

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**AZ ANGIOGENEZIS JELENTŐSÉGE ÉS GÁTLÁSÁNAK  
HATÁSAI AZ ÍZÜLETI GYULLADÁSRA ÉS AZ  
ÉRRENDSZERRE ARTHRITISZEKBE**

**Dr. Balogh Emese, MD**

**Témavezető: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, MD, PhD, DSc**



**DEBRECENI EGYETEM  
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2019**

# **Az angiogenezis jelentősége és gátlásának hatásai az ízületi gyulladásra és az érrendszerre arthritiszekben**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Klinikai Orvostudományok Tudományágban

Írta: Dr. Balogh Emese, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája  
Mozgásszervi betegségek programja keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

## **A doktori szigorlati bizottság:**

elnök: Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora  
Prof. Dr. Nagy György, az MTA doktora

## **A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:**

DE ÁOK Reumatológiai Tanszék 1. emeleti könyvtára  
2019. november 22. péntek, 11:00

**Az értekezés bírálói:** Dr. Fagyas Miklós, PhD  
Prof. Dr. Komócsi András, az MTA doktora

## **A bírálóbizottság:**

elnök: Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora  
Prof. Dr. Nagy György, az MTA doktora  
Dr. Fagyas Miklós, PhD  
Prof. Dr. Komócsi András, az MTA doktora

## **Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:**

DE ÁOK Tudományos Konferencia Központ, Kenézy Villa  
2019. november 22. péntek 13:00

# **1 BEVEZETÉS**

## **1.1 Az endothél és a gyulladáshoz vezető angiogenezis folyamata**

### **1.1.1 A gyulladt ízület endothéljének pathológiája inflammatórikus arthritiszekben**

Az angiogenesis már meglévő erekből történő új kapillárisok létrejöttét foglalja magában és el kell különítenünk azt a vaszkulogenezistől, melyben a kapilláris érelágazódás endothelialis prekursor sejtekből (EPC-k) történik egy primitív érhálózatot formálva. Az inflammatórikus arthritiszek típusos betegségek, ahol az angiogenesis a vaszkuláris integritás morfológiai megromlásához vezet. Ez olyan események sorozatából áll, ahol a meglévő erekből rendezetlen módon új kapillárisok képződnek. Ezt a lépcsőzetesen kontrollált folyamatot az angiogenezist serkentő és gátló regulátorok egyensúlyának felborulása irányítja, amely folyamatos átépüléssel jár. Az angiogén mediátorok a receptorokon keresztül aktiválják az endothélsejteket különböző jelátviteli útvonalakat bekapcsolva. Az aktivált sejtek proteáz enzimeket termelnek, amelyek károsítják az endothél bazális membránját és az interstíciumot, így egy áteresztőbb endothél kialakulásához vezetve. A kritikus változások, mint a vazodilatáció és permeabilitásfokozódás érsérülést, majd következményes regenerációt eredményez. Az endothélsejtek migrálnak és új kapilláriskezdeményeket formálnak. A kapilláriskezdemény közepvonalaiban proliferáció és intenzív mitózis, a végeknél pedig migrációs folyamatok zajlanak. Két kapilláriskezdemény végeinek egyesülésével végül új lumen formálódik. A kapillárisok-képződés az új bazális membrán megjelenésével és az ér pericyták által elősegített stabilizációjával fejeződik be. A szinoviális oxigénellátottság szegényes marad a rendezetlen mikrovaszkulátúra kialakulása miatt. Ez a gyulladás helyén levő, valamint a helyszínre törő immunsejtek megnövekedett energiaigényének köszönhetően hypoxiás mikrokörnyezet létrejöttét és a mitokondriális működés felborulását vonja maga után.

### **1.1.2 Gyulladáshoz vezető mediátorok az ízületben**

Számos gyulladáshoz vezető citokin, kemokin, kemokin receptor, proteázok, mátrix molekulák, növekedési faktorok és adhéziónak molekulák szerepét igazolták a gyulladt szövetek újraképződésében. Ebben a fejezetben azokról tárgyalunk bővebben, amelyek az angiogenesis elősegítésében és a fenntartásában fontosak.

Az érújdonképződés folyamata *növekedési faktorok (GF)*, mint a vaszkuláris endothéliális növekedési factor (VEGF) és angiopoetin-2 (Ang2) szintjének megemelkedésével indul, amely az endothélsejtek proliferációjához és elágazódásához vezet. A VEGF-nek kiemelt szerepe van az új erek képződésében. Az Ang2 a Tirozin Kináz Receptor-2 (Tie2) parciális agonistája és az angiopoetin-1-el (Ang1) a Tie2 kötőhelyekért versengve (az Ang1 teljes agoinsta hatásával ellentétben) egy lényegesen alacsonyabb Tie2 aktivitás kiváltója. Az Ang2-Ang1 egyensúlya szabja meg a Tie2 aktivációjának fokát, és az Ang2 túlsúlya az erek érési folyamata ellen hat, VEGF jelenlétében pedig egy hibás kapilláriselágazódást segít elő. Többféle VEGF izoforma létezik, a VEGF-A-t tekintik az angiogenesis fő regulátorának. Egyéb szabályozó molekulák, melyek VEGF általi vagy attól független útvonalon hatnak, az interleukinok (IL), így az IL-6, IL-17, IL-18 és a nitrogén-monoxid, endothelin-1, monocyta/makrofág migrációt gátló faktor (MIF), placenta GF (PIGF), fibroblaszt GF (FGF-1 and FGF-2), epidermális GF (EGF), hepatocytá GF (HGF), heparin-kötő endothéliális növekedési faktor (HB-EGF), keratinocytá GF (KGF), inzulinszerű GF-1 (IGF-1), kötőszöveti GF (CTGF), thrombocytá-eredtű GF (PDGF), valamint a transzformáló GF- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Az ér maturációs folyamata során az Ang1 fontos szerepet tölt be a pericyták begyűjtésében az újonnan formált bazális membrán köré, így segítve a keringés helyi beindulását.

A fő *proinflammatorikus és proangiogén citokinek* a tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukinok (IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18), granulocytá kolónia stimuláló faktor (G-CSF), granulocytá-monocyta kolónia stimuláló faktor (GM-CSF), és onkosztatin M is kifejtethetnek az endothélre gyakorolt közvetlen hatást, vagy pedig a gyulladással sejtekből történő proangiogén molekulák szekrécióját előidézve közvetetten hatnak.

A *kemokineknek és kemokin receptoroknak* szintén fontos szerepe van az inflammatorikus angiogenesis progressziójában, és az inflammatorikus arthritisek kapcsán már számos képviselőjük bemutatásra került a CXC, CC, C és CX3C családok tagjaiból. Egyesek erős kifejeződést mutatnak az ízületi belhártya szöveti felszínén. A kemokinek közvetetten is elősegíthetik az érújdonképződési folyamatot a különböző immunsejteknek a gyulladás helyszínére történő kemoattrakciójával.

Az *extracelluláris mátrix molekulák (ECM) és sejtadhéziós molekulák (CAM)*, a thrombospondin-1 (TSP-1) glikoprotein különböző jelátviteli útvonalon keresztül regulálják

az endothéliális adhéziót és neovaszkularizációt. Egyes növekedési faktorok proteoglykánokat kötnek az angiogenezis során.

*A proteázok az ECM-t emésztik, így elősegítve a növekedési faktorok és egyéb angiogenezis mediátorok felszabadulását és következményes gyulladással érújdonképződést.*

*Az egyéb fontos angiogenezist befolyásoló faktorokat nem tárgyaljuk részleteiben, mivel kutatásaink ezek vizsgálatára nem terjedtek ki.*

### **1.1.3 A szinoviális angiogenezist befolyásoló tényezők**

A *hypoxia-HIF-VEGF-Ang/Tie* rendszernek kiemelkedő jelentősége van az inflammatorikus arthritiszekhez társult angiogenezis kapcsán. A hypoxia a sejtek általi oxigénhiányos állapot, melynek során a molekuláris oxigén hiánya felülmúlja a keringés által nyújtott oxigénkínálatot és ezáltal egy bioenergetikai krízishelyzetet generál. A reumatoid szinoviumban kialakuló hypoxia mechanizmusaira 3 hipotézis elmélet próbál magyarázatot adni: egyrészt a szinoviális hyperplázia, a gyulladással folyadékgyülem és a merev ízületi tok hatására a kis kapillárisok elzáródnak; másrészt a migráció és proliferáció miatt a sejtek és közeli erek közötti távolság megnő, így a metabolikus igény is megemelkedik; valamint az angiotenzin konvertáz enzim elősegíti az angiotenzin II termelését, amely következményes vazokonstrikciónak és a hypoxia romlásáért felel. Az arthritiszben újonnan képződött erek rendellenes működésűek és nem képesek a szöveti oxigénegyensúly fenntartására ezzel a szinoviális szövetet és a szinoviális folyadékot hypoxiás állapotban tartják. Ez a gyulladással szövetben angiogén stimulusként szolgál, és a betegségaktivitás fokozódásával és a neovaszkularizációt elősegítő VEGF expressziójának erősödésével jár. A hypoxia kedvez a helytelen sejtmetabolizmusnak és a mitokondriumok rendellenes működésének, a reaktív oxigénvegyületek (ROS) túlprodukciónak és a gyulladás fokozódásával jár, amely végül egy éretlen, instabil mikrovaszkulátúra létrejöttét facilitálja. Az angiogén faktorok (mint például a VEGF) akkumulációját a hypoxia és a hypoxia indukálta faktorok (HIF-1 and HIF-2) segítik. A HIF HIF- $\alpha$  és HIF- $\beta$  egységekből áll. A HIF- $\alpha$  három izoformája közül a HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  strukturális és funkcionális hasonlóságokat mutat, melynek alapján elmondható, hogy hypoxiás környezetben mindkettő képes a sejtmagba transzlokálódni és a HIF-1 $\beta$ -val dimerizálódni. Ez a heterodimer a hypoxiára érzékeny DNS régiókhoz (HRE) kötődik és különböző gének átírását indítja el. Ezek közül a legfontosabb target gén a VEGF. Normoxiában a HIF- $\alpha$ -t prolyl-hydroxilázok hydroxilálják, amely aztán proteosómális

degradáción megy keresztül, azonban hypoxia esetén ez a hydroxilációs folyamat gátolva van és ez a HIF-1 $\alpha$  stabilizációjához, HIF-1 $\beta$ -val történő dimerizációjához és HRE-t tartalmazó gének következményes transzkripciójához vezet. Mind HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  erős expressziót mutatnak a rheumatoid arthritiszes (RA) szinoviális szövetben. A szöveti hypoxia azonban HIF-től független jelátviteli utakon keresztül is hathat, mint például a peroxiszóma-proliferátor-aktivált- $\gamma$  receptorokon (PPAR- $\gamma$ ) át. Az Ang1-Tie2 komplex a VEGF-en keresztüli interakcióval stimulálja az érstabilizálást és érújdonképződést. Ezzel ellentétben az Ang2 az Ang1 antagonistája, az erek érési szakaszát gátolja. Mind Ang1, Tie2 és VEGF kimutathatóak az RA szinoviumban már a betegség korai szakaszában. A hypoxia továbbá elősegíti a CXCL12 angiogén kemokin RA szinoviális fibroblasztok általi termelését is.

#### **1.1.4 Angiogén mediátorok mint terápiás célpontok és angiosztatikus szerek**

A VEGF-függő jelátviteli útonalakat már széles körben megcélozták a VEGF és VEGF receptor (VEGFR) inhibitorok - főként daganatkutatásokban történő - alkalmazásával. Limitált számú preklinikai vizsgálat is rendelkezésre áll egerek kollagén indukált arthritiszében tanúsított ígéretes eredményekkel. Egy bispecifikus Ang2 ellenes, genetikailag adalimumabhoz fuzionált peptid növelte az anti-TNF hatékonyságot. A HIF-1 arthritiszben és daganatokban való megcélzását is leírták már.

