

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY FROM
TIMISOARA**

FACULTY OF MEDICINE

Department IV BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY

HIMCINSCHI MIHAI-EMANUEL



PHD THESIS

**NON-CLASSICAL ALGORITHMS FOR ASSESSING
HYPERCOAGULABILITY USEFUL AS A PROGNOSTIC FACTORS
IN CURRENT MEDICAL PRACTICE**

A B S T R A C T

Scientific Coordinator:

PROF. UNIV. HABIL. DR. ANGHEL ANDREI

Timișoara

2026

ABSTRACT

INTRODUCTION

Primary hemostasis represents the set of processes by which platelet aggregates are formed at the site of a vascular injury. It involves the interaction between the vascular wall, platelets, platelet receptors and von Willebrand factor. Normal endothelium has antithrombotic and fibrinolytic properties, preventing platelet activation and excessive coagulation. In contrast, the subendothelium is highly thrombogenic, as it contains collagen, fibronectin, thrombospondin and von Willebrand factor, elements that favor platelet adhesion.

After vessel injury, platelets adhere to the subendothelium mainly through von Willebrand factor, which connects the exposed vascular matrix and glycoprotein Ib on the platelet surface. Platelets can also bind directly to collagen through specific receptors. Adhesion triggers platelet activation, a process in which platelets change shape, expose pseudopodia, release granular content and synthesize thromboxane A₂, a proaggregant and vasoconstrictor mediator.

Blood coagulation consists of a cascade of enzymatic reactions that lead to the formation of fibrin, strengthening the platelet plug. Coagulation factors are plasma proteins, many of which are zymogens synthesized in the liver. Of these, fibrinogen, factors II, VII, IX, and X, factor XIII, cofactors V and VIII, as well as natural coagulation inhibitors such as antithrombin, protein C, protein S, and TFPI, play central roles. Initiation of coagulation occurs mainly through exposure to tissue factor, which binds and activates factor VII. The tissue factor–VIIa complex activates factor X, and then thrombin is formed. Thrombin plays a central role: it converts fibrinogen into fibrin, activates platelets, activates cofactors V and VIII, and amplifies its own generation by activating factor XI. There is also a contact pathway, involving factors XII and XI, prekallikrein and high molecular weight kininogen, but this is of secondary importance in physiological hemostasis.

Light chain amyloidosis is presented as a systemic disease caused by clonal proliferation of plasma cells, which secrete excessively immunoglobulin light chains with tissue deposition potential. These proteins undergo aberrant folding and transform into insoluble amyloid fibrils, which are deposited in tissues and cause organ dysfunction. The lesion is determined not only by tissue infiltration, but also by the direct proteotoxic effects of circulating light chains. Diagnosis is based on tissue biopsy with Congo red and accurate amyloid typing. The most affected organs are the heart, kidneys, liver, nervous system and gastrointestinal tract. Cardiacally, the disease produces restrictive cardiomyopathy, microvascular ischemia, arrhythmias and an increased risk of intracardiac thrombosis. Renally, it can cause severe proteinuria and nephrotic syndrome, which favors hypercoagulability. From a hemostatic point of view, AL amyloidosis is paradoxically associated with both bleeding, through vascular fragility, platelet dysfunction and acquired factor X deficiency, and thrombosis, through stasis, nephrotic syndrome, inflammation and cardiac damage. Treatment aims at rapid control of the plasma clone and prevention of organ damage.

Thrombotic thrombocytopenic purpura is a rare, severe thrombotic microangiopathy, determined by a marked deficiency of ADAMTS13, the enzyme that fragments large multimers of von Willebrand factor. In its absence, very large multimers of vWF accumulate, which induce platelet aggregation and microvascular thrombosis. Clinically, the disease manifests itself by thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia, neurological damage, renal damage and sometimes fever. The diagnosis should be suspected early, and treatment initiated urgently, mainly by plasma exchange and corticosteroids. Rituximab and caplacizumab have significantly improved the prognosis, the latter acting rapidly by blocking the interaction between vWF and platelets.

Inflammation reduces the activity of natural anticoagulant systems, inhibits fibrinolysis and transforms the endothelium into a prothrombotic phenotype. Activated platelets amplify inflammation through the secretion of mediators and the interaction with leukocytes. A major role is played by neutrophils, which through NETosis release extracellular traps formed by DNA, histones and proteolytic enzymes. NETs promote platelet adhesion, activate the contact pathway of coagulation, degrade natural inhibitors of coagulation and support immunothrombosis. Thus, the text highlights the fact that hemostasis, coagulation, inflammation and systemic diseases are deeply interconnected.

AIM AND GENERAL OBJECTIVES

The central aim of this doctoral thesis is to investigate the clinical relevance of non-classical algorithms for the assessment of hypercoagulability and their potential role as prognostic tools in modern medical practice. The research is thus based on the identification of those characteristic elements that contribute to the establishment of the prediction factor for the pathologies: Light chain amyloidosis and thrombotic thrombocytopenic purpura.

In order to achieve the proposed goal, the following objectives were established:

- Detailing the disease context and the implications it has on the hemostatic and coagulological status of patients;
- Staging the statistical analysis process and identifying in particular the statistical tests, which, through their functionality and way of being constructed, give results that implicitly contain the value of a predictive factor;
- Detailed characterization of the studied cohorts in order to integrate all their elements in the statistical analysis process;
- Establishing the correlation between thrombosis recurrence and organ involvement, the time of diagnosis and therapeutic status, in patients with AL amyloidosis;
- Stratifying the inflammatory process in patients with AL amyloidosis and determining how it can function as a predictive factor for detecting the clinical context;
- Determining how the inflammatory process can influence/influence laboratory results designed to assess hypercoagulable status;

- Stratifying how serum levels of κ and λ light chains can be used as predictive factors in AL amyloidosis;
- Determining how the laboratory results for establishing the diagnosis of TTP can be used as prognostic factors in assessing various clinical manifestations;
- Determining how variables related to the patient's therapeutic course can be used as a predictive factor in assessing refractoriness/exacerbation.

STUDY I – HYPERCOAGULABILITY IN AL AMYLOIDOSIS AND THE IMPORTANCE OF THE PREDICTIVE VALUE OF TEG AND TGT FOR THE RECURRENCE OF THROMBOSIS IN INFLAMMATORY CONTEXT

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted within the Department of Hematology of the Fundeni Clinical Institute in Bucharest, in compliance with the ethical principles set forth in the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the ethics committee, and all patients provided informed consent. The data were anonymized before analysis. 61 consecutive patients diagnosed with AL amyloidosis, evaluated between January 2024 and June 2025, were included. Clinical and laboratory data relevant to hemostasis were systematically collected for each patient, using standardized forms and medical records.

The data included thrombotic history, organ involvement (renal, cardiac, hepatic), disease status, and treatments administered, including antithrombotic therapies and the timing of their administration relative to sample collection. Inflammatory and disease parameters, such as C-reactive protein, albumin, and free κ/λ light chains, were also analyzed. Organ involvement was recorded dichotomously, considering the impact of different dysfunctions on coagulation through distinct mechanisms.

The hemostasis assessment combined plasma tests (APTT, TQ, fibrinogen, D-dimers, factor X) with global functional methods. Thromboelastography (TEG) provided information on clot initiation, propagation, and stability in whole blood, while thrombin generation testing (TGT) assessed procoagulant potential at plasma level. The combined use of TEG and TGT allowed for a comprehensive characterization of coagulation status. Treatment-related variables were also recorded, including daratumumab-based therapies and use of direct oral anticoagulants, as well as the time of collection (diagnosis vs. treatment), to facilitate correct interpretation of the results.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. Data were processed through a standardized workflow. Given the biological variability and relatively small sample size, non-parametric methods were mainly used. Continuous variables were described by median and interquartile range, and the 95th percentile was used to highlight extreme values. Associations between categorical variables were assessed by Fisher's exact test, with Monte Carlo approximation when necessary. To identify independent relationships between laboratory variables and binary clinical outcomes, multivariable logistic regression models

were constructed, selecting predictors based on clinical and biological relevance. Model performance was assessed by the area under the ROC curve (AUC). All tests were two-sided, and the threshold for statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

During the cohort, 20 participants (32.8%) had a history of thrombosis, of which 6 participants (9.83%) had thrombosis before the diagnosis was confirmed.

Organ involvement was confirmed as follows: liver involvement in 21 patients (34.4%), kidney involvement in 34 patients (55.7%), and cardiac involvement in 37 participants (60.7%) (categories are not mutually exclusive).

Hemostasis and coagulation tests identified a hypercoagulable phenotype for 31 participants (50.8%) using TEG and for 25 participants (41.0%) using TGT. Regarding the therapeutic status at the time of inclusion of patients in the study, 43 participants (70.5%) were receiving daratumumab-based therapy, 18 participants (29.5%) were included at the initial diagnosis of the disease, and 26 participants (42.6%) were under anticoagulant therapy using DOAC, most of them for prophylactic purposes for atrial fibrillation (20 patients – 32.78%).

Within the studied population, the biochemical profile is noted by a median serum albumin level of 3.6 g/dl (IQR 2.8–9.8), along with a right-skewed distribution of free light chains k (16 mg/l, IQR 8.2–59) and l (23 mg/l IQR 12–48) and an increased inflammatory status, with CRP = 8 mg/l (IQR 2.7–24).

In the subgroup not recorded as receiving direct oral anticoagulants, coagulation parameters were generally within the laboratory reference ranges, with an APTT ratio of 0.97 (IQR 0.92–1.12), FX 98% (IQR 78–156) and TQ 96% (IQR 84–109), while the broader panel of plasma-based coagulation tests indicated an inflammatory reactive increase in fibrinogen (490 mg/dl, IQR 396–570) and a uniform distribution of D-dimers with a median below the upper limit (224 ng/ml, IQR 132–457), but with a significant increase reported towards the upper limits (P95 1118 ng/ml).

TEG testing using whole blood demonstrated consistent values with preserved clot initiation kinetics (R 5.3 min, K 1.2 min) and a trend towards stronger and faster clot formation in the upper part of the graph, with an ANGLE of 73°, MA 68 mm and G 10.

Thrombin generation (TGT) also showed a wide dispersion, with a median LAG of 3.7 min, a peak of 175 nM, a time to peak of 6.7 min and an ETP of 1127 nM/min and maximum 95th percentiles (11 min, 470 nM, 12 min and 2169 nM/min respectively), supporting substantial interindividual variability in thrombin generation capacity within the cohort.

To document whether thrombotic recurrence could be associated with clinical determinants, a series of Fisher's exact tests were performed, comparing history of thrombosis with major organ involvement, presence of treatment, and time of diagnosis.

No statistically significant correlations were identified between thrombosis and the patient's time of presentation at initial diagnosis ($p > 0.05$) or whether the patient was receiving daratumumab-based therapy at study entry ($p > 0.05$).

Similarly, thrombotic recurrence was not statistically associated with renal involvement ($p > 0.05$), hepatic involvement ($p > 0.05$), or cardiac involvement ($p > 0.05$).

Collectively, these analyses did not show a notable relationship between thrombotic recurrence and the documented patterns of treatment status, organ involvement, or time of diagnosis in our cohort.

Subsequently, multivariable analyses were performed to assess predictors of thrombosis recurrence and to explore determinants of hypercoagulability, as defined by global tests.

In a multiple logistic regression model including APTT ratio and Quick time activity as covariates, conventional clotting times did not significantly predict thrombosis recurrence ($p > 0.05$). In contrast, a model incorporating TEG parameters (K, ANGLE, and MA) was significantly associated with thrombosis recurrence (global model $p = 0.002$), indicating that whole blood viscoelastic markers of clot kinetics and clot strength were predictive of thrombotic status in this cohort. Similarly, thrombin generation capacity was more strongly associated with thrombosis recurrence, using a model that included TGT parameters (Peak and ETP) that significantly predicted recurrence ($p = 0.008$).

