

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**AZ OXIDÁLT LDL ELLENI AUTOANTITESTES
FOLYAMATOK SZEREPE ATHEROTROMBOTIKUS
KÓRKÉPEK IMMUNO-INFLAMMATORIKUS
FOLYAMATAIBAN**

Dr. Laczik Renáta Erika

Témavezető: Dr. Soltész Pál



**DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2011

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**AZ OXIDÁLT LDL ELLENI AUTOANTITESTES
FOLYAMATOK SZEREPE ATHEROTROMBOTIKUS
KÓRKÉPEK IMMUNO-INFLAMMATORIKUS
FOLYAMATAIBAN**

Dr. Laczik Renáta Erika

Témavezető: Dr. Soltész Pál



**DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2011

**AZ OXIDÁLT LDL ELLENI AUTOANTITESTES
FOLYAMATOK SZEREPE ATHEROTROMBOTIKUS
KÓRKÉPEK IMMUNO-INFLAMMATORIKUS
FOLYAMATAIBAN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Laczik Renáta Erika, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris programja) keretében

Témavezető: Dr. Soltész Pál, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

tagok: Dr. Nagy György, Ph.D.

Dr. Bódi Annamária, Ph.D

A doktori szigorlat időpontja: 2012. február 28.

Az értekezés bírálói:

Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.

Dr. Járai Zoltán, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.

Dr. Járai Zoltán, Ph.D.

Dr. Nagy György, Ph.D.

Dr. Bódi Annamária, Ph.D

Az értekezés védésének időpontja: 2012. február 28.

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az atherosclerosis egy olyan kiemelt morbiditású és mortalitású patológiás folyamat, melynek legfőbb makroszkópikus megnyilvánulása az artériákon kifejlődő atherosclerotikus plakk. Az artériás falban zajló immunmediált gyulladási folyamatok nem kizárólag a plakk kialakulásában játszanak fontos szerepet, hanem annak progressziójában is, mely a plakk instabillá válását eredményezve súlyos atherotrombotikus komplikációk forrása lehet. Jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képezik a plakkban zajló immunmediált gyulladási folyamatok, melyben a kulcsfontosságú autoantigének, immunsejtek, mediátorok megismerése és működésük feltérképezése új terápiás célpontokat szolgáltat a gyógyászat számára.

1. A plakk instabilitásához vezető immuno-inflammatorikus folyamatok

Az utóbbi évtizedek kutatásai alapján jól ismert, hogy az instabil plakkokban szubklinikai szinten krónikus gyulladás zajlik, melyet napjainkban már *in vivo* is sikerült vizualizálni FDG-PET módszerrel számos preklinikai állatkísérletben és humán klinikai tanulmányban.

Immunológiai szempontból a vulnerábilis plakk kialakulásához vezető gyulladás kulcsfontosságú szereplői a makrofágok, melyek proinflammatorikus citokineket, kemokineket, szöveti faktort, extracelluláris mátrix metalloproteinázokat, reaktív oxigénradikálokat, prosztanoidokat és komplement faktorokat termelnek. Kimutatták, hogy a fokozott makrofág-infiltráció jól korrelál a plakk progressziójának mértékével, ruptura hajlamával.

A plakkban a T-sejtek többsége aktivált állapotban van, a T-sejt szubpopulációk közül a CD8 pozitív T sejtek aránya a döntő. Ugyanitt B-sejtekből transzformálódott antitest-termelő plazmasejtek és NK-sejtek is kimutathatóak és a T-sejtek szomszédságában aktivált HLA-DR pozitív vaszkuláris simaizomsejtek halmozódnak fel. A fent jelzett sejtpopulációk között élénk interakció folyik. Ebben a folyamatban kiemelt jelentőségű a T-helper1/T-helper2 egyensúly Th1 irányú eltolódása, (IFN- γ , IL-1, TNF- α makrofágra

gyakorolt aktiváló hatása) valamint a T-helper 2 citokinek B-sejt aktivációs hatása. A sejtes kollaboráció döntően a CD40-CD40L közötti kölcsönhatás, mely szintén makrofág aktivációhoz vezet.

A plakkokban regulatív T sejtek is jelen vannak, melyeknek az atherosclerosisban betöltött funkciójáról még kevés adat áll rendelkezésre, de egyes preklinikai tanulmányok protektív szerepüket valószínűsítik. Az IL-17-et termelő Th17 sejtek szintén részt vesznek az atherosclerosis folyamatában, befolyásolják a VCAM-1-en keresztül a T sejtek migrációját illetve a CXCL-1-en keresztül a monociták adhézióját, azonban vitatott, hogy pro- vagy antiatherogén hatást fejtenek ki ebben a körképben.

Atherosclerosisban autoantitestes mechanizmusok is jelen vannak. Jelenleg három meghatározó autoantigént tudunk definiálni, melyek szerepe bizonyított a plakk kialakulásában, illetve progressziójában. Ezek az oxidált-LDL, a β 2-glikoprotein I és a 60 kDa-os hősokk fehérje. Ezek tehát egyfelől mint autoantigének részt vesznek az antigén függő sejtes gyulladáson vonulatokban, másfelől autoantitestek által mediált folyamatokat indítanak el, melyek önálló patogén szereppel bírnak.

2. Oxidált LDL

Az atherosclerotikus plakk kialakulásában döntő szerepet játszó immunogén makromolekula az oxidált LDL, mely az LDL partikulumok oxidatív módon módosított formája. Az atherosclerosis kialakulását megelőző lépésként a keringő LDL molekula az endotéliumon át az artériás fal subendoteliális terébe jut. Az irodalomból jól ismert, hogy az endotél permeabilitás és az intima felé irányuló LDL transzport meredeken megnő elsősorban a bifurkációkban és a vaszkulatura éles görbületeinél. Ebben a folyamatban atheroprotektív szereppel bír az endotél sejteket lumen felől borító glikokalix réteg, mely szabályozza, illetve redukálja az LDL penetrancia mértékét. A nyíróerők által kiváltott NO felszabadulás szintén atheroprotektív hatású. Bizonyos helyeken a krónikusan fennálló alacsony nyíróerők illetve számos noxa hatására azonban a glikoproteinek szintézise csökken, a glikokalix elvékonyodik, szerkezete megváltozik, ezáltal az LDL szabadon áramolhat az intimába.

A subendoteliális tér extracelluláris mátrixában a csapdába esett LDL egy többlépcsős folyamat során oxidálódik.

3. Az LDL oxidáció folyamata. Az oxidált LDL proatherogén sajátosságai

Az LDL oxidáció folyamatában a lipidek, foszfolipidek, apolipoprotein B-100 egyaránt különböző kémiai változásokon, modifikációkon mennek keresztül.

Az oxidált LDL számtalan biológiai hatását tekintve feltehetően proatherogén, mely leginkább a partikulum külső rétegét alkotó oxidált foszfolipideknek köszönhető.

Az oxidált koleszterol-észterek biológiai jellegzetességei: citotoxikus hatásúak a szérumentes-médiumban tenyésztett endotél sejtekre, az endotél sejteken M-CSF, VCAM-1, MCP-1 expressziót indukálnak, mellyel serkentik a monociták kemotaxisát az intimába, ellenben a szöveti makrofágok migrációját gátolják. Az oxidált LDL sejt kultúrában gátolja a lipopoliszacharid-indukált NF κ B expressziót és apoptózist indukál, azonban a simaizom sejtek kollagénszintézisét serkenti. A vazospazmust a NO felszabadulásának/funkciójának gátlásán keresztül éri el, trombózist az endotél sejtek által termelt szöveti faktor aktivitásának fokozódásával okoz valamint a gyulladást a makrofágok által szekretált proinflammatorikus citokinek széles skálájának indukálásával gerjeszti. Az oxidált LDL immunogén is, az oxidáció-specifikus epitópok ellen antitestek termelődnek. A klinikus szemszögéből vizsgálva az oxidált LDL hatását jól tükrözi, hogy számos autoimmun állapotban, akut koronária szindrómában ill. stabil koronária betegségben is jelen van, melyekben patogén szereppel bír.