*Indirekt támadás a konzervatív reumatológiai terápiás szerek által:* Ezek a szerek nem-specifikusan szuppresszálják az angiogenezist. Az infliximab általi TNF- $\alpha$  blokádnak csökkentette a VEGF, Ang1 és Tie2 expresszióját, valamint az RA szinovium vaszkularitását. A certolizumab-pegol gátolja a TNF-függő angiogenezist. Az anti-IL-6 receptor antitest tocilizumab is csökkentette a szérum VEGF szintjét RA-ban. A JAK-inhibitor tofacitinib a migráció, invázió és proangiogén citokinszekréció gátlását eredményezte pszoriázisos arthritiszben in vitro. Az IL-17 szerepe is felmerült a gyulladásos angiogenezisben, így az IL-17 blokádnak is ígéretes célpont lehet a jövőben.

A különféle kemokin ligandok elleni neutralizáló antitestek alkalmazása is terápiás és preventív előnyökkel járt már számos állati RA modell esetén. A kemokin hálózatban megtalálható komplex regulációs átkapcsolások miatt ezen törekvések azonban humán RA esetén nem jártak sikerrel.

Az *antibiotikumok általi célzás* - minocyclin, fumagillin analógok, valamint, deoxyspergualin, roxithromycin és clarithromycin - szintén angiogenesis gátló hatású és csökkenti a VEGF felszabadulását.

A tradicionális *herbáriák* szerepét is vizsgálták az angiogenesis szabályozásában. A szkopolin, celasztrol, fisztein, rezveratrol, kurkuma, és tetramethylpyrazine gátolja az angiogén citokinek termelését egér arthritisz modellek esetén.

### **1.1.5 Intracelluláris útvonalak és potenciális terápiás célpontok**

Számos jelátviteli útvonal szerepét (NFkB, MAPK, PI3K, ICOS, JAK/STAT, FAK, Src, Spk-1, Notch, neurológiai jelátvitel) hangsúlyozták a gyulladásos arthritiszek angiogenesisének pathogenesisében, s ezek gátlását főként daganatos betegségek esetén vizsgálták, de pár adat arthritiszkutatásokból is rendelkezésünkre áll.

## **1.2. Autoimmun-inflammatórikus atheroszklerózis**

### **1.2.1 Autoimmun atheroszklerózis, mint a gyulladásos arthritiszekhez kapcsolt felgyorsult angiogenesis szisztémás manifesztációja**

Az RA és más inflammatórikus arthritiszek emelkedett kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással járnak, ami az autoimmun atheroszklerózis folyamatainak köszönhető. Számos immunsejt, proinflammatórikus citokin, kemokin, növekedési faktor, proteázok, oldott vagy sejtfelszíni adhéziós molekulák és más mediátorok is jelentős szereppel bírnak az inflammatórikus atheroszklerózis és angiogenesis szabályozásában. Ezek közül egyesek a vaszkuláris események potenciális biomarkereiként is megállnak a helyüket. Tradicionális és gyulladásos rizikótényezők jósolják meg az arthritiszhez kapcsolt atheroszklerózis létrjöttét, és azt is feltételezik, hogy RA-ban a vaszkulátúra pathológiája a felfokozott szisztémás gyulladás következménye. A tradicionális rizikófaktorokat nem tárgyaljuk, mivel a gyulladásos útvonalak relevánsabbak a biomarkerek szempontjából. Számos pathológiás mechanizmus átfedést mutat az arthritisz és az inflammatórikus atheroszklerózis között. Mind a gyulladt szinóriumot, mind pedig az érfalakat inflammatórikus sejtek infiltrálják következményes endothéliális aktiváció kíséretében. A

szinoviális gyulladás és az atheroszklerotikus plakk-formáció, -progresszió és -ruptúra inflammatórikus T-sejtek és makrofágok által mediált folyamat. A szinoviális gyulladás a hypoxia indukálta neovaszkularizáció és angiogén hatású VEGF produkciója által erősödik. Az angiogén faktorok szintjének megemelkedése és az érújdonképződés a ruptúrakockázat elővetítője. A végső szöveti degradációs folyamatot mátrix metalloproteinázok katalizálják mind az atheroszklerotikus plakk ruptúrája és thrombózisa (a fibrózus sapka eróziójával), mind pedig az ízületi destrukció során. A genetikai, környezeti változásokhoz kötődő tényezők és az autoimmunitás háromszöge befolyásolja a szinoviális gyulladást és az atheroszklerózist egy olyan szisztémás gyulladás kialakításával, amely endothéliális diszfunkcióhoz, arteriális merevséghez és atheroszklerózishoz vezet.

### **1.2.2 Szisztémás inflammatórikus és angiogén mediátorok autoimmun atheroszklerózis esetén**

A szinoviális gyulladás és az autoimmun atheroszklerózis során is kulcsfontosságú esemény a gyulladással sejt és mediátorok helyi felhalmozódása. Számos, ebből a szempontból jelentős gyulladással faktort azonosítottak, és elmondható, hogy a proinflammatórikus mediátorok többsége angiogén hatással is rendelkezik. Munkacsoportunk és más szerzők is vizsgálták ezen mediátorok autoimmun atheroszklerózisra és kardiovaszkuláris betegségekre (CVD) kifejtett szerepét. A különféle proangiogén faktorok (VEGF, PDGF, FGF, HGF) által indukált érfali neovaszkularizáció segíti az atheroszklerózist. Több proinflammatórikus citokin, kemokin, adhéziós molekula, proteázok és egyéb faktorok szerepe lett leírva a gyulladással szinoviumban és a szisztémás atheroszklerózis angiogén folyamatában. Egy korábbi vizsgálat emelkedett VEGF, Ang2 és PDGF szinteket demonstrált, melyek pozitívan korreláltak a hosszabb RA betegség tartammal. A megnövekedett Ang1 és Ang2 szintek szintén pozitívan korreláltak a magas C-reaktív proteinnel (CRP), a szérumban PDGF magas koncentrációi pedig a megnövekedett carotid intima-media vastagsággal (ccIMT).

## **2 CÉLKITŰZÉSEK**

### **2.1 Első Vizsgálat**

Ezen vizsgálatban a defektív angiogenezis, oxidatív stressz, megváltozott celluláris bioenergetika és mitokondriális diszfunkció közötti kölcsönhatást vizsgáltuk infmlammatórikus arthritiszek esetében. Erre a célra RA szinoviális fibroblaszt sejteket (RASFC) és humán endothéliális (HUVEC) sejteket tanulmányoztunk a következők igazolására:

- az oxidatív stressz káros hatással van a sejtmetabolizmusra az aerob és anaerob légzési folyamatok során RASFC és HUVEC sejtek vizsgálata esetén
- A megváltozott bioenergetika fokozza a ROS produkciót, növeli a mitokondriális pontmutációkra való DNS érzékenységet és a mitokondriális komplexek aktivitáscsökkenését vonja magával RASFC vizsgálata esetén
- a proinflammatórikus és proangiogén válaszok fokozódnak, amennyiben RASFC oxidatív stressznek van kitéve
- az angiogenezis, oxidatív stressz és a megváltozott energiametabolizmus egyidejű kölcsönhatása igazolható humán RA szinoviális szövet vizsgálatával
- a tumor nekrozis faktor gátló (TNFi) terápia képes a szinoviális angiogenezis csökkentésére RA-s betegeknél.

## **2.2 Második Vizsgálat**

RA-s és AS-s betegek bevonásával a következőket tanulmányoztuk, hogy az inflammatórikus arthritiszekhez kapcsolt angiogenezis szabályozásának komplexitásáról közelebbi képet nyerjünk:

- Egy év hosszúságú TNFi terápia hatása a szérum angiogenezis biomarkereinek termelődésére
- Az angiogén biomarkerek által jelzett angiogén aktivitás mértéke az atheroszklerózisra, vaszkuláris patofiziológiára, orális egészségre és pár egyéb klinikai paraméterre vonatkoztatva.

Kutatásunk ezen része még nem került folyóiratban történő publikálásra.

## **3 MÓDSZEREK**

### **3.1 Első Vizsgálat**

#### **3.1.1 Betegek gyűjtése, térdízületi arthroszkópia és szinoviális szöveti minta nyérése**

Tizenöt aktív térdízületi gyulladással rendelkező RA-s beteg került kiválasztásra a vizsgálatok helyszínén: Reumatológiai Tanszék, St. Vincent's University Hospital, Dublin, Írország. Betegük a betegségmódosító szerek használatára rezisztensnek bizonyult és biológiai terápia elindítására vártak. Négyváltozós betegéaktivitási index (DAS28-CRP) került kiszámításra a viziteken (T0 és T3) a nyomásérzékeny és duzzadt ízületek, a beteg által értékelt globális egészségbecslés (PGH) és a C-reaktív protein (CRP) használatával. A betegek térdízületi arthroszkópián estek át a biológiai terápia elkezdése előtt (T0), majd 3 hónappal azt követően (T3). Szinoviális szöveti (ST) biopsziákat gyűjtöttünk primer szinoviális fibroblasztok izolálásával a későbbi szövettani vizsgálatok céljára.

#### **3.1.2 Rheumatoid arthritisz szinoviális fibroblaszt sejtek (RASFC) tenyésztése**

Az arthroszkópia során nyert RASFC-t 1 mg/ml 1-es típusú kollagenázzal (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) Gibco RPMI 1640 médiumban (Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK) emésztettük 4 órán keresztül 37 °C-os hőmérsékletben és 5 % CO<sub>2</sub>-t tartalmazó nedvesített levegő környezetében. A szétvált sejteket RPMI 1640 médiumot tartalmazó steril műanyagflakonokba helyeztük a következők hozzáadásával: 10 % Gibco FCS (Thermo Fisher Scientific), 20 mM 4-(2hydroxyethyl)-1-piperazinethánszulfonsav (Thermo Fisher Scientific), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) és amphotericin B (Fungizone 0.25 µg/ml; Invitrogen, Plymouth, MN, USA). A sejteket konfluenciáig növesztettük és a 4. és 7. elválasztás között használtuk fel. A RASFC-t 96 lyukú csíklmezekbe és T25 flakonokba helyeztük és 4-hydroxynonenál (4-HNE) (2.5 µM; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) jelenlétében (a lipidperoxidációnak egy magas reaktivitású produktuma) vagy bazális tápoldatban (0.1 % ethanol) tenyésztettük. A kísérleteinkben használt 4-HNE koncentráció kiválasztásánál korábban publikált sejtviabilitási vizsgálatok eredményeit vettük alapul. A stimulációt követően a felfokozott oxidatív stress ténye, a

mitokondriális diszfunkció és angiogén válaszok kerültek megítélésre, ahogyan azt majd a későbbiekben bemutatjuk.

### **3.1.3 Humán köldökvéna endotheliális sejtek (HUVEC) tenyésztése**

HUVEC (Lonza, Walkerville, MD, USA) sejteket inkubáltunk gazdagítva MCDB (Thermo Fisher Scientific) L-glutamin (Thermo Fisher Scientific), 0.5 ml epidermális növekedési faktor (Thermo Fisher Scientific), 50 ml FCS (Thermo Fisher Scientific), 0.5 ml of hydrokortizon, penicillin (100 U/ml; Bioscience), streptomycin (100 U/ml; Bioscience) és Fungizone (0.25 µg/ml; Bioscience) hozzáadásával. A sejtek 37 °C-on párásított levegőben 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében lettek tenyésztve, majd tripszin-ethyléndiamintetraecetsav (Lonza) hozzáadásával szétválasztva. A sejteket a 20. és 30. szétválasztás között használtuk fel.

### **3.1.4 Oxigénfelhasználási sebesség (OCR) és extracelluláris acidifikációs ráta (ECAR) Seahorse technológiával vizsgálva**

Az OCR és az oxidatív foszforilációt (OXPHOS) és glikolízist jellemző ECAR kerültek mérésre oligomycinnel (2 µg/ml), trifluorokarbonilcyanid phenylhydrazonnal (FCCP; 5 µM), antimycin A-val (2 µM) és 2-deoxyglükózzal (2-DG; 25 mM) való kezelés előtt és azt követően Seahorse XF24 analízistechnológia segítségével (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RASFC és HUVEC 30000 sejt/lyuk konfluenciáig lett tenyésztve Seahorse XF96 lyukú mikrolemezekre (Agilent Technologies) a transzfert követő 24 órás adhézió kíséretében. A sejteket assay médiummal öblítettük (nem bufferelt DMEM 10 mM glükózzal, 1 mM nátrium-pyruvátal és 2 mM L-glutaminnal, pH 7.4) mielőtt azokat ugyanezzel a médiummal 30 percig CO<sub>2</sub>-mentes inkubátorban 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően a sejteket 4-HNE-vel (2.5 µM) és bazális tápoldattal stimuláltuk 2 órán keresztül. Négy bazális OCR és ECAR mérést végeztünk 28 perc alatt a specifikus metabolikus inhibitorok hozzáadása előtt. A RASFC és a HUVEC metabolikus kapacitását figyelve további három OCR és ECAR mérést végeztünk 15 perc alatt az oligomycin, FCCP, antimycin és 2-DG injektálását követően.

