

Krzysztof Łukasz Piwowarek

Kliniczne znaczenie oznaczeń aktywności osoczowej acetylohydrolazy PAF w anafilaksji

Streszczenie

W prezentowanej dysertacji podjęto się oceny klinicznego znaczenia acetylohydrolazy czynnika aktywującego płytki (PAF-AH; *platelet activating factor acetylhydrolase*) w anafilaksji. Głównym założeniem analizy było rozważenie potencjalnego zastosowania pomiarów osoczowej aktywności tego enzymu jako markera ryzyka wystąpienia wspomnianej jednostki chorobowej.

Czynnik aktywujący płytki (PAF; *platelet activating factor*) jest mediatorem o dowiedzionym udziale w patogenezie wielu chorób z komponentą zapalną, w tym o etiologii alergicznej. Jego stężenie we krwi obwodowej jest dynamicznie regulowane przez osoczną acetylohydrolazę PAF. Udowodniono związek pomiędzy aktywnością tego enzymu a występowaniem i przebiegiem wielu zespołów chorobowych, takich jak cukrzyca, zespół policystycznych jajników i miażdżyca. W szczególności ostatnia wymieniona stanowi istotny problem medyczny i społeczny. Miażdżyca jest jednostką chorobową o złożonej patogenezie, u której podstaw wydaje się leżeć stres oksydacyjny, a także będący jego efektem przewlekły stan zapalny. Mimo, że odkryto już wiele czynników ryzyka tych procesów, kolejne są wciąż badane i być może będą użyteczne w stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego. Jednym z takich nowych czynników ryzyka jest aktywność PAF-AH. Choć jej rola w patofizjologii miażdżycy wciąż pozostaje kontrowersyjna, to dysponujemy już przekonującymi danymi na temat potencjalnej wartości tego enzymu jako markera procesu miażdżycowego. W dalszym ciągu nie ustalono jednak, czy i w jakich przypadkach może być on wykorzystywany do wczesnego diagnozowania subklinicznych postaci miażdżycy oraz do oceny jej dalszego przebiegu. W przypadku chorób alergicznych znaczenie PAF-AH podkreśla się w zakresie astmy oskrzelowej i anafilaksji. Badania wskazują, że niska aktywność osoczowej acetylohydrolazy PAF może być potencjalnym markerem predykcyjnym ciężkiego przebiegu przynajmniej niektórych rodzajów nadwrażliwości alergicznej. Interesujące w kontekście chorób alergicznych wydają się również możliwe zależności pomiędzy aktywnością

wspomnianego enzymu a polimorfizmami kodującego go genu, stężeniami poszczególnych frakcji lipoprotein, stosowaną farmakoterapią i przewlekłymi zespołami chorobowymi o innej etiologii.

Główny cel pracy stanowiła ocena związku między nasileniem reakcji anafilaktycznej a osoczną aktywnością acetylohydrolazy PAF. Dodatkowo badano korelacje pomiędzy aktywnością enzymu a innymi zmiennymi, takimi jak stężenie poszczególnych frakcji lipidogramu oraz ultrasonograficzne wykładniki subklinicznego procesu miażdżycowego. Reasumując, założyliśmy następujące hipotezy: 1) niska aktywność osoczowa PAF-AH jest związana z ciężkim przebiegiem reakcji anafilaktycznej; 2) aktywność osoczowa PAF-AH koreluje ze stężeniami frakcji lipidogramu; 3) aktywność osoczowa PAF-AH dodatkowo koreluje z grubością kompleksu intima-media tętnic szyjnych wspólnych (CIMT; *carotid intima-media thickness*).

Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z aktualnymi wytycznymi ICH-GCP, zasadami etycznymi zawartymi w bieżącej rewizji Deklaracji Helsińskiej oraz polskimi wymogami prawnymi i regulacyjnymi w tym zakresie. Metodyka badawcza projektu opierała się na sprawdzonych i uznanych metodach obecnych w międzynarodowej literaturze przedmiotu, szczególnie w pracach Pravettoniego i wsp. oraz Kisiela i wsp..

Do udziału w grupie badanej po wstępnej ocenie zakwalifikowano 101 pacjentów. Następnie 6 osób zostało zdyskwalifikowanych z uwagi na wystąpienie kryterium wykluczenia, tj. podwyższonego poziomu tryptazy w surowicy krwi obwodowej. Wskazuje on na ryzyko dysfunkcji komórek tucznych lub mastocytozy, które warunkują odmienny i swoisty patomechanizm anafilaksji.