In line with these results, contingency table analyses demonstrated significant correlations between thrombosis history and hypercoagulability status, as assessed by our viscoelastic and thrombin generation assays.

Fisher's exact test showed that thrombosis status was associated with TEG-defined hypercoagulability positivity ($p = 0.0066$), but even more strongly with TGT-defined hypercoagulability positivity ($p < 0.0001$).

Finally, we determined whether systemic inflammation and markers of fibrin turnover were correlated with hypercoagulability status demonstrated by our global tests.

In multiple logistic regression, a regression model including CRP, fibrinogen (FG), and D-dimer positively predicted TEG-positive status ($p < 0.0001$).

In contrast, the analogous model did not significantly predict TGT-positive status (the overall model provided a $p > 0.05$), suggesting that, in this data set, inflammation-related parameters were more closely aligned with viscoelastic hypercoagulability models than with positivity defined by plasma thrombin generation. These results are shown in Figure 1

Our multivariate analysis models were used to assess whether inflammatory biology and plasma fibrin levels (CRP, D-dimer, and fibrinogen) could be correlated with variables relevant to the clinical context.

The logistic model using multiple laboratory results accurately predicted whether patients were enrolled at baseline ($p = 0.0114$) and accurately predicted whether they were on an active daratumumab regimen at baseline ($p = 0.0414$). When organ involvement was queried using the same set of laboratory tests, there was only a marginal correlation with liver involvement ($p = 0.0539$), but a significant correlation with cardiac involvement ($p = 0.0131$).

These results indicate that the global inflammatory profile captured by CRP, D-dimer, and fibrinogen varies with disease progression and is more readily correlated with cardiac involvement than with hepatic involvement in our cohort.

Our multivariate analysis models were used to assess whether the biology expressed by serum levels of other κ and λ light chains can be correlated with characteristics relevant to the clinical context.

The logistic model using multiple laboratory results failed to accurately predict thrombosis recurrence ($p > 0.05$), cardiac involvement ($p > 0.05$), hepatic involvement ($p > 0.05$) or renal involvement ($p > 0.05$).

The same model was however able to highlight a trend towards predicting positivity of hypercoagulable status on the platform on which thrombelastography was performed with an $AUC=0.6269$ ($p=0.0887$), but this trend completely disappears when the same parameters are used to assess hypercoagulability status on the platform specific to thrombin generation time with an $AUC= 0.5061$ ($p=0.9357$).

Put into perspective, all these results converge towards testing the hypothesis that it is justified to document whether serum levels of κ and λ light chains can be useful to be used as predictive factors for assessing inflammatory status. Finally, the results of the multivariate analysis revealed an $AUC=0.6550$ ($p=0.0438^*$).

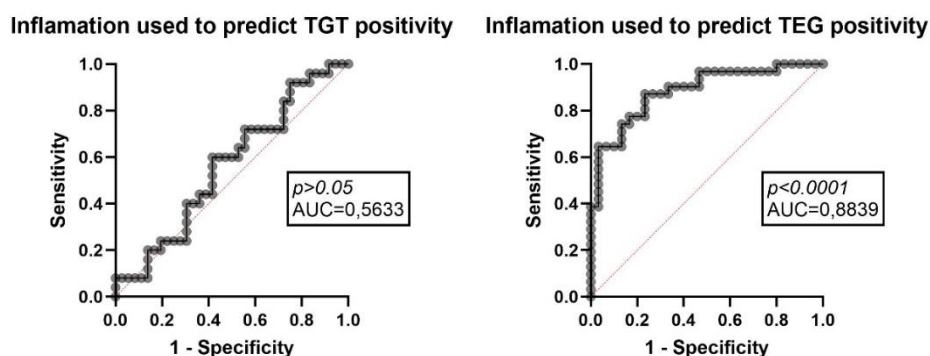


Figure 1: Inflammatory parameters (CRP, FG, D-Dimers) used as variables/determinants to predict TEG positivity (*=statistically significant), left; Inflammatory parameters (CRP, FG, D-Dimers) used as variables/determinants to predict TGT positivity, right.

DISCUSSIONS

Major organ involvement is a central feature of the cohort: cardiac involvement was present in 60.7% of patients, renal involvement in 55.7%, and hepatic involvement in 34.4%. These manifestations are important because each organ can modify the hemostatic profile differently. Liver involvement can alter the synthesis of coagulation factors and natural anticoagulants, renal involvement can favor hypercoagulability through urinary loss of anticoagulants and modification of the response to treatment, and cardiac involvement can amplify the thrombotic risk through stasis, reduced perfusion, and endothelial activation.

Another defining aspect is the high prevalence of thrombosis recurrence, of 32.8%, higher than in many previously published series. This suggests that thrombosis is not a rare event in AL amyloidosis and justifies a more in-depth hypercoagulant phenotyping than simple conventional screening. Differences from other studies may be explained by variations in design, definitions of thrombosis, duration of follow-up, and depth of clinical documentation.

Therapeutically, the cohort reflects current practice: most patients were treated with daratumumab, almost a third were at initial diagnosis, and 42.6% were receiving direct oral anticoagulants (DOACs), either prophylactically or curatively. These treatments influence not only the biology of the disease, but also the interpretation of laboratory tests, especially screening tests, which can be distorted by DOACs.

An important result of the study is the increased prevalence of global hypercoagulability, detected in 50.8% of patients by thromboelastography (TEG) and in 41.0% by thrombin generation testing (TGT). This shows that global tests capture the prothrombotic tendency better than APTT and TQ, which did not predict thrombotic recurrence. However, TEG and TGT are not interchangeable, as they explore different biological compartments.

As for serum kappa and lambda light chains, they did not have significant predictive value for thrombotic recurrence or organ damage. Only a modest association with inflammatory status was observed, suggesting that their utility is more as complementary markers of systemic inflammation than as direct predictors of hypercoagulability or clinical severity. The study emphasizes the need for larger cohorts, standardized protocols, and integrated predictive models.

CONCLUSIONS

This prospective cohort addressing Light Chain Amyloidosis captures a complex population in which multiorgan dysfunction (cardiac, renal, and hepatic) and plasma cell-directed therapy influence the interpretation and exploratory recommendations regarding hemostasis and coagulation.

Because the aforementioned factors modify the way we classically interpret laboratory test results, assessment of thrombosis risk must be individualized.

Thrombosis was frequently documented, supporting the hypothesis of an extended phenotyping. Global functional tests showed frequent hypercoagulability (TEG and TGT) even when screening clotting times were recorded as being within normal parameters.

APTT and PT ratios did not predict thrombosis recurrence, whereas models using TEG (K, Angle, MA) and TGT (Peak, ETP) were able to predict it, highlighting stronger clinical utility and non-interchangeability of platforms between whole blood and plasma (viscoelastic test versus thrombin generation).

Inflammation/fibrin turnover predicted TEG positivity, but not TGT, suggesting a tendency to bias viscoelastic results in an inflammatory context.

Clinically, TEG/TGT should therefore be targeted at diagnosis and during treatment, taking into account inflammation status. However, larger longitudinal studies with standardized sampling and a broader screening of the cohort by exclusion criteria that include ancillary events that may induce thrombosis are needed.

STUDY II – PROGNOSTIC AND OPTIMIZATION OF THERAPY IN THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA: PERSPECTIVES FOLLOWING EXPERIENCES OF THE USE OF CAPLACIZUMAB IN A PRIMARY HEMATOLOGY CENTER IN ROMANIA

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted within the Hematology and Bone Marrow Transplantation Center of the Fundeni Clinical Institute, in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki and with the approval of the ethics committee. All data were anonymized, and informed consent was obtained from patients upon admission. 31 patients diagnosed with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) between 2013 and 2024 were consecutively included. The diagnosis of immune TTP was established by associating a PLASMIC score ≥ 5 with a severe ADAMTS13 deficiency ($<10\%$). Determination of ADAMTS13 activity was initially performed by semiquantitative methods, and later an automated method based on FRET technology was implemented.

Patients were divided into two therapeutic groups: plasma exchange (PEX) associated with corticosteroids or PEX associated with caplacizumab. Data were collected from the time of diagnosis and during follow-up, including demographic, clinical, and laboratory variables. The parameters analyzed included the complete blood count, schistocytes, hemolysis markers (LDH), renal function (creatinine), liver samples and serial ADAMTS13 activity. The Coombs test was used for the differential diagnosis of hemolytic anemia.

Details regarding the intensity of treatment (number of PEX sessions, length of hospitalization, intensive care admission) and hematological response were documented. Refractory was defined by the persistence of thrombocytopenia and elevated LDH after 5 PEX sessions. Platelet recovery time was considered the interval until reaching the value of $150 \times 10^9/L$.

ADAMTS13 activity was evaluated by the FRET method, based on the energy transfer between fluorophores as a function of molecular distance. This technique allows for the precise quantification of enzymatic activity by detecting fluorescence changes generated by substrate cleavage. Compared to semiquantitative methods, FRET offers superior sensitivity and reproducibility, being able to detect small variations in enzymatic activity, clinically relevant in TTP.

In 2022, the laboratory implemented an automated FRET platform, which reduced analysis time and improved standardization of results. The system allows reporting values over a wide range (0–160%), facilitating longitudinal monitoring. Validation of the method was performed on a group of 20 patients, demonstrating concordance with the previous method and the ability to detect subtle changes in ADAMTS13 activity.

Although more expensive, the automated method offers significant advantages, including increased speed and accuracy, essential in the management of TTP. At the same time, interpretation of the results requires attention to possible interferences (hemolysis, hyperbilirubinemia, lipemia, heparin).

Therapeutic plasma exchange was initiated early (within the first 4 hours of suspicion), using central venous access and apheresis equipment. Plasma volume was calculated individually, and treatment was monitored through clinical and laboratory assessments, tracking hematological response and patient safety.

RESULTS

Our initial cohort comprised 31 patients, 16 of whom were treated with a combination of plasma exchange (PEX) and caplacizumab, while the remainder received only PEX and corticosteroid therapy.

The group had a predominantly female incidence of 64% and a median age of 43 years, consistent with known demographic trends for autoimmune TTP.

Only five patients had a PLASMIC score below 6. The overall incidence of infection, respiratory distress, neurological manifestations, gastrointestinal involvement, and refractoriness is detailed in Table 5.

By evaluating the distribution of patients treated with caplacizumab versus PEX, the only significant difference observed was in the number of days of hospitalization ($p = 0.004$), with a mean of 10.4 vs. 20.8 days.

The two subgroups divided according to the type of therapeutic approach were analyzed to determine the coefficient of variation of the following clinical variables: number of PEX sessions (VC = 56.5% in the caplacizumab group and VC = 56.6% in the PEX group), days of hospitalization (VC = 43.1% in the caplacizumab group and VC = 63.3% in the PEX group), days spent in intensive care (VC = 265% in the caplacizumab group and VC = 214% in the PEX group), and the number of days required for normalization of blood platelet levels (VC = 60.7% in the caplacizumab group and VC = 51.8% in the PEX group).

To further determine the effects of the two treatment protocols on the aforementioned variables, a coefficient of variation analysis was performed between the PEX and caplacizumab groups.

The result revealed a statistically significant difference between the treatment protocols in terms of the total number of days of patient hospitalization ($p < 0.05$).

It was also determined whether the type of treatment protocol was associated in any way with a predisposition to refractoriness, and the analysis using contingency tables generated a p value of 0.008 (Figure 2).