### **3.1.5 In vitro mitokondriális diszfunkció és mitokondriális DNS mutagenézis vizsgálata**

A ROS produkció DCFDA Celluláris Reaktív Oxigénvegyület Detektáló Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) segítségével lett mérve. RASFC sejteket tenyésztettünk tiszta aljú, sötét oldalú 96 lyukú csiklemezekre  $2.5 \times 10^4$  sejt/lyuk denzitásban éjjeli adhézióval. Másnap a sejteket  $1 \times$  bufferoldattal mostuk, majd  $25 \mu\text{M}$  2',7'-dichlorofluoreszcín-diacetáttal festettük  $1 \times$  bufferben 45 percen keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on és  $5\%$   $\text{CO}_2$  jelenlétében. A festést követően a sejteket újra mostuk, majd 4-HNE-vel kezeltük  $37^\circ\text{C}$ -on  $5\%$   $\text{CO}_2$  jelenlétében. A ROS fluoreszcencia szignál SpectraMax Gemini rendszer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) segítségével lett mérve  $485 \text{ nm}$  és  $538 \text{ nm}$ -en együttesen. Minden egyes állapotnál négy lyuk fluoreszcencia mérésével kapott átlagértékeit vizsgáltuk. A 24 órás 4-HNE stimulusnak kitett RASFC random mutációk gyakoriságának megítélésére mitokondriális random mutációs befogási vizsgálatot használtunk. A mitokondriális DNS-t (mtDNS) egy előzőekben leírt protokoll alapján extraháltuk. Ezt követően  $10 \mu\text{g}$  mtDNA-t emésztettünk  $100 \text{ U}$  Taq $\alpha$ I restrikciós enzimmel (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA),  $1 \times$  bovin szérum albuminnal és Taq $\alpha$ I-specifikus emésztőbufferrel ( $10 \text{ mM}$  Tris HCl,  $10 \text{ mM}$  MgCl $_2$ ,  $100 \text{ mM}$  NaCl, pH 8.4)  $10$  órán keresztül úgy, hogy  $100 \text{ U}$  Taq $\alpha$ I-et adtunk az elegyhez minden órában. A PCR amplifikációt  $25\text{-}\mu\text{l}$  reakcióelegyeken hajtottuk végre, melyek  $12.5 \mu\text{l}$  of  $2 \times$  SYBR Green Brilliant Master Mix-et (Stratagene, La Jolla, CA, USA),  $0.1 \mu\text{l}$  uracil DNS glikozilázt (New England Biolabs),  $0.7 \mu\text{l}$  forward és reverz primereket ( $10 \text{ pM}/\mu\text{l}$ ; Integrated DNA Technologies, Skokie, IL, USA) és  $6.7 \mu\text{l}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmaztak. Roche LightCycler 480 Eszközt (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) használtunk az amplifikálásra a következő ciklusprotokoll alapján:  $10$  perces  $37^\circ\text{C}$ -os,  $10$  perces  $95^\circ\text{C}$ -os, majd  $45$  darab  $15$  másodperces  $95^\circ\text{C}$ -os, végül  $1$  perces  $60^\circ\text{C}$ -os ciklusok. A mintákat  $72^\circ\text{C}$ -on tartottuk  $7$  percig és olvadási-görbeanalízist követően azonnal  $-80^\circ\text{C}$ -ra helyeztük. A használt primer szekvenciák a következők voltak: mtDNS másolatszámra  $5\text{'-ACAGTTTATG TAGCTTACCTCC-3'}$  (forward) és  $5\text{'-TTGCTGCG TGCTTGATGCTTGT-3'}$  (reverz); a random mutációkra,  $5\text{'-CCTCAACAGTTAAATCAACAAAACACTGC-3'}$  (forward) és  $5\text{'-GCGCTTACTTTGTAGCCTTCA-3'}$  (reverz).

### **3.1.6 Mitokondriális komplex I–V aktivitás vizsgálata**

Mitokondriális komplex I–V OXPHOS aktivitási assay kitet (Abcam) alkalmaztunk a 4-HNE direkt mitokondriális komplexekre kifejtett hatásainak megítélésére a légzési láncban. Ezek a vizsgálatok OXPHOS komplexekben gazdag marha szív mitokondriumok felhasználásával folytak. Az I-V mitokondriális komplexek aktivitásának mérése a kit

használati útmutatója szerint zajlott a különböző köztes termékek abszorbanciacsökkenésének meghatározásával 340-600 nm-es optikai denzitások mellett. Minden komplex esetben grafikusán ábrázoltuk a 4-HNE modulálta komplex enzimaktivitás százalékos csökkenését a bazális enzimaktivitáshoz képest.

### **3.1.7 Proangiogén mediátorok kvantifikálása RASFC kultúrában**

Az oxidatív stressz hatását a VEGF, Ang2, PDGF-B, bFGF, IL-8, RANTES, ICAM faktorok expresziójára RASFC 96 lyukú csíklemezekre történő tenyésztésével vizsgáltuk. A 24 órára széruméheztetett konfluens RASFC tenyészetet újabb 24 órára 4-HNE-vel inkubáltuk. A felülúszó folyadékot eltávolítva mértük abban a szekretált proteinek szintjét MSD módszerrel (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA) vagy specifikus enzimkapcsolt immunoszorbens módszerrel (ELISAs) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### **3.1.8 Az oxidatív stressz által aktivált RASFC stimuláló hatása HUVEC proangiogén mechanizmusaira**

Annak vizsgálatára, hogy az oxidatív stressz által aktivált RASFC további proangiogén mechanizmusokat aktivál-e HUVEC kultúrát vizsgáltunk. RASFC-t stimuláltunk 4-HNE-vel 24 órán át, majd a felülúszót (4-HNE RASFC-CM) eltávolítottuk. Bazális tápoldatként (bazális RASFC-CM) olyan fibroblaszt felülúszót használtunk, melyet 4-HNE stimulus nélkül tenyésztett RASFC sejtkultúrából nyertünk. Ezt követően HUVEC sejtkultúrákhoz 4-HNE RASFC-CM 10 %-os oldatát vagy bazális RASFC-CM-t adtunk. Annak megítélésére, hogy a HUVEC-re gyakorolt angiogén hatások nem a 10 %-os RASFC-CM-ben levő 4-HNE-nek köszönhetők HUVEC-et 4-HNE-t tartalmazó RPMI 1640 tápoldattal is tenyésztettünk, melyben a 4-HNE koncentrációja (0.25  $\mu$ M) megegyezett a 10 %-os 4-HNE RASFC felülúszóéval. A HUVEC RASFC-CM-val és RPMI oldattal való 24 órás inkubációját követően az endothéliális proangiogén válaszokat vizsgáltuk az alábbiakban részletezett módon.

*A HUVEC invázió* vizsgálatára BD BioCoat Matrigel inváziós kamrákat (BD Biosciences, Wokingham, UK) használtunk. A migrációs kamrában a sejteket  $2.5 \times 10^4$ /lyuk denzitásig 8- $\mu$ m-es Matrigéllel előkezelte membránokon tenyésztettük. A migrációs kamra

lyukaiba 10 %-os 4-HNE RASFC-CM-t vagy 4-HNE RPMI-t tartalmazó tápoldatot adtunk és a sejteket 48 óráig migrálni hagytuk. A nem migráló HUVEC sejteket eltávolítottuk a felszínről. Az inváziót mutató letapadó sejtek az alsó membránhoz kötődtek, ezeket 4 %-os paraformaldehid oldattal fixáltuk és 0.1 %-os kristályibolya festékkel festettük. Az invazív HUVEC átlagos számának megállapítására a sejteket 5 random nagynagyítású felületen számoltuk.

*A HUVEC csőképzés* vizsgálatához jégen előhűtött 96-lyukú csíklemezeket Matrigéllal (50 µl; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) borítottunk és 30 percig polymerizálódni hagytunk 37 °C-on, párasított 5 % CO<sub>2</sub>-t tartalmazó levegőben. A HUVEC sejteket tripszines emésztéssel szétválasztottuk, majd 4×10<sup>4</sup> sejt/ml koncentrációban reszuszpendáltuk endothéliális sejtnövekedési tápoldatban. Ötszáz mikroliter sejtszuszpenziót adtunk minden egyes kamrához 10 %-os 4-HNE RASFC-CM vagy 4-HNE RPMI jelenlétében és 8 órára inkubáltuk. A csőanalízist öt szekvenciális felületen nézve (10x-es nagyításban), a fókusz a Matrigél felszínére állítva, két független számláló végezte és két különálló endothélsejt közötti áthidaló összekötő ág számított 1 csőnek.

*A HUVEC sebgyógyulás* vizsgálata során HUVEC-et konfluenciáig tenyésztettünk 24 lyukú csíklemezekre. Egy steril pipetta hegyével minden lyuk közepére egy folytonos karcolási sérülést ejtettünk, majd a sejteket 24 óráig 10 %-os 4-HNE RASFC-CM-val vagy 4-HNE RPMI-vel stimuláltuk. A sérülésen keresztüli HUVEC migrációt 8 óra múlva mértük és fázis-kontraszt mikroszkóppal fényképeztük. A seb sejtrepopulációjának szemikvantitatív analizisét végeztük el és ×10 nagyítású képeket készítettünk. Az átlagos sebzáródást manuálisan kalkuláltuk minden seb három különböző mérésének átlagából. A seb mérésénél a 0. időpontban látott karcolást 100 %-ban nyitottnak tekintettük. Innen az összes karcolás záródásának százalékos arányát kalkuláltuk.

*A HUVEC proliferációt* kristályibolya sejtproliferációs vizsgálattal tanulmányoztuk. HUVEC-et tenyésztettünk 5000 sejt/lyuk denzitásban 96 lyukú csíklemezekre és 37 °C-on 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében éjszakára inkubáltuk. Másnap a sejteket 10 %-os 4-HNE RASFC-CM-val vagy 4-HNE RPMI-vel 24 órán át stimuláltuk, majd PBS-ben mostuk, 4 %-os PFA-ben fixáltuk és 1 %-os kristályibolya oldattal festettük. Ezt követően a lemezeket csapvízzel mostuk és éjszakára száradni hagytuk. A sejteket ezután 1 %-os Triton X-100 oldatban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), reszuszpendáltuk, és a sejtszám mikrolemes olvasó segítségével lett kvantifikálva 550 nm-es OD-n.

Végül a következő módon kvantifikáltuk a *HUVEC által termelt pro-angiogén mediátorokat*: HUVEC-et 96 lyukú csiklemezekre tenyésztettünk és 37 °C-on és 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében állni hagyunk. A következő napon a sejteket 10 %-os 4-HNE RASFC-CM-val vagy 4-HNE RPMI-vel 24 órára inkubáltuk, majd a felülúszókat eltávolítottuk és a szekretált proteinek szintjét (Ang2 és PDGF-BB) ELISA módszerrel kvantifikáltuk (R&D Systems).

