

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az oxidált LDL elleni autoantitestes folyamatok
szerepe az atherotrombotikus kórképek immuno-
inflammatorikus folyamataiban**

Dr. Laczik Renáta Erika

Témavezető: Dr. Soltész Pál



Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2011.

TARTALOMJEGYZÉK

<i>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</i>	4
<i>BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS</i>	6
Az atherosclerosis patogenezise	
1. Az endotél diszfunkció	
2. Az atherosclerotikus plakk kialakulása és típusai	
3. A plakk instabilitásához vezető immuno-inflammatorikus folyamatok	
4. Hősokk fehérjék	
5. β 2-glikoprotein I	
6. Oxidált LDL	
6./a. Az LDL oxidáció folyamata. Az oxidált LDL proatherogén sajátosságai	
6./b. Az anti-oxLDL antitestek hatása a habos sejt aktivációjára	
6./c. Az anti-oxLDL antitestek klinikai szerepe. Patogén vagy protektív antitestek?	
6./d. Az oxLDL/B2GPI ellen irányuló immunválasz atherogén hatása antifoszfolipid szindrómában	
7. A C-reaktív protein	
8. A statinok pleiotrop hatása, szerepük a plakk stabilizálásában	
<i>CÉLKITŰZÉS</i>	21
<i>BETEGEK ÉS MÓDSZEREK</i>	23
I./1. Az experimentális vizsgálatban résztvevő betegek jellemzése	
I./2. Perifériás mononukleáris sejtek szeparálása	
I./3. Sejtproliferáció <i>in vitro</i> vizsgálata	
I./4. Citokin szekréció <i>in vitro</i> vizsgálata	
II. A retrospektív klinikai vizsgálatba bevont betegek	
III./1. A prospektív klinikai vizsgálatba bevont betegek	
III./2. Az anti-oxLDL antitest szintek és a CRP detektálása	
IV. Statisztikai analízis	
<i>EREDMÉNYEK</i>	35

- I./1. *In vitro* limfocita proliferáció
- I./2. *In vitro* citokin szekréció
- II./1. Az IgG típusú anti-oxLDL antitest titerek értékelése
- II./2. C-reaktív protein értékek
- III. Az IgG típusú anti-oxLDL antitest szintek vizsgálata

<i>MEGBESZÉLÉS</i>	46
<i>ÖSSZEFOGLALÁS</i>	51
<i>ANGOL ÖSSZEFOGLALÓ (SUMMARY)</i>	53
<i>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</i>	55
<i>IRODALOMJEGYZÉK</i>	56
<i>SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</i>	56

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACS:	akut coronaria szindróma
ASA:	acetil-szalicilsav
ACE:	angiotenzin konvertáz enzim
aCL:	anti-cardiolipin
ADP:	adenozin-difoszfát
apoB100:	apolipoprotein B 100
APLA:	antifoszfolipid antitest
APS:	antifoszfolipid szindróma
APTI:	aktivált parciális tromboplasztin idő
BMI:	Body-mass index – testtömeg index
BrdU:	bróm-dezoxiuridin
β2GPI:	β2-glikoprotein I
CD:	cluster of differentiation
CRP:	C-reaktív protein
CXCL:	CXC (Cys-X-Cys) kemokin ligand
DNS:	dezoxiribonukleinsav
DRVVT:	hígított „Russel Viper Venom” idő
EF:	ejekciós frakció
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay – enzim-immunoassay
FcγR:	Fc-gamma receptor
FDG-PET:	fluorodexoxiglükóz-pozitron emissziós tomográfia
HELLP:	Hemolitikus anémia+Emelkedett májenzimek+Alacsony vérlemezkeszám
HLA-DR:	humán leukocita antigén-DR
H₂S:	hidrogén-szulfid
HSP:	hősokk protein
ICAM:	intercellularis adhéziós molekula
IgG, A, M:	immunglobulin G, A, M
IL-1, 6, 8:	interleukin-1, 6, 8
IMT:	intima-média falvastagság
IFNγ:	interferon-gamma
KCT:	kaolin alvadási idő

kDa:	kilodalton
LA:	lupus antikoaguláns
LDL:	low-density lipoprotein
lizo-PC:	lizofoszfátidil-kolin
LMWH:	alacsony molekulásúlyú heparin
LOX-1:	lektin-like oxLDL-1 - lektin-szerű oxLDL-1 (receptor)
M-CSF:	monocita/makrofág kolónia stimuláló faktor
MCP-1:	monocita kemoattraktáns protein 1
NFκB:	nukleáris faktor kappa-B
NK:	natural killer sejt - természetes ölósejt
NO:	nitrogén-monoxid
NS:	nem szignifikáns
oxPL:	oxidált foszfolipidek
p:	p érték-szignifikancia szintje
PBMC:	peripheral blood mononuclear cell - perifériás mononukleáris sejt
PBS:	Phosphate Buffered Saline (glükóz tartalmú foszfát puffer)
PC:	foszfátidil-kolin
PAF-AH:	platelet activating factor (trombocita aktiváló faktor)-acetilhidroláz
PTCA:	perkután transzluminális koronária angioplasztika
R:	regressziós koefficiens
RA:	rheumatoid arthritis
SLE:	szisztémás lupus erythematosus
SREBP:	sterol regulatory element binding protein - szterol szabályozó elemként kötődő fehérje
Tc:	citotoxikus T-sejt
Th:	T helper
TIA:	Tranzitórikus iszkémiás attack
TLR:	Toll-like receptor
TNF:	tumor nekrozis faktor
tPA:	szöveti plazminogén aktivátor
VCAM:	vaszkuláris sejt adhézións molekula
vWF:	von Willebrand faktor

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 gyulladással járó 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 gyulladással járó folyamatok, melyben a kulcsfontosságú autoantigének, immunsejtek, mediátorok megismerése és működésük feltérképezése új terápiás célpontokat szolgáltat a gyógyászat számára.

Az atherosclerosis patogenezeise

1. Az endotél diszfunkció

Az atherosclerosis makroszkópos manifesztációját megelőző állapot a még reverzibilisnek tekinthető ún. endotél diszfunkció, melynek kialakulásáért a különböző endogén valamint exogén noxák által kiváltott oxidatív stressz felelős. A létrehozott endotél-sérülés olyan biokémiai folyamatokat indít el, mely proliferációt és kontrakciót serkentő prokoaguláns természetű (vazoaktív) faktorok felszabadulásához vezet és ezzel egyidőben az ellenregulációs mechanizmusok is gátlás alá kerülnek, vagyis az egyensúly eltolódik a simaizom-proliferáció, vazokonstriktív és koaguláció irányába. Napjainkban a tünetmentes vaszkuláris károsodás jelentősége felértékelődött, ennek kimutatására számos noninvaszív módszer áll rendelkezésünkre, ilyen például a lézer Doppler áramlásmérés, a flow-mediált vazodilatáció, az artériás stiffness (augmentációs index, pulzushullám terjedési sebesség) mérése [1].

2. Az atherosclerotikus plakk kialakulása és típusai

Az atherosclerotikus plakk kialakulásában az első morfológiailag is észlelhető elváltozás egy „zsíros csík” beszűrődés kialakulása az érfalban, melynek hátterében leírták az intimába irányuló aktivált makrofág, T és B sejt bevándorlást [2].

A plakkon belül egy krónikus, intermittáló, időnként akutan fellángoló „low grade” gyulladás zajlik, mely a plakk lassú növekedését eredményezi. A plakk kialakulását követő progresszió során passzív (stabil) és aktív (instabil) fázisokat különíthetünk el, mely az eltérő kórszövettani és intravaszkuláris ultrahangos leletek kapcsán klinikailag is nyomon követhető. A stabil plakk lassan növekvő, sclerotikus, számtalan simaizom sejtet és kevés immunsejtet tartalmaz, az ér lumene felől vastag fibrózus köpeny határolja, ebből következik, hogy ruptura-készsége csekély. Ezzel szemben az instabil vagy vulnérabilis plakk jellegzetessége, hogy gyorsan növekszik és nagy, nekrotikus lipidmagja van, mely körül csekély simaizomsejt és sok makrofág található illetve vékony fibrózus sapka fedí, mely rupturára hajlamos [3; 4].

A ruptura az intravaszkuláris koagulációt beindító kulcsesemény, melynek aktív és passzív módja is ismert. A passzív berepedés a circumferenciális erők hatására a fibrotikus sapka legsérülékenyebb, széli részén alakul ki, míg az aktív ruptura a fibrózus sapka enzimikus destrukciója miatt következik be. Ez utóbbit a krónikus gyulladásos folyamatok fellángolása - elsősorban a reaktív oxigén gyökök, szöveti faktor, komplement faktorok, az extracelluláris mátrix komponenseire ható /proteo/lítikus enzimek lokális felszabadulása - váltja ki. A ruptura során képződő trombus a plakk lipidmagjába mélyen beterjed. A plakk-ruptura mellett ritkábban plakk-erózió is kialakulhat a plakk tetején, melyet nőkben gyakoribbnak találtak és emellett jóval gyakrabban eredményez hirtelen szívhalált (ezekben az esetekben a trombus felszínesen helyezkedik el) [5].

Az érintett artéria elzáródásához vezető atherotrombózis lokalizációtól függően súlyos klinikai kórképek formájában manifesztálódhat, ilyen pl., az akut koronária szindróma, a stroke vagy az alsó végtagi gangréna.

3. 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 [6].

Immunológiai szempontból a vulnérabilis plakk kialakulásához vezető gyulladás kulcsfontosságú szereplői a makrofágok, melyek proinflammatorikus citokineket, kemokineket, szöveti faktort, extracelluláris mátrix metalloproteinázokat, reaktív oxigéngyököket, prosztanoidokat és komplement faktorokat termelnek [7]. Kimutatták, hogy

a fokozott makrofág-infiltráció jól korrelál a plakk progressziójának mértékével, ruptura hajlamával [8].

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 [9] 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 sejt-kollaboráció döntően a CD40-CD40L közötti kölcsönhatás, mely szintén makrofág aktivációhoz vezet [10; 11]. 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 [12; 13]. 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 kórképben [14].

Atherosclerosisban autoantitestek 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 sejt-gyulladásos vonulatokban, másfelől autoantitestek által mediált folyamatokat indítanak el, melyek önálló patogén szereppel bírnak [15].

4. Hősokk fehérjék

A hősokk fehérjék rendkívül konzervált, minden élő szervezetben és sejtben megtalálható enzimek [16]. Fiziológiai körülmények között nagy jelentőséggel bírnak a fehérjék megfelelő konformációjának elnyerésében, megtartásában, továbbá elősegítik a nagy fehérje aggregátumok lebontását [17]. A hősokk fehérjéket hagyományos módon molekulatömegük szerint osztályozzák, legjobban ismert tagjaik a 60, 70, 90 és a 110 kDa molekulatömegű családokba tartoznak illetve ismertek még az ún. „small” vagy kis HSP-k” is. Az atherosclerosis vonatkozásában legtöbb figyelmet a Hsp60 molekula kapta (baktériumokban előforduló tagjait Hsp65-tel, humán megfelelőjét Hsp60-nal jelölik), mely nemcsak intracellulárisan van jelen, hanem a sejt felszínén is expresszálódik [18]. A Hsp60

szolubilis formája a keringésben is megtalálható és mennyisége jól korrelál az atherosclerosis súlyosságával nagyobb populációban is [19]. Az atheroscleroticus érbetegségben szenvedők jelentős részében patogenetikai szereppel bírnak a hősokk proteinek ellen termelődő autoantitestek is [20]. A Hsp 60 elleni autoimmun reakcióknak két forrása is lehet atherosclerosisban: egyrészt az élet során átélt infekciók (pl., Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis) hatására keletkezhetnek a saját Hsp60-nal keresztreakáló antitestek, melyek az erek falát károsító stresszhatásokra fokozottan expresszálódó hősokk fehérjékkel reagálnak és gyulladást valamint endotélsejt károsodást indukálnak. Másrészt az anti-Hsp 60-autoantitestek az immunrendszer érése során megőrződhetnek, mint reguláló, természetes autoantitestek, melyek a perifériás toleranciában játszanak fontos szerepet. Ezen antitestek mennyiségében és működésében bekövetkező változások szintén hozzájárulhatnak az erek falában fellépő gyulladás kiváltásához és elmélyüléséhez [21].

5. β 2-glikoprotein I

A másik jelentős autoantigén az atherosclerosis kialakulásában a β 2-glikoprotein I (apolipoprotein H), mely egy 50 kDa molekulatömegű protein kofaktor. Fiziológias körülmények között antikoaguláns hatású regulátor fehérje, gátolja a véralvadás során bekövetkező foszfolipid-függő reakciókat, vagyis a protrombináz, tenáz, XI és XII faktor aktiválódását, továbbá képes modulálni a trombociták ADP-indukált aggregációját is [22]. A β 2-glikoprotein I fehérje pozitív töltésű oldalláncának köszönhetően kölcsönhatásba lép a negatívan töltött foszfolipidekkel, majd egy hidrofób hurkot beillesztve lehorgonyozza magát a sejtfelszínhez, foszfolipid struktúrákhoz [23]. McNeil és mtsai azt találták, hogy a foszfolipidhez kapcsolt β 2-glikoprotein I autoantigént képez és antifoszfolipid autoantitestek termelését váltja ki [24]. Az antifoszfolipid autoantitestek (közülük is legjelentősebbként az anti-cardiolipin és anti- β 2GPI antitestek) patológiás részvételét már leírták az atherosclerosisban, akut koronária szindrómában és stroke-ban [25]. Újabb adatok szerint az autoantitestek által létrehozott endotél aktiváció a Toll-like receptorokon keresztül valósul meg, hasonlóan a lipopoliszacharidok által indukált aktivációhoz. A TLR természetes ligandját jelentő mikrobiális patogének és a β 2GPI között fennálló molekuláris mimikri alapján jöhet létre interakció a TLR és a β 2GPI között, és az anti- β 2GPI antitestek ezáltal triggerelik a gyulladást. Az antifoszfolipid antitestek hatására az endotél sejtek prokoaguláns és proinflammatorikus fenotípusúvá válnak és adhéziós molekulákat expresszálnak (ICAM, VCAM, E-szelektin), változik a prosztaglandin metabolizmus,

proinflammatorikus citokineket és kemokineket termelnek (IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1). Az antifoszfolipid antitestek hatására megváltozik a szöveti faktor expressziója is, illetve befolyásolják az eikozanoidok metabolizmusát, a protein C/S aktivációt, az annexin V kötődést, a pre-pro-endothelin 1 szintézist, csakúgy, mint az apoptózist. Ezen tényezők hatására hiperkoagulációs és proinflammatorikus állapot jön létre, valamint az atheroscleroticus plakokban kimutatható β 2GPI, mint autoantigén vesz részt a plakokban lejátszódó immuno-inflammatorikus folyamatokban, melyeken keresztül patológiás szerepet tölt be az atherosclerosis kialakulásában [26; 27; 28].