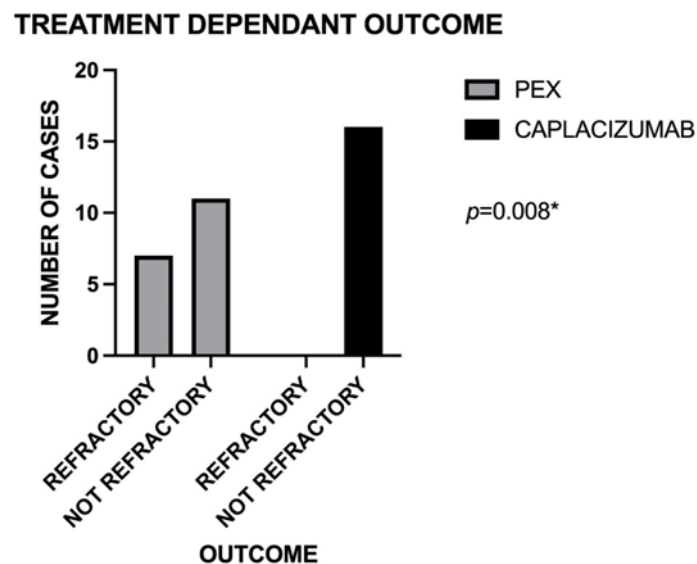


Figure 2. Treatment-dependent results for refractoriness

(*=statistically significant).

All these results suggest that the inclusion of caplacizumab in plasma exchange therapy and corticosteroids may reduce refractoriness and may also improve clinical outcomes compared to plasma exchange therapy and corticosteroids (0% refractoriness in the caplacizumab group vs. 20.59% in the PEX group).

However, no significant correlation was found between types and disease severity based on individual PLASMIC score parameters ($p < 0.05$).

In order to try to discover the predictive values of our data types, this segment of the paper focuses on the use of multivariable predictive models (which include paraclinical data from all 31 patients) to determine whether clinical outcomes, including the presence of infection at the time of diagnosis, major neurological symptoms, treatment refractoriness, respiratory distress, gastrointestinal involvement, exacerbation, and gender differences, could be predicted using continuous variables obtained from standard laboratory tests.

The efficiency of using this type of statistical analysis model was documented by reporting the area under the ROC curve (AUC) with representative p-values.

These were as follows: for infection, AUC = 0.828 ($p = 0.0024$), for respiratory distress, AUC = 0.899 ($p = 0.0006$), for gastrointestinal tract involvement, AUC = 0.800 ($p = 0.005$), for the presence of major neurological symptoms, AUC = 0.880 ($p = 0.0004$), for the presence of petechiae, AUC = 0.9133 ($p = 0.0019$) using age-dependent outcomes, hemoglobin, platelet count, white blood cell count, creatinine, total/direct/indirect bilirubin, and LDH. All of these data were measured at the time of diagnosis. For the prediction of refractoriness/exacerbation, the results of the statistical analysis included an AUC = 0.870 ($p = 0.0005$).

These results indicate a strong ability to predict acute complications, with AUC values ranging from 0.800 to 0.899, indicating high discriminatory power.

It also highlights the complex biological profile of thrombotic thrombocytopenic purpura, in which low platelet count, endothelial dysfunction, oxidative stress, and increased tissue permeability contribute to the development of multiorgan complications.

From another perspective of using this type of statistical analysis model, it was not able to provide a useful predictor for the following clinical characteristics: for the prediction of overall lung damage, AUC = 0.8214 ($p < 0.05$) and for the prediction of recurrence of death in the study population, AUC = 0.8448 ($p < 0.05$), using the results dependent on age, hemoglobin, platelet count, white blood cell count, creatinine, total/direct/indirect bilirubin, and LDH.

We applied the same predictive models for post-treatment outcomes (exacerbation or disease flare), considering treatment with PEX alone and corticosteroid therapy as an indicator of poor prognosis.

Predictor variables included the number of PEX sessions, number of days of hospitalization, number of days in intensive care, and days required for platelet count recovery. The model obtained an AUC=0.72 ($p=0.03$)

These findings highlight the complex and multifaceted biological profile of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), in which low platelet counts, endothelial dysfunction, oxidative stress, and increased tissue permeability contribute to the development of multiorgan complications.

DISCUSSIONS

Although the cohort analyzed was numerically reduced, it faithfully reflected the typical clinical and biological picture of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, a severe, life-threatening thrombotic microangiopathy characterized by marked thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia, and ischemic organ damage. The study was not limited to the description of the initial manifestations, but specifically followed the evolution after treatment, with an emphasis on therapeutic refractoriness, defined by the absence of an adequate response to first-line therapy. An important result of the analysis was the development of a predictive model based on common biological parameters, rapidly available in routine practice. Age, hemoglobin, white blood cell count, platelets at diagnosis, creatinine, bilirubin, and LDH proved useful in identifying patients at increased risk of unfavorable evolution, persistent disease activity, or the occurrence of complications, despite standard treatment. This observation supports the idea that early risk stratification can guide faster and more appropriate therapeutic decisions, especially in patients at high risk of microvascular thrombosis and organ ischemia.

In this context, early administration of caplacizumab seems particularly valuable, especially in patients with severe thrombocytopenia, very high LDH, significant neurological impairment, or renal failure at presentation. Our data suggest that early introduction of this therapy can reduce complications and mortality and limit the risk of refractoriness. At the same time, the study also analyzed prognostic factors associated with therapeutic practice, such as the number of plasma exchange sessions, which can function as indirect markers of disease severity and treatment intensity.

On the other hand, the evolution of patients cannot be explained only by initial data. We observed that the subsequent course is also influenced by dynamic factors, such as the elimination of ADAMTS13 inhibitors, the response to glucocorticoids, and the general immunological status. This highlights the importance of continuous longitudinal reassessment, based on successive monitoring of platelets, hemolysis markers, renal function, and signs of neurological or cardiac damage, instead of a rigid therapeutic approach.

By comparing the two therapeutic groups, patients treated with PEX alone and patients treated with PEX plus caplacizumab, relevant differences were observed not only in the mean values but also in the variability of clinical response. The caplacizumab group showed a reduced dispersion for several clinical outcomes, suggesting not only a better but also a more predictable evolution. The number of PEX sessions remained similar and highly variable in both groups, probably due to individualized decisions to stop the procedure, based on platelet response, hemolysis markers, and clinician judgment. In contrast, the length of hospital stay was more homogeneous and shorter in patients who received caplacizumab, suggesting a faster clinical stabilization.

The intensive care days showed a very high variability in both groups, explained by the heterogeneity of the severity of the disease: some patients stabilized quickly, while others required prolonged care due to neurological, cardiac, renal or hematological complications. The time to platelet recovery also varied between patients, even in the caplacizumab group, probably because this drug rapidly stops platelet consumption, but does not directly influence the production of autoantibodies. Thus, the dynamics of recovery still depend on the speed of elimination of inhibitors and the response to immunosuppression.

From a pathophysiological point of view, the results support the central mechanism of the disease: severe ADAMTS13 deficiency allows the persistence in circulation of ultra-large multimers of von Willebrand factor, which favor platelet aggregation and the formation of microvascular thrombi. This process causes consumptive thrombocytopenia, hemolysis and tissue ischemia. Caplacizumab acts rapidly by blocking the interaction between von Willebrand factor and platelets, interrupting the

formation of microvascular thrombi. This explains why treatment was associated with faster platelet normalization and shorter hospital stays, even though the number of PEX sessions was not dramatically reduced. PEX remains essential for the removal of circulating inhibitors and for the replenishment of ADAMTS13, and caplacizumab functions more as a therapeutic bridge until the effects of immunosuppression become effective. Our study has practical value especially in that it reflects the real experience of a reference center, in a context where immediate access to ADAMTS13 testing is not always possible. In such situations, the use of routine marker-based algorithms can support triage, early therapeutic decisions and identification of patients at high risk of refractoriness or complications. This approach is particularly relevant for emergency and intensive care units, where time is critical and treatment often needs to be started before definitive confirmation of the diagnosis.

An important contribution of the study was also the transition from semiquantitative ADAMTS13 testing to a quantitative, fully automated method. This change reduced the time to obtain results, increased diagnostic sensitivity and improved monitoring of relapse risk after remission. Integrating such a technological advance into a coherent clinical workflow can significantly influence prognosis, allowing for faster confirmation of atypical cases, adjustment of the duration of caplacizumab therapy and more precise surveillance of patients at persistent risk.

However, the results must be interpreted in the context of the study limitations: retrospective, single-center design, small number of patients, lack of randomization and the possibility of confounding factors related to the therapeutic indication or variable access to medication. The small sample size may limit the statistical power and stability of the predictive models. In addition, the change in the ADAMTS13 assay method during the study period may introduce some variability. Even so, the data provide important exploratory evidence and support the clinical utility of caplacizumab, as well as the value of a pragmatic prediction algorithm based on routine biomarkers. Until validated in larger, multicenter cohorts, these conclusions should be viewed as useful clinical guidance, not as a definitive standard.

CONCLUSIONS

Our findings indicate the feasibility of predicting acute complications and treatment refractoriness in TTP using commonly available laboratory parameters such as hemoglobin, platelet count, and LDH. The introduction of caplacizumab significantly reduced PEX sessions, hospitalization time, ICU stays, and platelet recovery time, improving both therapeutic predictability and overall patient outcomes.

Although routine laboratory tests were moderately predictive of post-treatment relapse, a more reliable prognostic value lies in serial testing of ADAMTS13 activity and inhibitors, as well as treatment-specific response variables.

Further research is needed to validate our findings in larger, multicenter prospective studies. Future directions include the integration of machine learning algorithms and cost-effectiveness analysis to refine treatment strategies and improve personalized management of TTP, especially in resource-limited settings.

STUDY III – THE ROLE OF EXTRACELLULAR NEUTROPHIL TRAPS IN NEOPLASTIC CONTEXT

MATERIALS AND METHODS

The document search procedure used aimed to synthesize the current evidence on the interaction between inflammation, NETs and thrombosis, as a unified immunological framework. To this end, a comprehensive bibliographic search was performed in PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science and Google Scholar, using predefined keywords related to inflammation, NETs, immunothrombosis and coagulation.

A total of 1752 scientific articles were thus identified, of which 80 were selected for further analysis. Experimental, observational and translational studies examining the mechanistic links between inflammatory pathways, NET formation and thrombotic events were eligible for review. After a two-step screening process (title/abstract and full review), relevant data were extracted and analyzed narratively due to methodological heterogeneity.

NETs AND THEIR ROLE IN NEOPLASTIC CONTEXT

The tumor microenvironment represents the set of cellular and non-cellular elements that interact with the tumor and influence its biological behavior. This ecosystem is formed by tumor cells, immune cells, extracellular matrix proteins, growth factors, newly formed blood vessels and fibroblasts. It is not a passive space, but a dynamic structure, capable of supporting or, in certain contexts, limiting tumor development. Its heterogeneity is essential: different regions of the same tumor can have distinct cellular compositions, with pro- or anti-tumor effects. Overall, the stroma and the immune infiltrate contribute to tumor proliferation, invasion, metastasis and response to treatment.

The extracellular matrix influences tumor progression through proteins such as fibronectin and collagen, which modulate signaling pathways involved in adhesion, migration and proliferation. In parallel, the immune infiltrate generates a chronic inflammatory environment, which can stimulate tumor growth. Cancer cells take advantage of this context by secreting factors capable of inhibiting essential immune functions, including T-cell activation and cytotoxic NK cell activity. Especially in early stages, the tumor recruits suppressor cells of myeloid or regulatory origin, creating a favorable framework for immune evasion.

In this landscape, NETs have become an important component of the tumor microenvironment. Their formation can be induced directly by the tumor, through the release of cytokines and growth factors, or indirectly, through the general proinflammatory state and cell death processes associated with tumorigenesis. Molecules such as interleukins, TNF-alpha, interferons, complement fragments and chemokines activate neutrophils and promote NETosis. Once formed, NETs not only perpetuate inflammation, but can also inhibit the antitumor immune response by depleting T-cells and reducing NK cell activity.