### **3.1.9 RASFC és szinoviális szövet (ST) immunfluoreszcens festése**

RASFC kultúrát 24 órás 4-HNE-vel való stimulációt követően immunfluoreszcens festéssel vizsgáltunk. A VEGF immunfluoreszcencia vizualizálására a sejteket 4 %-os PFA oldatával fixáltuk és primer nyúl VEGF elleni antitestekkel (Abcam) festettük. Az angiogenesis, oxidatív stressz és sejtbioenergetikai változások markereinek szinoviális koexpresszióját szintén immunfluoreszcens technikát alkalmazva vizsgáltuk fagyasztott metszeteken. a ST metszeteket acetonnal fixáltuk 10 percig, majd a következő antitestekkel inkubáltuk: primer egér antitest 4-HNE ellen (GENTAUR, Kampenhout, Belgium), primer nyúl antitest VEGF, Ang2, Tie2, ATP5B és glükóz transzporter-1 (GLUT1) (mind Abcam), glyceraldehid 3-foszfát dehydrogenáz (GAPDH) (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) és pyruvát kináz izozym 2 (PKM2) (Abgent, San Diego, CA, USA) ellen. A RASFC és ST mintákat egy éjszakán keresztül egy párasított kamrában inkubáltuk, majd másodlagos antitestekkel kezeltük 60 percig: Invitrogen Alexa Fluor 488-konjugált kecske antitest, Invitrogen Superclonal™ anti-egér antitest (Thermo Fisher Scientific) és Cy™3-konjugált kecske anti-nyúl antitest (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Ezt követően a sejtmagok festésére 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) használtunk (Sigma-Aldrich) 10 percig. A mintákat végül speciális fedőanyaggal fedtük (Molecular Probes antifade mounting medium (Thermo Fisher Scientific) és immunfluoreszcens mikroszkóp alatt értékeltük (Olympus BX51; Olympus, Hamburg, Germany).

### **3.1.10 Immunhisztokémia (IHC) és a szinoviális szövet pontozása**

Az immunhisztokémiai vizsgálatok 7-µm cryostat ST minták és DAKO ChemMate EnVision kit (Dako/Agilent Technologies, Glostrup, Denmark) használatával kerültek végrehajtásra. A minták 20 perces szobahőmérsékleten való kioldását követően azokat 10 percig acetonnal fixáltuk, majd PBS-ben mostuk 5 percig. A nem-specifikus kötődést 1 %-os

kazein és PBS elegyével gátoltuk 20 perces áztatás során. A mintákat nyúl monoklonális primer antitestekkel inkubáltuk VEGF, Ang2, Tie2, ATP5B (mind Abcam), GAPDH (Trevigen) ellen és egér monoklonális antitestekkel humán 4-HNE (GENTAUR) ellen. Immunoglobulin G kontroll antitesteket használtunk negatív kontrollként. A primer antitestekkel való 1 órás inkubációt követően az endogén peroxidáz aktivitást 0.3 %-os hidrogén-peroxiddal blokkoltuk 5 perces kezeléssel. A tárgylemezeket 30 percig inkubáltuk a másodlagos antitesttel, torna-peroxidázzal (Dako/ Agilent Technologies). A festés vizualizálására 3,3'-Diaminobenzidint (1:50), valamint Mayer haematoxylint (BDH Laboratories, Poole, UK) alkalmaztunk (30 másodperces áztatás), majd DPX szintetikus gyantával fedtük a mintákat. A szöveti pontozást külön-külön elvégeztük mind az intima (LL), szubintima (SL) és a mélyebb, vaszkuláris erekben leggazdagabb szinoviális kötőszöveti részben (BV) egy ismert és validált szemikvantitatív pontozási technikát alkalmazva, ahol a specifikus markerekkel festett (pozitív) sejtek százalékos arányát a nem festődő (negatív) sejtek százalékos arányához viszonyítottuk. A százalékos pozitivitást 0-4-ig terjedő skálán pontoztuk, ahol 0 = nincs megfestett sejt, 1 = a sejtek 1-25 %-a festődött meg, 2 = a sejtek 25-50 %-a festődött meg, 3 = a sejtek 50-75 %-a festődött meg, 4 = a sejtek 75-100 %-a festődött meg. Olympus DP50 fénymikroszkóp és AnalySIS program (Olympus Soft Imaging Solutions, Lakewood, CO, USA) segítségével készítettük el a fotografikus dokumentációt.

### **3.1.11 Statisztikai analízis**

IBM SPSS Statistics 20-as verzióját Windows programban futtatva (IBM, Armonk, NY, USA) végeztük a statisztikai analízist. Wilcoxon tesztet, Spearman korrelációt, Mann-Whitney U próbát használtunk a non-parametrikus változók értékelésére. A parametrikus adatokat egymintás Anova próbával elemeztük. Minden p érték kétoldali volt és a  $p < 0.05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **3.2 Második Vizsgálat**

### **3.2.1 Betegek gyűjtése**

Ötvenhárom olyan beteget (36 RA-s és 17 AS-s) vontunk be vizsgálatainkba, akiknek a betegségaktivitási indexei (négyváltozós betegségaktivitási index - DAS28-ESR  $> 5.2$ , illetve

a Bath Ankylosing Spondylitis betegségaktivitási index - BASDAI>4) aktív betegséget igazoltak. Mindnyájan TNFi terápia elindítása előtt álltak, amit a következő 12 hónapban folytattak. A 36 RA-s beteg közül 20-an heti 50 mg SC etanerceptet (ETN), 16-an certolizumab pegolt (CZP – 400 mg a 0., 2., 4. heteken, majd ezt követően 200 mg heti 2x SC) kaptak. A 17 AS-s beteg heti 50 mg SC etanerceptet kapott. A vizsgálatokat a terápia elkezdése előtt, majd 12 hónappal az elkezdése után végeztük el. Nyolc korban egyeztetett egészséges kontroll személytől csak egyszeri szérummintát gyűjtöttünk. A vizsgálati protokollt a Magyar Kutatásetikai Bizottság elfogadta (14804-2/2011/EKU). A betegek írásos beleegyező nyilatkozatát követően a Helsinki Deklarációnak megfelelően folytattuk le a vizsgálatokat.

### **3.2.2 Klinikai vizsgálat**

A betegek részletes kórtörténetét, a dohányzási státuszt és az elmúlt évben felmerülő CVD jelenlétét kérdőívvel rögzítettük. A betegek dentális státuszát fogorvosi vizsgálattal ítéltük meg: a hiányzó fogak száma és a periodontitis mértéke lett vizsgálva. A klinikai státusz a TNFi terápia elkezdése előtt (T0), annak 3. (T3), 6. (T6) és 12. (T12) hónapjában lett felvéve.

### **3.2.3 Laborvizsgálatok**

Magas szenzitivitású CRP (hsCRP), IgM típusú rheumatoid factor (RF) szinteket mértünk kvantitatív nephelometriával (Cobas Mira Plus-Roche) CRP és RF reagenseket használva (Dialab), valamint aCCP antitestek szérumszintjét határoztuk meg egy második generációs RA-Immunoszen CCP2 ELISA módszerrel (Euro Diagnostica). Az erythrocyta szedimentációs ráta (ESR) hagyományos Westergren módszerrel lett mérve (mm/hr).

Az angiogenezis szérum biomarkerei közül VEGF-et (V-Plex, Meso Scale Diagnostics; pg/ml), PDGF-BB-t (DuoSet ELISA, R&D Systems; pg/ml), Ang1-t (DuoSet ELISA, R&D Systems; pg/ml), Ang2-t (QuantiKine ELISA, R&D Systems; pg/ml) és TSP-1-t (DuoSet ELISA, R&D Systems; ng/ml) mértünk ELISA módszerrel a TNFi terápia elkezdése előtt, majd 6 és 12 hónappal azt követően.

Az anti-Citrullinált enoláz peptid-1 (anti-CEP1) IgG szinteket szintén meghatároztunk egy már korábban említett in-house peptid ELISA-val. Az anti-CEP IgG szinteket AU/ml-ben fejeztük ki egy standard görbe alapján. A pozitív és negatív cutoff érték 3.7 AU/ml volt.

### 3.2.4 A vaszkuláris fiziológia ultrahangos vizsgálata

Az *artéria brachialis* áramlás mediált dilatációja (FMD) a jobb karon került értékelésre (10 MHz, HP Sonos 5500). A vérnyomásmérő mandzsetta segítségével szupraszisztolés nyomást generáltunk 4.5 perces időtartamra, majd a felengedésével reaktív hyperaemiát idéztünk elő, mely során 90 másodpercig rögzítettük a maximális áramlási velocitást és artériás körfogatot. Az FMD értékek az alapállapottól való eltérés százalékában lettek kifejezve (FMD%).

Mindkét oldali *carotis communis intima-média vastagság (ccIMT)* is rögzítve lett (HP Sonos 5500, 10 MHz) 1 cm-rel a carotis bulbustól proximálisan. Az IMT-t a lument határoló első és második echogén vonalak közötti távolságként definiáltuk 10 mérés átlagát véve mindkét oldalon.

Az artériás érfali merevséget a *pulzushullám terjedési sebességével (PWV)* jellemeztük, melyet a TensioClinic arteriográf rendszer (Tensiomed Ltd, Budapest, Hungary) automatikusan generált a fossa jugularis és a symphysis közötti távolság kvócienseként. Az artériás elaszticitás csökkenésével a PWV megemelkedik.

### 3.2.5 Statisztikai analízis

A statisztikai analízis az SPSS 22.0 (IBM) szoftver segítségével történt. Az eredményeket folytonos változóknál  $\text{mean} \pm \text{SD}$ -ben és kategórikus változóknál %-ban szemléltettük. A folytonos változók kétmintás páros t-próbával és Wilcoxon analízissel, a nominális változók Chi-Square és Fisher exact teszttel lettek összehasonlítva. A korrelációvizsgálatra Spearman analízist használtunk. Lépcsős egyváltozós és többváltozós regresszióanalízisben vizsgáltuk az angiogén markerek (függő változók) független összefüggését más klinikai, labor és képalkotó paraméterekkel (független változók). A két paraméter között lineáris korrelációt mutató  $\beta$  standardizált lineáris koefficienseket meghatároztuk. A változások során a függő és független változók közötti összefüggéseket a B (+95% CI) regressziós koefficiens jelezte. A  $p < 0.05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## **4 EREDMÉNYEK**

### **4.1 Első Vizsgálat**

#### **4.1.1 Az oxidatív stressz in vitro hatása a RASFC és HUVEC sejtek bioenergetikájára**

Kutatócsoportunk már korábban demonstrálta, hogy a hypoxia körülményei megváltoztatják RASFC celluláris bioenergetikáját. valamint a gyulladt szinoviumban zajló fokozott oxidatív károsodást is igazoltuk. Elsőként azt tanulmányoztuk, hogy a gyulladt ízületben levő oxidatív stressz RASFC és HUVEC metabolizmusának átprogramozásához vezet-e.

OCR és ECAR profilokat vizsgáltunk oligomycin, FCCP, antimycin A és 2-DG injektálása előtt és után bazális és 4-HNE-vel stimulált RASFC kultúrában. Tudomásunk szerint elsőként mutattuk ki, hogy az OCR 4-HNE által indukált gátlása a RASFC metabolizmusát glikolízis irányába tolja el. A 4-HNE csökkentette a bazális ( $p < 0.05$ ) és maximális mitokondriális légzést ( $p < 0.001$ ), ATP szintézist ( $p = 0.1$ ) és rezervkapacitást ( $p < 0.01$ ). Ez a metabolikus változás fokozta a bazális glikolízist ( $p < 0.01$ ), glikolítikus kapacitást ( $p < 0.01$ ) és glikolítikus rezervkapacitást ( $p = 0.2$ ) oxidatív stressznek kitett RASFC esetén.

Seahorse HUVEC OCR és ECAR profilokat is karakterizáltunk oligomycin, FCCP, antimycin A és 2-DG hozzáadása előtt és azt követően. A RASFC-nél tapasztaltakkal hasonlóan a 4-HNE gátolta a bazális és maximális mitokondriális respirációt, ATP szintézist és rezervkapacitást (mind  $p < 0.01$ ), ellentétben a bazális glikolízis ( $p < 0.01$ ) és a glikolítikus rezerv ( $p < 0.05$ ) párhuzamos emelkedését tapasztaltuk oxidatív stressznek kitett HUVEC esetében.