Az LDL oxidáció jelenlegi tudásunk szerint elsősorban nem a keringésben történik, mivel az ott jelenlévő erőteljes antioxidáns védőmechanizmusok valamint az LDL saját transzport molekulája, az alfa-tokoferol (antioxidáns E-vitamin) akadályozzák ennek bekövetkezését. *In vivo*, az LDL főként a subendoteliális térben oxidálódik, mely döntően két lépcsőben történik: az első fázisban túlnyomórészt az LDL-t alkotó lipidek oxidálódnak, az apoB100 nem vagy alig („minimálisan oxidált LDL”), míg a második lépcsőben zajló további oxidáció során az apoB100 és a lipidek is további

módosulásokon mennek keresztül, ennek eredménye az oxidált LDL. A „minimálisan oxidált LDL” az anti-apoptotikus szignálút vonalat, proinflammatorikus kemokinek és citokinek termelését indukálja. Az LDL receptorokon keresztül felvételre kerülő „minimálisan oxidált LDL” illetve maga az LDL nem képesek felhalmozódni a makrofágban, mivel a növekvő mennyiségű intracelluláris koleszterin „downregulálja” az LDL receptort az SREBP (sterol regulatory element-binding protein) közvetítésével. A teljesen oxidált LDL a makrofágok specifikus plazmamembrán receptoraihoz (scavenger receptor A, scavenger receptor B /CD36/, LOX-1 receptor) magas affinitással kötődik. Mivel ezek a receptorok a makrofágok koleszterol tartalmának növekedésével nem „downregulálódnak”, lehetővé válik a koleszterin progresszív akkumulációja és a habos-sejtek képződése.

Az LDL nem-enzimatis úton (pl., fém-ionok, hem, nitrogén monoxidból képződő peroxinitrit és egyéb katalizátorok által), valamint enzimek (lipoxigenáz, mieloperoxidáz, glikációs enzimek) segítségével oxidálódhat az artériás érfalban.

Az LDL oxidációs mechanizmusa *in vitro* 3 lépésben modellezhető, melynek részeként reaktív aldehidek, lizo-PC és oxidált foszfolipidek (oxPL) keletkeznek. Az atheroscleroticus lézióban jól dokumentálhatóan megjelenik a lizo-PC, az oxPL és az aldehidek, melyek az oxLDL biológiai tulajdonságaiért, legfőképpen az immunogenitásáért felelősek. Az LDL oxidáció során keletkező oxPL és lizo-PC fontos szerepet játszik az oxLDL antigenitásában, melyben számos epitóp variáció vesz részt, melyeket aztán az antitestek széles skálája ismer fel. Jó néhány tanulmány szól az oxLDL elleni antitestek szintjének és az atherosclerosis fokának összefüggése mellett.

4. Az anti-oxLDL antitestek hatása a habos sejt aktivációjára

Az oxidált LDL partikulumokat a plakk aktivált makrofágjai részben a klasszikus, nem specifikus útvonalon (a scavenger receptorokon keresztül), részben az oxLDL ellen termelődő antitestekkel komplexet képezve a specifikus Fc γ receptorokon keresztül fagocitálják - így keletkeznek az észterifikált koleszterinnel telített habos sejtek. A habos sejtek tartós aktivitást mutatnak és a

korábban említett gyulladásozó faktorokat termelik, mellyel hozzájárulnak az inflammációs kaszkád fenntartásához, progressziójához és végső soron a plakk destabilizálódásához, rupturájához vezetnek.

Az anti-oxLDL antitestek akcelerálják az oxLDL molekulák felvételét és fokozzák a makrofágok aktivitását, emellett az IgG típusú anti-oxLDL/oxLDL immunkomplexek az Fc γ RI receptorok keresztközítésével aktiválják a monociták Akt-dependens túlélési szignálútját, mely szintén szerepet játszik a habos-sejt képződésben. Az anti-oxLDL mediált útvonalon sokkal gyorsabban, nagyobb mennyiségű oxLDL felvétele lehetséges a klasszikus (scavenger-receptor) útvonalhoz viszonyítva, az antitestek hatására a makrofágok aktiválódnak, immunológiailag aktív habos sejtekké alakulnak, a plakk tovább progrediál, végül instabillá válik. A CD4+ T-sejtek is képesek felismerni az oxLDL-t HLA-DR-függő módon - tehát az oxLDL nemcsak humorális, hanem celluláris immunválaszt is elindít.

Korábban már említettük az oxLDL komplexképző hajlamát β 2GPI-vel, mely szintén target autoantigénként funkcionál. Az IgG típusú anti- β 2GPI antitestek hozzákötődnek az oxLDL/ β 2GPI komplexekhez és az Fc γ R I receptorok közvetítésével rapidan inkorporálódnak a makrofágokba. Az oxLDL/ β 2GPI komplexek és az ellenük irányuló autoantitestek gyakran vannak jelen a szérumban autoimmun állapotokban is (például SLE, APS) és kapcsolatba hozhatók az atherosclerosis akcelerálásával.

Azonban nemcsak oxLDL/ β 2GPI partikulumok léteznek, hanem kialakulhatnak CRP/oxLDL/ β 2GPI aggregátumok is. Az oxLDL/ β 2GPI komplexekben a C-reaktív protein az oxLDL komponens foszforil-kolin láncához hozzákötődik, mintegy opszonizálja a komplexeket és végső soron tovább serkenti az Fc γ receptorokon keresztül folyó immunkomplex clearance-t. A CRP eredetileg az innate immunitásban játszik fontos szerepet, aktiválja a klasszikus komplement útvonalat, mely a komplement receptorokon keresztül a fagocitózis fokozásához vezet.

5. Az anti-oxLDL antitestek klinikai szerepe. Patogén vagy protektív antitestek?

Az oxLDL stimulálja a B sejtek anti-oxLDL antitest termelését. Az anti-oxLDL antitestek patogén vagy protektív hatásáról különböző tanulmányok születtek az irodalomban. Kezdetben elsősorban az antitestek protektív szerepe mellett szólt több olyan tanulmány, melyekben nyulakat és egereket oxLDL-el immunizáltak. Ezekben az esetekben az atherosclerosis redukciója korrelált az IgG típusú anti-oxLDL antitest szintekkel.

A humán anti-oxLDL antitestek fontos szerepet játszanak az oxLDL szintek regulációjában. Ezek az antitestek megjelennek gyerekekben, egészséges felnőttekben és például koronária betegekben. Az antitestek szintjét gyermekekben szignifikánsabban magasabbnak találták, mint felnőttekben. Ez valószínűsíti, hogy a magas antitest szintek gyermekekben modulálják az antigént, és így védelmet nyújtanak az atherosclerosis és a kardiovaszkuláris betegségekkel szemben. Egy másik tanulmányban 130 egészséges egyén bevonásával a plazma oxLDL koncentrációk fordítottan korreláltak az anti-oxLDL antitestek szintjeivel, és egy újabb tanulmány szerint negatívan korreláltak a carotis artériák intima-media vastagságával. Ezek a tanulmányok azt sugallják, hogy egészséges egyéneknél az anti-oxLDL antitesteknek az atherosclerosis és a kardiovaszkuláris betegségek kifejlődésével szemben protektív funkciójuk van.

Az előzőekkel szemben az utóbbi időben előtérbe kerültek az antitestek patogén szerepéről szóló tanulmányok, melyekben leírják, hogy az atheroscleroticus léziók olyan immunglobulinokat tartalmaznak, amelyek specifikusak az oxLDL-re. Az anti-oxLDL, és/vagy anti-malondialdehid-LDL antitestek megjelennek a koronária betegek szérumában, és magasabb titereket érnek el, mint az egészségesekben, tehát az így kimutatható emelkedett antitest szinteknek diagnosztikai vagy prognosztikai értéke lehet koronária betegségekben. Ezek az antitestek jelezhetik a koronária atherosclerosis kiterjedését is. Megjelenésük kapcsolatban van a PTCA után bekövetkező koronária restenosis magas rizikójával. A magasabb antitest szintek perifériás occluzív érbetegségben is

korreláltak az atherosclerosis kiterjedésével. Egy további közleményben az aldehid-modifikált apoB-100 peptid 210 ellen termelődő IgG magas szintjei szoros összefüggést mutattak a lipidgazdag, kevés kötőszöveti mátrixot tartalmazó vulnerábilis plakkok előfordulásával, miközben az aldehid-modifikált apoB-100 peptid 210 és 240 ellen termelődő IgM típusú ellenanyagok szintje a lipidszegény, fibrózus stabil plakkok megjelenésével korrelált. Tsimikas és mtsai pozitív lineáris összefüggést tártak fel az IgG típusú oxLDL antitestek és az angiographiával igazolt koronária betegség között, míg negatív korreláció igazolódott az IgM típusú oxLDL tekintetében, de ezek az antitestek nem voltak független előrejelzői a jövőbeli kardiovaszkuláris eseményeknek. A humán anti-oxLDL antitestek különböző osztályait, alosztályait azonosították, melyek az IgA, IgG1, IgG2, IgG3, és IgM.