Tak powstałą finalną grupę badaną podzielono następnie na dwie podgrupy, zależnie od nasilenia najcięższej reakcji anafilaktycznej w wywiadach, co oceniano zgodnie ze skalą Müllera. Pierwsza podgrupa skupiała uczestników, u których w przeszłości występowały reakcje o maksymalnej ciężkości do II stopnia włącznie. Liczyła ona 43 chorych, w tym 21 kobiet i 22 mężczyzn. W drugiej podgrupie znaleźli się pacjenci po minimum jednej reakcji III lub IV stopnia. Było to 52 chorych, w tym 27 kobiet i 25 mężczyzn. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 20 osób – 9 kobiet i 11 mężczyzn – z ujemnym wywiadem atopowym.

W toku badań stwierdzono, że osoczowa aktywność acetylohydrolazy czynnika aktywującego płytki była istotnie niższa u pacjentów obciążonych wywiadem anafilaksji w porównaniu do grupy kontrolnej z ujemnym wywiadem atopowym (kolejno średnio 21,38

nmol/min/ml dla grupy kontrolnej, 9,47 nmol/min/ml dla podgrupy pierwszej oraz 10,16 nmol/min/ml dla podgrupy drugiej, w obydwu przypadkach $p < 0,0001$). Różnica ta jest wielokrotna i statystycznie znacząca. Obniżenie aktywności osoczowej PAF-AH w podobnym stopniu dotyczyło wszystkich podgrup ciężkości anafilaksji, a także było niezależne od czynnika wywołującego. Nie zaobserwowano związku pomiędzy stopniem ciężkości anafilaksji w wywiadzie a redukcją aktywności enzymu.

Grubość kompleksu intima-media tętnic szyjnych wspólnych była średnio niższa u uczestników z III i IV stopniem ciężkości anafilaksji wg Müllera w wywiadzie. Różnica ta była istotna statystycznie w przypadku pomiaru manualnego CIMT (0,0672 vs 0,0583, $p = 0,0126$), natomiast nie osiągnęła znamienności statystycznej dla pomiaru półautomatycznego. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy grubością kompleksu intima-media tętnic szyjnych a aktywnością osoczową PAF-AH. Wspomniana w poprzednim podpunkcie różnica w wartościach CIMT musiała zatem wynikać z innych przyczyn.

Podsumowując wyniki badania, osoczowa aktywność PAF-AH stanowi obiecujący parametr mogący pomóc w praktyce klinicznej wyodrębnić grupę pacjentów niezagrożonych wystąpieniem anafilaksji i niewymagających w związku z tym pracochłonnych oraz kosztochłonnych działań profilaktycznych. Z uwagi na częściowo rozbieżne względem poprzednich prac wyniki, konieczne wydają się jednak dalsze badania w tym zakresie. Szczególnie pożądane byłoby bezpośrednie określenie różnic w aktywności enzymu pośród możliwie dużych grup chorych: z anafilaksją o różnej ciężkości, alergią bez anafilaksji i mastocytozą. Metaanaliza prac uwzględniających te aspekty miałaby wówczas szansę wprowadzić oznaczenie osoczowej aktywności PAF-AH do rutynowej praktyki alergologicznej jako część stratyfikacji ryzyka anafilaksji w populacji chorych podejrzewanych o możliwość jej wystąpienia.

Abstract

Clinical significance of plasma PAF acetylhydrolase activity measurements in anaphylaxis

In the presented dissertation an assessment of the clinical importance of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) in anaphylaxis was acknowledged. The main

assumption of the analysis was to consider the potential use of measurements of plasma enzyme activity as a risk marker for the mentioned disease.