A major aspect is the contribution of NETs to treatment resistance. In the case of chemotherapy, available data show that increased levels of NETs are associated with reduced efficacy. These structures have been shown to protect tumor cells through indirect mechanisms, including the action of soluble factors produced by myeloid suppressor cells and neutrophils. In multiple myeloma, for example, neutrophils and myeloid cells in the bone marrow have reduced the cytotoxic effect of some chemotherapeutic agents. NETs appear to function as a protective barrier and even modify the availability of some drugs to the tumor cell. Importantly, dissolution of these networks with deoxyribonuclease can restore sensitivity to treatment, suggesting a possible therapeutic direction.

NETs are also involved in resistance to immunotherapy. Modern immune checkpoint blockade therapies depend on the ability of T lymphocytes to recognize and destroy malignant cells. However, increased neutrophil numbers and intense NETosis activity correlate with poorer responses. In particular, IL-17 signaling promotes neutrophil recruitment, increased PD-1 and PD-L1 expression, and

functional exclusion of CD8 T cells from the tumor space. NETs may also act as a physical barrier between effector immune cells and tumor cells, reducing the direct contact required for cytotoxicity. Blocking IL-17, neutrophils, or NETosis, in combination with PD-1 inhibition, appears to improve antitumor responses.

Radiotherapy is influenced by a similar mechanism. Although radiation initially produces a beneficial inflammatory response, recruitment of neutrophils into irradiated tissue may promote NETosis. NETs may cover the surface of tumor cells and limit the effectiveness of radiation, acting as a mechanical barrier and altering CD8 T cell infiltration into the tumor. Increased presence of NETs and predominance of intratumoral neutrophils are associated with poor response to radiotherapy and reduced survival. Again, degradation of NETs by deoxyribonucleases improved the therapeutic response, reinforcing the idea that these structures actively contribute to radioresistance.

Beyond their role in treatment resistance, NETs represent a central link between inflammation and thrombosis. They are composed of decondensed chromatin, histones, and granular proteins released by activated neutrophils and constitute the foundation of the concept of immunothrombosis. Inflammation stimulates the formation of NETs, which in turn amplify inflammation and create a prothrombotic environment. Extracellular DNA and histones promote the activation of coagulation factors, thrombin generation, platelet aggregation, and endothelial damage. In addition, NETs interact with tissue factor and von Willebrand factor, reinforcing the link between the inflammatory response and coagulation.

CONCLUSIONS

In conclusion, this review highlights the crucial role of NETs as a key link between inflammation, tumor biology, and thrombosis within a unified immune system.

The synthesized evidence indicates that NET formation is not only a defense mechanism but also a key factor contributing to tumor progression, immune evasion, and resistance to conventional anticancer therapies, including chemotherapy, immunotherapy, and radiotherapy.

In the tumor microenvironment, NETs promote a persistent proinflammatory state, facilitate immunosuppression, and interfere with an effective antitumor response by limiting the cytotoxic activity of immune cells.

Furthermore, their interaction with platelets, endothelial cells, and coagulation factors supports their involvement in thrombus formation and stabilization, reinforcing the concept of immunothrombosis.

The bidirectional relationship between inflammation and NETs creates a self-perpetuating proliferation cycle that exacerbates both tumor progression and the risk of thrombosis.

CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS

This doctoral research analyzes the clinical utility of non-classical methods for assessing hypercoagulability and their prognostic value in hematology, focusing on two complex conditions: AL amyloidosis and thrombotic thrombocytopenic purpura. The central idea of the thesis is that conventional coagulation tests, such as prothrombin time and activated partial thromboplastin time, only partially describe the hemostatic balance and fail to capture the real risk of thrombosis or bleeding in these patients. Therefore, a more integrated and dynamic assessment of coagulation is needed.

The results show that global functional tests, especially thrombin generation and viscoelastic methods, provide essential clinical information that cannot be obtained by routine tests. These methods assess clot formation, thrombin production and its stability, providing a more realistic picture of the relationship between procoagulant and anticoagulant mechanisms. In systemic diseases, such as AL amyloidosis, where several pathogenic mechanisms act simultaneously, these tests highlight hemostatic imbalances that would otherwise remain undetected.

In AL amyloidosis, research has highlighted a paradoxical hemostatic profile, in which bleeding risk and thrombotic predisposition coexist. This imbalance is determined by endothelial dysfunction, organ damage, circulating light chains and the influence of treatment. In addition, acquired deficiencies of some coagulation factors, especially factor X, may occur, which increases the risk of bleeding. In parallel, nephrotic syndrome, cardiac damage, inflammation and immobilization favor hypercoagulability. Thus, the hemostatic state of the patient with AL amyloidosis cannot be correctly interpreted by isolated parameters, but requires the integration of biological and clinical data.

The thesis also emphasizes the major role of systemic inflammation in modifying coagulation. Inflammation influences the endothelium, platelet function and natural anticoagulant mechanisms, favoring a prothrombotic environment and reduced fibrinolysis. Consequently, inflammatory markers should be considered when interpreting functional tests and estimating thrombotic risk.

In thrombotic thrombocytopenic purpura, the study highlights the importance of rapid diagnosis and early initiation of therapy. Since the result of ADAMTS13 activity is not always immediately available, predictive models based on accessible parameters, such as platelets, hemoglobin, LDH and creatinine, have been proposed. These markers may help in the early identification of high-risk patients and in the selection of a faster and more appropriate therapeutic approach. In this context, the use of caplacizumab was associated with faster hematological recovery and a reduction in the need for prolonged plasma exchange.

Overall, the thesis demonstrates that the integration of clinical data, functional coagulation tests and statistical models can transform laboratory medicine from a strictly diagnostic tool into a real support for prognosis and therapeutic decision. The overall conclusion is that integrated hemostatic assessment is essential in complex hematological diseases and supports precision medicine through better risk stratification and more individualized treatments.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul IV BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE

HIMCINSCHI MIHAI-EMANUEL



TEZĂ DE DOCTORAT

ALGORITMI NON-CLASICI DE APRECIERE A
HIPERCOAGULABILITĂȚII UTILI CA FACTOR DE PROGNOSTIC ÎN
PRACTICA MEDICALĂ CURENTĂ

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. HABIL. DR. ANGHEL ANDREI

Timișoara

2026

REZUMAT

INTRODUCERE

Hemostaza primară reprezintă ansamblul proceselor prin care se formează agregatul plachetar la locul unei leziuni vasculare. Ea implică interacțiunea dintre peretele vascular, trombocite, receptori plachetari și factorul von Willebrand. Endoteliul normal are proprietăți antitrombotice și fibrinolitice, împiedicând activarea plachetară și coagularea excesivă. În schimb, subendoteliul este puternic trombogen, deoarece conține collagen, fibronectină, trombospondină și factor von Willebrand, elemente care favorizează aderența plachetară.

După lezarea vasului, trombocitele aderă la subendoteliu mai ales prin intermediul factorului von Willebrand, care face legătura între matricea vasculară expusă și glicoproteina Ib de pe suprafața plachetelor. Trombocitele se pot lega și direct de collagen prin receptori specifici. Aderența declanșează activarea plachetară, proces în care trombocitele își schimbă forma, expun pseudopode, eliberează conținutul granular și sintetizează tromboxan A₂, un mediator proagregant și vasoconstrictor.

Coagularea sângelui constă în reacții enzimatică în cascadă care duc la formarea fibrinei, consolidând dopul plachetar. Factorii de coagulare sunt proteine plasmatice, mulți dintre ei fiind zimogeni sintetizați în ficat. Dintre aceștia, fibrinogenul, factorii II, VII, IX și X, factorul XIII, cofactorii V și VIII, precum și inhibitorii naturali ai coagulării, cum sunt antitrombina, proteina C, proteina S și TFPI, au roluri centrale. Inițierea coagulării are loc în principal prin expunerea factorului tisular, care leagă și activează factorul VII. Complexul factor tisular–VIIa activează factorul X, iar apoi se formează trombina. Trombina are rol central: transformă fibrinogenul în fibrină, activează trombocitele, activează cofactorii V și VIII și amplifică propria generare prin activarea factorului XI. Există și o cale de contact, în care intervin factorii XII și XI, precalicreina și kininogenul cu greutate moleculară mare, dar aceasta are importanță secundară în hemostaza fiziologică.

Amiloidoza cu lanțuri ușoare este prezentată ca o boală sistemică produsă de proliferarea clonală a plasmocitelor, care secretă excesiv lanțuri ușoare de imunoglobuline cu potențial de depunere tisulară. Aceste proteine suferă pliere aberantă și se transformă în fibrile amiloide insolubile, care se depozitează în țesuturi și produc disfuncție de organ. Leziunea nu este determinată doar de infiltrarea tisulară, ci și de efectele proteotoxice directe ale lanțurilor ușoare circulante. Diagnosticul se bazează pe biopsie tisulară cu roșu Congo și pe tiparea exactă a amiloidului. Cele mai afectate organe sunt inima, rinichii, ficatul, sistemul nervos și tractul gastrointestinal. Cardiac, boala produce cardiomiopatie restrictivă, ischemie microvasculară, aritmii și risc crescut de tromboză intracardiacă. Renal, poate cauza proteinurie severă și sindrom nefrotic, care favorizează hipercoagulabilitatea. Din punct de vedere hemostatic, amiloidoza AL se asociază paradoxal atât cu sângerare, prin fragilitate vasculară, disfuncție plachetară și deficit dobândit de factor X, cât și cu tromboză, prin stază, sindrom nefrotic, inflamație și afectare cardiacă. Tratamentul vizează controlul rapid al clonei plasmatice și prevenirea deteriorării organelor.

Purpura trombotică trombocitopenică este o microangiopatie trombotică rară, severă, determinată de deficitul marcat de ADAMTS13, enzima care fragmentează multimerii mari ai factorului von Willebrand. În lipsa acesteia, se acumulează multimeri foarte mari de vWF, care induc agregare plachetară și tromboză microvasculară. Clinic, boala se manifestă prin trombocitopenie, anemie hemolitică microangiopatică, afectare neurologică, afectare renală și uneori febră. Diagnosticul trebuie

suspectat precoce, iar tratamentul inițiat de urgență, în principal prin schimb plasmatic și corticosteroizi. Rituximab și caplacizumab au îmbunătățit semnificativ prognosticul, acesta din urmă acționând rapid prin blocarea interacțiunii dintre vWF și trombocite.

Inflamația reduce activitatea sistemelor anticoagulante naturale, inhibă fibrinoliza și transformă endoteliul într-un fenotip protrombotic. Trombocitele activate amplifică inflamația prin secreția de mediatori și interacțiunea cu leucocitele. Un rol major îl au neutrofilele, care prin NEToză eliberează capcane extracelulare formate din ADN, histone și enzime proteolitice. NET-urile favorizează aderența plachetară, activează calea de contact a coagulării, degradează inhibitorii naturali ai coagulării și susțin imunotromboza. Astfel, textul evidențiază faptul că hemostaza, coagularea, inflamația și bolile sistemice sunt profund interconectate.

SCOP ȘI OBIECTIVE GENERALE

Scopul central al acestei teze de doctorat este de a investiga relevanța clinică a algoritmilor non-clasici pentru evaluarea hipercoagulabilității și rolul lor potențial ca instrumente prognostice în practica medicală modernă. Cercetarea astfel se bazează pe identificarea acelor elemente caracteristice care contribuie la constituirea factorului de predicție pentru patologii: Amiloidoza cu lanțuri ușoare și purpura trombotică trombocitopenică.