Az irodalomban ellentmondásos adatok vannak arra, hogy az oxidált LDL elleni autoantitestek patogén vagy protektív funkcióval bírnak az atherosclerosisban, számos pro- és kontra érv szól mindkettő mellett. Ennek az ellentmondásnak a feloldására lehetséges magyarázatként szolgál Shoenfeld és mtsainak illetve Tsimikas és mtsainak tanulmányai, melyek azt erősítik meg, hogy az eltérő izotípus formáknak eltérő szerepe van az atherosclerosisban. Az IgM típusúnak inkább védő, míg az IgG típusú antitesteknek egyértelműen proatherogén szerepet tulajdonítanak.

Egy experimentális adat szerint az IgG oxLDL elleni antitestek kis dózisban elősegítik mind a CD32A (FcγRIIA) receptorokon, mind a CD36 (scavenger) receptorokon keresztüli oxLDL felvételt, ezzel szemben nagy dózisban gátolják a CD36 receptorok általi felvételt és elősegítik az oxLDL felvételét a CD32A receptorokon keresztül a makrofágokba.

6. Az oxLDL/β2GPI ellen irányuló immunválasz atherogén hatása antifoszfolipid szindrómában

Egy tanulmányban az antifoszfolipid szindrómát (APS) experimentálisan egérben modellezték, és kimutatták, hogy az oxLDL-el immunizált egerekben szignifikánsan súlyosabb betegség fejlődött ki, mint a natív LDL-el immunizáltakban. Számos klinikai tanulmány foglalkozik az APS betegekben megfigyelt akcelerált

atherosclerosis (carotis IMT növekedése, perifériás artériás obliteráló érbetegség, aorta atherosclerosisának gyors fokozódása) és az oxLDL/ β 2GPI komplex elleni antifoszfolipid, anti-oxLDL antitestek kapcsolatával.

Ismertté vált, hogy az oxLDL, a β 2-glikoprotein I illetve az ellenük irányuló humorális mechanizmusok között kölcsönös kapcsolat mutatható ki: az oxLDL elősegíti a β 2GPI molekula konformációjának megváltozását, ezáltal megkönnyíti az antifoszfolipid autoantitestek kötődését. Előzőleg részletesen tárgyaltuk, hogy az anti- β 2GPI autoantitestek fokozzák az oxLDL/ β 2GPI komplexek felvételét a CD64 (Fc γ RI) receptorokon keresztül a makrofágokba, ilyen módon serkentik az oxLDL akkumulációját és a proatherogén habos sejtek képződését.

Antifoszfolipid szindrómában az oxLDL/ β 2GPI komplex elleni IgG-típusú anti-oxLDL antitestek összefüggésbe hozhatók az artériás tromboemboliás eseményekkel. Az APS patogenezisében elfogadott, hogy a Th2-függő citokinek és a humorális immunmechanizmusok dominálnak, azonban nem hagyhatóak figyelmen kívül azok a tanulmányok, melyek krónikus *in vivo* CD4+ és CD8+ T sejt stimulációról és a Th-1 citokinek szekréciójáról számolnak be primer APS-ben. Ezek alapján felvetődik, hogy az oxLDL elleni antitestek súlyosbíthatják az APS klinikai manifesztációját és az oxLDL komplexekkel reagáló antifoszfolipid autoantitestek hozzájárulhatnak az APS-ben tapasztalható akcelerálódó atherosclerosis patomechanizmusához. Az oxLDL-habossejt-inflammatorikus vonulat serkenti az endotél sejtek aktivációját is, mely további leukociták toborzásához és migrációjához vezet. A plakokban felhalmozódó gyulladásozó sejtek az érfalban zajló immuno-inflammatorikus válasz következményének tekinthetők, ezáltal az atherosclerosis tovább progrediál.

7. A C-reaktív protein

A C-reaktív protein szintről már bebizonyították, hogy a kardiovaszkuláris betegségek erős, független rizikófaktora. Az emelkedett CRP szint prognosztikai jelentőséggel is bír. Irodalmi adatok alapján instabil angina és akut miokardiális infarktuszban szenvedő betegekben a CRP szintek magasabbak, mint az

egészségesek esetében, illetve a magasabb CRP szintek a miokardiális infarktus rosszabb prognózisát jelentik. A klinikai alkalmazhatósága azonban korlátozott értékű a kardiovaszkuláris rizikó becslésére, mivel szintje megemelkedik számos más gyulladásos patogenezisű betegségben is.

8. A statinok pleiotrop hatása, szerepük a plakk stabilizálásában

A statinok minden koleszterincsökkentő terápia alapját képezik, melyet komplex módon érnek el. Egyrészt gátolják a 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzim A (HMG-CoA) reduktáz hatását, mely a májban zajló koleszterin szintézis mevalonát útvonalának kulcsfontosságú enzime; másrészt képesek stimulálni az LDL részecskék clearance-ét is azáltal, hogy „up-regulálják” az LDL receptorokat. Ismert még egyéb, ún. pleiotróp” hatásuk is: csökkentik a plakkok lipidmagját elősegítve a plakk stabilizációját, hozzájárulnak a fibrózus sapka megerősítéséhez, gátolják a trombocita aggregációt és a trombus képződést. A statinok lipidcsökkentő hatásuktól függetlenül módosíthatnak számos immuno-inflammatorikus folyamatot is. Az atherosclerotikus plakkon belül a statinok csökkentik a makrofágok számát, a fibrózus sapka megrepedésében közreműködő fehérjebontó enzimek felszabadulását és „down-regulálják” azon sejtadhéziós molekulák expresszióját, melyek részt vesznek a monociták és az endotél felszín kölcsönhatásában, valamint a közelmúltban megjelent irodalmi adatok szerint lassíthatják a diabetes mellitus kialakulását.

CÉLKITŰZÉS

I. Experimentális vizsgálatunk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az oxidált LDL stimuláció hatását limfocitákon *in vitro* körülmények között antifoszfolipid szindrómában.

Az antifoszfolipid szindrómás betegekből szeparált limfociták proliferációját illetve citokin szekrécióját egészséges kontrollal összevetve jellemeztük oxLDL jelenlétében, választ keresve arra a kérdésre, hogy az oxLDL autoantigén stimulus hatására hogyan viselkednek a limfociták az említett kórképekben.

A munkánk során vizsgáltuk, hogy:

1. Az oxLDL különböző koncentrációi (5 és 20 µg/ml) jelenlétében hogyan alakul a szeparált limfociták proliferációja illetve 20 µg/ml oxLDL stimulus hatására hogyan változik a limfociták citokin szekréciója? Van-e statisztikailag meghatározható különbség az antifoszfolipid szindrómás betegek és egészséges kontrollok között a stimulált limfocita proliferációban?
2. Az oxLDL elsősorban mely citokinek szekrécióját stimulálja az említett betegségben? Ez összefüggésbe hozható-e a Th1 vagy Th2 immunválasz dominanciájával a betegség patomechanizmusában?
3. Antifoszfolipid szindrómában az említett autoantigének proliferációt és citokin termelést indukáló hatása mutat-e összefüggést a klinikai, artériás vagy vénás tromboemboliás eseményekkel?