6. Oxidált LDL

A harmadik, az atheroscleroticus plakk kialakulásában döntő szerepet játszó immunogén molekula az oxidált LDL, mely az LDL partikulumok oxidatív módon módosított formája. Az atherosclerosis kialakulását megelőző lépésként a keringő LDL molekula az endotheliumon át az artériás fal subendoteliális terébe jut. Az irodalomból jól ismert, hogy az endothel permeabilitás és az intima felé irányuló LDL transzport meredeken megnő elsősorban a bifurkációkban és a vaszkulatura éles görbületeinél [29]. Ebben a folyamatban atheroprotektív szereppel bír az endothel 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 [30].

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

6./a. 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 [31].

Az oxidált LDL számtalan biológiai hatását tekintve feltehetően proatherogén, mely leginkább a partikulum külső rétegét alkotó oxidált foszfolipideknek köszönhető [32].

Az oxidált koleszterol-észterek biológiai jellegzetességei: citotoxikus hatásúak a sérült endotéliumon, az endotélium sejtjeire, az endotélium sejtjeiken 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 NFκB expressziót és apoptózist indukál, azonban a simaizom sejtek kollagénszintézisét serkenti. A vazospazmust a NO felszabadulásának/funkciójának gátlásán keresztül éri el, trombózist az endotél sejtek 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 [31]. 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 bizonyítottan patogén szereppel bír [28; 33; 34; 35]. Elmondható, hogy az oxLDL kapcsolatban áll az atherosclerosis szubklinikai formájával is [36]. A klinikai szövődmények megjelenése előtt észlelhető, hogy nagy mennyiségű oxidált LDL akkumulálódik az atheroscleroticus plakkokban és a keringő oxidált LDL szérum koncentrációi korrelációt mutatnak az akut koronária szindróma súlyosságával [37].

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 [38; 39]. *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 [40]. 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 a SREBP (sterol regulatory element-binding protein) közvetítésével [41]. 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, mely a habos-sejtek kialakulásáig tart [42; 43].

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

A szabad fémionok magas koncentrációban sejtek jelenléte nélkül is oxidálják az LDL-t *in vitro*, azonban *in vivo* extracellulárisan a fém ionok /Cu²⁺, Fe²⁺/ szabad formában számottevően nem fordulnak elő, kivéve talán a hemokromatózist és a Wilson kórt, azonban egyikben sem tapasztalták az atherosclerosis rizikójának emelkedését [44]. A szervezetben a kötött vas legnagyobb része elsősorban a hem komplexben található. A hem szintén katalizálja az LDL oxidációját, illetve a képződő oxLDL a hem-oxigenáz 1 gént serkenti, melynek aktiválódása kapcsán további oxidáció játszódik le. A folyamatban protektív szerepűnek bizonyult a kénhidrogén (H₂S), melyet fiziológiás körülmények között a vaszkuláris simaizomsejtek termelnek [45].

A közelmúltban hazai kutatócsoport ismertette, hogy a lágy atherosclerotikus plakk további progressziója során gyakran bevérzés jön létre, mely származhat a plakk fibrinsapkájának rupturájából, endotélsérülésből illetve a vasa vasorum-ok felől a plakkba irányuló neovaszkularizáció során keletkező sérülésekből. A plakkba került vörösvérsejtek szétesnek, a kiszabaduló hemoglobin a plakkon belül erősen oxidatív környezetbe kerül és tovább oxidálódik. A keletkező ferri- és ferrilhemoglobinok, majd a hemből kiszabaduló vas a plakkon belüli tovább oxidálja a lipideket, mely a plakk progressziójához vezet [46].

Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre, hogy a thiolok is fontos szerepet játszanak az atherosclerosisban. A cisztein a Fe³⁺-t Fe²⁺-vé és az alfa-tokoferol szabad gyökét redukálja, emellett a cisztein-cisztin átalakulással szabad gyökök felszabadulását idézi elő, melyek összességében elősegítik az LDL oxidációját, tehát proatherogének [47].

Az aktivált endotél sejtek, simaizomsejtek és a makrofágok szuperoxid anion termelésével az egyik igen erős antioxidáns, az endotél sejtek által termelt NO-t is képesek peroxinitritté oxidálni, mely atherosclerosisos plakkban szintén részt vesz az LDL oxidációjában [48].

A protektív oldalon, a vas és hemoglobin körforgásban egyaránt fontos szerepet betöltő haptoglobin antioxidáns hatása jól ismert. Levy és mtsai írták le, hogy a haptoglobin 2-2 genotípus összefüggést mutat a gyengébb antioxidáns védelemmel. Ez a haptoglobin genotípus diabeteses betegekben 2-5x-ös kardiovaszkuláris kockázat-emelkedéssel társul [49; 50].

A lipoxigenáz egy intracellulárisan elhelyezkedő vastartalmú dioxigenáz enzim, mely közvetlenül oxidálja a többszörösen telítetlen zsírsavakat [51]. *In vitro* megfigyelték, hogy a makrofágokban található 12/15-lipoxigenáz LDL jelenlétében a citoplazmából a membránba vándorol és oxidálja azt. Az LDL oxidációja ebben a folyamatban az LDL-receptorhoz kapcsolt proteintól függ, melyen keresztül az LDL a makrofághoz kötődik, azonban ebben az esetben sem degradáció, sem endocitosis nem történik [52]. *In vivo* a helyzet sokkal bonyolultabb, a lipoxigenáz egyes izoformái eltérő biológiai hatást mutattak állatmodelleken különböző tanulmányokban, ebből kifolyólag a lipoxigenáz gyulladást elősegítő vagy gátló szerepe az atherosclerosisban jelenleg is vitatott [53].

A leukociták (neutrofilek, monociták) azurofil granulumaiban előforduló mieloperoxidáz enzim is szorosan kötődik a gyulladás és az oxidatív stressz kialakulásához [54]. Az aktivált leukociták, szöveti makrofágok mieloperoxidázt szekretálnak, mely reaktív vegyületek (pl., hipoklórsav) és szabadgyökök képződését katalizálja. Epidemiológiai közlemények leírják, hogy a magas plazma mieloperoxidáz szintek a kardiovaszkuláris betegségek rizikójának emelkedésével társulnak és nem függenek a klasszikus rizikófaktoroktól [55].

A proteinek - LDL esetén az apoB100 - glikozilációja igen gyakori főleg diabeteses betegekben. A glikált LDL partikulumok a későbbiekben nagyobb valószínűséggel oxidálódnak, de maga a glikáció folyamata is szabad gyökök termelését eredményezi, mely szintén proatherogén tényező [56].

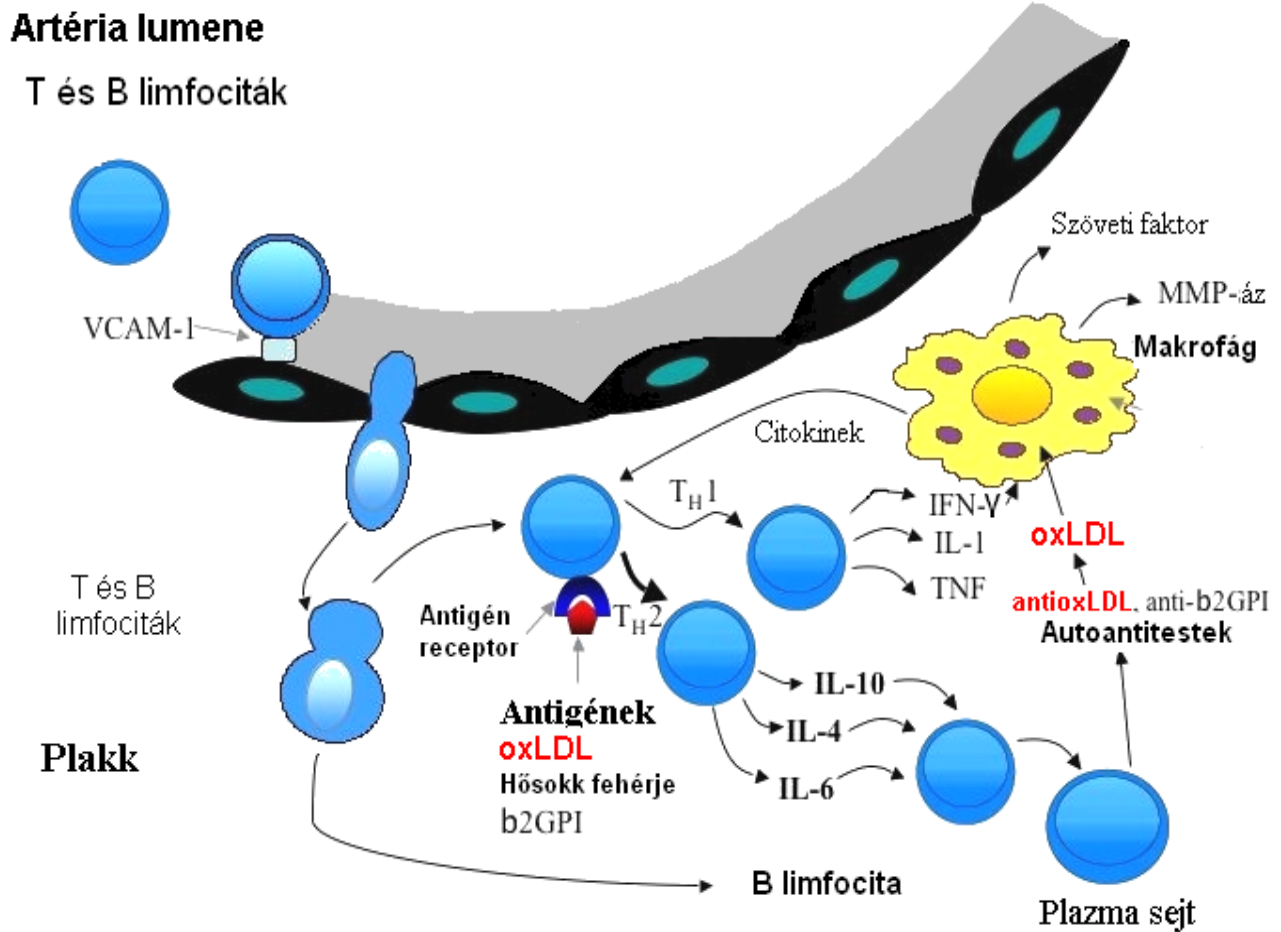
Az LDL oxidációs mechanizmusa *in vitro* 3 lépésben történik: a „konzumpció” (hasznosítás) fázisában az endogén antioxidánsok felhasználása történik, a „propagáció” (sokasodás) fázisában a telítetlen zsírsavak igen gyorsan hidroperoxidokká oxidálódnak, majd a „dekompozíció” (szétesés) fázisában a hidroperoxidok egyrészt oxidált foszfolipidekké (oxPL) hasadnak, melyek rövid acetyl-csoportokat tartalmaznak, másrészt reaktív aldehidekké, mint a malondialdehid és a 4-hydroxinonaldehid. Ezen felül a továbbiakban az oxPL-ek lizofoszfátidil-kolinná (lizo-PC) hidrolizálnak, melyet az LDL-asszociált PAF-acetilhidroláz katalizál. Ez az enzim kalcium-független foszfolipázA2 aktivitást mutat és elsősorban a foszfolipideket hidrolizálásáért felelős [57; 58]. Az oxidáció mértéke és a lizo-PC keletkezési üteme a PAF-AH enzim aktivitásától szorosan függ [59].

Az atherosclerotikus lézióban jól dokumentálhatóan megjelenik a lizo-PC, az oxPL és az aldehidek, melyek az oxLDL biológiai tulajdonságaiért, legfőképpen az immunogenitásáért felelősek [60; 61]. 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 [62; 63].

6./b. 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 túltelített makrofágok [64]. A makrofágok gyulladással habos sejtté alakulását az Fc γ receptorok mellett a Toll-like receptorok aktiválódása is elősegíti (főleg a TLR 2, TLR 4), melyek főleg az NF-kappaB útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat (ezeket a receptorokat a β 2GPI és az oxLDL is képes aktiválni) [65]. A kialakult habos sejtek tartós aktivitást mutatnak és a korábban említett gyulladással faktorokat termelnek, mellyel hozzájárulnak a gyulladással kaskád fenntartásához, progressziójához és végső soron a plakk destabilizálódásához, rupturájához vezetnek (1. ábra) [66].



1. ábra: A plakkban zajló fontosabb immuno-inflammatorikus folyamatok (Libby általunk módosított ábrája)

Az anti-oxLDL antitestek akcelerálják az oxLDL molekulák felvételét és fokozzák a makrofágok aktivitását [25; 67]. Emellett az IgG típusú anti-oxLDL/oxLDL immunkomplexek az Fc γ RI receptorok kereszt kötésével aktiválják a monociták Akt-dependens túlélési szignálútját, mely szintén szerepet játszik a habos sejt képződésben [68]. 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. Emellett a CD4+ T-sejtek is képesek felismerni az oxLDL-t HLA-DR-függő módon - tehát az oxLDL nemcsak humorális, hanem celluláris immunválaszt is elindít [9; 66; 67; 69].

Az irodalomból jól ismert az oxLDL komplexképző hajlama a 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 RI receptorok közvetítésével rapidan inkorporálódnak a makrofágokba. Ez a folyamat is nagyon intenzíven zajlik, így könnyen belátható, hogy a habos sejt képződés ugrásszerűen megnő, mely klinikailag az atherosclerosis fokozódásában nyilvánul meg [70; 71]. 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 [72].

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 láncaihoz hozzákötődik, mintegy opsonizálja 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, felismeri az apoptotikus sejtek valamint a baktériumok sejtfalának PC komponensét és aktiválja a klasszikus komplement útvonalat. A komplement receptorokon keresztül a makrofágok aktiválódnak, a fagocitózis fokozódik illetve az oxLDL/ β 2GPI fagocitózisával szaporodnak a habos sejtek is [73].