În vederea obținerii scopului propus, următoarele obiective au fost stabilite:

- Detalierea contextului de boală și a implicațiilor pe care acesta îl are asupra statusului hemostatic și coagulologic al pacienților;
- Etapizarea procesului de analiză statistică și identificarea în particular a testelor statistice, care, prin funcționalitatea și modul lor de a fi construite, conferă rezultate ce conțin în mod implicit valoarea de factor păredictiv;
- Caracterizarea detaliată a cohortelor studiate în vederea integrării tuturor elementelor acestora în procesul de analiză statistică;
- Stabilirea corelației dintre recurența trombozei și afectarea organelor, momentul diagnosticului și cu statusul terapeutic, la pacienții cu AL amiloidoză;
- Stratificarea procesului inflamator la pacienții cu AL amiloidoză și determinarea modului în care acesta poate funcționa ca și factor de predicție pentru decelarea contextului clinic;
- Determinarea modului în care procesul inflamator poate să influențeze/influenteze rezultatele de laborator concepute pentru aprecierea statusului hipercoagulant.
- Stratificarea modului în care nivelele serice ale lanțurilor ușoare k și l pot fi folosite ca și factori de predicție în AL amiloidoză
- Determinarea modului în care rezultatele paraclinice în vederea stabilirii diagnosticului TTP pot să fie folosiți ca și factori de prognostic în aprecierea diverselor manifestări clinice;
- Determinarea modului în care variabilele de țin de parcursul terapeutic al pacientului pot fi folosiți ca și factor de predicție în aprecierea refractarității/exacerbării.

STUDIUL I – HIPERCOAGULABILITATEA ÎN AL AMILOIDOZĂ ȘI IMPORTANȚA VALORII PREDICTIVE A TEG ȘI TGT PENTRU RECURENȚA TROMBOZEI ÎN CONTEXT INFLAMATOR

MATERIALE ȘI METODE

Studiul a fost realizat în cadrul Departamentului de Hematologie al Institutului Clinic Fundeni din București, cu respectarea principiilor etice prevăzute de Declarația de la Helsinki. Protocolul a fost aprobat de comitetul de etică, iar toți pacienții au oferit consimțământ informat. Datele au fost

anonimizate înainte de analiză. Au fost incluși consecutiv 61 de pacienți diagnosticați cu amiloidoză AL, evaluați între ianuarie 2024 și iunie 2025. Pentru fiecare pacient s-au colectat sistematic date clinice și de laborator relevante pentru hemostază, folosind formulare standardizate și dosarele medicale.

Datele au inclus istoricul trombotic, afectarea de organ (renală, cardiacă, hepatică), starea bolii și tratamentele administrate, inclusiv terapiile antitrombotice și momentul administrării acestora față de recoltarea probelor. Au fost analizați și parametri inflamatori și de boală, precum proteina C reactivă, albumina și lanțurile ușoare libere κ/λ . Afectarea organelor a fost înregistrată dihotomic, având în vedere impactul diferitelor disfuncții asupra coagulării prin mecanisme distincte.

Evaluarea hemostazei a combinat teste plasmatic (APTT, TQ, fibrinogen, D-dimeri, factor X) cu metode funcționale globale. Tromboelastografia (TEG) a oferit informații despre inițierea, propagarea și stabilitatea cheagului în sânge integral, în timp ce testarea generării de trombină (TGT) a evaluat potențialul procoagulant la nivel plasmatic. Utilizarea combinată a TEG și TGT a permis o caracterizare complexă a statusului coagulării. Au fost înregistrate și variabile legate de tratament, inclusiv terapiile bazate pe daratumumab și utilizarea anticoagulantelor orale directe, precum și momentul recoltării (diagnostic vs. tratament), pentru a facilita interpretarea corectă a rezultatelor.

Analiza statistică a fost realizată utilizând GraphPad Prism. Datele au fost procesate printr-un flux standardizat. Având în vedere variabilitatea biologică și dimensiunea relativ redusă a eșantionului, s-au utilizat în principal metode non-parametrice. Variabilele continue au fost descrise prin mediană și interval intercuartil, iar pentru evidențierea valorilor extreme s-a utilizat percentila 95. Asocierile între variabile categoricale au fost evaluate prin testul exact Fisher, cu aproximare Monte Carlo când a fost necesar.

Pentru identificarea relațiilor independente între variabilele de laborator și rezultatele clinice binare, s-au construit modele de regresie logistică multivariabilă, selectând predictorii pe baza relevanței clinice și biologice. Performanța modelelor a fost evaluată prin aria de sub curba ROC (AUC). Toate testele au fost bilaterale, iar pragul de semnificație statistică a fost stabilit la $p < 0,05$.

REZULTATE

Pe parcursul cohortei, 20 de participanți (32,8%) au avut tromboză în antecedente, dintre care 6 participanți (9,83%) au prezentat tromboză înainte de confirmarea diagnosticului.

Afectarea organelor a fost confirmată după cum urmează: afectare hepatică la 21 de pacienți (34,4%), afectare renală la 34 de pacienți (55,7%) și afectare cardiacă la 37 de participanți (60,7%) (categoriile nu se exclud reciproc).

Testele de hemostază și coagulare au identificat un fenotip hipercoagulabil pentru 31 de participanți (50,8%), utilizând TEG și pentru 25 de participanți (41,0%) utilizând TGT. În ceea ce privește statusul terapeutic la momentul includerii pacienților în studiu, 43 de participanți (70,5%) primeau terapie pe bază de daratu-mumab, 18 participanți (29,5%) au fost incluși la diagnosticul inițial al bolii, iar 26 de participanți (42,6%) erau sub terapie anticoagulantă utilizând DOAC, majoritatea în scop profilactic pentru fibrilația atrială (20 de pacienți – 32,78%).

În cadrul populației studiate, profilul biochimic se face remarcant printr-o mediană a nivelului de albumină serică de 3,6 g/dl (IQR 2,8–9,8), alături de o distribuție spre dreapta asimetrică a lanțurilor ușoare libere κ (16 mg/l, IQR 8,2–59) și λ (23 mg/l IQR 12–48) și de un status inflamator crescut, cu PCR = 8 mg/l (IQR 2,7–24).

În subgrupul care nu fost înregistrat ca primind anticoagulate orale directe, parametrii de coagulare s-au clasat în general în limitele intervalelor de referință ale laboratorului, cu o rată APTT

de 0,97 (IQR 0,92–1,12), FX 98% (IQR 78–156) și TQ 96% (IQR 84–109), în timp ce panelul mai larg de teste de coagulare pe bază de plasmă a indicat o creștere reactivă inflamatorie a fibrinogenului (490 mg/dl, IQR 396–570) și o distribuție uniformă a D-dimerilor cu o mediană aflată sub pragul maxim admis (224 ng/ml, IQR 132–457), însă cu o raportare a creșterii semnificativă înspre limitele superioare (P95 1118 ng/ml).

Testarea TEG utilizând sânge integral a demonstrat valori consistente cu o cinetică de inițiere a cheagului păstrată (R 5,3 min, K 1,2 min) și o tendință către o formare a cheagului mai puternică și mai rapidă în partea superioară a graficului, cu un UNGHI de 73°, MA 68 mm și G 10.

Generarea de trombină (TGT) a prezentat, de asemenea, o dispersie largă, cu un LAG median de 3,7 min, un vârf de 175 nM, un timp până la vârf de 6,7 min și o ETP de 1127 nM/min și percentile maxime 95 (11 min, 470 nM, 12 min și respectiv 2169 nM/min), susținând o variabilitate interindividuală substanțială a capacității de generare a trombinei în cadrul cohorței.

Pentru a documenta dacă recurența trombozei ar putea fi asociată cu variabile clinice determinante, au fost efectuate o serie de teste exacte Fisher, care compară istoricul trombozei cu afectarea majoră a organelor, prezența tratamentului și momentul diagnosticului.

Nu au fost identificate corelații statistice semnificative între tromboză și momentul prezentării pacientului la diagnosticul inițial ($p > 0,05$) sau dacă acesta urma terapie pe bază de daratumumab la momentul includerii în studiu ($p > 0,05$).

În mod similar, recurența trombotică nu a fost asociată statistic cu afectarea renală ($p > 0,05$), afectarea hepatică ($p > 0,05$) sau afectarea cardiacă ($p > 0,05$).

Colectiv, aceste analize nu au arătat o relație notabilă între recurența trombotică și modelele documentate de statusul tratamentului, afectarea organelor sau momentul diagnosticului în cohorta noastră.

Ulterior, au fost efectuate analize multivariabile pentru a evalua predictorii recurenței trombozei și pentru a explora determinanții hipercoagulabilității, așa cum sunt definiți prin teste globale.

Într-un model de regresie logistică multiplă care include raportul APTT și activitatea timpului Quick ca și covariate, timpii de coagulare convenționali nu au prezis semnificativ recurența trombozei ($p > 0,05$). În schimb, un model care încorporează parametrii TEG (K, ANGLE și MA) a fost semnificativ asociat cu recurența trombozei (model global $p = 0,002$), indicând faptul că markerii vâscoelastici din sângele integral ai cineticii cheagului și ai rezistenței cheagului au fost predictivi ai statusului trombotic în această cohortă. În mod similar, capacitatea de generare a trombinei a fost mult mai puternic legată de recurența trombozei, utilizând un model care include parametrii TGT (Peak și ETP) care au prezis semnificativ recurența ($p = 0,008$).

În concordanță cu aceste rezultate, analizele tabelor de contingență au demonstrat corelații semnificative între istoricul trombozei și statusul de hipercoagulabilitate, pus în perspectivă prin testele noastre vâscoelastice și de generare a trombinei.

Testul exact Fisher a arătat că statusul trombozei a fost asociat cu pozitivitatea hipercoagulabilității definite de TEG ($p = 0,0066$), dar și mai puternic cu pozitivitatea hipercoagulabilității definite de TGT ($p < 0,0001$).

În cele din urmă, am stabilit dacă inflamația sistemică și markerii nivelului de turnover al fibrinei au fost corelați cu statusul de hipercoagulabilitate demonstrat de testele noastre globale.

În regresia logistică multiplă, un model de regresie care include CRP, fibrinogen (FG) și D-dimer a prezis pozitiv statusul TEG-pozitiv ($p < 0,0001$).

În schimb, modelul analog nu a prezis semnificativ statusul pozitiv al TGT (modelul general a furnizat un $p > 0,05$), sugerând că, în cadrul acestui set de date, parametrii legați de inflamație au fost mai strâns aliniați cu modelele de hipercoagulabilitate vâscoelastică decât cu pozitivitatea definită prin generarea de trombină plasmatică. Aceste rezultate sunt prezentate în Figura 1

Modelele noastre de analiză multivariată au fost utilizate cu scopul de a evalua dacă biologia inflamatorie și nivelul plasmatic a fibrinei (CRP, D-dimer și fibrinogen) pot să fie corelate cu variabile relevante pentru contextul clinic.

Modelul logistic ce folosește rezultate de laborator multiple a prezis cu precizie dacă pacienții au fost incluși în studiu la momentul diagnosticului inițial ($p = 0,0114$) și a prezis cu acuratețe dacă aceștia urmau o schemă terapeutică activă pe bază de Daratumumab în punctul de includere în studiu ($p = 0,0414$). Când a fost interogată afectarea de organ, utilizând analogul set de teste de laborator, s-a stabilit doar o corelație limită cu afectarea hepatică ($p = 0,0539$), dar în același timp o corelație semnificativă cu implicarea cardiacă ($p = 0,0131$).

Aceste rezultate indică faptul că profilul inflamator global surprins de CRP, D-dimer și fibrinogen variază odată cu progresia bolii și este mai prompt corelat cu implicarea cardiacă decât cu implicarea hepatică în cohorta noastră.

Modelele noastre de analiză multivariată au fost utilizate cu scopul de a evalua dacă biologia exprimată prin nivelurile serice ale lanțurilor ușoare k și l, pot să fie corelate cu caracteristicile relevante pentru contextul clinic.

Modelul logistic ce folosește rezultate de laborator multiple nu a reușit să prezică cu precizie recurența trombozei ($p > 0.05$), afectarea cardiacă ($p > 0.05$), afectarea hepatică ($p > 0.05$) sau renală ($p > 0.05$).

