segítheti az őssejt-transzplantáción átesett betegek későbbi klinikai ellátását. Szenzitivitást és specificitást számítottunk a sC5b-9 emelkedés prediktív tényezőként való értékeléséhez. A sC5b-9 szint korai emelkedése 100%-os szenzitiviással és 61%-os specifitással jelezte előre a TA-TMA kialakulását gyermek kohorsz betegcsoportunkban.

Túlélési eredmények

Az összesített túlélés 24/33 (73%) medián 2,6 (interkvartilis tartomány, 1,5-2,9) év követési idő múlva betegcsoportunkban. A nem malignus betegek összesített túlélése kiváló (15/16, 94%). Ezzel szemben a treosulfan alapú kondícionáló kezelés után a malignus beteg

relapszus rátája magas, 7/17 beteg relapszusban halt meg, míg 1/17 beteg halt meg transzplantációval összefüggő halálok miatt. A transzplantációval összefüggő halálozás alacsony volt a +30. nap után a teljes betegcsoportban (2/33, 6%). Nem volt különbség a TA-TMA-s (7/10, 70%) és nem TA-TMA-s (17/23, 74%) betegek összesített túlélési eredményei között. Továbbá nem találtunk összefüggést a moratlitás és a korai sC5b-9 szint emelkedése között.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A Ph.D. munkám során célul tűztük ki a TA-TMA incidenciájának vizsgálatát gyermek kohorsz betegcsoportunkban különböző diagnosztikus kritériumrendszerek alkalmazásával, elemeztük a komplement biomarkerek változásait őssejt-transzplantáció során, valamint vizsgáltuk a komplementaktiváció és a TA-TMA kialakulása közötti lehetséges összefüggéseket. Eredményeink alapján szoros összefüggés áll fenn a terminális komplement aktivációs komplex korai emelkedése és a TA-TMA későbbi

kialakulása között. A sC5b-9 korai emelkedése 100%-os szenzitivitással prediktálta a szövődmény kiakakulását.

A disszertáció konklúziói a következők:

(1) Megfigyeléseink alapján a thromboticus microangiopathia egy gyakori szövődmény allogén őssejt-transzplantáció után. A TA-TMA incidenciája egy 6%-tól (2/33) 30% -os (10/33) skálán változott a különböző diagnosztikus kritériumrendszertől függően. Összesen 10/33 betegnél definiáltunk az enyhétől a súlyos esetekig terjedő TA-TMA-t. A TA-TMA incidenciáját és a diagnózis időpontját befolyásolja az alkalmazott diagnosztikus kritériumrendszer.

(2) Jellemzően a TA-TMA graft-versus host betegség és/vagy vírus reaktiváció után jelentkezett. A TA-TMA kialakulását 3/10 esetben GVHD, 2/10 esetben vírusreaktiváció, és 4/10 esetben vírusreaktiváció és GVHD is megelőzte. A csökkentett toxicitású kondícionáló kezelés után a betegek nagy részénél a TA-TMA egy enyhe, önkorlátozó formában zajlott,

szervkárosodásra utaló jelek nélkül, és calcineurin inhibitorok elhagyása vagy váltása után a betegek nagy részénél a TA-TMA oldódott.

(3) A terminális komplement aktivációs komplex volt az egyetlen komplement paraméter, amely longitudinális vizsgálata során szignifikáns változásokat találtunk a TA-TMA kialakulásával összefüggésben. Nem volt szignifikáns összefüggés a TA-TMA kialakulása és a klasszikus és alternatív út aktivitásának változásai, valamint a C3, C4, C4d, és C3a koncentrációk és az ADAMTS13 aktivitás változásai között.