II. A retrospektíven végzett klinikai vizsgálatunk célkitűzése volt, hogy akut koronária szindrómásokban és stabil koronária betegekben egy illesztett kontroll csoport segítségével tanulmányozzuk az oxLDL elleni autoantitestek szintjét.

A következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Akut koronária szindrómában és stabil koronária betegekben meghatározott anti-oxLDL antitest szintek mutatnak-e

statisztikailag jelentős különbséget az egészséges kontrollok értékeihez képest?

2. Az oxLDL elleni autoantitestek szintje kapcsolatba hozható-e a betegek hospitalizációja során észlelt klinikai eseményekkel?
3. Az akut koronária betegekben erős prediktív értékkel bíró (azonban alacsonyabb specificitása miatt korlátozottan alkalmazható gyulladáson marker) CRP valamint az anti-oxLDL antitestek titerék hogyan viszonyulnak egymáshoz, kimutatható-e korreláció közöttük?

III. Ezen vizsgálat publikált eredményeire épülően egy prospektív klinikai tanulmány keretében akut koronária szindrómában tovább elemeztük az IgG anti-oxLDL antitest-titerék kapcsolatát a betegek hospitalizációja során bekövetkező akut klinikai eseményekkel illetve a statin terápiával.

Az alábbi kérdésfeltevések indokoltak:

1. Az IgG oxLDL elleni autoantitesteknek a beteg felvételekor mért szintje mutat-e összefüggést az akut koronária szindróma szövődmenyes vagy szövődmenymentes lefolyásával vagyis lehet-e prediktív szerepe az antitesteknek az akut koronária szindróma kimenetelében?
2. A koleszterinszintet csökkentő statin kezelés milyen kapcsolatban van az akut koronária szindrómás betegek IgG típusú anti-oxLDL antitest titerével?

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

I./1. Az experimentális vizsgálatban résztvevő betegek jellemzése

A vizsgálatot a DE OEC III. sz. Belgyógyászati Klinika kardiovaszkuláris szakrendelése által gondozott primer antifoszfolid szindrómások valamint egészséges önkéntesek bevonásával végeztük. A tanulmány során vizsgált betegek és egészséges véradók részletes tájékoztatásban részesültek az Etikai Bizottság Protokollja szerint és a vérvételek belegegyezésüket követően történtek meg. Az antifoszfolid szindrómás populáció 13 betegből (1 férfi és 12 nő) állt, átlagos életkoruk $47,3 \pm 12,1$ év (27–67 év) volt, mindegyikük esetében teljesült a módosított Sapporo klasszifikációs kritériumtünetekből legalább egy klinikai és egy laboratóriumi feltétel.

Az antifoszfolid antitestek (az IgG típusú anti- β 2GPI, anticardiolipin és antifoszfátidil-szerin antitestek) jelen voltak a betegek szérumában. Négy beteg szerológiailag egyszeres antitest pozitivitást mutatott, kilenc beteg kettős vagy háromszoros antitest pozitivitást hordozott. A gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek (fehérvérsejtszám, Westergreen érték, CRP, szérum IL-1) a vérvétel idején a normál tartományban voltak. Az APS-en belül további alcsoportokat határoztunk meg a betegség progressziója során jelentkező artériás vagy vénás tromboemboliás események szerint. Az artériás APS csoportban ($n = 5$) a betegeknek döntően artériás tromboemboliás manifesztációi voltak, melyek TIA, stroke, epilepszia, akut koronária szindróma vagy arteria centralis retinae trombózisa formájában nyilvánultak meg. A vénás csoportban ($n = 8$) elsősorban a vénás érrendszert érintő tromboemboliás események jelentkeztek, mint a mélyvénás trombózis vagy a pulmonáris embólia.

Az illesztett kontrollként szolgáló kilenc egészséges önkéntes (két férfi és hét nő) tünet- és panaszmentes volt, átlagéletkoruk $49,6 \pm 7,3$ év (32–56 év), szerológiailag antifoszfolid antitest negatívak, gyulladáshoz kapcsolódó paramétereik nem tértek el a normáltól, kórtörténetükben krónikus betegség nem szerepelt.

I./2. Perifériás mononukleáris sejtek szeperálása

A humán perifériás mononukleáris sejteket natív vénás vérből Ficoll-Histopaque 1077 gradiens centrifugálással nyertük. A mononukleáris sejteket PBS-el átmostuk, majd reszuszpendáltuk és termosztátban (37°C; 86% páratartalom; 5% CO₂ mellett), komplett RPMI tápfolyadékban oxLDL antigén jelenlétében proliferáltattuk. A kiindulási sejtszámot 96-lyukú mikrotiter lemezen lyukanként 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be.

I./3. Sejtproliferáció *in vitro* vizsgálata

A perifériás mononukleáris sejteket tisztított 5 és 20 ug/ml oxLDL epitóp (Intracel, Frederick, MD, USA) hozzáadásával stimuláltuk. A sejtproliferáció meghatározását BrdU kolorimetriás enzim-kapcsolt immunszorbens esszé (ELISA) technikával (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) végeztük, követve a gyártó utasításait.

Az antigénre adott proliferációs válasz meghatározásakor bevezettük a proliferációs index (PI) használatát:

PI = antigén jelenléte mellett mért proliferáció/ antigén hozzáadása nélkül mért proliferáció

I./4. Citokin szekréció *in vitro* vizsgálata

A citokin termelés vizsgálatánál a korábban említett körülmények között a mononukleáris sejteket 37°C-on 20 µg/ml oxLDL jelenlétében 26 órán át inkubáltuk, majd a termelt citokinek (IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α) mennyiségét ELISA (BD Opt EIA kit™, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) teszttel határoztuk meg a gyártó utasításait követve.

Az antigénre adott citokin szekréciós válasz értékeléséhez a citokin szekréciós indexet (CSI) használtuk:

CSI = (antigén jelenléte mellett mért citokin szekréció/ antigén hozzáadása nélkül mért citokin szekréció)*100

II. A retrospektív klinikai vizsgálatban részt vevő betegek

Akut koronária szindrómásokat, stabil koronária betegeket és egészséges önkénteseket vontunk be a retrospektív módon végzett klinikai tanulmányba.

A DE OEC III. sz. Belgyógyászati Klinika Intenzív Osztályán kezelt harminnégy akut koronária szindrómás (ACS) beteg (húsz férfi és tizennégy nő) átlagéletkora $72,3 \pm 9,4$ év (47-87 év) volt. A felállított diagnózisok a következő megoszlást mutatták: tíz esetben instabil angina, öt esetben nem ST-elevációs miokardiális infarktus (NSTEMI) és tizenkilenc esetben ST-elevációval járó miokardiális infarktus (STEMI).

Az akut koronária szindrómás betegeket két csoportra bontottuk, abból a célból, hogy megvizsgáljuk, hogy az oxLDL elleni autoantitestek a beteg felvételekor észlelt szintje mutat-e összefüggést az akut koronária szindróma szövődmenyes vagy szövődmenymentes lefolyásával.

1. Magas kockázatú (high risk) csoport: ide azokat soroltuk, akiknél a hospitális szakban *kamrai ritmuszavar* jelentkezett, akiknek *rekurráló iszkémiás fájaldalmuk* volt, akiknél *sürgős koronária intervenció* vált szükségessé, akiknél *keringési elégtelenség* vagy *kardiális halálozás* lépett fel. A magas kockázatú csoportba sorolt 20 beteg átlagéletkora $73,05 \pm 0,8$ (54-84) év volt, nem szerinti megoszlása 7 férfi és 13 nő.

2. Alacsony kockázatú (low risk) csoport: ide azok kerültek, akiknél az *instabil angina* illetve a *miokardiális infarktus szövődmenymentesen* zajlott. Az alacsony kockázatú csoportba tartozó 14 beteg közül 7 férfi és 7 nő volt, átlagéletkoruk $71,3 \pm 11,4$ (47-87 év).

A magas és alacsony kockázatú csoport között nem volt szignifikáns különbség a Framingham-i rizikófaktorokban. A csoportok életkorban illesztettek voltak, azonban a nemek arányában eltérő összetételűek, a magas kockázatú csoportban a nők aránya magasabb volt, azonban valamennyien a postmenopausalis életkorban voltak.