#### **4.1.2 A mitokondriális mutagenézis és a mitokondriális OXPHOS enzimkomplexek aktivitása 4-HNE által indukált oxidatív stressz esetén RASFC kultúránál**

Korábban már bemutatták, hogy az RA-s ízületben a megnövekedett mtDNS mutációk gyakorisága és a mitokondriális diszfunkció szoros korrelációban áll a szinoviális gyulladással és a hypoxiával. Csoportunk szintén leírta a proangiogén válaszok erősödését az oxidatív stressznek kitett endothéliális sejtek esetében. Jelen munkánkban a mtDNS mutációinak gyakoriságát és a mitokondriális diszfunkciót tanulmányoztuk 4-HNE-vel

stimulált RASFC esetében. A 4-HNE-vel kezelt RASFC markáns ROS termelését és a mtDNA pontmutációk gyakoriságának emelkedését figyeltük meg ( $p < 0.001$  és  $p = 0.06$ ) a bazális sejtekhez viszonyítva. A 4-HNE proteinkötés a proteinaktivitást megváltoztathatja, így a következőkben a mitokondriális OXPHOS I-V. komplexek fehérjéit egyenként is megvizsgáltuk. A 4-HNE szignifikánsan csökkentette a III-mas complex (8 %-al) és a IV-es complex (70 %-al) aktivitását a bazális értékekhez képest (mindkettő  $p < 0.01$ ). Nem szignifikánsan eltérő, de alacsonyabb enzimaktivitás szintén megfigyelhető volt az I-es complex (9 %-al), II-es complex (22 %-al) és az V-s complexek (12 %-al) esetében 4-HNE-vel való kezelés után (mind  $p = 0.2$ ).

#### **4.1.3 Proangiogén és proinflammatorikus mediátorok in vitro szekréciója oxidatív stressznek kitett RASFC kultúrában**

Mivel szoros kapcsolatot igazoltunk a redox állapotok és az energiametabolizmus megváltozása között RASFC esetén, a következőkben az oxidatív stressz hatását vizsgáltuk RASFC proangiogén és proinflammatorikus mediátorainak elválasztására. RASFC sejtek, melyeket 4-HNE jelenlétében inkubáltunk, fokozottabb VEGF immunfluoreszcenciát mutattak a bazális sejtekhez viszonyítva. Mindemellet a 4-HNE szignifikánsan növelte a kulcsfontosságú proangiogén és proinflammatorikus mediátorok szintjét a bazális RASFC-hoz viszonyítva (VEGF/Ang2/bFGF/IL-8 mind  $p < 0.05$ , PDGF-B/RANTES/ICAM mind  $p < 0.01$ ). Ezen eredmények és a csoportunk előzőekben publikált TNF- $\alpha$  által indukált mitokondriális diszfunkciót igazoló publikációja tovább erősíti azt a feltételezést, hogy RA-ban komplex kölcsönhatás létezik az oxidatív károsodás, oxigénmetabolizmus és az angiogenesis folyamatok között.

A fentiek által motiválva a továbbiakban az in vivo angiogenezises válaszokat figyeltük meg 15 RA-s betegnél TNFi kezelés kezdete előtt (T0), valamint 3 hónappal a terápia elkezdését követően (T3). A makroszkópikus vaszkularitás és a ST angiogén markerek expressziójának csökkenését tapasztaltuk (VEGF  $p = 0.1$ , Ang2  $p < 0.005$ , Tie2  $p < 0.005$ ) a T0-T3 időpontok összevetése során.

#### **4.1.4 Az oxidatív stressz által aktivált RASFC HUVEC proangiogén mechanizmusait indukálja**

Ismert, hogy a RASFC erőteljesen befolyásolja a patológiás angiogenezist a gyulladt ízületben, ennél fogva következőként azt vizsgáltuk, hogy a megfigyelt celluláris szintű bioenergetikai változások és a RASFC által oxidatív stressz hatására elindított kifejezett proinflammatorikus folyamatok a HUVEC következményes proangiogén mechanizmusainak beindulásával járnak-e. RASFC-t stimuláltunk 4-HNE jelenlétében és anélkül, majd a felülúszókat eltávolítottuk. Mikroszkóposan demonstráltuk a 4-HNE RASFC-CM stimulatív hatását a HUVEC inváziójára ( $p < 0.001$ ), proliferációjára ( $p < 0.05$ ), csöképzésére ( $p < 0.001$ ), sebgyógyulására ( $p < 0.001$ ) és Ang2 és PDGF-B szekréciójára (mindkét  $p$  érték  $< 0.05$ ) a bazális RASFC-CM hatásához viszonyítva.

Annak igazolására hogy a HUVEC proangiogén válasza az oxidatív stressz által aktivált RASFC-nak, de nem a CM-ben jelen lévő reziduális 4-HNE hatásának köszönhető további kísérletet végeztünk. RPMI 1640 CM 4-HNE-vel történő dúsításával ( $0.25 \mu\text{M}$ ; 4-HNE RPMI 1640 kontroll) ugyanolyan 4-HNE koncentrációt hoztunk létre, mint a 10 % 4-HNE RASFC-CM esetében használt. Szignifikáns inváziót ( $p < 0.001$ ), csöképzést ( $p < 0.01$ ) és sebgyógyulást ( $p < 0.001$ ) figyeltünk meg a HUVEC kultúrában 4-HNE RASFC-CM hatására a 4-HNE RPMI kontroll CM-hez viszonyítva, amely megerősíti a feltételezést, mi szerint a 4-HNE képes a RASFC által indukált angiogenezis fokozására a gyulladt ízületben.

#### **4.1.5 A ST angiogenezis, oxidatív stressz és megváltozott bioenergetika közötti összefüggés**

Végül az angiogén faktorok, a már korábban megfigyelt oxidatív stressz és sejtmétabolizmus markerei közötti korrelációt vizsgáltuk betegcsoportunkban. A 4-HNE oxidatív stressz marker ST expressziója a VEGF ( $r=0.63$ ;  $p=0.015$ ) és Tie2 ( $r=0.56$ ;  $p=0.029$ ), valamint a GAPDH glikolítikus protein ( $r=0.60$ ;  $p=0.03$ ) emelkedett expressziójával pozitívan korrelált, a mitokondriális ATP5B ( $r=-0.52$ ,  $p=0.017$ ) marker expressziójával pedig negatív korrelációt mutatott. Mindezek mellett immunofluoreszcens kolokalizációt is megfigyeltünk a 4-HNE és az angiogén faktorok (VEGF, Ang2, Tie2), mitokondriális markerek (ATP5B) és glikolítikus proteinek (GAPDH, PKM2, GLUT1) expressziója során.

## **4.2 Második Vizsgálat**

### **4.2.1 Demográfiai adatok**

A vizsgált csoport 34 nőből és 19 férfiből állt, akiknek átlagéletkora  $52.0 \pm 12.1$  (range: 24-83) év volt. Az átlagos betegségi időtartam  $8.5 \pm 7.9$  (range: 1-44) év volt. TNFi terápia előtt az RA-s betegeknél  $5.00 \pm 0.86$  átlagos DAS28-ESR értéket, míg az AS-s betegeknél  $5.79 \pm 1.19$  átlagos BASDAI értéket kalkuláltunk.

#### **4.2.2 A TNFi terápiára adott klinikai válasz**

RA-s betegeknél (n=36) a TNFi kezelés előtti DAS28-ESR ( $5.00 \pm 0.86$ ), szignifikánsan csökkent a terápia 12. hónapjára ( $3.02 \pm 0.96$ ;  $p < 0.001$ ). Az AS-s csoportban (n=17) a BASDAI szintén szignifikáns csökkenést mutatott  $5.79 \pm 1.19$ -ről  $1.86 \pm 1.04$ -re a 12. hónapban ( $p < 0.001$ ).

#### **4.2.3 A TNF gátlás hatása az angiogén biomarkerek szintjére**

Elsőként az angiogenezis fő regulátorának, a VEGF-nek a megemelkedett szintjét konfirmáltuk az arthropathiás betegeknél (RA+AS, n=53) korban egyeztetett egészséges kontrollokhöz (n=8) viszonyítva:  $267.8 \pm 133.3$  vs  $140.7 \pm 63.5$  pg/ml. Ezen magas VEGF értékek nem szignifikáns csökkenést mutattak a terápia előtti értékekhez képest a TNFi kezelés 6. hónapjára ( $267.9 \pm 123.3$  pg/ml-ről  $239.8 \pm 116.3$  pg/ml-re,  $p = 0.082$ ), majd ez szignifikánssá fokozódott a 12. hónapra ( $220.9 \pm 120.7$  pg/ml,  $p = 0.007$ ) az RA+AS kombinált kohortban. A szérum PDGF-BB értékek szignifikáns esése volt megfigyelhető már a 6. ( $8187.4 \pm 6282.0$  pg/ml-ről  $6579.4 \pm 3819.2$  pg/ml-re;  $p = 0.015$ ), majd a 12. hónapban is ( $6020.4 \pm 3216.1$  pg/ml;  $p = 0.005$ ). A szérum Ang2 értékek a terápia 6. hónapjára szignifikánsan csökkentek ( $2790.0 \pm 1381.1$  pg/ml-ről  $2473.7 \pm 1136.1$  pg/ml-re;  $p = 0.024$ ) és a tendencia a 12. hónapig folytatódott ( $2537.2 \pm 1156.1$  pg/ml);  $p = 0.081$ ). A TNFi terápia az Ang1 és TSP-1 szinteket nem változtatta meg.

#### **4.2.4 Az angiogén biomarkerek egyéb paraméterekkel való korrelációja**

A 12. havi PDGF-BB szintek, a TNFi előtti és 12. havi Ang2 értékek jól korreláltak a betegség időtartamával ( $p < 0.05$ ). A bazális CRP pozitív korrelációt mutatott a bazális Ang1, valamint a bazális és 12. havi Ang2 értékekkel ( $p < 0.05$ ). A 12. havi CRP korrelált a pre-terápiás és 12. havi Ang2-vel ( $p < 0.05$ ). A terápia előtti aCCP és anti-CEP szintje korrelált a

pre-terápiás TSP-1-el ( $p < 0.05$ ), a TNFi előtti ccIMT pedig a pre-terápiás PDGF-BB-val és TSP-1-el ( $p < 0.05$ ). A 12. havi PDGF-BB szintek a dohányzók ( $n=14$ ) csoportjában szignifikánsan magasabbak voltak a nem dohányzókhoz ( $n=39$ ) viszonyítva ( $8903.2 \pm 5084.1$  pg/ml vs  $4866.2 \pm 1895.8$  pg/ml;  $p=0.01$ ). A foghullás és periodontitis nem volt összefüggésben az angiogén markerek megemelkedett szintjével.

Az egyváltozós regresszióanalízis alapján a TNFi terápia előtti PDGF-BB szint jól korrelált a pre-terápiás ccIMT-vel, míg a 12.havi PDGF-BB a betegségi időtartammal és a pozitív dohányzási anamnézissel ( $p < 0.05$ ). A TNFi előtti Ang1 értéke korrelált a pre-terápiás CRP-vel, míg a 12. havi Ang2 a betegségi időtartammal, a pre-terápiás és 12. havi CRP-vel ( $p < 0.05$ ). Végül a TNFi előtti TSP-1 értéke korrelált a betegségi időtartammal, pre-terápiás ccIMT-vel és CEP szintekkel ( $p < 0.05$ ).

A többváltozós regresszióanalízis alapján a dohányzás az emelkedett poszt-terápiás PDGF-BB szintnek független jelzője ( $p=0.006$ ). A betegségi időtartam befolyásolja a kezdeti Ang2 ( $p < 0.001$ ) és a 12. havi Ang2 ( $p=0.004$ ) szinteket, valamint a pre-terápiás TSP-1 értékét ( $p=0.028$ ). A TNFi előtti CRP a pre-terápiás Ang2 független prediktora volt ( $p=0.004$ ), hasonlóan a TNFi előtti CEP befolyásolta a pre-terápiás TSP-1 szintjét ( $p=0.002$ ).

## **5 MEGBESZÉLÉS**

### **5.1 Első Vizsgálat**

A szinoviális angiogenezisnek kiemelt szerepe van a lokális gyulladás fenntartásában az inflammatorikus arthritisek esetén. Ez a defektív érújdonképződési folyamat olyan proinflammatorikus mediátorok kifejezett produkciójával jár, melyek többsége proangiogén hatással is rendelkezik, és a circulus vitiosus elmélyítésében jelentőséggel bír. Az ezen molekulák túltermelése következtében kialakuló szisztémás gyulladásos folyamat a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatát és a látens vagy tünetes atheroszklerózis kockázatát növeli. Munkánkban a gyulladásos arthritisek pathofiziológiájához kapcsolt, mind az ízületet, mind pedig a perifériás vaszkulaturát plakkformációval érintő angiogenezist tárgyaltuk. A korábbi kutatásokra támaszkodva a legfontosabb proangiogén hatással is rendelkező proinflammatorikus mediátorokat tekintettük át azon kulcsfontosságú szabályozó

jelátviteli útvonalak érintésével, melyek potenciális jövőbeni terápiás célpontot jelenthetnek a gyulladásszerű arthritiszek angiogenezisgátlásában.