6./c. Az anti-oxLDL antitestek klinikai szerepe. Patogén vagy protektív antitestek?

Az oxLDL stimulálja a B sejtek anti-oxLDL antitest termelését [73; 74]. 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 [75; 76].

A humán anti-oxLDL antitestek fontos szerepet játszanak az oxLDL szintek szabályozásában. Ezek az antitestek megjelennek gyerekekben, egészséges felnőttekben és mindenekelőtt koronária szindrómás betegekben. Az antitestek szintjét gyermekekben szignifikánsabban magasabbnak találták, mint felnőttekben [77]. 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 [78], és egy újabb tanulmány szerint negatívan korreláltak a carotis artériák intima-media vastagságával [79]. Ezek a tanulmányok azt sugallják, hogy

egészséges egyénekben 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 is, 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 [62; 80; 81]. Ezek az antitestek jelezhetik a koronária atherosclerosis kiterjedését is [82]. Megjelenésük kapcsolatban van a PTCA után bekövetkező koronária restenosis magas rizikójával [83]. A magasabb antitest szintek perifériás obliteratív érbetegségben is korreláltak az atherosclerosis kiterjedésével [84]. Egy további közleményben az aldehyd-modifikált apoB-100 peptid 210 ellen termelődő IgG magas szintjei szoros összefüggést mutattak a lipidgazdag, kevés kötőszöveti mátrixot tartalmazó vulnerábilis plakkok előfordulásával, miközben az aldehyd-modifikált apoB-100 peptid 210 és 240 ellen termelődő IgM típusú ellenanyagok szintje a lipidszegény, fibrózus stabil plakkok megjelenésével korrelált [85]. Tsimikas és mtsai pozitív lineáris összefüggést tártak fel az IgG típusú oxLDL antitestek és az angiográfiával 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 [86]. A humán anti-oxLDL antitestek különböző osztályait, alosztályait azonosították: IgA, IgG1, IgG2, IgG3, és IgM [87].

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 [86; 88].

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 [89].

6./d. Az oxLDL/ β 2GPI 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 [90]. Számos klinikai tanulmány foglalkozik az APS betegekben megfigyelt akcelerált atherosclerosis (carotis IMT növekedése, perifériás artériás obliteratív érbetegség, aorta atherosclerosisának fokozódása) és az oxLDL/ β 2GPI komplex elleni antifoszfolipid, anti-oxLDL antitestek kapcsolatával [91; 92; 93].

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 [66]. 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 [66; 94].

Antifoszfolipid szindrómában az oxLDL/ β 2GPI komplex elleni IgG-típusú anti-oxLDL antitestek összefüggésbe hozhatók az artériás tromboemboliás eseményekkel [66, 72]. 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 [95]. 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-habos sejt-inflammatorikus vonulat serkenti az endotél sejtek aktivációját is, mely további leukociták toborzásához és migrációjához vezet [96]. A plakkban felhalmozódó gyulladássos sejtek az érfalban zajló immuno-inflammatorikus válasz következményének tekinthetők, ezáltal az atherosclerosis tovább progrediál [97; 98].

7. A C-reaktív protein

A C-reaktív protein szintről már bebizonyították, hogy a kardiovaszkuláris betegségek erős, független rizikófaktora. A humán CRP 5 polipeptidláncból álló ciklikus pentamer szerkezetű akut fázis plazmaprotein, mely kalcium-dependens módon képes mikroorganizmusok membránjához kötődni, majd a klasszikus úton vált ki komplement aktivációt, illetve a kötődő C3b-n keresztül a komplexet opsonizálja a fagocitáknak. CRP elsősorban a májban expresszálódik, mely proinflammatorikus citokinek (IL-1, IL-6, TNF- α) által szabályozott, ennek ellenére az „akut-fázison” kívül is észlelhető az emelkedése számos krónikus gyulladásos betegségben, mint az RA és az atherosclerosis [99].

A CRP az atherosclerosis patogenezisében aktív mediátorként is részt vesz: aktiválja az artériák endotéliumját, szerepet játszik a makrofágok plakkba történő vándorlásában és a habos sejt képződésben [100]. Az emelkedett CRP szint prognosztikai jelentőséggel is bír [33]. Irodalmi adatok alapján instabil anginás és akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben a CRP szintek magasabbak, mint az egészségesek esetében [34], a magasabb CRP szintek a miokardiális infarktus rosszabb prognózisát jelentik [35]. 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 [101, 102]. A statinok lipid-csökkentő hatásuktól függetlenül módosíthatnak számos immuno-inflammatorikus folyamatot is. Az atherosclerotikus plakkon belül a statinok csökkentik a makrofágok számát [103-107], a fibrózus sapka megrepedésében közreműködő fehérjebontó enzimek felszabadulását [108-110] és „down-regulálják” azon sejtadhéziós molekulák expresszióját, melyek részt vesznek a monociták és az endotél felszín kölcsönhatásában [111],

valamint a közelmúltban megjelent irodalmi adatok szerint lassíthatják a diabetes mellitus kialakulását [112].

CÉLKITŰZÉS

I. Kísérletes vizsgálatunk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az oxidált LDL stimuláció hatását limfocitákon *in vitro* körülmények között antifoszfolid szindrómában. Az antifoszfolid szindrómás betegekből szeparált limfociták proliferációját illetve citokin szekrécióját egészséges kontrollal összevetve jellemeztük oxLDL jelenlétében, választ keresve arra a kérdésre, hogy oxLDL autoantigén stimulus hatására hogyan viselkednek a limfociták az említett kórképben.

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 antifoszfolid 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. Antifoszfolid 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 gyulladásos 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 szövődményes vagy szövődménymentes 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 antifoszfolipid 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 beleegyezésüket követően történtek meg. Az antifoszfolipid 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 [113] legalább egy klinikai és egy laboratóriumi feltétel (I. táblázat).

Kritériumok	Módszerek
<u>Klinikai tünetek</u> Trombózis	Egy vagy több képalkotó vizsgálattal igazolt vénás, artériás, illetve kisereket érintő trombózis.
Terhespatológia	– Három vagy több ismeretlen eredetű spontán vetélés. – Egy vagy több ismeretlen eredetű intrauterin elhalás 10 hétnél idősebb gesztációs korban. – Egy vagy több, a 34. hét előtt bekövetkezett koraszülés pre-eclampsia, eclampsia, illetve placentaris elégtelenség következtében.
<u>Laboratóriumi tünetek</u> aCL autoantitest-pozitivitás két vagy több alkalommal (az egyes vizsgálatok között minimum hat hétnek kell eltelnie.)	Felnőttek esetében β 2GPI-dependens ELISA módszer segítségével kell kvantitatívan meghatározni, gyermekkori APS esetén az egyes autoantitest emelkedett titerének specificitása, illetve szenzitivitása még pontosan nem ismert.
<i>Lupus antikoaguláns</i> - pozitivitás két vagy több alkalommal (az egyes vizsgálatok között minimum hat hétnek kell eltelnie.)	A foszfolipid-dependens alvadási paraméterek (APTI, KCT, DRVVT) emelkedése jelzi. APTI: aktivált parciális tromboplastin idő KCT: kaolin alvadási idő DRVVT: hígított „Russel Viper Venom” idő

I. táblázat: Az antifoszfolipid-szindróma diagnosztikus kritériumrendszere

Az antifoszfolipid antitestek (az IgG típusú anti-B2GPI, anticardiolipin és antifoszfatidil-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 az 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), szerológiai antifoszfolipid antitest negatívak, gyulladáshoz kapcsolódó paramétereik nem tértek el a normáltól, kórtörténetükben krónikus betegség nem szerepelt. A kontroll és a betegcsoport jellemzőit az II. táblázat foglalja össze.

	ANTIFOSZFOLIPID SZINDRÓMA	KONTROLLOK
Általános adatok		
Betegek száma	13	9
Életkor (év)	47,3 ± 12,1 (27-67)	49,6 ± 7,3 (32-56)
Férfi	1 (8%)	2 (22%)
Nő	12 (92%)	6 (78 %)
A szérumban kimutatható antifoszfolid antitestek		
Lupus antikoaguláns	2 (15%)	-
Anti-cardiolipin (IgA: IgM: IgG)	11 (85%) (2: 7: 10)	-
Anti-β2GPI (IgA: IgM: IgG)	9 (69%) (4: 7: 8)	-
Anti-foszfátidil-szerin (IgA: IgM: IgG)	3 (23%) (0: 2: 3)	-
egyszeres APLA+	3 (23%)	-
dupla/tripla APLA +	9 (69%)	-
Antifoszfolid szindrómára utaló anamnesztikus klinikai adatok		
Visszatérő vetélések	5 (38%)	-
Mélyvénás trombózis	5 (38%)	-
Szubkután vaszkulitisz	5 (38%)	-
TIA/agyi infarktus vagy vérzés/agyi erek vaszkulitise	4 (31%)	-
Pulmonális embolia	3 (23%)	-
Akut koronária szindróma	1 (8%)	-
HELLP szindróma	1 (8%)	-
Diagnózis		
primer APS (arteriás)	5 (38%)	-
primer APS (vénás)	8 (62%)	-
Trombocita aggregáció-gátló/antikoaguláns terápia		
LMWH	1 (8%)	-
Warfarin	6 (46%)	-
Aspirin (100 mg)	4 (31%)	1 (11%)
Clopidogrel	1 (8%)	-

II. táblázat: A tanulmányba bevont betegek és kontrollok demográfiai, klinikai és szerológiai adatai

A betegek és egészséges kontrollok vérvétele szimultán történt. A mononukleáris sejtek szeparálásához a minták közvetlenül feldolgozásra kerültek, majd az összegyűjtött szérummintákat lefagyasztottuk és -70°C -on tároltuk a további elemzések megkezdéséig.

I./2. Perifériás mononukleáris sejtek szeparálása

A humán perifériás mononukleáris sejteket heparinnal alvadásgátolt vénás vérből Ficoll-Histopaque 1077 gradiens centrifugálással nyertük. A mononukleáris sejteket PBS-el átmostuk, majd reszuszpendáltuk és termosztátban (37°C ; 86% páratartalom; 5% CO_2 mellett), 10% újszülött borjú savó-, antibiotikum/antimikotikum- és L-glutaminnal (Gibco®, Grand Island, USA) komplettált RPMI 1640 tápfolyadékban oxLDL antigén jelenlétében proliferáltattuk. A kiindulási sejtszámot 96-lyukú mikrotiter lemezen lyukanként 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be.

I./3. Sejtprolifерáció *in vitro* vizsgálata

A perifériás mononukleáris sejteket tisztított, immunogén, 5 és 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú oxLDL epitóp (Intracel RP047 / CuSO_4 oxidáció/, Frederick, MD, USA) hozzáadásával stimuláltuk. A sejtprolifерáció meghatározását BrdU kolorimetriás enzimkapcsolt immunszorbens esszé (ELISA) technikával (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) végeztük, követve a gyártó utasításait. A vizsgálat önkontrollos volt, kettős negatív kontrollként a tápfolyadék illetve a mitogén nélküli sejtaktivitás szolgált, pozitív kontrollként a sejtek fitohemagglutininra (1 és 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú nem specifikus mitogénre) adott proliferációs válaszát használtuk. A mononukleáris sejteket oxLDL epitóp jelenlétében 37°C -on 84 órán át tenyésztettük, ezután további 12 órán át BrdU hozzáadása mellett inkubáltuk. A tápfolyadékhoz adott pirimidin-analóg (5-bróm-2'-dezoxiuridin) a DNS szintézis során inkorporálódott a sejtek DNS-ébe a timidin helyére. A sejtek fixálása, DNS-ük denaturálása után torna peroxidáz jelzőenzimmel jelzett BrdU-elleni antitesteket adtunk hozzá, majd a peroxidáz enzim szubsztrátjával, a tetrametil-benzidinnel inkubációt végeztünk. A szubsztrát bontása kromogén (sárga színű) végterméket eredményezett, a reakciót kénsavval állítottuk le és a lemezeket 450 nm-en automata többszörös fotométer (Labsystems, Helsinki, Finland) segítségével analizáltuk. A mért abszorbancia értékek egyenesen arányosak voltak az osztódás mértékével.

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, ezután a mikrotiter lemezeket centrifugáltuk és a felülúszót leszívtuk, melyben a termelt citokinek (IL-1, IL-2, IL-6, TNFα) mennyiségét ELISA (BD Opt EIA kit™, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) teszttel határoztuk meg, melynek szenzitivitása 1 pg/ml koncentrációig terjed.

A módszer alapjául a szendvics enzim-immunoassay technika szolgál. Egy adott citokin mérésekor először az adott citokinre specifikus monoklonális ellenanyagot rávisszük egy mikrolemezre. A standardok és a minták citokin mennyisége az immobilizált antitestekhez tapad. Mosást követően a kitapadt citokin kimutatásához biotinnal kapcsolt poliklonális antitesteket adunk a rendszerhez, majd torma peroxidáz enzimmel jelzett streptavidinnel inkubáljuk. A felesleget ismételt mosással távolítjuk el. Ezután a maradék (a minta citokin koncentrációjával arányos mennyiségű) torma-peroxidázhoz hozzáadjuk az enzim kromogén (tetrametil-benzidin) szubsztrátját. A szubsztrát bontása kapcsán változik a minta színintenzitása. Spektrofotométer (ELISA-reader) segítségével meghatározzuk a színintenzitás erősségét, mely arányos az adott citokin koncentrációjával.

A mérés során elkészítettük a standardokat és a reagenseket az eljárási előírásoknak megfelelően.

1. A mikrolemez lyukaiba 100 µl anticitokin (pl., anti-IL-4) antitestet mértünk be, majd egy teljes éjszakán át 4 °C-on inkubáljuk.
2. Szobahőmérsékleten az antitest felesleget eltávolítottuk, a nem-specifikus kötéseket mélyedésenként 200 µl blokkoló oldattal szüntettük meg (ezzel 1 órán át inkubáltuk, majd PBS-el háromszor mostuk).
3. Az egyes mélyedésekbe 100-100 µl standardot, mintát, vagy kontrollt mértünk be, majd két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.
4. Ezt követően az egyes mélyedésekben lévő reakcióelegyet kiszívtuk, majd négyszer mostuk, minden egyes alkalommal a folyadékot teljes mértékben eltávolítottuk.