A DE OEC III. sz. Belgyógyászati Klinika kardiovaszkuláris szakrendelése által gondozott hatvankét stabil koronária beteg átlag

életkora $66,8 \pm 11,2$ év (31-84 év) volt; nem szerinti megoszlása negyvenhárom férfi és tizenkilenc nő. A populációban huszonhét betegnek volt megelőzően miokardiális infarktusa, három beteg esetében coronarographiával volt igazolható a koszorúér szűkület és harminckét betegnél írtak le mellkasi panaszokkal párhuzamosan pozitív terheléses EKG-t.

A kontroll csoportot korban és nemben illesztett ötven egészséges önkéntes véradó alkotta.

III./1. A prospektív klinikai vizsgálatba bevont betegek

Az előző klinikai vizsgálat publikált eredményeire építve prospektív klinikai tanulmányt indítottunk, melyet akut koronária szindrómás betegek részvételével végeztünk, összehasonlítva őket egy egészséges kontroll csoporttal.

Összesen ötvennégy beteget vontunk be a tanulmányba, akik a DE OEC III. sz. Belgyógyászati Klinika Intenzív Osztályára kerültek felvételre akut koronária szindróma (ACS) miatt. A betegek nem szerinti megoszlása huszonnyolc férfi és huszonhat nő volt, átlagéletkoruk $69,8 \pm 11,1$ év (30–77 év). Tizennyolc esetben instabil angina, tizenegy betegnél nem ST-elevációs miokardiális infarktus (NSTEMI), huszonöt esetben ST-elevációs miokardiális infarktus (STEMI) volt a diagnózis. A betegek hospitalizációja során minden esemény, beavatkozás, terápia, laborlelet rögzítésre került a MedSolution elektronikus adatbázisban. A tanulmányból kizártuk azokat, akiknek kötőszöveti betegsége, friss fertőzése, malignus alapbetegsége, máj- vagy veseelégtelensége volt, illetve azokat is, akik immunuszuppresszív terápiában részesültek. A betegbeválasztásnál azokat az eseteket tekintettük statin terápiában részesülőnek, akik a kórházi felvétel előtt legalább hat hónapon keresztül rendszeresen statin készítményt szedtek. Nem vehettek részt a vizsgálatban azok sem, akik régen statint szedtek, azonban a betegfelvétel előtti hónapokban elhagyták azt.

Az akut koronária szindrómás betegeket itt is két csoportra osztottuk:

1. Magas kockázatú (high risk) csoport: ide azokat soroltuk, akiknél a hospitális szakban *kamrai ritmuszavar* jelentkezett, akiknek *rekurráló iszkémiás fájdalom* volt, akiknél *sürgős koronária*

intervenció vált szükségessé, akiknél *keringési elégtelenség* vagy *kardiális halálozás* lépett fel. A magas kockázatú csoportba 33 beteg került, 17 férfi és 16 nő, átlagéletkoruk $67,2 \pm 10,4$ év volt. Ebben a csoportban négy beteg (12%) szedett rendszeresen statin készítményt.

2. Alacsony kockázatú (low risk) csoport: az instabil angina illetve a miokardiális infarktus *szövődménymentesen* zajlott ezeknél a betegeknek. Az alacsony kockázatú csoportba sorolt 21 beteg (11 férfi és 10 nő) átlagéletkora $64,4 \pm 9,8$. Az érintettek közül összesen nyolc beteg (38%) részesült állandó statin kezelésben.

A két csoport nem különbözött egymástól szignifikánsan az ún. klasszikus Framingham-i rizikótényezőkben. A kontroll csoport negyvenegy, korban és nemben illesztett egészséges önkéntesből állt.

III./2. Az anti-oxLDL antitest szintek és a CRP detektálása

Mindkét klinikai tanulmányban a betegek és kontrollok perifériás vérmintáiból (4,0 ml natív vénás vér) IgG típusú anti-oxLDL antitest titer meghatározás történt a Regionális Immunológiai Laboratóriumban. (A vérvételek a betegek klinikai felvételre kerülésekor, a terápia megkezdése előtt történtek.) A mérésekhez ImmuLisa oxLDL antibody ELISA kiteket (IMMCO – Buffalo, New York, USA) alkalmaztunk a gyártó által meghatározott protokoll betartásával.

Az első klinikai tanulmányhoz szükséges CRP értékeket turbidimetriás módszerrel (Integra-400; Hoffmann-La Roche Ltd.; Basel, Switzerland) határoztuk meg.

IV. Statisztikai analízis

Statisztikai számításainkhoz a Statistica for Windows Version 7.0 szoftvert alkalmaztuk. Két mintasor összehasonlítása során, a szignifikancia szintjének számításakor, normál eloszlás esetén T-próbát, nem parametrikus eloszlású minta esetén Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Különbséget $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Korreláció analízist parametrikus eloszlás esetén Pearson-tesztel, nem parametrikus eloszlás esetén Spearman tesztel végeztünk.

EREDMÉNYEK

I./1. *In vitro* limfocita proliferáció

Az APS és kontroll csoport sejt proliferációjának összehasonlítása

5 µg/ml oxLDL alkalmazása mellett mind a kontroll, mind az APS csoportban a proliferációs értékek átlaga 1,0 alatt volt, vagyis a kiinduláshoz képest az összsejtszám mindkét esetben csökkent, de különbségük nem volt szignifikáns (PI_{APS} : $0,95 \pm 0,28$ és $PI_{kontroll}$: $0,79 \pm 0,10$; $p = ns$).

20 µg/ml oxLDL stimuláció mellett jelentősen emelkedett PI értékeket találtunk APS-ben a kontroll csoporttal összevetve (PI_{APS} : $1,76 \pm 1,8$ és $PI_{kontroll}$: $0,56 \pm 0,42$; $p = 0,032$).

Az artériás és vénás APS csoportban 20 µg/ml oxLDL jelenlétében összehasonlítottuk a proliferációs kapacitásokat és a vénás APS csoportban emelkedett proliferációt (PI-t) kaptunk ($APS_{vénás}$: $2,1 \pm 2,28$; $APS_{artériás}$: $0,98 \pm 0,28$; $p = 0,03$). Ugyanígy, a vénás APS és egészséges kontroll csoport proliferációs értékeit 20 µg/ml oxLDL stimulus mellett összevetettük és a betegeknél jelentősen emelkedett PI-t találtunk ($APS_{vénás}$: $2,1 \pm 2,28$; kontroll: $0,56 \pm 0,42$; $p = 0,002$).

I./2. *In vitro* citokin szekréció

Az APS és kontroll csoport citokin termelésének összehasonlítása

OxLDL stimulus hatására az IL-2 termelés közel kétszeres emelkedést ért el az APS csoportban a kontrollal összehasonlítva (CSI_{APS} median: 118,8, interkvartilis tartomány /25-75%/: 84,9-175,2 illetve $CSI_{kontroll}$ median: 63,3, interkvartilis tartomány /25-75%/: 44,9-80,5; $p = 0,018$), ezzel párhuzamosan szignifikáns IFN- γ szekréció emelkedés is történt (CSI_{APS} : $163,2 \pm 98,5$ és $CSI_{kontroll}$: $77,4 \pm 46,6$; $p = 0,025$).

A TNF- α , IL-4, és IL-10 citokinek esetében nem találtunk jelentős különbséget az APS és kontroll csoportok között.

A vénás APS csoportból származó mononukleáris sejtek IL-2 szekréciója fokozódott oxLDL hatására, de a kontroll értékekhez viszonyítva nem érte el a szignifikáns mértéket. Ezzel párhuzamosan

az artériás APS-ben is tapasztaltunk mérsékelt IL-2 és IFN γ emelkedést az egészséges csoporttal összevetve. A TNF- α , IL-4 és IL-10 szekréció azonban mindkét APS alcsoportban konzekvensen alacsony szinten maradt.