Același model a reușit totuși să scoată în evidență o tendință spre a prezice pozitivitatea statusului hipercoagulant pe platforma pe care s-a realizat trombelastografia cu un $AUC=0,6269$ ($p=0,0887$), însă această tendință dispăre complet în momentul în care aceiași parametri sunt folosiți în aprecierea statusului de hipercoagulabilitate pe platforma specifică timpului de generare de trombină cu un $AUC= 0,5061$ ($p=0,9357$).

Puse în perspectivă, toate aceste rezultate confluează înspre testarea ipotezei conform căreia este justificat să documentăm dacă nivelele serice ale lanțurilor ușoare k și l pot să fie utile a fi folosite ca și factori de predicție pentru aprecierea statusului inflamator. În cele din urmă, rezultatele analizei multivariate au pus în evidență o $AUC=0,6550$ ($p=0,0438^*$).

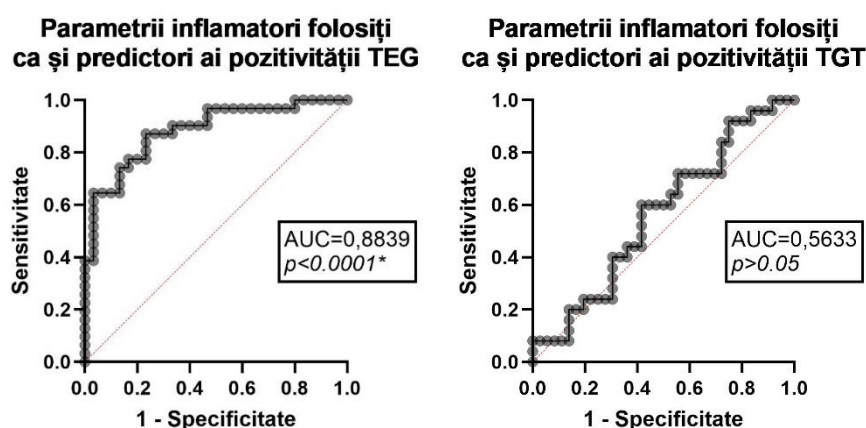


Figura 1: Parametrii inflamatori (CRP, FG, D-Dimeri) utilizați ca variabile/determinanți pentru a prezice pozitivitatea TEG (*=semnificativ statistic), stânga; Parametrii inflamatori (CRP, FG, D-Dimeri) utilizați ca variabile/determinanți pentru a prezice pozitivitatea TGT, dreapta.

DISCUȚII

Afectarea organelor majore este un element central al cohorței: implicarea cardiacă a fost prezentă la 60,7% dintre pacienți, cea renală la 55,7%, iar cea hepatică la 34,4%. Aceste manifestări sunt importante deoarece fiecare organ poate modifica diferit profilul hemostatic. Afectarea hepatică poate altera sinteza factorilor de coagulare și a anticoagulanților naturali, afectarea renală poate favoriza hipercoagulabilitatea prin pierdere urinară de anticoagulanți și modificarea răspunsului la tratament, iar afectarea cardiacă poate amplifica riscul trombotic prin stază, perfuzie redusă și activare endotelială.

Un alt aspect definitoriu este prevalența ridicată a recurenței trombozei, de 32,8%, mai mare decât în multe serii publicate anterior. Aceasta sugerează că tromboza nu este un eveniment rar în amiloidoza AL și justifică o fenotipare hipercoagulantă mai aprofundată decât simplul screening convențional. Diferențele față de alte studii pot fi explicate prin variații de design, definiții ale trombozei, durată de urmărire și profunzimea documentării clinice.

Pe plan terapeutic, cohorta reflectă practica actuală: majoritatea pacienților erau tratați cu daratumumab, aproape o treime se aflau la diagnosticul inițial, iar 42,6% primeau anticoagulante orale directe (DOAC), fie profilactic, fie curativ. Aceste tratamente influențează nu doar biologia bolii, ci și interpretarea testelor de laborator, mai ales a testelor de screening, care pot fi distorsionate de DOAC.

Un rezultat important al studiului este prevalența crescută a hipercoagulabilității globale, detectată la 50,8% dintre pacienți prin tromboelastografie (TEG) și la 41,0% prin testarea generării de trombină (TGT). Acest lucru arată că testele globale surprind mai bine tendința protrombotică decât APTT și TQ, care nu au prezis recurența trombotică. Totodată, TEG și TGT nu sunt interschimbabile, deoarece explorează compartimente biologice diferite.

În ceea ce privește lanțurile ușoare serice kappa și lambda, acestea nu au avut valoare predictivă semnificativă pentru recurența trombotică sau afectarea de organ. S-a observat doar o asocieră modestă cu statusul inflamator, sugerând că utilitatea lor este mai degrabă ca markeri complementari ai inflamației sistemice decât predictorii direcți ai hipercoagulabilității sau ai severității clinice. Studiul subliniază nevoia unor cohorte mai mari, protocoale standardizate și modele predictive integrate.

CONCLUZII

Această cohortă prospectivă care abordează Amiloidoza cu lanț ușor surprinde o populație complexă în care disfuncția multiorganică (cardiacă, renală și hepatică) și terapia direcționată asupra celulelor plasmatice influențează interpretarea și recomandările exploratorii privind hemostaza și coagularea.

Deoarece factorii menționați anterior modifică modul în care interpretăm clasic rezultatele testelor de laborator, evaluarea riscului de tromboză trebuie individualizat.

Tromboza a fost frecvent documentată, susținând ipoteza unei fenotipări extinse. Testele funcționale globale au arătat hipercoagulabilitate frecventă (TEG și TGT) chiar și atunci când timpii de coagulare de screening au fost înregistrați ca fiind în parametri normali.

Raporturile APTT și PT nu au prezis recurența trombozei, în timp ce modelele care utilizează TEG (K, Angle, MA) și TGT (Peak, ETP) au fost capabile să o prezică, evidențiind o utilitate clinică mai puternică și non-interschimbabilitatea platformelor dintre sângele integral și plasmă (testul vâscoelastic versus generarea de trombină).

Turnover-ul inflamației/fibrinei a prezis pozitivitatea TEG, dar nu și TGT, sugerând o tendință de prejudecată către pozitivitatea rezultatelor vâscoelastice într-un context inflamator.

Clinic, TEG/TGT ar trebui, așadar, vizat în momentul diagnosticului și în timpul tratamentului, ținând cont de statusul inflamației. Cu toate acestea, sunt necesare studii longitudinale mai ample, cu eșantionare standardizată și o screening mai amplu al cohortei prin criterii de excludere care includ evenimente auxiliare ce pot induce tromboză.

STUDIUL II – PROGNOSTICUL ȘI OPTIMIZAREA TERAPIEI ÎN PURPURA TROMBOTICĂ TROMBOCITOPENICĂ: PERSPECTIVE ÎN URMA EXPERIENȚELOR UTILIZĂRII CAPLACIZUMABULUI DIN CADRUL UNUI CENTRU PRIMAR DE HEMATOLOGIE DIN ROMÂNIA

MATERIALE ȘI METODE

Studiul a fost realizat în cadrul Centrului de Hematologie și Transplant Medular al Institutului Clinic Fundeni, cu respectarea principiilor Declarației de la Helsinki și aprobarea comitetului de etică. Toate datele au fost anonimizate, iar consimțământul informat a fost obținut de la pacienți la internare. Au fost incluși consecutiv 31 de pacienți diagnosticați cu purpură trombocitopenică trombocică (TTP) între 2013 și 2024. Diagnosticul de TTP imună a fost stabilit prin asocierea unui scor PLASMIC ≥ 5 cu un deficit sever de ADAMTS13 ($<10\%$). Determinarea activității ADAMTS13 s-a realizat inițial prin metode semicantitative, ulterior fiind implementată o metodă automatizată bazată pe tehnologia FRET.

Pacienții au fost împărțiți în două grupuri terapeutice: schimb plasmatic (PEX) asociat cu corticosteroizi sau PEX asociat cu caplacizumab. Datele au fost colectate de la momentul diagnosticului și pe parcursul urmăririi, incluzând variabile demografice, clinice și de laborator. Parametrii analizați au cuprins hemoleucograma, schistocitele, markerii hemolizei (LDH), funcția renală (creatinină), probele hepatice și activitatea serială ADAMTS13. Testul Coombs a fost utilizat pentru diagnosticul diferențial al anemiei hemolitice.

Au fost documentate detalii privind intensitatea tratamentului (numărul de sesiuni PEX, durata spitalizării, internarea în terapie intensivă) și răspunsul hematologic. Refractaritatea a fost definită prin persistența trombocitopeniei și a LDH crescut după 5 sesiuni PEX. Timpul de recuperare plachetară a fost considerat intervalul până la atingerea valorii de $150 \times 10^9/L$.

Activitatea ADAMTS13 a fost evaluată prin metoda FRET, bazată pe transferul de energie între fluorofori în funcție de distanța moleculară. Această tehnică permite cuantificarea precisă a activității enzimatică prin detectarea modificărilor de fluorescență generate de clivajul substratului. Comparativ cu metodele semicantitative, FRET oferă sensibilitate și reproducibilitate superioare, fiind capabilă să detecteze variații mici ale activității enzimatică, relevante clinic în TTP.

În 2022, laboratorul a implementat o platformă automatizată FRET, care a redus timpul de analiză și a îmbunătățit standardizarea rezultatelor. Sistemul permite raportarea valorilor pe un interval larg (0–160%), facilitând monitorizarea longitudinală. Validarea metodei a fost realizată pe un lot de 20 de pacienți, demonstrând concordanță cu metoda anterioară și capacitatea de a detecta modificări subtile ale activității ADAMTS13.

Deși mai costisitoare, metoda automatizată oferă avantaje semnificative, inclusiv rapiditate și precizie crescută, esențiale în managementul TTP. Totodată, interpretarea rezultatelor necesită atenție la posibile interferențe (hemoliză, hiperbilirubinemie, lipemie, heparină).

Schimbul plasmatic terapeutic a fost inițiat precoce (în primele 4 ore de la suspiciune), utilizând acces venos central și echipamente de afereză. Volumul plasmatic a fost calculat individual, iar tratamentul a fost monitorizat prin evaluări clinice și de laborator, urmărind răspunsul hematologic și siguranța pacientului.

REZULTATE

Cohorta noastră inițială a cuprins 31 de pacienți, dintre care 16 au fost tratați cu o combinație de schimb de plasmă (PEX) și caplacizumab, în timp ce restul au primit doar PEX și terapie cu corticosteroizi.

Grupul a prezentat o incidență predominant feminină de 64% și o vârstă mediană de 43 de ani, aliniindu-se cu tendințele demografice cunoscute pentru TTP autoimună.

Doar cinci pacienți au avut un scor PLASMIC sub 6. Incidența generală a infecției, dificultăților de respirație, manifestărilor neurologice, afectării gastrointestinale și refractarității este detaliată în Tabelul 5.

Prin evaluarea distribuției pacienților tratați cu caplacizumab versus PEX, singura diferență semnificativă observată a fost în numărul de zile de spitalizare ($p = 0,004$), cu o medie de 10,4 vs. 20,8 zile.

Cele două subgrupuri divizate conform tipului de abordare terapeutică au fost analizate pentru a determina coeficientul de variație al variabilelor clinice următoare: numărul ședințelor de PEX (VC = 56,5% în cadrul grupului ce a primit caplacizumab și VC = 56,6% în cadrul grupului ce a primit PEX), zilele de spitalizare (VC = 43,1% în cadrul grupului ce a primit caplacizumab și VC = 63,3% în cadrul grupului ce a primit PEX), zilele pe care pacientul le-a petrecut în terapie intensivă (VC = 265% în cadrul grupului ce a primit caplacizumab și VC = 214% în cadrul grupului ce a primit PEX) și numărul de zile necesare pentru normalizarea nivelului de plachete sanguine (VC = 60,7% în cadrul grupului ce a primit caplacizumab și VC = 51,8% în cadrul grupului ce a primit PEX).