Platelet-activating factor (PAF) has a direct role as a mediator in the pathogenesis of various disorders with an inflammatory component, including those with allergic aetiology. The peripheral blood concentration of PAF is dynamically regulated by plasma PAF acetylhydrolase (PAF-AH). An association between the enzyme activity and incidence has been proven as well as the progression of numerous ailments, such as diabetes, polycystic ovary syndrome or atherosclerosis, has been vindicated. In particular, beforenamed atherosclerosis is an important medical and social issue. It presents complex pathogenesis which is based probably on oxidative stress and consequent chronic inflammation. Although many risk markers of these processes have been discovered, still others are being established and they could be potentially used during cardiovascular risk stratification. One of the new risk factors is plasma PAF-AH which role in the pathogenesis of atherosclerosis as before remains controversial, while data have been convincing about the usability of this enzyme as a marker of the mal process. However, it has not been discovered, whether and when it can be used for early detection of subclinical atherosclerosis and prognosis of its process. In terms of allergic disorders, the importance of PAF-AH is emphasized in the case of bronchial asthma and anaphylaxis. The studies suggest that low activity of plasma PAF acetylhydrolase could be a potential predictive marker for increased severity of some types of allergic hypersensitivity reactions. The possible associations between the enzyme activity and population polymorphism, levels of lipoprotein fractions, an applied pharmacotherapy and chronic disorders of different aetiology, appear to be also interesting within the context of the allergic disorder.

The main purpose of the study was to assess the association among plasma PAF-AH activity and severity of anaphylactic reactions. In addition, it was meant to explore correlations among the enzyme activity and other variables such as concentrations of lipidogram fractions and morphological parameters of subclinical atherosclerosis. All of this summarises the following establishments in research hypothesis: 1) high plasma PAF-AH activity is associated with severe anaphylaxis course; 2) plasma PAF-AH activity correlates with levels of Lipidogram fractions; 3) plasma PAF-AH activity positively correlates with carotid intima-media thickness (CIMT).

The study was performed according to the principles of the ICH-GCP consolidated guidelines and the ethical principles regarding the current revision of the Declaration of

Helsinki together with Polish legal and regulatory requirements. The methodology of the project was based on proved and accepted methods represented in international literature, especially in publications of Pravettoni et al. and Kisiel et al.

For this project, 101 patients were qualified to participate in the research group after the initial assessment. Nevertheless, 6 participants were disqualified due to the exclusion criteria, i.e. an elevated level of tryptase in peripheral blood serum. It indicates the risk of mast cell dysfunction or mastocytosis which determines the different and specific pathomechanism of anaphylaxis.

Eventually, the study group of 95 patients was divided into two subgroups depending on the severity of the most severe anaphylactic reaction in the past, which was assessed according to the Müller's scale. The first subgroup focused participants who had reactions with maximum severity of first and second degree. It counted 43 people, including 21 women and 22 men. In the second one, there were patients after third and fourth-degree reactions and it counted 52 people, including 27 women and 25 men. Finally, a control group was established from 20 people, therein 9 female and 11 males with negative atopic history.

As a result of the test it has been observed that plasma activity of platelet-activating factor acetylhydrolase was significantly lower in patients with anaphylaxis history compared to the control group with negative atopic history (on average 21.38 nmol/min/ml for the control group, 9.47 nmol/min/ml for the first subgroup and 10.16 nmol/min/ml for the second subgroup, in both cases $p < 0.0001$). This difference is multiple and clearly statistically significant. Also, the decrease of plasma activity of PAF-AH was similar for all subgroups of anaphylaxis, regardless of the triggering allergen. No correlation was observed between the severity of anaphylaxis in medical history and the reduction of enzyme activity.

The thickness of intima-media complex of common carotid arteries was on average lower in the participants with the third or fourth degree of severity of anaphylaxis according to the Müller's scale. This difference was statistically significant in the case of manual CIMT measurement (0.0672 vs. 0.0583, $p = 0.0126$), but did not reach statistical significance for semi-automatic analysis. Interconnection was not found between the thickness of the carotid intima-media complex and plasma PAF-AH activity so the difference in CIMT values above-mentioned had to result from other reasons.

Concluding the results of the study, the plasma activity of PAF-AH is a promising parameter that can help to distinguish a group of patients not threatened with development of

anaphylaxis and do not require laborious or expensive prophylactic procedures. In terms of partially divergent results from previous research, further works in this field appear to be necessary. It would be particularly desirable to directly determine differences in enzyme activity among possibly large-sized groups of patients with anaphylaxis of varying severity, allergy without anaphylaxis and mastocytosis. A meta-analysis of surveys taking into account these aspects would have the potential to introduce the measurement of PAF-AH plasma activity for routine practice as a part of the anaphylaxis risk stratification in patients considering the possibility of its occurrence.