II./1. Az IgG típusú anti-oxLDL antitest titerek értékelése

Az első klinikai tanulmányban az oxidált LDL elleni antitestek szintje akut koronária szindrómásokban ($21,6 \pm 26,45$ EU/ml) és stabil koronária betegekben ($15,25 \pm 16,64$ EU/ml) egyaránt magasabbnak bizonyult az egészséges kontrollokhoz ($5,95 \pm 6,21$ EU/ml) viszonyítva ($p=0,0002$ és $p=0,0016$). A stabil koronária csoport antitest titeréhez ($15,25 \pm 16,64$ EU/ml) képest is jelentősen megemelkedett anti-oxLDL értékek észlelhetők akut koronária szindrómában ($21,6 \pm 26,45$ EU/ml; $p=0,0288$).

Az adatok áttekintése után, figyelembe véve az értékek jelentős szórását, úgy döntöttünk, hogy alcsoportos bontásban is elvégezzük az elemzést. Tekintettel erre, az akut koronária szindrómás betegeket két csoportra bontottuk az obszervációjuk alatt fellépő klinikai manifesztációk szerint. Az akut koronária szindrómás betegek esetében összevetve a klinikai adatokat az oxLDL elleni antitest szintekkel összefüggést találtunk az emelkedett antitest szintek és az akut koronária szindróma hospitális szakában fellépő magas rizikójú szövődmények megjelenése között. A fellépő kamrai ritmuszavar, rekuráló iszkémiás fájdalom, sürgős koronária intervenció, keringési elégtelenség illetve kardiális halálozás alapján a magas kockázatú csoportba sorolt betegeknél az anti-oxLDL antitest érték: $32,98 \pm 31,72$ EU/ml-nek adódott, ezzel szemben az alacsony kockázatú csoportban szignifikánsan alacsonyabb antitest szinteket tapasztaltunk: $10,87 \pm 9,26$ EU/ml, $p=0,0018$.

II./2. C-reaktív protein értékek

A C-reaktív protein (CRP) szintek akut koronária szindrómásokban ($43,5 \pm 66,06$ mg/l) szignifikánsan magasabbak voltak összehasonlítva a stabil koronária csoporttal ($15,25 \pm 9,13$ mg/l; $p=0,0027$) valamint az egészséges kontrollokkal ($2,8 \pm 0,36$ mg/l; $p=0,011$).

Érdekes módon azoknál a betegeknél tapasztaltunk számottevően emelkedett CRP értékeket a kórházi felvétel idején, akiknél az akut koronária esemény végül fatális kimenetelű lett a hospitális időszakban, míg azoknál, akik túléltek az infarktust, jelentősen alacsonyabbak voltak a kezdeti CRP szintek ($p=0,000075$). Ennek alapján joggal vetődik fel, hogy a kiindulási CRP értékek erős prediktív értékkel bírhatnak az akut koronária szindróma mortalitásában.

Az akut koronária szindrómás és a stabil koronária betegek oxLDL elleni antitest és CRP értékei között egyaránt pozitív lineáris korrelációt találtunk, mely erősnek adódott akut koronária szindrómában ($r = 0,73$), miközben a stabil csoportban csak közepesen erős volt ($R=0,43$; $p<0,0001$).

III. Az IgG típusú anti-oxLDL antitest szintek vizsgálata

A második klinikai tanulmányban az akut koronária szindrómás betegek IgG típusú anti-oxLDL antitest titere szignifikánsan magasabbnak bizonyult az egészséges kontrollokkal összevetve ($22,80\pm 23,30$ EU/ml illetve $7,50\pm 5,27$ EU/ml, $p<0,0001$).

A csoportbontást követően megvizsgálva, a magas rizikójú (súlyos, fent részletezett szövődményektől szenvedő) akut koronária szindrómás betegek IgG anti-oxLDL antitest titere (median: 21,5 EU/ml, interkvartilis_{25-75%}: 15,0 – 29,5 EU/ml) lényegesen emelkedett volt az alacsony rizikójú (szövődménymentes) csoporthoz képest (median: 11,4 EU/ml, kvartilis_{25-75%}: 6,3–14,0 EU/ml), $p<0,001$.

A kórházi felvétel előtt statint szedő tizenkét betegből csak négy betegnél észleltünk súlyos szövődményeket a hospitalizációs periódus alatt. Összehasonlítottuk a statint szedő és nem szedő csoportban az anti-oxLDL antitestek szintjét, az összkoleszterin és LDL értékeket. A statinnal kezelt és nem kezelt csoportban az összkoleszterin ($4,9\pm 1,2$ vs. $5,3\pm 1,3$) és az LDL szintek ($2,2\pm 0,8$ vs. $3,2\pm 1,1$) nem különböztek szignifikánsan. Ezzel szemben az IgG anti-oxLDL titerek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a korábban statinkezelésben részesült betegeknél ($11,3\pm 3,9$ EU/ml) összevetve a statinkezelésben nem részesült betegekkel ($25,9\pm 25,2$ EU/ml; $p<0,03$).

MEGBESZÉLÉS

Az atherosclerosis az artériás fal krónikus gyulladással járó betegsége, melyben az immuno-inflammatorikus folyamatok kiemelkedő patológiai szereppel bírnak. Ezen immunmechanizmusok kulcsfontosságú, plak-asszociált target antigénje az oxidált LDL, melynek jelenlétét az atherosclerosis mellett leírták más autoimmun állapotokban is (elsősorban ilyen az antifoszfolipid szindróma és a szisztémás lupus erythematosus). Az ellene irányuló autoantitestek (anti-oxLDL) nemcsak elősegítik az oxidált LDL akkumulációját a makrofágokban („habos-sejt képzők”), hanem olyan komplement-asszociált és egyéb sejtes útvonalakat is aktiválnak, melyek az ér falban zajló gyulladást tovább fokozzák és ezzel az atherosclerosis folyamata rapidan progrediál.

Munkánk egyik részeként *in vitro* kísérlet keretében tanulmányoztuk az oxidált LDL által indukált limfocita proliferációs és citokin szekréciós választ antifoszfolipid szindrómás betegekben. Az irodalomból ismert, hogy antifoszfolipid szindrómában az oxLDL a β 2GPI-vel komplexet képezve serkenti az atherogenezist, az ellene irányuló autoantitestes mechanizmusok habos sejtek képződéséhez vezetnek. Klinikai szempontból számos bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az antifoszfolipid szindrómás betegekben akcelerált atherosclerosis zajlik. Ez alapján joggal merült fel, hogy megvizsgáljuk az oxidált LDL hatását antifoszfolipid szindrómás betegek limfocitáin és a kapott eredményeket összevessük a betegek klinikai manifesztációival. Az irodalomból ismert tény, hogy egészséges emberekben a keringő oxLDL szintje alacsony (1-5 μ g/ml), mely indokolja a kísérletben az 5 μ g/ml alkalmazását, azonban ez atherosclerotikus lézióban 4-5x-ösére, de akár 70-szeresére is növekedhet, ezért alkalmaztunk mi is egy magasabb (20 μ g/ml) oxLDL koncentrációt is. A kapott eredmények azt mutatják, hogy 20 μ g/ml oxidált LDL hatására az antifoszfolipid szindrómás csoportban jelentős proliferáció-fokozódás igazolható a kontrollokhoz képest. Érdekes módon az alacsony (5 μ g/ml-es) koncentrációjú oxLDL stimulussal nem sikerült számottevő proliferációt kiváltani, sőt éppen ellenkezőleg, az APS és a kontroll

csoporthoz egyaránt csökkent a sejtosztódás értékeinek átlaga ($PI < 1,0$). Egy korábbi kísérletben Xavier és munkatársai hasonló eredményre jutottak, akik human koronária erekből származó endotél sejt kultúrákon vizsgálták az 1–8 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL hatását. Ebben a koncentráció tartományban az oxLDL gátolta az endotél sejtek osztódását a koncentráció növelésével arányosan citotoxikus hatást kifejtve. Az oxLDL citotoxikus tulajdonságát nemcsak endotél, hanem simaizomsejt és limfoblast kultúrákon is megerősítették. Antifoszfolipid szindrómában a 20 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL jelenlétében bekövetkezett, egészséges csoportban nem észlelt sejtosztódás felveti, hogy az oxidált LDL patogén limfocita aktivációt indukál APS-ben, melynek további szerepe lehet a betegség progressziója során gyakran megfigyelhető akcelerált atherosclerosis patogenezisében.