5. 100 µl biotinált anticitokin antitestet mértünk be az egyes mélyedésekbe, majd egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltunk.
6. Ezt követően négyszer újra mostuk az egyes mélyedéseket.
7. Az egyes mélyedésekbe 100 µl streptavidin-peroxidáz enzim konjugátumot mértünk be, majd 30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.
8. Ezt követően ismét ötször mostuk a mélyedéseket.
9. 100 µl szubsztrátoldatot mértünk be a mélyedésekbe, majd 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk fénytől védve a színreakció kifejlődéséig.
10. 450 nm-s hullámhosszon az abszorbancia értéket az egyes mélyedések esetében 30 percen belül lemértük többszörös ELISA readerrel (Labsystems, Helsinki, Finland).

Az így mért abszorbanciaértékeket kétszer olvastuk le, a kapott optikai denzitásokat átlagoltuk. A standard értékekre az ELISA-reader számítógépes programjának segítségével négyparaméteres logisztikus görbét illesztettünk, az így képzett standardgörbe alapján tudtuk meghatározni az egyes mintákban az adott citokin szintet.

Az antigénre adott citokin szekréción válasz elemzéséhez a citokin szekréción indexet (CSI) használtuk:

$$\text{CSI} = (\text{antigén jelenléte mellett mért citokin szekréción} / \text{antigén hozzáadása nélkül mért citokin szekréción}) * 100$$

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 szövődményes vagy szövődménymentes lefolyásával.

1. Magas kockázatú (high risk) csoport: ide azokat soroltuk, akiknél a kórházi időszakban *kamrai ritmuszavar* jelentkezett, akiknek *rekurráló iszkémiás fájdalmuk* volt, akiknél *sürgős koronária intervenció igénye, keringési elégtelenség* vagy *kardiális halálozás* lépett fel. A magas kockázatú csoportba sorolt 20 beteg átlagéletkora $73,0 \pm 8,4$ (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 szövődménymentesen* 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 koronarográfiával 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. A vizsgálatban résztvevők adatait a III. táblázatban részleteztük.

	Akut coronaria szindróma	Stabil coronaria betegség	Kontroll
Általános adatok			
Betegszám	34	62	50
Életkor (év)	72,3 ± 9,4 (47-87)	66,8 ± 11,2 (31-84)	70,3 ± 10,8 (47-85)
Férfi	14 (41 %)	43 (69 %)	22 (44 %)
Nő	20 (59 %)	19 (31 %)	28 (56 %)
Rizikófaktorok			
Dohányzó	6 (18 %)	18 (29 %)	10 (20 %)
Obesitas (BMI>25)	9 (26 %)	23 (37 %)	5 (10 %)
Diabetes	8 (23 %)	15 (24 %)	-
Hypertonia	29 (85 %)	33 (53 %)	-
Triglicerid (mmol/l)	1,6 ± 1	2,7 ± 1,2	1,1 ± 0,8
Total cholesterolin (mmol/l)	5,6 ± 1,3	6,1 ± 0,7	4,3 ± 0,9
LDL (mmol/l)	3,1 ± 1,1	4,2 ± 0,8	2,6 ± 1
HDL (mmol/l)	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,4
Urea (µmol/l)	309 ± 70	473 ± 105	281 ± 75
CRP (mg/l)	47,5 ± 72	3,9 ± 4	2,9 ± 2,3
EF (%)	42,4 ± 11	44 ± 12	55 ± 9
Diagnózis			
STEMI	19 (56 %)	-	-
NSTEMI	5 (15 %)	-	-
Instabil angina	10 (29 %)	-	-
Gyógyszeresedés			
ACE gátló	27 (80 %)	44 (71 %)	-
β-receptor blokkoló	20 (59 %)	27 (44 %)	1 (2 %)
Statin	11 (32 %)	27 (44 %)	7 (14 %)
ASA	31 (91 %)	56 (90 %)	-

III. Táblázat: Az retrospektív klinikai vizsgálatban résztvevő akut, stabil koronária betegek és a kontrollok demográfiai adatai, rizikófaktorok megoszlása

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 immunszuppresszív terápiaiban részesültek. A betegbeválasztásnál azokat az eseteket tekintettük statin terápiaiban 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 fájdalomuk* volt, akiknél *sürgős koronária intervenció igénye*, *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 betegeknél. 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. Ebben a tanulmányban résztvevők részletes adatait a IV. táblázatban tüntettük fel.

	Akut koronária szindróma (n=54)	Magas rizikójú csoport (n=33)	Alacsony rizikójú csoport (n=21)	Kontrollok (n=41)
Életkor (év)	69,8 ± 11,1 (30-77)	67,2 ± 10,4	64,4 ± 9,8	70,6 ± 5,3 (47-68)
Férfiak	28 (52%)	17 (52%)	11 (52%)	16 (39%)
Nők	26 (48%)	16 (48%)	10 (48%)	25 (61 %)
Dohányzás	15 (28%)	11 (33%)	4 (19%)	8 (20%)
BMI (25<)	28 (52%)	16 (48%)	12 (57%)	4 (10%)
Diabetes	16 (30%)	10 (30%)	6 (29%)	-
Hypertonia	46 (85%)	27 (82%)	19 (90%)	-
Összkoleszterin (mmol/l)	5,2 ± 1,3	5,3 ± 1,3	5,2 ± 1,3	4,1 ± 0,8
Triglicerid (mmol/l)	1,9 ± 1,1	1,7 ± 0,8	2,2 ± 1,4	1,2± 0,6
LDL (mmol/l)	2,9 ± 1,1	3,0 ± 1,2	2,8 ± 0,9	-
HDL (mmol/l)	1,2 ± 0,4	1,2± 0,5	1,2 ± 0,3	-
Ejekciós frakció /EF/ (%)	47± 11	46 ± 11	48± 11	56 ± 6
CRP (mg/l)	8,9 (2,1-42,4)	31,9 (7,8-95,9)	2,15 (2,1-4,1)	2,4 (0,5-4,8)
Diagnózis				
STEMI	25 (46%)	18 (55%)	7 (33%)	-
NSTEMI	11 (21%)	7 (21%)	4 (19%)	-
Instabil angina	18 (33%)	8 (24%)	10 (48%)	-
Gyógyszeres terápia				
Béta-blokkoló	32 (59 %)	18 (55 %)	14 (66 %)	6 (14,6%)
ACE-gátló	46 (85 %)	27 (82 %)	19 (90 %)	-
Kalcium-csatorna blokkoló	28 (52 %)	16 (48 %)	12 (57 %)	-
Trombocita aggregáció gátló	21 (39 %)	12 (36 %)	9 (43 %)	-
Statin (atorvastatin)	12 (22%)	4 (12%)	8 (38%)	-

IV. Táblázat: A prospektív klinikai vizsgálatban résztvevő akut koronária betegek és kontrollok rizikófaktorai, demográfiai adatai

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 kitéket (IMMCO – Buffalo, New York, USA) alkalmaztunk a gyártó által meghatározott protokoll betartásával.

A módszer alapja szilárd fázisú enzim-immunoassay technika. A mikrolemezek gyárilag oxLDL antigénnel vannak fedve. A pozitív, a negatív standard kontroll és a minta savók anti-oxLDL mennyisége az immobilizált antigénekhez tapad. Mosást követően a kitapadt anti-oxLDL kimutatásához torma peroxidáz jelzőenzimmel kapcsolt kecske poliklonális anti-humán IgG antitesteket adunk a rendszerhez. A felesleget ismételt mosással távolítjuk el. Ezután a minta anti-oxLDL koncentrációjával arányos mennyiségű torma-peroxidázhoz hozzáadjuk az enzim kromogén (tetrametil-benzidin) szubsztrátját, óvjuk a fénytől. A szubsztrát bontása kapcsán változik a minta színintenzitása. Az enzim-szubsztrát színreakciót blokkoló oldattal leállítjuk, a kapott színintenzitást spektrofotométer (ELISA-reader) segítségével 450 nm-en meghatározzuk. Az oldat abszorbanciájának mértéke arányos az anti-oxLDL koncentrációjával.

A retrospektív klinikai tanulmányhoz szükséges CRP értékeket turbidimetriás módszerrel (Integra-400; Hoffmann-La Roche Ltd.; Basel, Switzerland) határoztuk meg, mely a mintán áthaladó fényerősség-változás (csökkenés) meghatározásán alapszik, mely egyenesen arányos a minta CRP koncentrációjával.

IV. Statisztikai analízis

Statisztikai számításainkhoz a Statistica for Windows Version 7.0 szoftvert alkalmaztuk. Kvantitatív adatainkat eloszlás szempontjából Kolmogorov-Smirnov, valamint Lilliefors teszttel elemeztük. A normál eloszlást átlag és szórás (\pm SD) értékekkel jellemeztük. 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-teszttel, nem parametrikus eloszlás esetén Spearman teszttel végeztünk. Amennyiben számításaink során szignifikáns korrelációt találtunk, a két

független változót koordináta rendszerben ábrázoltuk, jelölve a korreláció típusát, a szignifikancia szintjét, valamint a regressziós koefficiens (R) értékét.

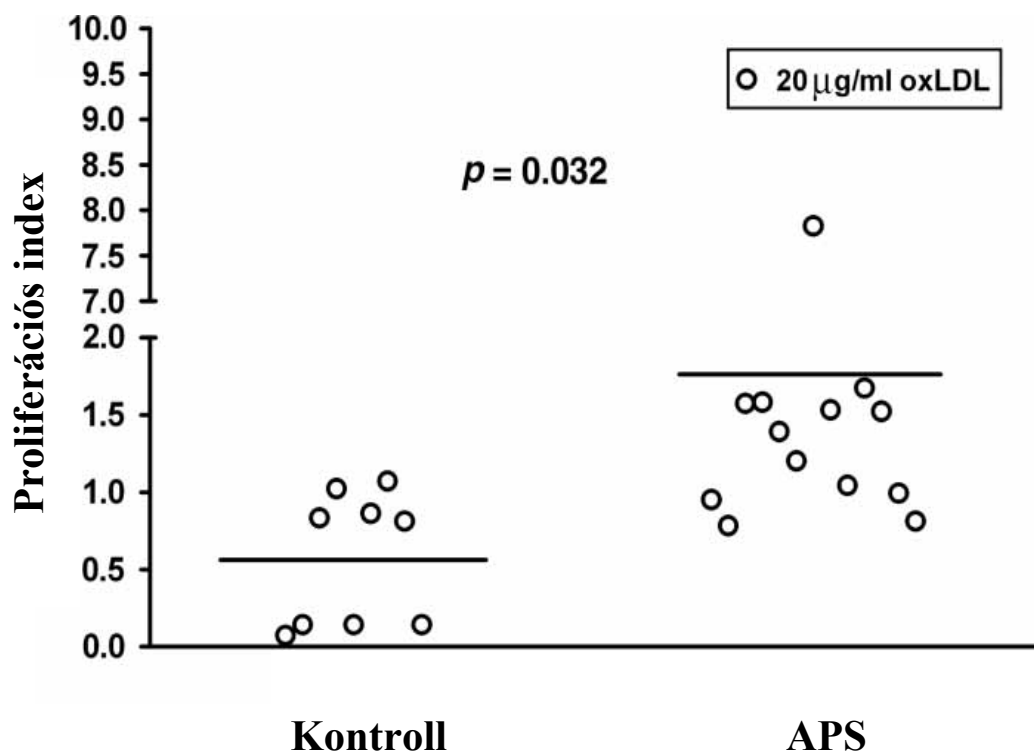
EREDMÉNYEK

I./1. *In vitro* limfocita proliferáció

Az APS és kontroll csoport sejt proliferációjának összehasonlítása

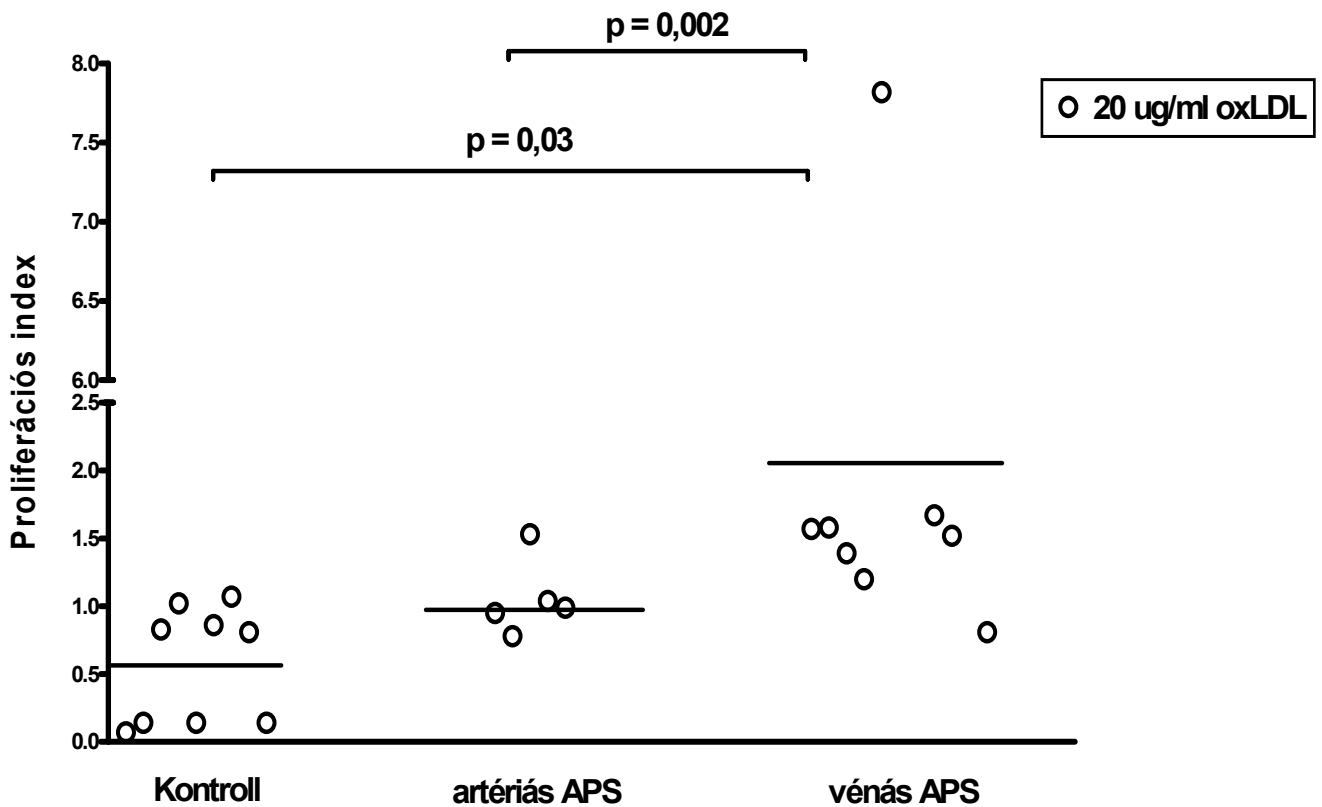
5 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL alkalmazása mellett mind a kontroll, mind az APS csoportban a proliferációs értékek átlaga 1,0 alatt volt, vagyis a kiinduláshoz képest az összsejtszám mindkét esetben csökkent, de különbségük nem volt szignifikáns (PI_{APS} : $0,95 \pm 0,28$ és $\text{PI}_{\text{kontroll}}$: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

20 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL stimuláció mellett jelentősen emelkedett PI értékeket találtunk APS-ben a kontroll csoporttal összevetve (PI_{APS} : $1,76 \pm 1,8$ és $\text{PI}_{\text{kontroll}}$: $0,56 \pm 0,42$; $p = 0,032$; 2. ábra).