Tudomásunk szerint elsőként mutattuk be, hogy az oxidatív stressz kulcsfontosságú szerepet tölt be inflammatórikus arthritiszekben a celluláris bioenergetika átprogramozásában az OXPHOS intenzitásának csökkentésével és a glikolízis elősegítésével RASFC és HUVEC kultúrák esetén. A maximális és ATP-kapcsolt respiráció és rezervkapacitás csökkenése demonstrálta ezt a változást a glikolitikus kapacitás és rezervkapacitás ellentétes növekedésével. A megváltozott sejtbioenergetika ROS fokozott termelésével, a mtDNS mutációival, valamint a III-mas és IV-es mitokondriális komplexek aktivitáscsökkenésével járt. Szemléltettük, hogy az oxidatív stressz serkenti a proinflammatórikus és proangiogén markerek RASFC általi produkcióját és elősegíti a HUVEC proangiogén profiljának előtérbe kerülését, amennyiben azt 4-HNE által stimulált RASFC felülűszójával inkubáljuk. Ezt intenzív invázió, sejtproliferáció, migráció, csőképzés és proangiogén mediátorok elválasztása jellemez. Megfigyeltük továbbá az angiogén markerek, oxidatív stressz és a megváltozott energiametabolizmus markereinek kolokalizációját szinoviális szövetben, amely ezen szabályozó mechanizmusok kölcsönhatását bizonyítja. Mi több, TNFi terápia is szignifikánsan csökkentette a szinoviális szöveti angiogenezist RA-s betegek esetében.

A hypoxia vezető metabolikus jelenség a gyulladt RA-s szinoviumban és a ROS túlprodukciójával és megnövekedett lipid peroxidációval jár. A sejtszintű mitokondriális funkció és integritás is károsodik a mtDNS, a lipidek és más proteinek 4-HNE által létrehozott kovalens modifikációja miatt. A légzési lánc metabolikus sajátosságai, a protein transzport és mitokondriális dinamikai és minőségabályozási folyamatok károsodását egyaránt leírták. Korábbi vizsgálatok bemutatták, hogy a mtDNS mutációs frekvencia és a következményes mitokondriális diszfunkció jól korrelált a megnövekedett makroszkópikus szinoviális vaszkularitásfokozódással, a magas szintű szöveti hypoxiával és az oxidatív stressz mértékével, valamint a proinflammatórikus citokinek megemelkedett szintjével. A mtDNS igen érzékeny az oxidatív stressz által okozott károsodásra, amelyet in vitro kísérletekben jellemeztünk RASFC használatával, mitokondriális random mutációs befogási tesztekkel. A random mitokondriális pontmutációs frekvenciát 4-HNE-vel való stimulálást követően kvantifikáltuk. Ez a technika olyan amplifikációs módszeren alapul, mely nagy mennyiségű mtDNS molekula szűrésére alkalmas a nem kiterjedt, oxidatív stressz hatására létrejövő mutációk azonosítására. A 4-HNE-nek mutagén potenciálja van, melyet kísérleteinkben a 4-HNE-nek kitett RASFC mitokondriális mutációinak megnövekedett száma bizonyított. 4-HNE-guanin

kötéseket a p53 tumorszupresszor gén esetén humán limfoblasztoid sejtvonalnál is azonosítottak, amely génmutációkhoz vezetett és a sejtciklus megállását, apoptózist, DNS javítást és differenciációt befolyásolta. A mitokondriális genom megváltozása elsődlegesen a megemelkedett ROS szinteknek köszönhető. Vizsgálatunk bemutatja a ROS túlprodukciónak a 4-HNE-nek kitett RASFC által, amely megerősíti azt a feltételezést, hogy a 4-HNE ROS túltermelését indukáló hatással rendelkezik, mely tovább rontja az oxidatív stressz kapcsolt mitokondriális mutagenezist.

A gyulladásszerű arthritiszek esetén fellépő oxidatív károsodás VEGF függő, vagy attól független utakon mediálhat angiogenezist az excesszív ROS felhalmozódás és lipid peroxidáció együttes megjelenésével, így következnek a lipid peroxidáció miatt fellépő mtDNS instabilitást vizsgáltuk a légzési lánc metabolizmusára kifejtett hatások azonosításával. RASFC és HUVEC sejtvonalakat 4-HNE jelenlétében vagy anélkül vizsgáltunk, és a megnövekedett energiaigényre adott valószínű válaszként a bioenergetikai profil OXPHOS irányból anaerob glikolízis felé való eltolódását figyeltük meg. Ez alacsony maximális és ATP-kapcsolt respirációval és rezervkapacitással járt együtt a glikolitikus kapacitás és rezerv párhuzamos megemelkedésével. A mitokondriális komplexek enzimaktivitása is csökkent oxidatív stressz hatására. Az anaerob glikolízis kompenzatórikus mechanizmusai csupán rövidtávú energiaszolgáltatóként hatnak, és hosszabb idejű dependencia egy bioenergetikai krízishelyzet kialakulását vonhatja maga után olyan súlyos energiahiányos állapothoz vezetve, amely hozzájárul a diszfunkcionális angiogenezis, sejtmigráció, invázió és pannuszképződés romlásához. Régebbi, szív és tüdő eredetű epitheliális sejteket vizsgáló kísérletek eredményeivel összhangban vannak megfigyeléseink, és a 4-HNE indukálta mitokondriális légzési deficienciát támaszják alá. A mitokondriális légzés 4-HNE stimulációt követő gátlása az elektron transzport lánc (ETC) proteinjeinek vagy az ATP-szintáz által alkotott 4-HNE-protein komplexek csökkent funkcionális működéséből, vagy a RASFC 4-HNE-t detoxifikáló folyamatainak csökkent képességéből eredeztethető, mivel ezek nagy mennyiségű energiafelhasználást igényelnek. Egy munkacsoport proteomikus technika segítségével többféle 4-HNE módosított proteint azonosított egér eredetű szív mitokondriumokban a kemoterápiás doxorubicinnal való kezelés után. Ezen proteinek a mitokondriális energiametabolizmus folyamataiban játszottak szerepet, mint az ETC alegységei, a NDUFS2 (komplex I), SDHA (komplex II) és ATP5B (komplex V), valamint a TCA ciklus komponense, a dihydrolipoami-dehydrogenáz. Végül a 4-HNE megkötése a mitokondriális proteinek aktivitáscsökkenéséhez, hanyatló OCR és felgyorsuló

ECAR profilokhoz vezetett. Már korábban leírták, hogy a 4-HNE-vel módosított proteinek részt vesznek a metabolikus folyamatokban, celluláris adhézióban, citoskeletális reorganizációban és anti-oxidációs folyamatokban humán vérlemezkék vizsgálata esetén. Glikolitikus inhibitorok használatával a RASFC és HUVEC proinflammatorikus válaszai gyengíthetők, valamint a K/BxN egerek arthritisének súlyossága is enyhül. A glükóz-6-foszfát izomeráz glikolitikus enzim hypoxia általi aktivációja pedig felgyorsítja a VEGF termelést, proliferációt és inváziót RASFC és HUVEC sejteknél. Az elektrofil lipidek számos glikolitikus protein, mint PKM2, GAPDH, fruktóz-bifoszfát aldoláz A és foszfoglicerát-kináz 1 kötésére képesek. Ezek a kovalens módosítások a glükóz metabolizmust károsítva glikolitikus intermedierek felhalmozódásához vezethetnek. Ez jól illeszkedik azon vizsgálatok eredményeihez, melyek a tejsav szintjének szignifikáns megemelkedését és az ECAR erősödését figyelték meg humán thrombocytáknál 4-HNE jelenlétében történő inkubációt követően, valamint emelkedett 18F-fludeoxyglükóz felvételt és glikolitikus metabolizmust az oxidált alacsony-sűrűségű lipoprotein (oxLDL) által a kifejezett GLUT1 expresszió és hexokináz aktivitás következtében. Ezt a választ a HIF-1- $\alpha$  ROS termelése befolyásolta. Az oxLDL ezen metabolikus hatása azonban a Src (PP2) és foszfatidilinozitol-3 kináz inhibitorai által teljesen megfékezhető volt, ami ezen útvonal szabályozó szerepét hangsúlyozza a glükóz metabolizmus és immunsejtaktiváció folyamataiban.

Ismert, hogy a RASFC erősen involvált a gyulladással járó ízületi pathológiás angiogenezisének regulálásában. A hypoxia és az oxidatív stressz kulcsfontosságú mediátora a hibás angiogenezis pathológiájának, melyet a RASFC eredetű proangiogén és proinflammatorikus citokinszintek emelkedésének bemutatásával igazoltunk 4-HNE indukálta oxidatív stressz kiváltását követően. Megerősödött migráció, csöképés, proangiogén mediátor szekréció volt megfigyelhető HUVEC kultúrában, amikor azt 4-HNE által aktivált RASFC CM-jával kezeltük. Az angiogenezis és oxidatív stressz markerei koexpressziót mutattak ST-ben mikroszkóposan vizsgálva, illetve TNFi terápia RA-s betegeknél a ST angiogenezis csökkenéséhez vezetett. Kísérleteink bizonyítják, hogy a 4-HNE közvetlen és közvetett proangiogén stimulusokon keresztül is hat a gyulladt ízületben. Eredményeinkkel korrelál több más szerző megfigyelése, mi szerint a 4-HNE indukálja a COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-18 és NF- $\kappa$ B expresszióját, valamint a NLRP3 inflammaszóma aktivációjához vezet. A redox folyamatok hangsúlyos miatti felfokozott angiogén folyamatokat mások is dokumentálták HUVEC kultúrát, keratinocytákat, tüdő epithélialis sejteket vagy retinasejteket használva.

Szinoviális koexpressziót vizsgálva a 4-HNE fokozott koexpresszióját figyeltük meg az angiogenezis és glikolízis markereivel, azonban csökkent koexpressziót a mitokondriális légzés markereivel. A különböző markerek szinoviális kolokalizációja immunfluoreszcens technikával vizsgálva megerősíti a szoros kölcsönhatás jelenlétét az oxidatív stressz, megváltozott bioenergetikai profil és diszfunkciós angiogenezis folyamatai között.

A TNF- $\alpha$  proangiogén hatásai ismertek és a kapilláriságazódást a VEGF, Ang1 és Ang2 jelátviteli útvonalain át segíti. Munkánk során azt figyeltük, hogy a TNFi terápia az angiogén mediátorok szintjét megváltoztatja-e a terápia 3. hónapjában vizsgálva. A TNFi kezelés a VEGF, Tie2 receptor és ligandja, az Ang2 ST expresszióját csökkentette, amely a TNF- $\alpha$  és angiogenezis közötti szoros kapcsolatra világít rá. A makroszkópos vaszkularitás csökkenése jól korrelált az angiogén markerek (VEGF, Ang2, Tie2) csökkent ST expressziójával IHC vizsgálattal, amely szintén az előbbi tényt erősíti. Adataink más kutatások eredményeivel is egyezők, mi szerint az angiogén markerek expressziója és az endothéliális sejtaktiváció is mérséklődik TNFi terápia hatására. Mindezekon túl, etanercept és infliximab TNFi terápia az oxidatív károsodás ellen hat RA-ban, az oxidatív stresszmarkerek és lipid peroxidáció markereinek vér és vizeleti szintjét csökkenti és a DAS28-al mért betegségaktivitási index javulását eredményezi. A TNF- $\alpha$ -tól eltérő jelátviteli utak gátlása is szupresszív hatással lehet az oxidatív stressz markereinek kifejeződésére, amit egy IL-6 receptor tocilizumabos gátlásával végrehajtott vizsgálat is alátámasztott, ahol ezen markerek szintje a TNFi hatásához képest is szignifikánsabban csökkent.

## 5.2 Második Vizsgálat

A szinoviális angiogenesis kardinális szereppel bír a helyi inflammatórikus válasz szabályozásában, de a proinflammatórikus és proangiogén citokinek felszabadulása szisztémás gyulladást is generál, amely az atheroszklerózis, CV morbiditás és mortalitás megnövekedett kockázatával jár.