Pentru a determina în continuare efectele celor două protocoale terapeutice asupra variabilelor menționate, s-a efectuat o analiză a coeficientului de variației între grupul ce a primit PEX și cu grupul care a primit caplacizumab.

Rezultatul obținut a relevat o diferență statistic semnificativă între protocoalele terapeutice în referitor la numărul de zile totale de spitalizare a pacientului ($p < 0,05$).

S-a determinat, de asemenea, dacă tipul de protocol terapeutic a fost asociat în orice fel cu o predispoziție la refractaritate, iar analiza utilizând tabele de contingență a generat o valoare p de 0,008 (Figura 2).

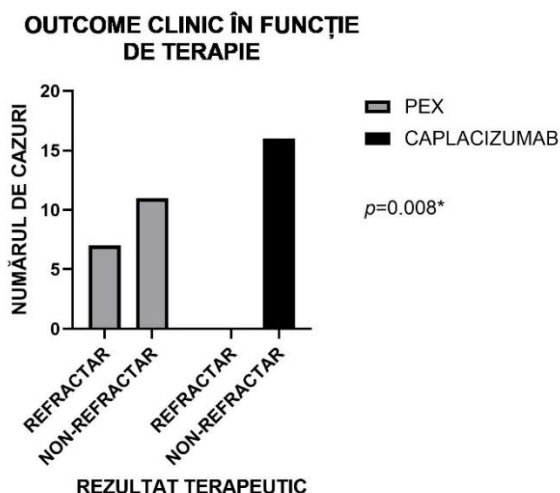


Figura 2. Rezultate dependente de tratament pentru refractaritate
(*=semnificativ statistic).

Toate aceste rezultate sugerează că includerea caplacizumabului la terapia de schimb de plasmă și corticosteroizi poate să reducă refractaritatea și poate, de asemenea să îmbunătățească rezultatele clinice în comparație cu terapia de schimb de plasmă și corticosteroizii (0% refractaritate în grupul caplacizumab față de 20,59% în grupul PEX).

Cu toate acestea, nu s-a constatat nicio corelație semnificativă între tipuri și severitatea bolii pe baza parametrilor individuali ai scorului PLASMIC ($p < 0,05$).

Cu scopul de a încerca să descoperim valorile predictive a tipurilor noastre de date, acest segment din lucrare se focusează pe utilizarea modelelor multivariabile predictive (ce cuprind/includ datele paraclinice de la toți cei 31 de pacienți) cu scopul de a determina dacă rezultatele clinice, printre care prezența infecției la momentul diagnosticului, simptomele neurologice majore, refractaritatea la tratament, dificultățile de respirație, afectarea gastro-intestinală, exacerbaria și diferențele de sex, ar putea să fie prezise folosind variabilele de tip continuu obținute în urma efectuării testelor de laborator standard.

Eficiența utilizării acestui tip de model de analiză statistică, a fost documentată prin raportarea ariei de sub curba ROC (AUC) cu valori p reprezentative.

Acestea au fost după cum, urmează: pentru infecție, AUC = 0,828 ($p = 0,0024$), pentru detresa respiratorie, AUC = 0,899 ($p = 0,0006$), pentru afectarea de tract gastrointestinal, AUC = 0,800 ($p = 0,005$), pentru prezența simptomelor neurologice majore, AUC = 0,880 ($p = 0,0004$), pentru prezența peteșilor, AUC = 0,9133 ($p = 0,0019$) utilizând rezultatele dependente de vârstă, hemoglobină, numărului de trombocite, numărului de leucocite, creatinină, bilirubină totală/directă/indirectă și LDH. Toate aceste date au fost măsurate la momentul diagnosticului. Pentru predicția refractarității/exacerbării, rezultatele analizei statistice cuprind o AUC = 0,870 ($p = 0,0005$).

Aceste rezultate indică o capacitate puternică de anticipare a complicațiilor acute, cu valori ale AUC cuprinse între 0,800 și 0,899, indicând o putere discriminativă ridicată.

De asemenea, evidențiază profilul biologic complex al purperei trombotice trombocitopenice, în care numărul scăzut de trombocite, disfuncția endotelială, stresul oxidativ și permeabilitatea tisulară crescută contribuie la dezvoltarea complicațiilor multiorganice.

Dintr-o alta perspectivă a utilizării acestui tip de model de analiză statistică, acesta nu a fost capabil să ofere un factor de predicție util pentru următoarele caracteristici clinice: pentru predicția afectării pulmonare generale, $AUC = 0,8214$ ($p < 0,05$) și pentru predicția recurenței decesului în cadrul populației studiate, $AUC = 0,8448$ ($p < 0,05$), utilizând rezultatele dependente de vârstă, hemoglobină, numărului de trombocite, numărului de leucocite, creatinină, bilirubină totală/directă/indirectă și LDH.

Am aplicat aceleași modele predictive pentru rezultatele post-tratament (exacerbare sau exacerbare a bolii), considerând tratamentul doar cu PEX și terapie cu corticosteroizi ca indicator al unui prognostic nefavorabil.

Variabilele predictoare au inclus numărul de sesiuni PEX, numărul de zile de spitalizare, numărul de zile în terapie intensivă și zilele necesare pentru recuperarea numărului de trombocite. Modelul a obținut o $AUC=0,72$ ($p=0,03$).

Aceste constatări evidențiază profilul biologic complex și multifățetat al purperei trombocitopenice trombotice (TTP), în care numărul scăzut de trombocite, disfuncția endotelială, stresul oxidativ și permeabilitatea tisulară crescută contribuie la dezvoltarea complicațiilor multiorganice.

DISCUȚII

Deși cohorta analizată a fost redusă numeric, aceasta a reflectat fidel tabloul clinic și biologic tipic al purperei trombocitopenice trombotice dobândite, o microangiopatie trombotică severă, amenințătoare de viață, caracterizată prin trombocitopenie marcată, anemie hemolitică microangiopatică și afectare ischemică de organ. Studiul nu s-a limitat la descrierea manifestărilor inițiale, ci a urmărit în mod special evoluția după tratament, cu accent pe refractaritatea terapeutică, definită prin absența unui răspuns adecvat la terapia de primă linie.

Un rezultat important al analizei a fost dezvoltarea unui model predictiv bazat pe parametri biologici uzuali, disponibili rapid în practica de rutină. Vârsta, hemoglobina, numărul de leucocite, trombocitele la diagnostic, creatinina, bilirubina și LDH s-au dovedit utile în identificarea pacienților cu risc crescut de evoluție nefavorabilă, activitate persistentă a bolii sau apariția complicațiilor, în ciuda tratamentului standard. Această observație susține ideea că stratificarea precoce a riscului poate ghida decizii terapeutice mai rapide și mai adecvate, mai ales la pacienții cu risc mare de tromboză microvasculară și ischemie de organ.

În acest context, administrarea timpurie a caplacizumabului pare deosebit de valoroasă, în special la pacienții cu trombocitopenie severă, LDH foarte crescut, afectare neurologică importantă sau insuficiență renală la prezentare. Datele noastre sugerează că introducerea precoce a acestei terapii poate reduce complicațiile și mortalitatea și poate limita riscul de refractaritate. Totodată, studiul a analizat și factori de prognostic asociați practicii terapeutice, precum numărul de ședințe de schimb plasmatic, care pot funcționa ca markeri indirecti ai severității bolii și ai intensității tratamentului.

Pe de altă parte, evoluția pacienților nu poate fi explicată doar prin datele inițiale. Am observat că parcursul ulterior este influențat și de factori dinamici, precum eliminarea inhibitorilor ADAMTS13, răspunsul la glucocorticoizi și statusul imunologic general. Aceasta subliniază importanța unei reevaluări longitudinale continue, bazate pe monitorizarea succesivă a trombocitelor, markerilor de hemoliză, funcției renale și a semnelor de afectare neurologică sau cardiacă, în locul unei conduite terapeutice rigide.

Prin compararea celor două grupuri terapeutice, pacienți tratați doar cu PEX și pacienți tratați cu PEX plus caplacizumab, s-au observat diferențe relevante nu doar la nivelul valorilor medii, ci și al

variabilității răspunsului clinic. Grupul tratat cu caplacizumab a prezentat o dispersie mai redusă pentru mai multe rezultate clinice, sugerând o evoluție nu doar mai bună, ci și mai previzibilă. Numărul de sesiuni PEX a rămas similar și foarte variabil în ambele grupuri, probabil din cauza deciziilor individualizate de oprire a procedurii, bazate pe răspunsul plachetar, markerii hemolizei și aprecierea clinicianului. În schimb, durata spitalizării a fost mai omogenă și mai scurtă la pacienții care au primit caplacizumab, ceea ce sugerează o stabilizare clinică mai rapidă.

Zilele de terapie intensivă au prezentat o variabilitate foarte mare în ambele grupuri, explicabilă prin heterogenitatea severității bolii: unii pacienți s-au stabilizat rapid, în timp ce alții au necesitat îngrijiri prelungite din cauza complicațiilor neurologice, cardiace, renale sau hematologice. Timpul până la recuperarea trombocitelor a variat de asemenea între pacienți, chiar și în grupul cu caplacizumab, probabil pentru că acest medicament oprește rapid consumul plachetar, dar nu influențează direct producția de autoanticorpi. Astfel, dinamica recuperării depinde în continuare de viteza de eliminare a inhibitorilor și de răspunsul la imunosupresie.

Din punct de vedere fiziopatologic, rezultatele susțin mecanismul central al bolii: deficitul sever de ADAMTS13 permite persistența în circulație a multimerilor ultra-mari de factor von Willebrand, care favorizează agregarea plachetară și formarea de trombi microvasculari. Acest proces determină trombocitopenie de consum, hemoliză și ischemie tisulară. Caplacizumab acționează rapid prin blocarea interacțiunii dintre factorul von Willebrand și trombocite, întrerupând formarea trombilor microvasculari. Aceasta explică de ce tratamentul a fost asociat cu normalizarea mai rapidă a trombocitelor și reducerea duratei de spitalizare, chiar dacă numărul de sesiuni PEX nu s-a redus în mod spectaculos. PEX rămâne esențial pentru eliminarea inhibitorilor circulanți și pentru re aprovizionarea cu ADAMTS13, iar caplacizumab funcționează mai degrabă ca o punte terapeutică până când efectele imunosupresiei devin eficiente.

Studiul nostru are valoare practică mai ales prin faptul că reflectă experiența reală a unui centru de referință, într-un context unde accesul imediat la testarea ADAMTS13 nu este întotdeauna posibil. În astfel de situații, utilizarea unor algoritmi bazati pe markeri de rutină poate susține triajul, deciziile terapeutice precoce și identificarea pacienților cu risc mare de refractaritate sau complicații. Această abordare este relevantă în special pentru unitățile de urgență și terapie intensivă, unde timpul este critic și tratamentul trebuie adesea început înainte de confirmarea definitivă a diagnosticului.

O contribuție importantă a studiului a fost și tranziția de la testarea semicantitativă a ADAMTS13 la o metodă cantitativă, complet automatizată. Această schimbare a redus timpul de obținere a rezultatelor, a crescut sensibilitatea diagnosticului și a îmbunătățit monitorizarea riscului de recădere după remisie. Integrarea unui astfel de progres tehnologic într-un flux clinic coerent poate influența semnificativ prognosticul, permițând confirmarea mai rapidă a cazurilor atipice, ajustarea duratei terapiei cu caplacizumab și supravegherea mai precisă a pacienților cu risc persistent.