2. ábra: Az oxLDL stimuláció jelenlétében észlelt proliferációs indexek az antifoszfolipid szindrómás (APS) és az egészséges kontroll csoportban

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 ($APS_{\text{vénás}}: 2,1 \pm 2,28$; $APS_{\text{artériás}}: 0,98 \pm 0,28$; $p = 0,03$). 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 ($APS_{\text{vénás}}: 2,1 \pm 2,28$; kontroll: $0,56 \pm 0,42$; $p = 0,002$; 3. ábra).



3. ábra: Az oxLDL stimuláció jelenlétében észlelt proliferációs indexek az artériás, vénás APS és az egészséges kontroll csoportban

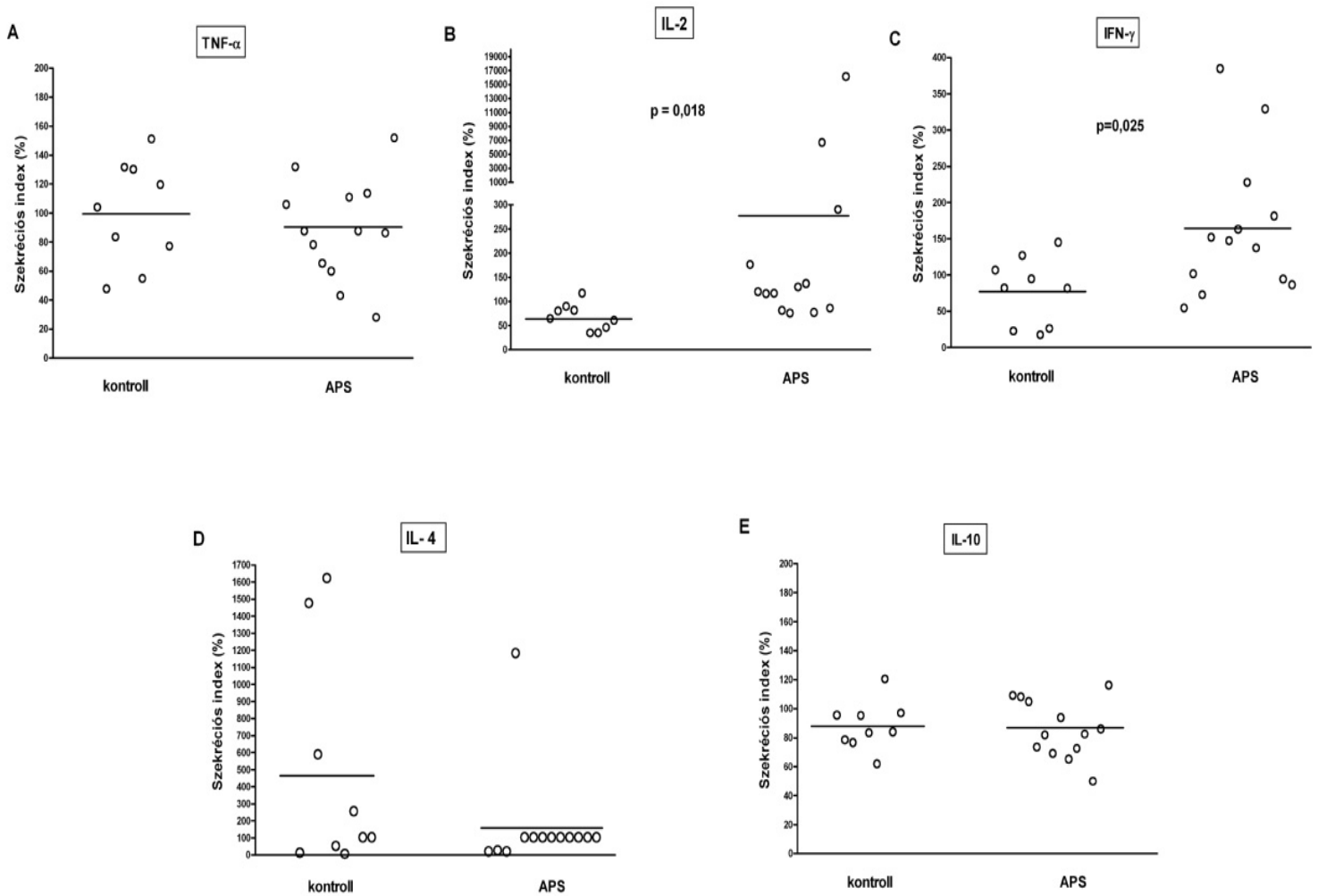
I./2. *In vitro* citokin szekréció

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; $p = 0,018$); 4/B ábra), ezzel párhuzamosan szignifikáns IFN- γ szekréciónövekedés is történt (CSI_{APS} : $163,2 \pm 98,5$ és CSI_{kontroll} : $77,4 \pm 46,6$; $p = 0,025$; 4/C ábra).

A TNF- α , IL-4, és IL-10 citokinek esetében nem találtunk jelentős különbséget az APS és kontroll csoportok között (4/A, D, E ábrák).



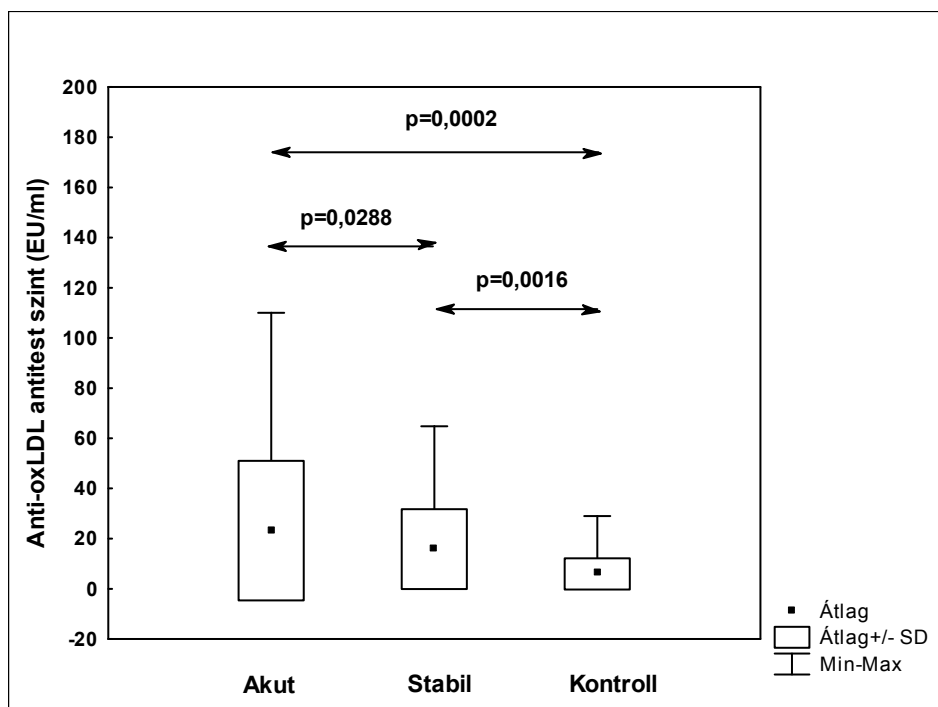
4/A-E ábra: Az oxLDL stimuláció jelenlétében észlelt citokin szekréciónövekedés az APS és az egészséges kontroll csoportban

A vénás APS csoportból származó mononukleáris sejtek IL-2 szekréciónövekedett 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

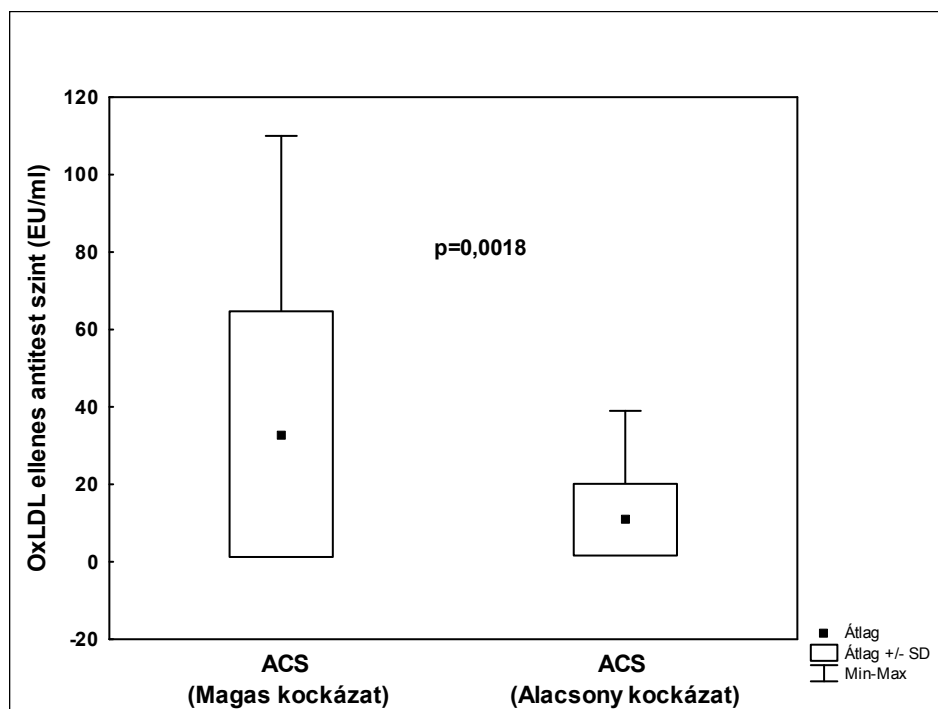
Az retrospektív klinikai tanulmányban az oxidált LDL elleni antitestek szintje akut koronária szindrómásokban ($21,6 \pm 26,45$ EU/ml) és stabil koronária betegekben ($15,25 \pm 16,64$ EU/ml) egyaránt magasabbnak bizonyult az egészséges kontrollokhoz ($5,95 \pm 6,21$ EU/ml) viszonyítva ($p=0,0002$ és $p=0,0016$). 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; $p=0,0288$; 5. ábra).



5. ábra: Az oxLDL elleni antitest szintek alakulása az akut, a stabil koronária betegekben és az egészséges kontroll csoportban

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, rekurráló iszkémiás fájdalom, sürgős koronária intervenció igénye, 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; $p=0,0018$; 6. ábra.

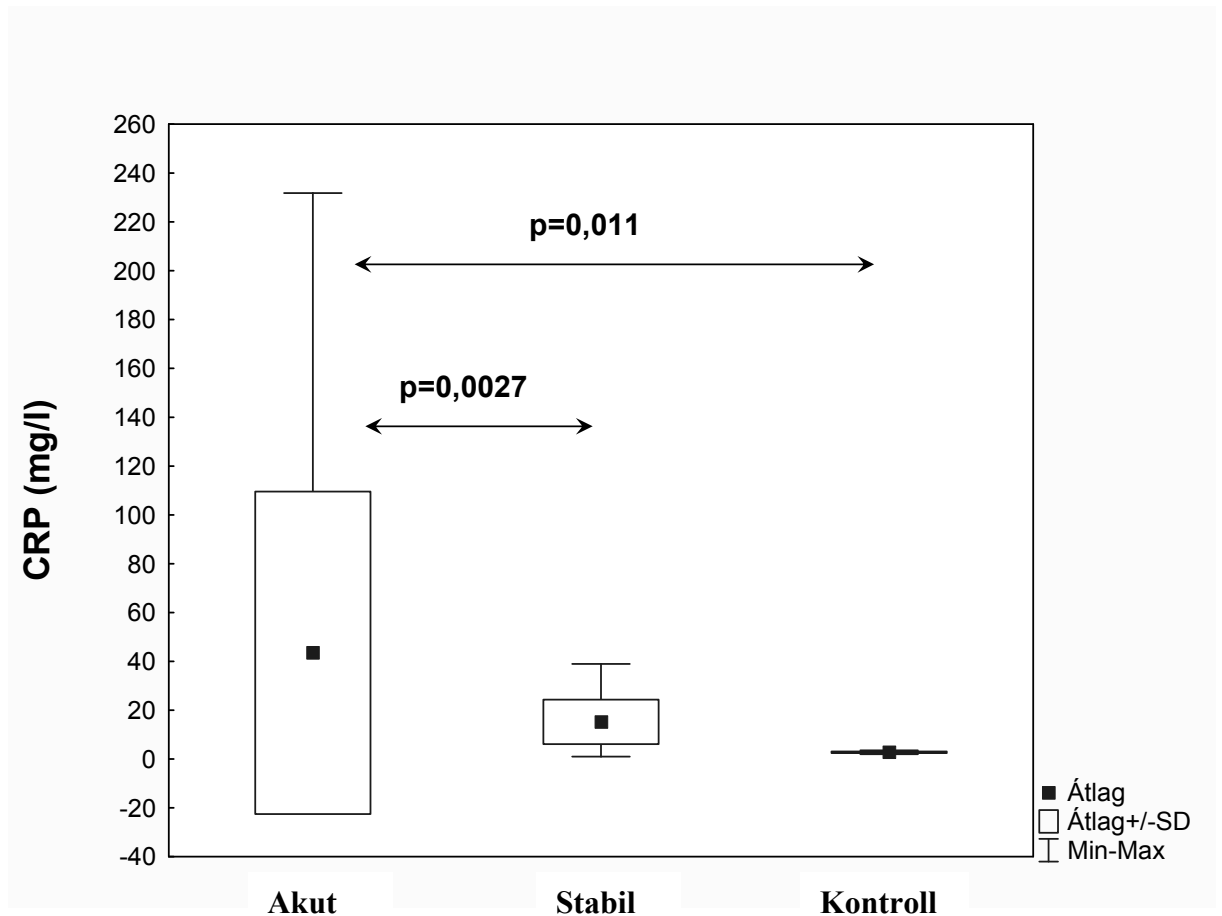


6. ábra: Akut koronária szindrómában az aoxLDL antitest szintek összefüggése a hospitalizáció során kialakuló szövődményekkel

II./2. A 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; $p=0,011$; 7. ábra.