Korábbi adatok alátámasztják, hogy a TNFi terápia képes az RA és AS-hez kapcsolt angiogenezis és atheroszklerózis megfékezésére. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a TNFi terápia képes-e a az angiogén mediátorok szintjének csökkentésére 6, illetve 12 hónappal a kezelés megkezdését követően. Kutatásunk egyedülálló mivolta abból ered, hogy a biológiai terápia angiogén biomarkerekre kifejtett hatását a vaszkuláris pathofiziológia (FMD,

ccIMT, PWV), orális egészség és egyéb klinikai paraméterek változásának párhuzamos rögzítése mellett vizsgáltuk.

A TNFi terápia hatékonynak bizonyult mind RA, mind AS esetén, melyet a DAS28-ESR és BASDAI indexek csökkenése tükrözött.

Betegcsoportunk terápia előtti átlagos VEGF értéke a korban egyeztetett egészséges kontroll csoporthoz képest egyértelműen magasabb volt, mely rávilágított az angiogenezis dominanciájára inflammatorikus arthritisben. Egy év hosszúságú TNFi kezelés a VEGF, PDGF-BB és Ang2 szintek szignifikáns esését eredményezte. Néhány már írtak a VEGF termelés csökkenéséről TNFi terápia alkalmazása során RA-s és psoriasisos arthropathiás (PsA) betegek esetén. Azt is bemutatták, hogy a PDGF-B általi szabályozás a HIF-1 által közvetített útvonalakkal átfed a tumorangiogenezises metasztázisképzésben kemotaktikus és proliferatív tulajdonságokat mutatva, így a tumorkutatás attraktív célpontjaként szolgál. A PDGFR gátlása az RA szinoviális fibroblasztok ECM bontó hatását is csökkenti. Tudomásunk szerint elsőként demonstráltuk, hogy a TNFi terápia a PDGF-B szintjét csökkenti inflammatorikus arthropathiás betegek esetében, bizonyítva az átfedést az inflammatorikus és angiogén útvonalak között. Ezen útvonal imatinib receptor tirozin kináz (RTK) inhibitor általi gátlása az RA-hoz kapcsolt ízületi destrukció megfékezésében már hatásosnak bizonyult. A TSP-1 angiogenezisben betöltött szerepével kapcsolatban megoszlanak a vélemények, mivel hatásai anti-angiogén és pro-angiogén jellegűek egyaránt, s gátlásuk vizsgálata leginkább a tumorkutatásban releváns. Valószínűleg a TSP-1 komplex hatásmechanizmusa járult hozzá azon eredményeinkhez, melyek szerint a szérumban TSP-1 értékek 12 hónapos TNFi terápiát követően szignifikánsan nem változtak.

Kísérleteink egyértelmű pozitív korrelációt mutattak a VEGF és Ang2 szintek között, míg az Ang1 VEGF-től függetlennek bizonyult. Ezen felül az Ang2-nek kiemelkedő szerepe van a neoangiogenezis elindításában, s korai PsA-ban az Ang2 fokozott termelését már igazolták. Az arthritiszek pathogenezisében az Ang1/Ang2 arány változhat: a VEGF függő Ang2 magas szintje kísérheti a korai gyulladást és proliferációt, míg a VEGF-től független Ang1 szintek a későbbi érematurációs folyamatokban lehetnek fontosak. Valóban, vizsgálatunkba magas betegségaktivitással rendelkező inflammatorikus arthropathiás betegeket vontunk be, amely tükrözheti a korai aktív Ang2 függő szinoviális angiogenezis dominanciáját az Ang1 párhuzamos háttérbe szorulásával. A TNFi terápia mind a VEGF, mind pedig az Ang2 termelés szupressziójához hozzájárult.

A TNFi angiogenezis markerekre kifejtett hatása mellett vizsgáltuk ezen markerek szintjének a vaszkuláris pathofiziológiával, atheroszklerózissal, orális egészséggel és más paraméterekkel való összefüggését. Az Ang2 értékek korreláltak a CVD anamnézissel rámutatva az angiogenezis jelentőségére inflammatorikus atheroszklerózisban. Az Ang2 és PDGF-BB korrelált a betegségi időtartammal, az Ang1 és az Ang2 pedig a CRP-vel mindazt tükrözve, hogy a hosszú betegségi időtartam és a fokozott gyulladás aktív angiogenezissel jár. Hashimoto és társai leírták az aktív arthritisz és magas titerű angiogén faktorok korrelációját. Kurosaka és csoportja úgy találták, hogy a szérum VEGF szintek markerei az RA betegségaktivitásnak, de az ízületi destrukció prediktorai is egyben. Az Ang1 szint talán a krónikus arthritisz hasznos markere lehet, míg az Ang2 emelkedése kifejezett neoangiogén állapotokhoz társul. Úgy találtuk, hogy a kezdeti Ang2 korrelált a posztterápiás CRP-vel és fordítva, a 12. havi Ang2 a kezdeti CRP-vel, mely a szisztémás gyulladás és a angiogenezis együttes jelenlétéről tanúskodik.

A TNFi terápia előtti aCCP és anti-CEP antitestek pozitívan korreláltak a TSP-1 szintjével az autoimmunitás és neoangiogenezis kapcsolatát megvilágítva. Az angiogenezis és ACPA összefüggése RA-ban a témát célzó tanulmányok hiányában még nem igazán körülírt. Egy korábbi vizsgálat nem talált kapcsolatot a VEGF titer és az aCCP státusz között. A periodontitis és anti-CEP szerepe már be lett mutatva arthritiszek esetében, de nem találtunk olyan tanulmányokat, melyek az angiogenezis és periodontitis vagy anti-CEP összefüggését vizsgálják arthritiszben. Azt tudjuk, hogy a Porphyromonas gingivalis serkenti a TSP-1 elválasztását, amelyről ismert, hogy egy RA-s periodontitis-t triggerelő faktor. Amíg az anti-CEP korrelált a TSP-1-el, addig egyik szóban forgó angiogén faktor sem mutatott asszociációt a meglévő periodontitis-el vagy fogvesztéssel.

A kezdeti PDGF-BB és TSP-1 korrelált a ccIMT-vel, mely arra enged következtetni, hogy ezen angiogén mediátorok az autoimmun atheroszklerózisban is szereppel bírnak. Valóban, előzetes adatok bizonyítják, hogy az angiogenezis hozzájárul az atheroszklerózis pathogeneziséhez. A PDGF-BB és TSP-1 fontos a vaszkuláris simaizom sejtproliferáció és migráció, valamint számos egyéb atheroszklerózissal összefüggő folyamat segítésében, azonban nem találtunk olyan közleményeket, melyek ezen angiogén faktorok közvetlen hatását leírnák az arthritiszhez társuló atherogenezis folyamatában.

A dohányzás, az atheroszklerózis és CVD mind jól ismert tényezők az arthritiszek pathogenezisében. Többváltozós analízisünk során a PDGF-BB szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a dohányzó betegek esetében a nem dohányzóakkal szemben a TNFi

kezelés 12. hónapjára. A dohányzás inflammatorikus angiogenezissel való közvetlen kapcsolata még nem lett kimerítően vizsgálva, habár a PDGF-BB jelátvitel szerepe már említésre került a dohányzás által indukált pulmonális hypertónia kialakulásában.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az angiogenezis kiemelkedő szereppel bír az inflammatorikus arthritisek pathogenezisében, valamint az arthritisekhez társuló inflammatorikus (felgyorsult) atheroszklerózisban is. Néhány angiogén mediátor titere jól korrelál a betegségi időtartammal, CRP-vel, RA-hoz asszociált antitestek jelenlétével és a carotis atheroszklerózissal. Az egy év hosszúságú TNFi terápia mind RA-ban, mind AS-ben csökkentette néhány angiogén mediátor produkcióját, ennél fogva következtethetünk, hogy némely angiogén mediátor biomarkerként funkcionálhat az angiogenezis, gyulladás és atheroszklerózis összefüggését igazolva inflammatorikus arthritisek esetében.

## **6 KONKLÚZIÓ**

Munkánk során áttekintettük a gyulladásos szinoviális angiogenezis és autoimmun atheroszklerózis kulcsfontosságú pathomechanizmusait. Bemutattuk a domináns proinflammatorikus molekulákat a diszfunkcionális angiogenezis folyamatában és a defektív neovaszkularizációs kaskád lehetséges jövőbeni terápiás célpontjairól is beszéltünk. Megvizsgáltuk a szinoviális celluláris bioenergetika, oxidatív stressz és angiogenezis RA-ban való kölcsönhatását. Megfigyeltük, hogy az oxidatív stressz hatása olyan bioenergetikai változásokhoz vezet, melyben az oxidatív foszforiláció az anaerob glikolízis irányába tolódik el a gyulladt ízület magas energiaszükségleteire adott válaszként. Ez egy bioenergetikai krízishelyzet kialakulását facilitálja, mely a már amúgy is defektív angiogenezist ronthatja, s így további gyulladást generál RA-ban. Végül leírtuk, hogy az angiopoetin/Tie2 rendszer képviselőinek szinoviális expressziója TNFi terápiával mérsékelhető. Bemutattuk, hogy inflammatorikus arthropathiákban - mint az RA és AS - a proangiogén mediátorok szintje jól korrelál a betegségi időtartammal, a gyulladás mértékével, az autoimmunitást tükröző ACPA antitestekkel és a szisztémás atheroszklerózissal is. Igazoltuk, hogy a TNFi terápia alkalmazása sikeresen szupresszálja egyes angiogén markerek (VEGF, PDGF-BB és Ang2) produkcióját ezen vegyes betegcsoporton. A fentiek alapján elmondható, hogy némely proangiogén marker biomarkerként funkcionálhat az angiogenezis, gyulladás és atheroszklerózis összefüggését alátámasztva inflammatorikus arthritisek esetében.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

### 7.1 Első Vizsgálat

Az inflammatorikus arthritisek helyi és szisztémás gyulladással jellemezhetők, s olyan események körkörös kaszkádját vonják maguk után, mely egy bioenergetikus krízis alapjául szolgál. Az endothélium megváltozott biológiája és a különféle proinflammatorikus mediátorok egy defektív angiogenezishez vezetnek, amely tovább súlyosbítja a szinoviális gyulladást, proliferációt és destruktív pannusz képződését. A gyulladt ízület egy hypoxiás mikrokörnyezetet teremt és az oxidatív stressz dominálása a légzési láncban változásokat idéz elő, mégpedig az anaerob glikolízis előnyben részesítésével. A további reaktív oxigénvegyületek felhalmozódása és a lipid peroxidáció kedvez a mitokondriális mutációk létrejöttének. A hypoxia, oxidatív stressz, mitokondriális alulműködés, bioenergetikai állapotváltozás, illetve a proangiogén és proinflammatorikus mediátorok felhalmozódása egymással szerves kölcsönhatásban zajlik többféle sejt szignáltranszdukciós folyamatot is involválva. A gyulladás és a defektív angiogenezis nemcsak helyileg, hanem szisztémásan is megmutatkozik autoimmun vaszkuláris plakk-képződés és atheroszklerózis formájában. Több terápiás target is bemutatásra került, melyek ígéretes jövőbeni terápiás stratégiák lehetnek az inflammatorikus arthritisek kezelésében.

Munkánkban az oxidatív stressz szerepét értékeltük a sejt bioenergetikájára, illetve a proangiogén és proinflammatorikus válaszokra olyan primer rheumatoid arthritisz szinoviális fibroblaszt sejtek (RASFC) és humán köldökvéna endoteliális sejtek (HUVEC) vizsgálatával, amelyeket oxidatív stressz markerrel, 4-Hydroxy-2-nonenállal (4-HNE) inkubáltunk. Az extracelluláris savasodási sebesség (ECR), az oxigénfogyasztás sebessége (OCR), a mitokondriális DNS stabilitás és a proangiogén, valamint a proinflammatorikus folyamatok kerültek értékelésre Seahorse készülék használatával, I-V enzimkomplex aktivitási vizsgálatokkal, random mutációs mitokondriális jelölővizsgálatokkal, ELISA módszerrel és funkcionális vizsgálatokkal az érképződés, migráció és invázió vizsgálatára. Az angiogén markerek expressziója a szinoviális szövetben (ST) immunhisztokémiával (IHC) került elemzésre olyan rheumatoid arthritiszes betegek esetében, akik térdízületi arthroszkópián estek át tumor nekrosis faktor- $\alpha$  inhibitorikus (TNFi) kezelés előtt, illetve 3 hónappal azt követően.