A betegeket az anamnézisben rögzített artériás vagy vénás dominanciájú tromboemboliás események szerint két csoportra osztottuk (artériás és vénás APS), melyek nemcsak a klinikai események érrendszeri lokalizációjában, hanem a feltételezett patogenezisben is eltérnek. A vénás APS háttérében elsősorban B-sejt mediált folyamatok vannak jelen, domináló Th2 immunválasszal és a keringésben is megnyilvánuló magas antifoszfolipid antitest szintekkel. (A vizsgálat időpontjában a vénás APS-s betegeknek nem volt akut tromboemboliás eseménye, de mindegyiküknél magas volt az antifoszfolipid autoantitestek szintje.) Ezzel ellentétben az artériás APS-ben a klinikai képet kevert etiológia jellemzi, melyben az APS jellegzetességei és az atherosclerotikus folyamatok együtt jelennek meg. Ezekben a betegeknél a zajló akcelerált atherosclerosis mellett megtalálhatóak az antifoszfolipid antitestek, melyek a (bevezetésben részletezett) számos útvonalon erősítik a plakkban zajló gyulladáshoz vezető folyamatokat. Az APS-ben észlelt akcelerált atherosclerosisban az anti- $\beta 2\text{GPI}$ autoantitestek és a hiper/diszlipidémia együttesen támogatják az oxLDL migrációját a plakkokba, ahol habos sejteket képezve akkumulálódnak a makrofágokban. Összességében elmondható, hogy az autoantitestek hozzájárulnak az atherotrombotikus események előfordulásának növekedéséhez. Az antifoszfolipid szindrómában 20 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL

stimulációval jelentős IL-2 valamint IFN- γ szekréció emelkedést értünk a kontrollokhoz képest, melynek magyarázata vénás és artériás APS-ben különböző. Úgy gondoljuk, hogy vénás APS-ben az oxLDL módosíthatja a klinikai képet az erek gyulladásában szerepet játszó immunfolyamatok felerősítésével. Ezzel szemben artériás APS-ben felvethető, hogy elsősorban a Th1-mediált immunválasz dominál és az oxLDL elősegíti az artériás tromboemboliás események bekövetkezését azáltal, hogy triggereli a plakk-asszociált inflammatorikus folyamatokat. Összefoglalva azt találtuk, hogy az oxidált LDL limfocita proliferációt és döntően a Th1 citokinek termelését serkenti antifoszfolipid szindrómában, mely az APS-ben patogén funkcióval bír és hozzájárul a betegség során zajló atherosclerosis akcelerálásához.

Munkánk másik részében az oxidált LDL elleni autoantitestek szérumszintjeivel foglalkoztunk akut koronária szindrómás és stabil koronária betegekben. A stabil és instabil koronária betegség patológiai alapja a koronária erekben jelenlévő atheromatous plakk. Az atherosclerosisban már az egészen korai fázisban (korai zsíros csík) megjelennek a makrofágok és a T-limfociták. A legtöbb monocitából illetve makrofágból habos sejt lesz. A makrofágok az atheroscleroticus érfalban proinflammatorikus citokinek, kemokinek, extracelluláris mátrix bontóenzimeket, reaktív oxigénradikálokat, prosztanoidokat, komplement faktorokat termelnek, a jelenlévő T-sejt szubpopulációk közül a CD8 pozitív T-sejtek aránya fokozott. A plakkban B-sejtek és természetes ölüsejtek is kimutathatóak illetve aktivált HLA-DR pozitív simaizomsejtek halmozódnak fel. Az említett sejtpopulációk között élénk interakció folyik. Ebben a folyamatban kiemelt jelentőségű a T-helper1/T-helper2 egyensúly Th1 irányú eltolódása (interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1) makrofágra gyakorolt aktiváló hatása) valamint a T-helper2 citokinek B-sejt aktivációs hatása.

Instabil koronária betegség (instabil angina, akut miokardiális infarktus) háttérében jól ismert az atheroscleroticus plakk sérülése, mely atherotrombotikus szövődmény kialakulásához vezet. A komplex atheroma a lument szűkíti, a makrofág aktivációs termékek mennyisége jelentősen megnő, valamint párhuzamosan jelentős

simairom proliferáció alakul ki. Az atheroma progressziójának szempontjából és ennek megfelelően a klinikai tünetek megjelenésében illetve felerősödésében döntő a plakk sérülése, mely lehet felszínes erózió (mely már klinikailag végzetes koronária trombozisz oka lehet), plakkon belüli mikrovérzések és in situ plakk trombozisz, valamint a plakk fibrózus sapkájának berepedése, mely az akut miokardiális infarktuszok közel háromnegyedének a közvetlen oka.

A plakokban jelenleg három jól definiált antigén azonosítható: a hőszokk protein, a β 2GPI és az oxidált LDL. Ezen autoantigének hozzájárulnak a T helper sejtek aktiválódásához. A T helper 1 irányú aktiváció jól ismert az atherosclerosis folyamatában, a domináns citokinek az IFN- γ és a TNF- α . Nem elhanyagolható azonban a T helper 2 útvonal sem, melyet az utóbbi időben differenciáltabban szemlélünk a benne részt vevő citokinek alapján. Az IL-4 és IL-6 erős B sejt aktivátorok, és felerősítik a korábban említett antigének ellen beindult autoantitestek mechanizmusát. Mivel ezek az autoantitestek a keringésben is megjelennek, azt a kérdést tettük fel, hogy alkalmasak-e az atherosclerosisos plakk folyamatainak monitorozására.

Az LDL oxidatív módosításával keletkező oxidált LDL egy olyan plakk specifikus komponens, mely erős immunogén tulajdonságú és humorális immunválasz megindulását, antitest termelését váltja ki. A humán anti-oxLDL antitestek különböző osztályait, alosztályait azonosították: IgA, IgG1, IgG2, IgG3, és IgM, azonban az atherosclerosisban játszott szerepüket tekintve az irodalomban megoszlanak a vélemények. Számos olyan tanulmány született, melyek az antitestek protektív szerepét támasztják alá, állatmodelles kísérletekben az atherosclerosis mértékének redukciója korrelált az IgG típusú anti-oxLDL antitest szintekkel, továbbá azt találták, hogy az antitestek központi szereppel bírnak az oxLDL szintek szabályozásában. Az oxLDL elleni antitestek megjelennek gyerekekben, egészséges felnőttekben és koronária szindrómás betegekben is, egy vizsgálatban gyermekekben szignifikánsan magasabb anti-oxLDL szinteket találtak, mint felnőttekben, ami azt sugallta, hogy az antitestek az antigén neutralizálásával védelmet nyújtanak az atherosclerosis és a kardiovaszkuláris betegségekkel

szemben. Az irodalomban elsősorban az utóbbi időben az antitestek patogén szerepéről szóló tanulmányok kerültek előtérbe, melyek az emelkedett IgG anti-oxLDL antitest koncentrációkat összefüggésbe hozzák a kardiovaszkuláris betegségek és a perifériás obliteratív érbetegségek kifejlődésével.

Jelenleg a plakk gyulladáshoz vezető folyamatait monitorozó, esetleg a plakk-ruptura bekövetkezését előrejelző, megfelelően specifikus biomarker nem áll rendelkezésünkre, annak ellenére, hogy az igen érzékeny CRP a miokardiális infarktus erős, független rizikófaktora. A CRP nem plakk-specifikus, de igen szenzitív akut fázis fehérje, melynek szintje nemcsak a plakkban zajló gyulladás esetén, de számos fertőző betegségben, autoimmun állapotban, daganatos betegségben is megemelkedhet. Ezért joggal merül fel az igény olyan plakk-specifikus, szenzitív biomarker iránt, mely jól korrelálna a plakkban zajló gyulladáshoz vezető folyamatokkal.