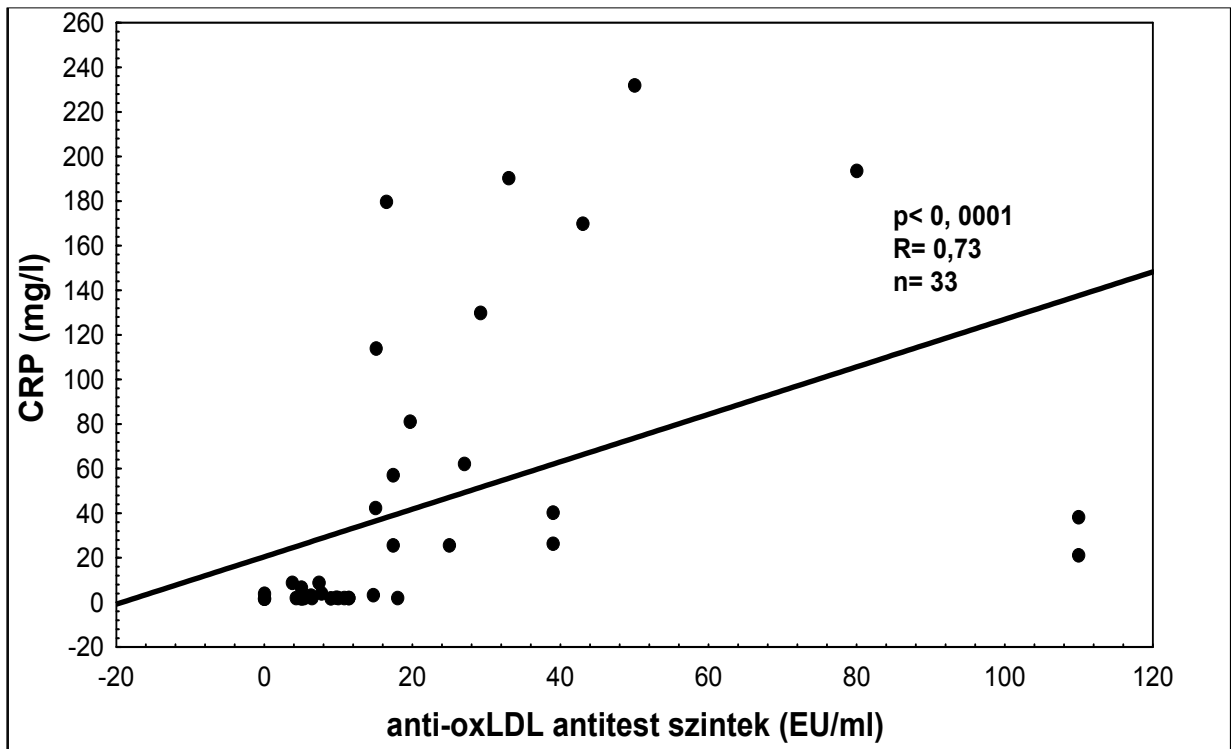
7. ábra: A CRP szintek alakulása az akut, a stabil koronária betegekben és az egészséges kontroll csoportban

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.

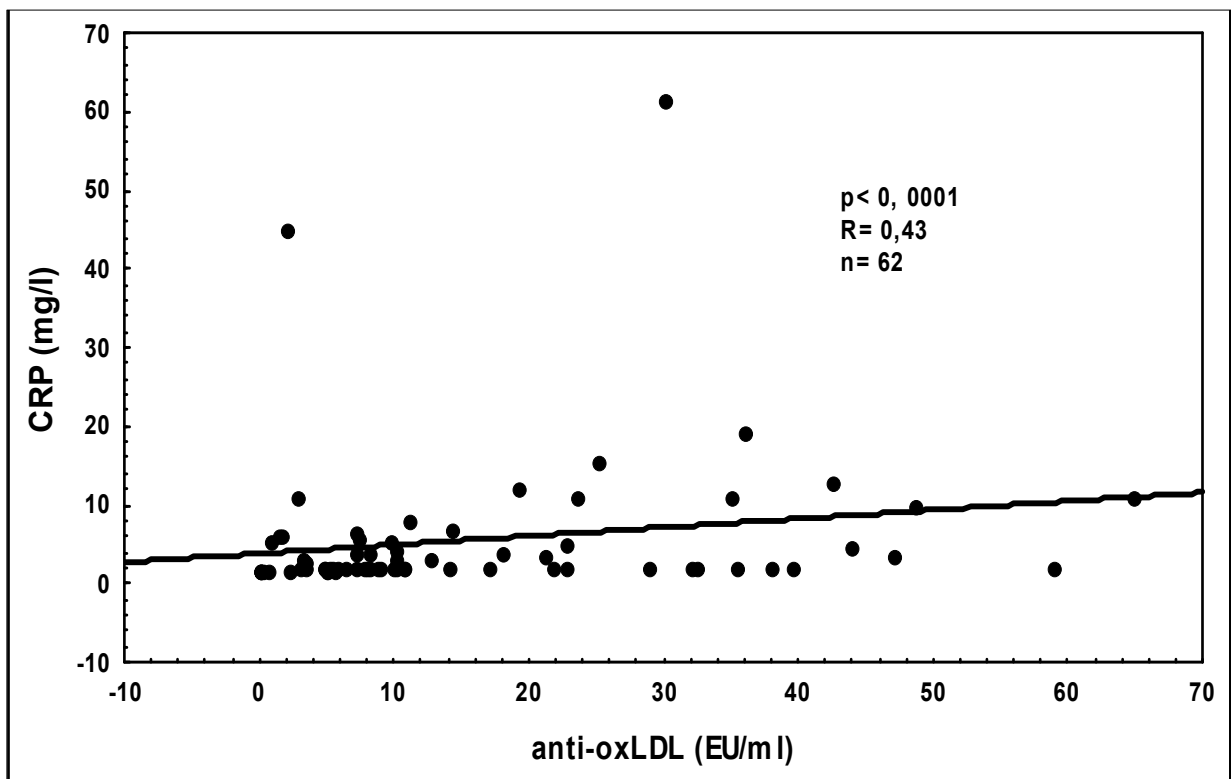
Az akut koronária szindrómás és a stabil koronária betegek oxLDL elleni antitest és CRP értékei között egyaránt pozitív lineáris korrelációt találtunk, mely erősnek adódott akut

koronária szindrómában ($r = 0,73$; $p < 0,0001$), miközben a stabil csoportban csak közepesen erős volt ($R=0,43$; $p < 0,0001$; 8/A és 8/B ábra).

8A)



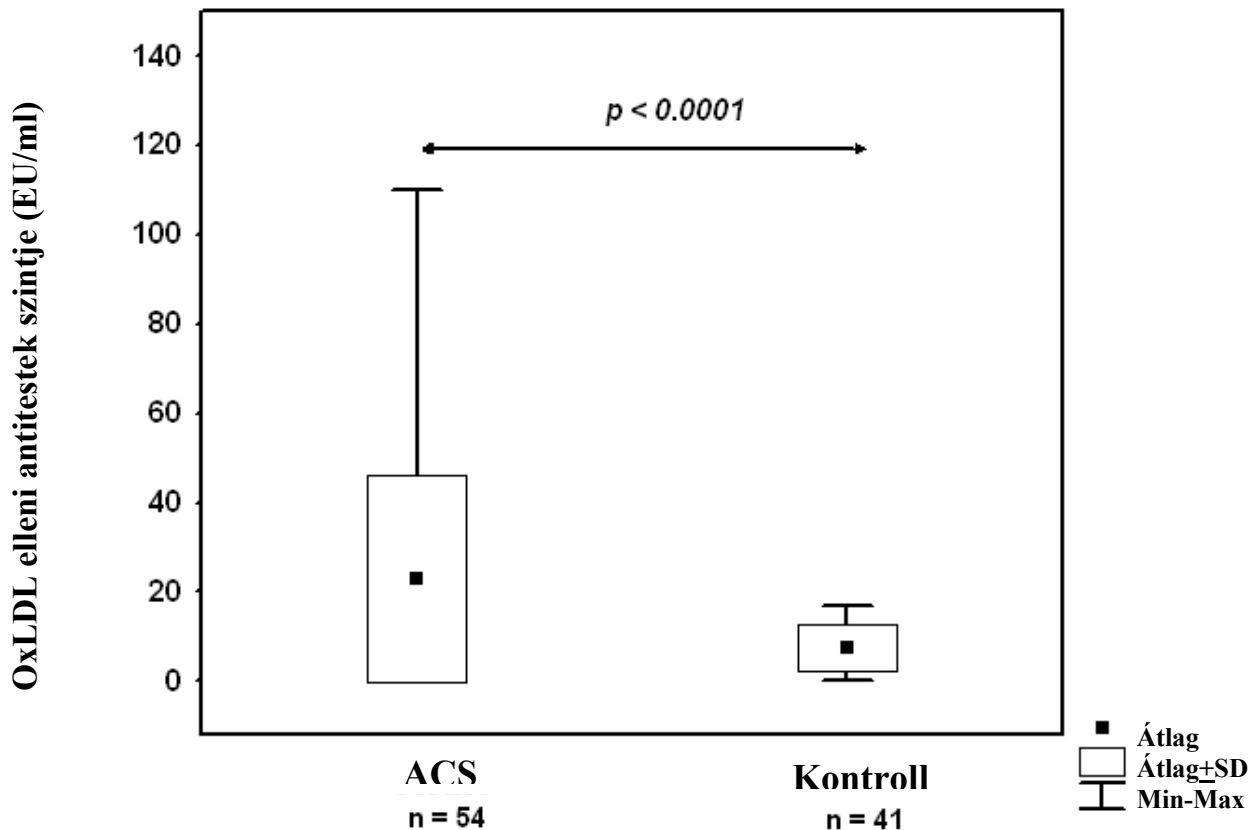
8B)



8/A-B. ábra: A CRP és az anti-oxLDL antitest szintek korrelációja akut koronária szindrómában (A) és stabil koronária betegekben (B)

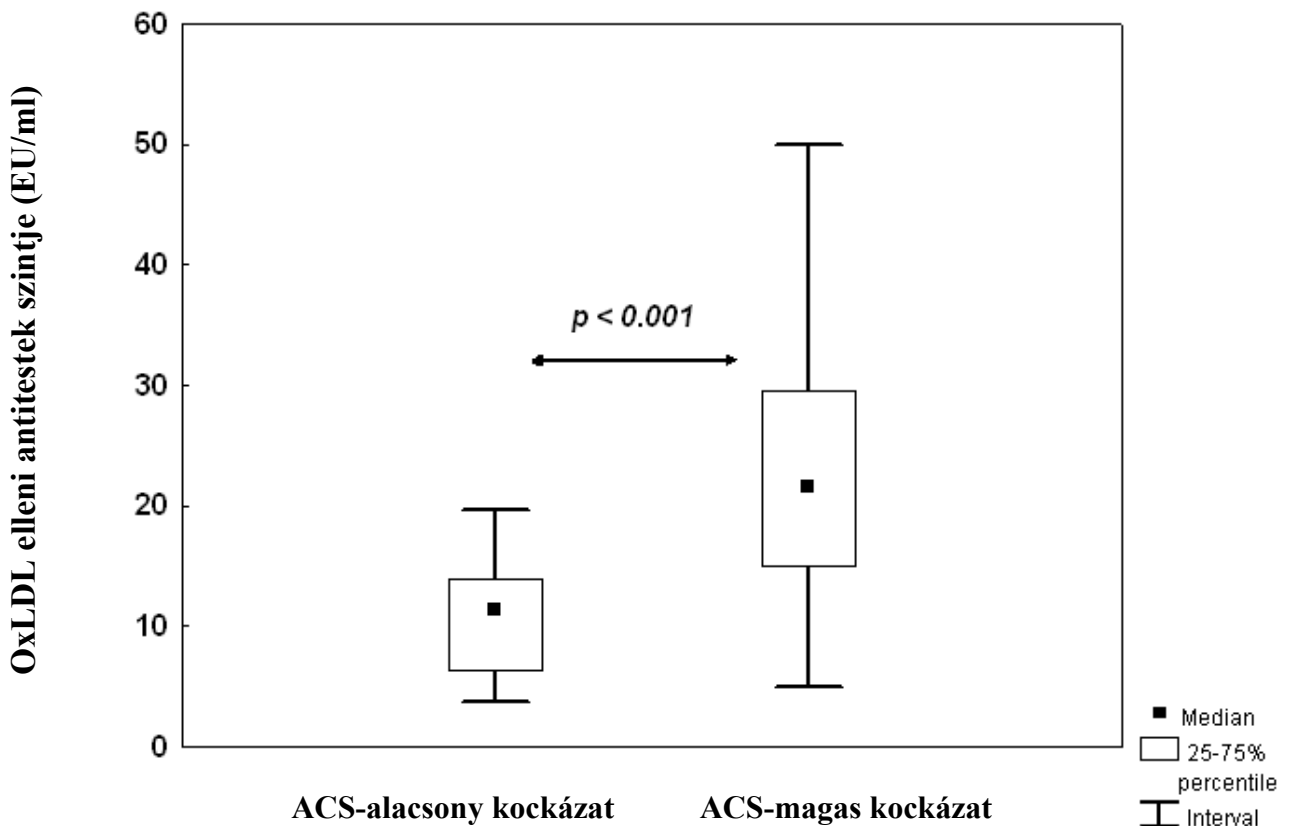
III. Az IgG típusú anti-oxLDL antitest szintek vizsgálata

A prospektív klinikai tanulmányban az akut koronária szindrómás betegek IgG típusú anti-oxLDL antitest titere szignifikánsan magasabbnak bizonyult az egészséges kontrollokkal összevetve ($22,8 \pm 23,3$ EU/ml illetve $7,5 \pm 5,3$ EU/ml, $p < 0,0001$; 9. ábra).