(4) Prospektív, konszekutív kohorszvizsgálatunk keretében elsőként vizsgáltuk a komplementrendszer aktivitásának longitudinális változásait az allogén vérképző őssejt-átültetés utáni első 100 napban, és elsőként írtunk le szoros összefüggést a terminális komplement aktivációs komplex korai emelkedése és a TA-TMA későbbi kialakulása között. Eredményeink alapján a sC5b-9 korai (kiindulási szintről a +28. napra) emelkedése, a legtöbb szövődmény

kialakulása előtt, előre jelezte a későbbi TA-TMA-t. A sC5b-9 szint korai emelkedése 100%-os szenzitiviással és 61%-os specifitással jelezte előre a TA-TMA kialakulását gyermek kohorsz betegcsoportunkban. A kiindulási sC5b-9 szintekben nem volt különbség a később TA-TMA-s betegek (208 (166- 271) ng/mL, medián (interquartilis tartomány)) értékei, és azon betegek értékei között, akiknél nem alakult ki később TA-TMA (200 (144-266) ng/mL), azonban a +28. napon szignifikáns különbség volt megfigyelhető (411 (337-471) ng/mL versus 201 (185-290) ng/mL, p=0,004). Továbbá mind a 10/10 később TA-TMA-s betegnél korai sC5b-9 szint emelkedést detektáltunk, szemben a nem TA-TMA-s betegcsoprtban 9/23 betegnél volt korai sC5b-9 emelkedés (p=0.031).

(5) A treosulfan alapú csökkentett toxicitású kondícionáló kezelés magas aránya miatt (24/33) a korai transzplantációhoz kötődő súlyos szövődmények aránya indokoltan alacsony volt kohorsz betegcsoportunkban, és nem volt összefüggés a TA-TMA és a nem relapszushoz kötődő mortalitás között. Ha agresszívebb vagy

toxikusabb kondícionáló kezeléseket követő, független kohorsz vizsgálatok során is validálnák megfigyelésünket, a terminális komplement aktivációs komplex sC5b-9 mérése segíthetne azonosítani azokat a beteget, akiknél korai sC5b-9 szint emelkedés detektálható, és a későbbi TA-TMA kialakulásának a rizikója emelkedett. A sC5b-9 komplement aktivációs marker és a TA-TMA aktivitását jelző többi paraméter monitorozása segítheti a klinikust a TA-TMA korai felismerésében, és lehetővé teheti a kiválasztott betegek számára az optimális kezelést. További nagy esetszámú vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy a sC5b-9 korai emelkedése a TA-TMA független prediktora.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Horváth O, Kállay K, Csuka D, Mező B, Sinkovits G, Kassa C, Stréhn A, Csordás K, Sinkó J, Prohászka Z, Kriván G. (2018) Early Increase in Complement Terminal Pathway Activation Marker sC5b-9 Is Predictive for the Development of Thrombotic

Microangiopathy after Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant, 24: 989-996.
IF: 4.704 (2016)

Horváth O, Prohászka Z, Kállay K, Kassa C, Stréhn A, Csordás K, Sinkó J, Kriván G. (2017) [Changes in diagnostic criteria of thrombotic microangiopathy after stem cell transplantation]. Orv Hetil, 158: 1043-1050. Hungarian.
IF: 0.349 (2016)

A disszertációtól független közlemények:
Horváth O, Kállay K, Kriván G. (2015) [A vashiányos anaemia korszerű kezelése gyermekkorban] Gyermekgyógyásztai Továbbképző Szemle, 20: 211-213. Hungarian.

Kállay K, Zakariás D, Csordás K, Benyó G, Kassa C, Sinkó J, Stréhn A, Horváth O, Vásárhelyi B, Kriván G. (2018) Antithymocyte Globuline Therapy and Bradycardia in Children. Pathol Oncol Res. doi: 10.1007/s12253-018-0403-y. Article in Press.

IF: 1.736 (2016)

Kállay K, Kassa C, Réti M, Karászi É, Sinkó J, Goda V, Stréhn A, Csordás K, Horváth O, Szederjesi A, Tasnády S, Hardi A, Kriván G. (2018) Early Experience With CliniMACS Prodigy CCS (IFN-gamma) System in Selection of Virus-specific T Cells From Third-party Donors for Pediatric Patients With Severe Viral Infections After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. J Immunother, 41: 158-163.
IF: 3.203 (2016)