Jelenlegi értekezésünkben azt a kérdést vetettük fel, hogy az atherosclerosisban kiemelt jelentőségű oxidált LDL ellen képződött ellenanyagok alkalmasak-e az instabilitást jelző klinikai események monitorozására. A vizsgált oxidált LDL elleni antitest szintek szoros összefüggést mutattak akut koronária szindrómában a hospitalizációs időszakban bekövetkező életet fenyegető komplikációkkal, magas szint esetén gyakrabban fordult elő kamrai ritmuszavar, rekuráló iszkémiás fájdalom, sürgős koronária intervenció szükségé, keringési elégtelenség vagy hirtelen bekövetkező halálozás. Ezeket az eredményeket sikerült egy prospektív, nagyobb betegszámra épülő klinikai vizsgálatban is megerősíteni.

A statin kezelésben részesült akut koronária szindrómás betegekben szignifikánsan alacsonyabb oxLDL elleni antitest szintek voltak kimutathatók a statin kezelésben nem részesült betegekhez képest. Érdekes módon, az így kapott eredmény nem függött a statinok lipidcsökkentő funkciójától, inkább a statinok pleiotrop (anti-inflammatorikus) hatásával magyarázható és ilyen módon indirekt bizonyítékul szolgálhat az anti-oxLDL antitest és a plakk inflammatorikus folyamatainak szoros kapcsolatára. Az irodalomban a korábban említett tanulmányok támogatják vizsgálati eredményeinket, az IgG-típusú anti-oxLDL patogén szerepét.

Léteznek olyan tanulmányok is, mint például a Santos és mtsai által végzett, melyek cáfolják az IgG-típusú anti-oxLDL emelkedését akut koronária szindrómában és elsősorban az antitestek protektív szerepét erősítik. Véleményünk szerint ezek az ellentmondások részben abból adódhatnak, hogy az oxidált LDL-en számtalan immunogén epitóp létezik, melyek ellen termelődhetnek antitestek. A kísérleteknél az LDL oxidáció eltérő módszere illetve a mérésekhez felhasznált oxLDL epitópok az egyes gyártók szerint változhatnak, ezért nehéz a méréseket standardizálni, illetve a különböző termékekkel végzett méréseket összehasonlítani.

Összefoglalásul eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az akut koronária betegek esetében az anti-oxLDL antitest szinteknek prediktív értéke van a betegség szövődményes kimenetelében (azaz újabb infarktus kialakulásában, instabil angina létrejöttében, kardiális halálozás bekövetkeztében).

Ezen adatok és eredmények birtokában felvetődik, hogy az oxLDL elleni IgG antitest egy lehetséges, új biomarker az atherosclerosis klinikai progressziójában, ennek igazolására azonban további, nagyobb populáción végzett vizsgálatok szükségesek.

ÚJ EREDMÉNYEK

Vizsgálataink során az oxidált LDL által indukált immunmechanizmusokat tanulmányoztuk antifoszfolipid szindrómás betegekből szeparált mononukleáris sejteken, továbbá az ellene irányuló antitestek klinikai összefüggéseit elemeztük akut koronária szindrómás és stabil koronária betegekből.

1. Igazoltuk, hogy az oxidált LDL magas koncentrációja *in vitro* serkenti a mononukleáris sejtek proliferációját, IL-2 valamint IFN- γ szekrécióját antifoszfolipid szindrómában.

2. Bebizonyosodott, hogy ez a jelenség az APS-s betegekre jellemző, egészséges egyénekből szeparált limfocitáknál nem figyelhető meg.

3. Az APS betegeket a tromboemboliás események érrendszeri lokalizációja szerint artériás illetve vénás csoportra osztva, mindkét alcsoportban az oxLDL stimulus Th1-citokin szekréciót és limfocita proliferációt indukált.

4. A vénás APS etiológiáját tekintve felvethető, hogy a Th1-immunfolyamatok a kóros immunválasz perzisztálását támogatják és súlyosbítják a klinikai képet.

5. Az artériás APS-ben ugyanakkor az oxLDL által triggerelt Th1-immunválasz (a dyslipidaemia és anti-B2GPI antitestek mellett) jelentős szerepet kaphat az artériás trombózisokkal párhuzamosan kialakuló akcelerált atherosclerosis etiopatogenezisében.

6. Akut koronária szindrómás és stabil koronária betegekből mért IgG-típusú anti-oxLDL antitest-szinteket elemezve kimutattuk, hogy mindkét kórképben megemelkedik az ellenanyag-szint az egészségesekhez viszonyítva, mely akut koronária szindrómában sokkal nagyobb mértéket ölt.

7. Igazolódott, hogy a kezdeti emelkedett anti-oxLDL antitest-titerek akut koronária szindrómában összefüggnek a hospitalizációs periódus alatt fellépő instabilitást jelző klinikai eseményekkel (rekurráló ischaemiás mellkasi fájdalom, sürgős koronária intervenció, malignus ritmuszavar, keringési elégtelenség, halálozás).

8. Az IgG-típusú anti-oxLDL és CRP szintek jó korrelációja ACS-ben szintén alátámasztja az antitestek fontos szerepét az atherosclerotikus plakk instabillá válásában.

9. Összességében megállapítottuk, hogy az oxidált LDL stimulálja a limfocita proliferációt és a Th1-típusú citokinek termelését antifoszfolipid szindrómában, mely akcelerált atherosclerosishoz vezethet, továbbá, hogy a keringő IgG anti-oxLDL antitestek részt vesznek az instabil-plakk asszociált immunfolyamatokban és kezdeti emelkedésük jó prediktív értékkel bírhat az akut koronária szindróma szövődményes lefolyására.

Iktatószám: DEENKÉTK /199/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Laczik Renáta
Neptun kód: T7MOOD
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Soltész, P., Veres, K., Laczik, R., Dér, H., Csípő, I., Tímár, O., Szomják, E., Szegedi, G., Szodoray, P.: Evaluation of antibodies to oxidized low-density lipoprotein and assessment of C-reactive protein in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease.
Thromb. Haemost. 98 (2), 413-419, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH06-10-0561>
IF:3.501
2. Soltész P., Veres K., Laczik R., Csípő I., Lakos G., Szodoray P., Szegedi G.: Autoantitestek mechanizmusok akut koronária szindrómában.
Cardiol. Hung. 38, 132-137, 2008.
3. Soltész P., Veres K., Csípő I., Tumppek J., Laczik R., Hevér T., Szodoray P., Szegedi G.: Autoantitestek mechanizmusok szerepe az atheroszklerózis folyamatában.
Metabolizmus 6 (2), 57-59, 2008.
4. Laczik, R., Szodoray, P., Veres, K., Lakos, G., Sipka, S., Szegedi, G., Soltész, P.: Oxidized LDL induces in vitro lymphocyte activation in antiphospholipid syndrome.
Autoimmunity. 43 (4), 334-339, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03966.x>
IF:2.138
5. Laczik, R., Szodoray, P., Veres, K., Szomják, E., Csípő, I., Sipka, S., Shoenfeld, Y., Szekaneecz, Z., Soltész, P.: Assessment of IgG antibodies to oxidized LDL in patients with acute coronary syndrome.
Lupus. 20 (7), 730-735, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0961203311398884>
IF:2.6 (2010)

További Közlemények

6. Soltész, P., Dér, H., Veres, K., Laczik, R., Sipka, S., Szegedi, G., Szodoray, P.:
Immunological features of primary anti-phospholipid syndrome in connection with
endothelial dysfunction.
Rheumatology (Oxford). 47 (11), 1628-1634, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ken349>
IF:4.136
7. Veres, K., Szodoray, P., Szekanecz, Z., Lakos, G., Kiss, E., Laczik, R., Sipka, S., Bodolay,
E., Zeher, M., Muszbek, L., Szegedi, G., Soltész, P.: Clinical and immunoserological
characteristics of the transition from primary to overlap antiphospholipid syndrome.
Lupus. 19 (13), 1520-1526, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0961203310374336>
IF:2.6
8. Kovács, D., Szabó, L., Fedor, R., Laczik, R., Soltész, P., Lőcsey, L., Asztalos, L.:
Prospective Study of Changes in Arterial Stiffness among Kidney-Transplanted
Patients.
Transplant. Proc. 43 (4), 1252-1253, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.03.074>
IF:0.993 (2010)

Összesített impakt faktor: 15,968

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 8,239

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött
adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal
Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.09.22