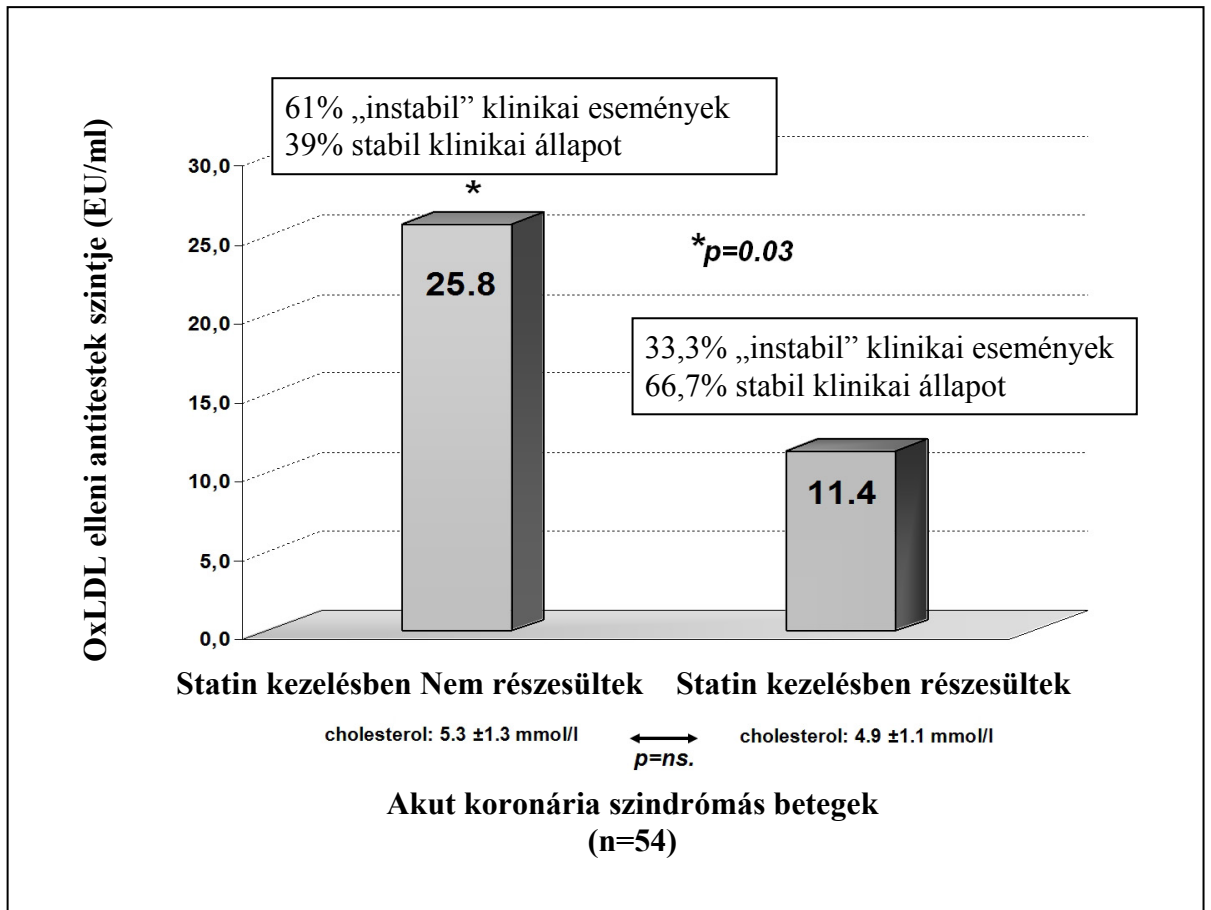
9. ábra: Az oxLDL elleni antitest szintek összehasonlítása akut koronária szindrómás betegekben és az egészséges kontroll csoportban

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 tartomány /25-75%/: 15,0 – 29,5 EU/ml) lényegesen emelkedett volt az alacsony rizikójú (szövődménymentes) csoporthoz képest (median: 11,4 EU/ml; interkvartilis tartomány /25-75%/: 6,3–14,0 EU/ml; $p < 0,001$; 10. ábra).



10. ábra: Az oxLDL elleni antitest szintek az akut koronária szindróma magas és alacsony rizikójú csoportjaiban

A kórházi felvétel előtt statint szedő tizenkét betegből csak négy betegnél észleltünk súlyos szövődeményeket 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 betegekben ($11,3 \pm 3,9$ EU/ml) összevetve a statinkezelésben nem részesült betegekkel ($25,9 \pm 25,2$ EU/ml; $p < 0,03$; 11. ábra).



11. ábra: Az oxLDL elleni antitest szintek az akut koronária szindróma statint szedő és nem szedő csoportjaiban

MEGBESZÉLÉS

Az atherosclerosis az artériás fal krónikus gyulladásos betegsége, melyben az immuno-inflammatorikus folyamatok kiemelkedő patológiai szereppel bírnak. Ezen immunmechanizmusok kulcsfontosságú, plakk-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) [66]. Az ellene irányuló autoantitestek (anti-oxLDL) nemcsak elősegítik az oxidált LDL felhalmozódását a makrofágokban („habos sejt képzők”), hanem olyan komplement asszociált és egyéb sejtes útvonalakat is aktiválnak, melyek az érfalban 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 [94]. 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) [114], mely indokolja a kísérletben az 5 μ g/ml alkalmazását, azonban ez atherosclerotikus lézióban 4-5x-ösére, de akár 70-szeresére is növekedhet [115], 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 kontrollokhöz 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 csoportban egyaránt csökkent a sejtosztódás értékeinek átlaga ($PI < 1,0$). Egy korábbi kísérletben Xavier és munkatársai hasonló eredményre jutottak [116], akik human koronária erekből származó endotél sejt kulturákon vizsgálták az 1–8 μ g/ml oxLDL hatását. Ebben a koncentráció tartományban az oxLDL gátolta az endotél sejtek osztódását a koncentráció növelésével arányosan citotoxikus hatást kifejtve [116]. Az oxLDL citotoxikus tulajdonságát endotél, simaizomsejt és limfoblast kulturákon is megerősítették [46; 117; 118;

119]. Antifoszfolipid szindrómában a 20 µg/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 progressiója 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 betegeinknek 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 betegekben a zajló akcelerált atherosclerosis mellett megtalálhatóak az antifoszfolipid antitestek, melyek a (bevezetésben részletezett) számos útvonalon erősítik a plakkban zajló gyulladásos folyamatokat. Az APS-ben észlelt akcelerált atherosclerosisban az anti-β2GPI 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 µg/ml oxLDL stimulációval jelentős IL-2 valamint IFN-γ szekréció emelkedést értünk a kontrollokhöz 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 T-sejt proliferációt és döntően a Th1 citokinek termelését serkenti antifoszfolipid szindrómában, mely az APS-ben patogén funkcióval bír és hozzájárul a betegség során zajló atherosclerosis akcelerálódásához.

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 atheromatosus plakk. A plakkban már az egészen korai fázisban (korai zsíros csík) megjelennek a makrofágok és a T-

limfociták. A legtöbb úgynevezett habos sejt - melyek scavenger és egyéb receptoraik révén a módosított glikoproteineket, oxLDL-t felveszik - monocita illetve makrofág. A makrofágok az atheroscleroticus érfalban proinflammatorikus citokineket, kemokineket, extracelluláris mátrix bontóenzimeket, reaktív oxigéngyököket, prosztanoidokat, komplement faktorokat termelnek, a jelen lévő T-sejt szubpopulációk közül a CD8 pozitív T-sejtek aránya fokozott. A plakokban B-sejtek és természetes ölősejtek is kimutathatóak illetve aktivált HLA-DR pozitív simaizomsejtek halmozódnak fel, közöttük 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) hátterében 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 simaizom 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 trombózis oka lehet), plakkon belüli mikrovérzések [46] és in situ plakk trombózis, valamint a plakk fibrózus sapkájának berepedése, mely az akut miokardiális infarktusok közel háromnegyedének a közvetlen oka.

A plakokban jelenleg három jól definiált antigén azonosítható: a hősokk 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 autoantitestes mechanizmust. Mivel ezek az autoantitestek a keringésben is megjelennek, azt a kérdést tettük fel, hogy alkalmasak-e az atherosclerosis 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, megjelenésük kapcsolatban van a koronária angioplasztika után bekövetkező koronária restenosis magas rizikójával.

Jelenleg a plakk gyulladós 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 gyulladós 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, sürgős koronária intervenció igénye, rekuráló iszkémiás fájdalom, 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 [62; 80; 81; 82; 83; 84] támogatják vizsgálati eredményeinket, az IgG-típusú anti-oxLDL patogén szerepét. Léteznek olyan

tanulmányok is, mint például a Santos és mtsai által végzett [120], 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.

ÖSSZEFOGLALÁS

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.

Igazoltuk, hogy az oxidált LDL magas koncentrációja *in vitro* serkenti a mononukleáris sejtek proliferációját, IL-2 valamint IFN- γ szekrécióját antifoszfolipid szindrómában. Bebizonyosodott, hogy ez a jelenség az APS-s betegekre jellemző, egészséges egyénekből szeparált limfocitáknál nem figyelhető meg. 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. A vénás APS etiológiáját tekintve felvethető, hogy a Th1-immunfolyamatok a kóros immunválasz perzisztálását támogatják és súlyosbítják a klinikai képet. Az artériás APS-ben ugyanakkor az oxLDL által triggerelt Th1-immunválasz (a diszlipidaemia és anti- β 2GPI antitestek mellett) jelentős szerepet kaphat az artériás trombózisokkal párhuzamosan kialakuló akcelerált atherosclerosis etiopatogenezisében.

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. Igazolódott, hogy a kezdeti emelkedett anti-oxLDL antitest-titerek akut koronária szindrómában összefüggnek a hospitalizációs periódus alatt fellépő instabilitást jelző klinikai eseményekkel. A statin kezelésben részesült akut koronária szindrómás betegekből a kezeletlenekhez viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb anti-oxLDL antitest szintek a statinok pleiotrop (anti-inflammatorikus) hatásával magyarázva indirekt bizonyítékul szolgálhatnak a plakk gyulladáshoz vezető folyamatok és ezen ellenanyagok szoros kapcsolatára. Az IgG-típusú anti-oxLDL és CRP szintek jó korrelációja ACS-ben szintén alátámasztja az antitestek fontos szerepét az atherosclerotikus plakk instabillá válásában.

Összességében megállapítottuk, hogy az oxidált LDL stimulálja a limfocita proliferációt és a Th1-típusú citokinek termelését antifoszfolipid szindrómában, mely akcelerált atherosclerosis-hoz 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.

Kulcsszavak: anti-oxLDL antitestek, oxidált LDL, antifosfolipid szindróma, akut koronária szindróma, atherosclerotikus plakk, stabil koronária betegség

SUMMARY

We investigated immune processes induced by oxidized LDL with the involvement of mononuclear cells separated from patients with antiphospholipid syndrome (APS), in addition, we analyzed the clinical relations of antibodies to oxLDL in patients with acute coronary syndrome and stable coronary artery disease.

In vitro, we could confirm that high concentrations of oxidized LDL increase proliferation and IL-2, IFN- γ secretion of mononuclear cells in antiphospholipid syndrome. It has been proven that this phenomenon is typical for patients with APS, it can not be observed in lymphocytes separated from healthy individuals. Based on the vascular localization of thromboembolic events, patients with APS were divided into arterious and venous subgroups. The oxLDL stimulus induced Th1-cytokine secretion and lymphocyte proliferation in both subgroups. In consideration of the etiology of venous APS, we suggest that the Th1-derived immune processes can promote persistence of pathological immune responses and worsen the clinical outcome. At the same time, oxLDL triggered Th1-derived immune mechanisms (with dyslipidaemia and anti- β 2GPI antibodies) can have an emphasized role in the etiopathogenesis of accelerated atherosclerosis which develops in parallel with arterial thromboses.

It has been detected that the level of IgG-type anti-oxLDL antibodies were elevated both in patients with acute coronary syndrome (ACS) and stable coronary artery disease compared to healthy controls, moreover, these antibodies were present in much larger concentration in acute coronary syndrome. In acute coronary syndrome, it has been confirmed that the elevated initial anti-oxLDL antibody-titer correlate well with unstable clinical events (complications such as circulatory failure, sudden cardiac death, malignant arrhythmias, recurrent angina) during hospitalization. There were significantly lower levels of IgG anti-oxLDL antibodies in patients with ACS on statin therapy compared to those without statin therapy, which can be due to the pleiotropic (anti-inflammatory) effects of statins. This phenomenon could provide an indirect evidence of close connection between these antibodies and inflammatory processes in the plaque. In ACS, the strong correlation of IgG-type anti-oxLDL antibodies and CRP can also support the important role of these antibodies in the progression of atherosclerotic plaque toward instability.

In summerizing these results, we conclude that oxidized LDL can stimulate lymphocyte proliferation and secretion of Th1-type cytokines in antiphospholipid syndrome,

which results in accelerated atherosclerosis. Moreover, the circulating IgG anti-oxLDL antibodies participate in unstable plaque-associated immune processes and their initial elevation has a predictive value in unstable outcome of acute coronary syndrome.

Keywords: antibodies to oxidized LDL, oxidized LDL, atherosclerotic plaque, antiphospholipid syndrome, acute coronary syndrome, stable coronary artery disease

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Prof. Dr. Zeher Margit egyetemi tanárnak, a DE OEC III. sz. Belgyógyászati Klinika vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra PhD munkám elkészítését.

Őszinte köszönetemet fejezem ki Dr. Soltész Pál témavezetőmnek, hogy minden területen hozzájárult szakmai fejlődésemhez, önálló munkára ösztönzött, széleskörű betekintést nyújtott a klinikumba és a kutatásba egyaránt, valamint végig támogatta PhD munkámat.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Sipka Sándornak, aki a laboratóriumi munka lehetőségét megteremtette, köszönöm Dr. Csípó Istvánnak, Dr. Gyimesi Editnek és Kovács Ildikónak, valamint Dr. Lakos Gabriellának, akikkel az immunológiai vizsgálatokat végeztük.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szekanez Zoltánnak, Dr. Szodoray Péternek, akik a publikációk összeállításában nyújtottak segítséget. Dr. Veres Katalinnak és Dr. Kerekes Györgynek, akiktől mindvégig sokat tanulhattam. Köszönet illeti az Intenzív Osztály orvosait és nővéreit (elsősorban Kocsis Zsoltnét, Pappné Farkas Ildikót és Sipos Andreát).