Totuși, rezultatele trebuie interpretate în contextul limitărilor studiului: design retrospectiv, monocentric, număr redus de pacienți, lipsa randomizării și posibilitatea factorilor de confuzie legați de indicația terapeutică sau de accesul variabil la medicație. Dimensiunea mică a eșantionului poate limita puterea statistică și stabilitatea modelelor predictive. În plus, schimbarea metodei de testare ADAMTS13 pe parcursul perioadei de studiu poate introduce o anumită variabilitate. Chiar și așa, datele oferă dovezi exploratorii importante și susțin utilitatea clinică a caplacizumabului, precum și valoarea unui algoritm pragmatic de predicție bazat pe biomarkeri de rutină. Până la validarea în cohorte mai mari și multicentrice, aceste concluzii trebuie privite ca ghidaj clinic util, nu ca standard definitiv.

CONCLUZII

Constatările noastre indică fezabilitatea prezicerii complicațiilor acute și a refractarității terapeutice în cazul unui TTP utilizând parametri de laborator disponibili în mod obișnuit, cum ar fi hemoglobina, numărul de trombocite și LDH. Introducerea caplacizumab a redus semnificativ sesiunile de PEX, timpul de spitalizare, șederile la ATI și timpul de recuperare a trombocitelor, îmbunătățind atât predictibilitatea terapeutică, cât și rezultatele generale ale pacienților.

Deși testele de laborator de rutină au fost moderat predictive pentru recidiva post-tratament, o valoare prognostică mai fiabilă constă în testarea serială a activității ADAMTS13 și a inhibitorilor, precum și în variabilele de răspuns specifice tratamentului.

Sunt necesare cercetări suplimentare pentru a valida constatările noastre în studii prospective mai ample, multicentrice. Direcțiile viitoare includ integrarea algoritmilor de învățare automată și a analizei cost-eficacitate pentru a rafina strategiile de tratament și a îmbunătăți gestionarea personalizată a TTP, în special în contexte cu resurse limitate.

STUDIUL III – ROLUL NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS ÎN CONTEXT NEOPLAZIC

MATERIALE SI METODE

Procedura de documentare folosită a avut scopul de a sintetiza dovezile actuale privind interacțiunea dintre inflamație, NETs și tromboză, ca un cadru imunologic unificat. În acest sens, o căutare bibliografică cuprinzătoare a fost efectuată în PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science și Google Scholar, utilizând cuvinte cheie predefinite legate de inflamație, NET, imunotromboză și coagulare.

Au fost astfel identificate un total de 1752 de articole științifice dintre care 80 au fost selectate pentru analiză suplimentară. Studiile experimentale, observaționale și translaționale care examinează legăturile mecanistice dintre căile inflamatorii, formarea NET și evenimentele trombotice au fost eligibile pentru revizuire. După un proces de screening în doi pași (titlu/abstract și revizuire integrală), datele relevante au fost extrase și analizate narativ datorită eterogenității metodologice.

NETs ȘI ROLUL LOR IN CONTEXT NEOPLAZIC

Micromediul tumoral reprezintă ansamblul elementelor celulare și non-celulare care interacționează cu tumora și îi influențează comportamentul biologic. Acest ecosistem este format din celule tumorale, celule imune, proteine ale matricei extracelulare, factori de creștere, vase de sânge nou formate și fibroblaste. Nu este un spațiu pasiv, ci o structură dinamică, capabilă să susțină sau, în anumite contexte, să limiteze dezvoltarea tumorală. Heterogenitatea sa este esențială: diferitele regiuni ale aceleiași tumori pot avea compoziții celulare distincte, cu efecte pro- sau antitumorale. În ansamblu, stroma și infiltratul imun contribuie la proliferarea, invazia, metastazarea și răspunsul la tratament al tumorii.

Matricea extracelulară influențează progresia tumorală prin proteine precum fibronectina și colagenul, care modulează căile de semnalizare implicate în adeziune, migrare și proliferare. În paralel, infiltratul imun generează un mediu inflamator cronic, care poate stimula creșterea tumorală. Celulele canceroase profită de acest context prin secreția unor factori capabili să inhibe funcțiile imune esențiale, inclusiv activarea limfocitelor T și activitatea citotoxică a celulelor NK. În special în stadiile timpurii, tumora recrutează celule supresoare de origine mieloidă sau reglatoare, creând un cadru favorabil evadării imune.

În acest peisaj, NETs au devenit o componentă importantă a micromediului tumoral. Formarea lor poate fi indusă direct de tumoră, prin eliberarea unor citokine și factori de creștere, sau indirect, prin starea proinflamatorie generală și procesele de moarte celulară asociate tumorigenezei. Molecule precum interleukinele, TNF-alfa, interferonii, fragmentele complementului și chemokinele activează neutrofilele și favorizează NEToza. Odată formate, NETs nu doar perpetuează inflamația, ci pot și să inhibe răspunsul imun antitumoral prin epuizarea limfocitelor T și reducerea activității celulelor NK.

Un aspect major este contribuția NETs la rezistența la tratament. În cazul chimioterapiei, datele disponibile arată că nivelurile crescute de NETs se asociază cu eficacitate redusă. S-a demonstrat că aceste structuri pot proteja celulele tumorale prin mecanisme indirecte, inclusiv prin acțiunea unor factori solubili produși de celule mieloide supresoare și neutrofile. În mielomul multiplu, de exemplu, neutrofilele și celulele mieloide din măduva osoasă au redus efectul citotoxic al unor agenți chimioterapici. NETs par să funcționeze ca o barieră protectoare și chiar să modifice disponibilitatea unor medicamente la nivelul celulei tumorale. Important este că dizolvarea acestor rețele cu dezoxiribonuclează poate restabili sensibilitatea la tratament, sugerând o posibilă direcție terapeutică.

NETs sunt implicate și în rezistența la imunoterapie. Terapiile moderne de blocare a punctelor de control imun depind de capacitatea limfocitelor T de a recunoaște și distruge celulele maligne. Totuși, un număr crescut de neutrofile și o activitate intensă a NETozei se corelează cu răspunsuri mai slabe. În special, semnalizarea prin IL-17 favorizează recrutarea neutrofilelor, creșterea expresiei PD-1 și PD-L1 și excluderea funcțională a limfocitelor T CD8 din spațiul tumoral. NETs pot acționa inclusiv ca o barieră fizică între celulele imune efectoare și celulele tumorale, reducând contactul direct necesar pentru citotoxicitate. Blocarea IL-17, a neutrofilelor sau a NETozei, în asociere cu inhibarea PD-1, pare să îmbunătățească răspunsul antitumoral.

Radioterapia este influențată de un mecanism similar. Deși iradierea produce inițial un răspuns inflamator util, recrutarea neutrofilelor în țesutul iradiat poate favoriza NEToza. NETs pot acoperi suprafața celulelor tumorale și pot limita eficiența radiațiilor, acționând ca o barieră mecanică și modificând infiltrarea limfocitelor T CD8 în tumoră. Prezența crescută a NETs și predominanța neutrofilelor intratumorale se asociază cu răspuns slab la radioterapie și supraviețuire redusă. Din nou, degradarea NETs prin dezoxiribonuclează a dus la ameliorarea răspunsului terapeutic, întărind ideea că aceste structuri contribuie activ la radiorezistență.

Dincolo de rolul lor în rezistența la tratament, NETs reprezintă o verigă centrală între inflamație și tromboză. Ele sunt compuse din cromatină decondensată, histone și proteine granulare eliberate de neutrofilele activate și constituie fundamentul conceptului de imunotromboză. Inflamația stimulează formarea NETs, iar acestea, la rândul lor, amplifică inflamația și creează un mediu protrombotic. ADN-ul extracelular și histonele favorizează activarea factorilor de coagulare, generarea de trombină, agregarea plachetară și lezarea endoteliului. În plus, NETs interacționează cu factorul tisular și factorul von Willebrand, consolidând legătura dintre răspunsul inflamator și coagulare.

CONCLUZII

În concluzie, această analiză evidențiază rolul crucial al NETs ca o legătură cheie între inflamație, biologia tumorii și tromboză în cadrul unui sistem imunitar unificat.

Dovezile sintetizate indică faptul că formarea NETs nu este doar un mecanism de apărare, ci și un factor cheie care contribuie la progresia tumorii, evaziunea imună și rezistența la terapiile anticancerigene convenționale, inclusiv chimioterapia, imunoterapia și radioterapia.

În micromediul tumoral, NETs promovează o stare proinflamatorie persistentă, facilitează imunosupresia și interferează cu un răspuns antitumoral eficient prin limitarea activității citotoxice a celulelor imune.

În plus, interacțiunea lor cu trombocitele, celulele endoteliale și factorii de coagulare susține implicarea lor în formarea și stabilizarea trombusului, întărind conceptul de imunotromboză.

Relația bidirecțională dintre inflamație și NET creează un ciclu de proliferare auto-perpetuat care exacerbează atât progresia tumorii, cât și riscul de tromboză.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Această cercetare doctorală analizează utilitatea clinică a unor metode non-clasice de evaluare a hipercoagulabilității și valoarea lor prognostică în hematologie, concentrându-se pe două afecțiuni complexe: amiloidoza AL și purpura trombocitopenică trombotică. Ideea centrală a tezei este că testele convenționale de coagulare, precum timpul de protrombină și timpul de tromboplastină parțial activată, descriu doar parțial echilibrul hemostatic și nu reușesc să surprindă riscul real de tromboză sau sângerare la acești pacienți. Prin urmare, este necesară o evaluare mai integrată și mai dinamică a coagulării.

Rezultatele arată că testele funcționale globale, în special generarea de trombină și metodele vâscoelastice, oferă informații clinice esențiale care nu pot fi obținute prin testele de rutină. Aceste metode evaluează formarea cheagului, producția de trombină și stabilitatea acestuia, oferind o imagine mai realistă a raportului dintre mecanismele procoagulante și anticoagulante. În bolile sistemice, cum este amiloidoza AL, unde mai multe mecanisme patogenice acționează simultan, aceste teste evidențiază dezechilibre hemostatice care altfel ar rămâne nedetectate.

În amiloidoza AL, cercetarea a evidențiat un profil hemostatic paradoxal, în care coexistă riscul hemoragic și predispoziția trombotică. Acest dezechilibru este determinat de disfuncția endotelială, afectarea de organ, lanțurile ușoare circulante și influența tratamentului. În plus, pot apărea deficite dobândite ale unor factori de coagulare, în special factorul X, ceea ce crește riscul de sângerare. În paralel, sindromul nefrotic, afectarea cardiacă, inflamația și imobilizarea favorizează hipercoagulabilitatea. Astfel, starea hemostatică a pacientului cu amiloidoză AL nu poate fi interpretată corect prin parametri izolați, ci necesită integrarea datelor biologice și clinice.

Teza subliniază și rolul major al inflamației sistemice în modificarea coagulării. Inflamația influențează endoteliul, funcția plachetară și mecanismele anticoagulante naturale, favorizând un mediu protrombotic și o fibrinoliză redusă. În consecință, markerii inflamatori trebuie luați în considerare la interpretarea testelor funcționale și la estimarea riscului trombotic.

În purpura trombocitopenică trombotică, studiul evidențiază importanța diagnosticului rapid și a inițierii precoce a terapiei. Deoarece rezultatul activității ADAMTS13 nu este întotdeauna disponibil imediat, au fost propuse modele predictive bazate pe parametri accesibili, precum trombocitele, hemoglobina, LDH și creatinina. Acești markeri pot ajuta la identificarea timpurie a pacienților cu risc crescut și la alegerea unei conduite terapeutice mai rapide și mai adecvate. În acest context, utilizarea caplacizumabului s-a asociat cu recuperare hematologică mai rapidă și reducerea necesarului de schimb plasmatic prelungit.

Per ansamblu, teza demonstrează că integrarea datelor clinice, a testelor funcționale de coagulare și a modelelor statistice poate transforma medicina de laborator dintr-un instrument strict

diagnostic într-un sprijin real pentru prognostic și decizie terapeutică. Concluzia generală este că evaluarea hemostatică integrată este esențială în bolile hematologice complexe și susține medicina de precizie printr-o stratificare mai bună a riscului și tratamente mai individualizate.