Külön megköszönöm családomnak és férjemnek, hogy türelmükkel, áldozatvállalásukkal végig mellettem álltak és támogattak munkám végzésében.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F et al: From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 830-834.
2. Terkeltaub RA: IL-10: an 'immunologic scalpel' for atherosclerosis? *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2823-2825.
3. Fuster V: Mechanisms leading to myocardial infarction. *Circulation* 1994; 90: 2126-2146.
4. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250.
5. Burke AP, Farb A et al: Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997; 336: 1276-1282.
6. Rudd JH, Narula J, Strauss HW et al: Imaging atherosclerotic plaque inflammation by fluorodeoxyglucose with positron emission tomography: ready for prime time? *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2527-2535.
7. Libby P, Geng YJ, Aikawa M et al: Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 330-335.
8. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP et al: Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003; 349: 2316–2325.
9. Hansson GK: Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-1890.
10. Bobryshev YV: Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 511-517.

11. Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874.
12. Sasaki N, Yamashita T, Takeda M et al: Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation* 2009; 120: 1996–2005.
13. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S et al: Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12: 178–180.
14. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z: Interleukin-17: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 2010; 21: 404-408.
15. Batuca JR, Amaral MC, Alves JD: Humoral mechanisms of atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 401-408.
16. Morimoto RI: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998; 12: 3788-3796.
17. Padmini E: Physiological adaptations of stressed fish to polluted environments: role of heat shock proteins. *Rev Environ Contam Toxicol* 2010; 206: 1-27.
18. Metzler B, Abia R, Ahmad M et al: Activation of heat shock transcription factor 1 in atherosclerosis. *Am J Pathol* 2003; 162: 1669–1676.
19. Xu Q, Schett G, Perschinka H et al: Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 2000; 102: 14-20.
20. Xu Q, Willeit J, Marosi M et al: Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 1993; 341: 255–259.
21. Prohászka Z, Füst Gy: Immunological aspects of heat shock proteins – the optimum stress of life. *Mol Immunol* 2004; 41: 29-44.

22. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T: Beta2-glycoprotein I, anti-beta2-glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res* 2004; 114: 461-465.
23. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM et al: Adhesion mechanism of human β_2 -glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18: 5166–5174.
24. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: B2-Glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.
25. Sherer Y, Shoenfeld Y: Mechanism of disease: atherosclerosis in autoimmun diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 1-8.
26. Del Papa N, Guidali L, Sala A et al: Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies: human polyclonal and monoclonal anti-beta2 glycoprotein I antibodies react in vitro with endothelial cells through adherent beta2 glycoprotein I and induce endothelial activation. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 5511-5561.
27. Raschi E, Testoni C, Borghi MO, Fineschi S, Meroni PL: Endothelium activation in the antiphospholipid syndrome. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 282-286.
28. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N et al: Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 5998-6004.
29. Vincent PE, Sherwin SJ, Weinberg PD: The effect of the endothelial glycocalyx layer on concentration polarisation of low density lipoprotein in arteries. *J Theor Biol* 2010; 265: 1-17.
30. Gouverneur M, Van Den Berg B, Nieuwdorp M, Stroes E, Vink H: Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J Intern Med* 2006; 259: 393-400.

31. Steinberg D: The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res* 2009; S376–381.
32. Leitinger N: Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 1063–1071.
33. Biasucci LM, Santamaria M, Liuzzo G: Inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndrome. *Minerva Cardioangiol* 2002; 50: 475-486.
34. Auer J, Berent R, Lassnig E, Eber B: C-reactive protein and coronary artery disease. *Jpn Heart J* 2002; 43: 607-619.
35. Mirat J, Raguz M, Romic Z et al: Inflammation markers in acute coronary syndrome. *Acta Med Croatica* 2004; 58: 115-117.
36. Hulthe J, Fagerberg B: Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines. (AIR Study) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1162-1167.
37. Ehara S, Ueda M, Naruko T et al: Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 103: 1955-1960.
38. Itabe H: Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis. *Clin Rev Allerg Immunol* 2009; 37: 4–11.
39. Stocker R, Keaney Jr JF: Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381–1478.
40. Harkewicz R, Hartvigsen K, Almazan F et al: Cholesteryl ester hydroperoxides are biologically active components of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2008; 283: 10241-10251.

41. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and Q1 fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125–1131.
42. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA et al: Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002; 277: 49982–49988.
43. Yoshida H, Kondratenko N, Green S et al. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J* 1998; 334: 9-13.
44. Yunker LM, Parboosingh JS, Conradson HE et al: The effect of iron status on vascular health. *Vasc Med* 2006; 11: 85-91.
45. Jeney V, Komódi E, Nagy E és mtsai: Suppression of hemin-mediated oxidation of low-density lipoprotein and subsequent endothelial reactions by hydrogen sulfide (H₂S). *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 616-623.
46. Emőke Nagy, John W. Eaton, Viktória Jeney et al: Red Cells, Hemoglobin, Heme, Iron, and Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30:1347-1353.
47. Schöneich C, Dillinger U, von Bruchhausen F, Asmus KD: Oxidation of polyunsaturated fatty acids and lipids through thiyl and sulfonyl radicals: reaction kinetics, and influence of oxygen and structure of thiyl radicals. *Arch Biochem Biophys* 1992; 292: 456–467.
48. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481–487.

49. Levy AP, Levy JE, Kalet-Litman S et al: Haptoglobin genotype is a determinant of iron, lipid peroxidation, and macrophage accumulation in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 134–140.
50. Kalet-Litman S, Moreno PR, Levy AP: The haptoglobin 2-2 genotype is associated with increased redox active hemoglobin derived iron in the atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2010; 209: 28–31.
51. Yamamoto S: Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1128: 117–131.
52. Zhu H, Takahashi Y, Xu W et al: Low density lipoprotein receptor-related protein-mediated membrane translocation of 12/15-lipoxygenase is required for oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *J Biol Chem* 2003; 278: 13350–13355.
53. Kühn H, Römisch I, Belkner J: The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 1014–1029.
54. Klebanoff SJ: Myeloperoxidase: friend or foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598–625.
55. Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG: Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem* 2009; 55: 1462–1470.
56. Menzel EJ, Sobal G, Staudinger A: The role of oxidative stress in the long-term glycation of LDL. *Biofactors* 1997; 6: 111–124.
57. Tselepis AD, Chapman MJ: Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atherosclerosis* 2002; 3: 57-68.
58. Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M: Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog Lipid Res* 2003; 42: 93-114.

59. Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina SAP et al: Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1212: 353-360.
60. Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, Watson AD, Vora D: Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis. *Trends Cardio Med* 2001; 11: 142-147.
61. Parthasarathy S, Weiland E, Steinberg D: A role of endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1046-1050.
62. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R et al: Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339: 883-887.
63. Chiesa R, Melissano G, Castellano R et al: In search of biological markers of high-risk carotid artery atherosclerotic plaque: enhanced LDL oxidation. *Ann Vasc Surg* 1998; 12: 1-9.
64. Prohászka Z, Füst Gy: Az atherosclerosis, mint gyulladákos betegség. *MOTESZ Magazin* 2006; 1: 37-40.
65. Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, Monaco C: Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *J Inflamm (Lond)* 2011; 28: 1-17.
66. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A et al: Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation* 2005; 112: 3337-3347.
67. Shoenfeld Y, Sherer Y, Haratz D: Atherosclerosis as an infectious inflammatory and autoimmune disease. *Trends Immunol* 2001; 22: 293-295.
68. Oksjoki R, Kovanen PT, Lindstedt KA et al: OxLDL-IgG immune complexes induce survival of human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 576-83.

69. Shoenfield Y, Sherer Y, George J, Haratz D: Autoantibodies associated with atherosclerosis. *Ann Med* 2000; 32: 37-40.
70. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z et al: Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 569–573.
71. Kajiwara T, Yasuda T, Matsuura E: Intracellular trafficking of B2GPI complexes with lipid vesicles in macrophages: implications on the development of APS. *J Autoimmunity* 2007; 29: 164-173.
72. Lopez D, Kobayashi K, Merrill JT et al: IgG autoantibodies against beta2-glycoprotein I complexed with a lipid ligand derived from oxidized low-density lipoprotein are associated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol* 2003; 10: 203–211.
73. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13043-13048.
74. George J, Afek A, Gilburd B et al: Hyperimmunization of apo-E deficient mice with homologous malondialdehyde low density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis* 1998; 138: 147-152.
75. Palinski W, Miller E, Witztum JL: Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor deficient rabbits with homologous malondialdehyde –modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 821-825.
76. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B et al: Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 2002; 109: 745-753.
77. Iughetti L, Volta C, Maggi E et al: Circulating antibodies recognizing oxidatively modified low-density lipoprotein in children. *Pediatr Res* 1999; 45: 94-99.

78. Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M et al: Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2000; 148: 171-177.
79. Fukumoto M, Shoji T, Emoto M et al: Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 703-707.
80. Wu, R., Nityanand, S., Berglund, L. et al: Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 3159-3163.
81. Edelstein C, Pfaffinger D, Hinham J et al: Lysine-phosphatidylcholine adducts in kringle V impart unique immunological and potential pro-inflammatory properties to human apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 2003; 278: 52841-52847.
82. George J, Ahmed A, Patnaik M et al: The prediction of coronary atherosclerosis employing arteficial neural networks. *Clin Cardiol* 2000; 23: 453-456.
83. George J, Harats D, Bakhsi E et al: Anti-oxidized low density lipoprotein antibody determination as a predictor of restenosis following percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Immunol Lett* 1999; 68: 263-266.
84. Bergmark C, Wu R, de Faire U et al: Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 441-445.
85. Goncalves I, Gronholdt ML, Söderberg I et al: Humoral immune response against defined oxidized low-density lipoprotein antigens reflects structure and disease activity of carotid plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1250–1255.

86. Tsimikas S, Brilakis ES, Lennon RJ et al: Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *J Lipid Res* 2007; 48: 425–433.
87. Wu R, Shoenfield Y, Sherer Y et al: Anti-idiotypes oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations: possible immunomodulation of atherosclerosis. *Autoimmunity* 2003; 36: 91-97.
88. Freire de Carvalho J, Sherer Y, Shoenfeld Y: The fine-tuning of anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in cardiovascular disease and thrombosis. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1157-1159.
89. Nagarajan S: Anti-OxLDL IgG blocks OxLDL interaction with CD36, but promotes FcγR, CD32A-dependent inflammatory cell adhesion. *Immunol Lett* 2007; 108: 52-61.
90. George J, Blank M, Hojnik M et al: Oxidized low density lipoprotein (Ox LDL) but not LDL aggravates the manifestations of experimental antiphospholipid syndrome (APS). *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 227-233.
91. Ames PR, Delgado AJ, Lopez LR et al: Antibodies against beta2-glycoprotein I complexed with an oxidised lipoprotein relate to intima thickening of carotid arteries in primary antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol* 2006; 13: 1–9.
92. Spronk PE, Overbosch EH, Scut NH: Severe atherosclerotic changes including aortic occlusion, associated with hyperhomocysteinaemia and antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 699–701.
93. Evans SM, Brittenden J, Adam DJ et al: Vascular surgical society of Great Britain and Ireland: Prevalence and significance of thrombophilia in patients with intermittent claudication. *Br J Surg* 1999; 86: 702–703.
94. Matsuura E, Kobayashi K, Hurley BL, Lopez LR: Atherogenic oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I (oxLDL/beta2GPI) complexes in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2006;15(7):478-483.

95. Karakantza M, Theodorou GL, Meimaris N et al: Type 1 and type 2 cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Hematol* 2004; 83: 704–711.
96. Boyd HC, Gown AM, Wolfbauer G et al: Direct evidence for a protein recognised by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 1989; 135: 815-825.
97. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS et al: Modification of low-density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3883-3887.
98. Stemme S, Faber B, Holm J et al: T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3893-3897.
99. Zhang N, Ahsan MH, Purchio AF, West DB: Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: Response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition. *J Immunol* 2005; 174: 8125–8134.
100. Labarrere CA, Zaloga GP: C-reactive protein: From innocent bystander to pivotal mediator of atherosclerosis. *Am J Med* 2004; 117: 499-507.
101. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK: Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729–736.
102. Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM: Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med* 2004; 4: 385–393.
103. Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, et al: Pravastatin has cholesterol lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 684–691.

104. Shiomi M, Ito C: Effect of cerivastatin sodium, a new inhibitor of HMG-CoA reductase, on plasma lipid levels, progression of atherosclerosis, and lesional composition in the plaques of WHHL rabbits. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 961–968.
105. Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, et al: HMG-CoA reductase inhibition with atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 2057–2064.
106. Ferro D, Parrotto S, Basili S, et al: Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 427–431.
107. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, et al: Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of Wantanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2001; 103: 993–999.
108. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, et al: Cerivastatin, an HMGCoA reductase inhibitor, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; 103: 276–283.
109. Bellosta S, Via D, Canavesi M, et al: HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1671–1678.
110. Crisby M, Fredriksson GN, Shah PK, et al: Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001; 103: 926–933.
111. Niwa S, Totsuka T, Hayashi S: Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol* 1996; 18: 669–675.

112. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001; 103: 357–362.
113. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T et al: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
114. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT et al: Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 331-339.
115. Nishio E, Arimura S, Watanabe Y: Oxidized LDL induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 413-418.
116. Xavier HT, Abdalla DS, Martinez TL et al: Effects of oxidized LDL on in vitro proliferation and spontaneous motility of human coronary artery endothelial cells. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83: 493–497.
117. Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Negre-Salvayre A: Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB J* 1994; 8: 1075-1080.
118. Dong Y, Zhang M, Wang S et al: Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes* 2010; 59: 1386-1396.
119. Nishi K, Itabe H, Uno M et al: Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1649–1654.

120. Santos AO, Fonseca FA, Fischer SM et al: High circulating autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein are related to stable and lower titers to unstable clinical situation. *Clin Chim Acta* 2009; 406: 113-118.

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., Tumpek 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., Szekanez, 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