A 4-HNE általi oxidatív stressz az energiametabolizmus megváltozásához vezetett a bazális, maximális és adenzin-trifoszfát kapcsolt mitokondriális légzési folyamat és rezervkapacitás gátlásával RASFC és HUVEC sejtekben, amely az III. és V. oxidatív foszforilációs enzimkomplexek csökkent működését vonta maga után. Ellenkezőleg, a 4-HNE stimulatív hatással volt a bazális glikolízisre, glikolitikus kapacitásra és rezervre, mely a mitokondriális mutációk számának növekedésével és reaktív oxigénvegyületek felhalmozódásával járt. A 4-HNE a RASFC proangiogén aktivitását is stimulálta, amely a HUVEC további inváziós, migrációs és érképződési képességét növelte, illetve belőle proangiogén mediátorok felszabadulását segítette elő. Az angiogenezis markerei, mint a vaszkuláris endoteliális növekedési factor (VEGF), tirozin-kináz receptor 2 (Tie2), és ligandja az angiopoetin 2 (Ang2) együttes expressziót mutattak az oxidatív stressz és az oxigén metabolizmus markereivel a gyulladt szinoviális szövetben vizsgálva. A TNFi terápia szignifikánsan csökkentette a szinovium makroszkópikus vaszkularitásfokozódását és az Ang2/Tie2 mikroszkópos expresszióját RA-s betegek esetében.

Az oxidatív stressz hatása megváltoztatja a sejtválaszt egy bioenergetikai átállással az anaerob légzés irányába, amely a gyulladás és a defektív angiogenezis felgyorsulásához vezethet RA-ban.

## **7.2 Második vizsgálat**

A gyulladás és a defektív angiogenezis nemcsak helyileg, hanem szisztémásan is megmutatkozik autoimmun vaszkuláris plakk-képződés és atheroszklerózis formájában. Több terápiás target is bemutatásra került, melyek ígéretes jövőbeni stratégiák lehetnek az inflammatorikus arthritisek kezelésében. A kifejezett szisztémás gyulladás az atheroszklerózis, CV morbiditás és mortalitás rizikójának emelkedésével járhat. Vizsgálatunkban azt vettük szemügyre, hogy a TNFi kezelés megváltoztatja-e az angiogén mediátorok szintjét 6 és 12 hónappal a terápia kezdetét követően, valamint azt, hogy az angiogén mediátorok megemelkedett szintje kapcsolódik-e az FMD/ccIMT/PWV által bemutatott megváltozott vaszkuláris fiziológiához. Hasonlóan meg kívántuk ítélni, hogy az angiogén válasz változása egyrészt korrelál-e az orális egészségmegváltozással, másrészt hogy a dohányzás ténye azt befolyásolja-e.

A TNFi terápia klinikailag hatékonynak bizonyult mind RA, mind pedig AS kezelésében, amit a DAS28-ESR és BASDAI indexek szignifikáns csökkenése tükrözött. A

TNFi-vel való egy éves kezelés a szérumban VEGF, PDGF-BB és Ang2 értékek szignifikáns csökkenését eredményezte. Úgy gondoljuk, hogy a TSP-1 komplex, együttesen anti- és pro-angiogén hatásmechanizmusa vezethet azon megfigyelésünkhöz, mely szerint a szérumban TSP-1 szintje a TNFi terápia 6. és 12. hónapjára szignifikánsan nem változott.

Egyértelmű pozitív korrelációt írtunk le a magas VEGF és Ang2 szintek között, amíg az Ang1 hatása valamelyest VEGF-től függetlennek tűnt. Mindezen túl az Ang2 szintje korrelált a CV megbetegedések jelenlétével alátámasztva az angiogenezis és inflammatórikus atheroszklerózis közötti összefüggést. Az Ang2 és a PDGF-BB szintje korrelált a betegségi időtartammal, illetve az Ang1 és Ang2 összefüggést mutatott a CRP-vel, így igazolva az intenzív angiogenezis, hosszú betegségi időtartam és szisztémás gyulladás együttes átfedését. Ezen felül megfigyeltük, hogy a magas kezdeti Ang2 szintek jól korrelálnak a terápiát követő perzisztensen emelkedett CRP szintekkel, hasonlóan eredményt látva amikor a 12. havi Ang2 értékeket hasonlítjuk a kezdeti CRP értékekhez.

A kezdeti aCCP és anti-CEP autoantitestek jelenléte szintén korrelált a TSP-1 értékekkel az autoimmunitás és neoangiogenezis átfedését tükrözve.

A kezdeti PDGF-BB és TSP-1 összefüggést mutatott a cIMT-vel azt sugallva, hogy ezen angiogén mediátorok szereppel bírnak az autoimmun atheroszklerózis folyamatában.

A többváltozós regressziószámítás alapján a PDGF-BB szintje dohányosok esetében szignifikánsan magasabb volt a nem dohányosokhoz viszonyítva a TNFi terápia 12. hónapjában, amely azt sugallja, hogy a dohányzás ténye a gyulladás folyamatát, valamint a neovaszkularizációt felerősíti és a terápiás választ csökkenti.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az angiogenesis kiemelt szereppel bír az inflammatórikus arthropathiák pathogenezisében, valamint a arthritiszekkel társuló felgyorsult inflammatórikus atheroszklerózisban is. Néhány angiogén mediátor biomarkerként funkcionálhat az angiogenezis, gyulladás és atheroszklerózis együttes megjelenésének alátámasztásában arthritiszek esetében.

## **8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Legmélyebb hálával **Szekanecz Zoltán** **Professzor Úrnak** tartozom, aki fantasztikusan lelkes és kedves témavezetőként kivételesen motiváló, ösztönző módon hatott munkámra a PhD-s éveim során. Megtiszteltetés mentoromnak tudni őt, mindig éreztem a bátorítását, megbecsülését és támogatását együttműködésünk évei során.

Ez a PhD nem lehetne sikeres a dublini mentoraim buzdítása és kitartó támogatása nélkül. Örök hálával tartozom **Professor Ursula Fearon-nak**, **Professor Douglas J Veale-nak** és **Monika Biniecka-nak**. Mindnyájan egy segítő partnerség szellemében, erősítő barátsággal, türelemmel és tudatos magabiztossággal kísérték végig akadémiai pályámon.

Nagyra tartom és köszönöm a professzionális útmutatást, amit **Mary Connollytól**, **Wei Gaotól**, **Ronan Mullantól**, **Len Hartytól**, **Szamosi Szilviától**, **Végh Edittől**, **Váncsa Andreától**, **Szántó Sándor Professzor Úrtól**, **Szűcs Gabriella Professzor Asszonytól** és **Hodosi Katalintól** kaptam. Különös köszönet illeti azon fennmaradó kollegáimat is, akik értékes segítségükkel hozzájárultak ezen munka létrejöttéhez: **Trudy McGarry**, **Carl Orr**, **Chin-Tek Ng**, **Jennifer McCormick**, **Sander W Tas**, **Chrissta X Maracle**, **Pusztai Anita**, **Hamar Attila**, **Kerekes György**, **Csomor Péter**, **Bodoki Levente**, **Pogácsás Lilla**, **Balázs Fruzsina**, **Tar Ildikó**, **Karin Lundberg**, **Nastya Kharlamova** és **Nagy Zoltán**.

Klinikai mentoraimnak, **Professor Oliver FitzGerald-nak** és **Professor Eamonn Molloy-nak**, valamint kollegáimnak és barátaimnak **Szentpétery Ágnesnek**, **Martina Cooneynak**, **Mairead Murraynek**, **Anne-Marie Bakernek**, **Joao Madruga Diasnak** is köszönöm az elmúlt évek alatti pártfogását.

A vizsgálatokban résztvevő **betegeinknek** is kiemelt köszönet jár.

Különös kiváltságom szerető családom, férjem - **Ladislav Csehy**, lányunk - **Csehy Júlia Laura** és szüleim (**Balogh Sándor** és **Balogh Sándorné**), testvérem (**Balogh Sándor**) támogatása, amiért kifejezhetetlen hálával tartozom.



Nyilvántartási szám: DEENK/287/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Balogh Emese  
Neptun kód: CWH742  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

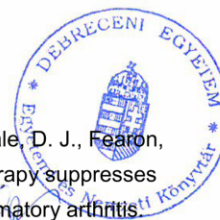
1. **Balogh, E.**, Biniécka, M., Fearon, U., Veale, D. J., Szekanez, Z.: Angiogenesis in inflammatory arthritis.  
*Isr. Med. Assoc. J.* 21, 345-352, 2019.  
IF: 0.828 (2018)
2. **Balogh, E.**, Pusztai, A., Hamar, A., Végh, E., Szamosi, S., Kerekes, G., McCormick, J., Biniécka, M., Szántó, S., Szűcs, G., Nagy, Z., Fearon, U., Veale, D. J., Szekanez, Z.: Autoimmune and angiogenic biomarkers in autoimmune atherosclerosis.  
*Clin. Immunol.* 199, 47-51, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2018.12.011>  
IF: 3.548 (2018)
3. **Balogh, E.**, Veale, D. J., McGarry, T., Orr, C., Szekanez, Z., Ng, C. T., Fearon, U., Biniécka, M.: Oxidative stress impairs energy metabolism in primary cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis.  
*Arthritis Res. Ther.* 20 (1), 1-15, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-018-1592-1>  
IF: 4.148





**További közlemények**

4. Szekanecz, Z., **Balogh, E.**, Koch, A. E.: Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis.  
In: Rheumatology. Ed.: Marc C. Hochberg, Alan J. Silman, Josef S. Smolen, Michael E. Weinblatt, Michael H. Weisman, Elsevier, Philadelphia, 764-767, 2019.
5. Tas, S. W., Maracle, C. X., **Balogh, E.**, Szekanecz, Z.: Targeting of proangiogenic signalling pathways in chronic inflammation.  
*Nat. Rev. Rheumatol.* 12 (2), 111-122, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.164>  
IF: 12.188
6. Gao, W., McCormick, J., Connolly, M., **Balogh, E.**, Veale, D. J., Fearon, U.: Hypoxia and STAT3 signalling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis.  
*Ann. Rheum. Dis.* 74 (6), 1275-1283, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204105>  
IF: 12.384
7. Biniecka, M., Connolly, M., Gao, W., Ng, C. T., **Balogh, E.**, Gogarty, M., Santos, L., Murphy, E., Brayden, D., Veale, D. J., Fearon, U.: Redox-Mediated Angiogenesis in the Hypoxic Joint of Inflammatory Arthritis.  
*Arthritis Rheumatol.* 66 (12), 3300-3310, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.38822>
8. **Balogh, E.**, Dias, J. M., Orr, C., Mullan, R., Harty, L., FitzGerald, O., Gallagher, P., Molloy, M., O'Flynn, E., Kelly, A., Minnock, P., O'Neill, M., Moore, L., Murray, M., Fearon, U., Veale, D. J.: Comparison of remission criteria in a tumour necrosis factor inhibitor treated rheumatoid arthritis longitudinal cohort: patient global health is a confounder.  
*Arthritis Res. Ther.* 15 (6), 1-8, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/ar4421>  
IF: 4.117
9. Shemirani, A. H., Szomják, E., **Balogh, E.**, András, C., Kovács, D., Ács, J., Csiki, Z.: Polymorphism of clotting factors in Hungarian patients with Raynaud's phenomenon.  
*Blood Coagul. Fibrinolysis.* 22 (1), 56-59, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834234fe>  
IF: 1.238
10. Biniecka, M., Kennedy, A., Ng, C. T., Chang, T. C., **Balogh, E.**, Fox, E. J., Veale, D. J., Fearon, U., O'Sullivan, J. N.: Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis.  
*Arthritis Res. Ther.* 13 (4), 1-9, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/ar3424>  
IF: 4.445





11. Saber, T., Veale, D. J., **Balogh, E.**, McCormick, J., NicAnUltaigh, S., Connolly, M., Fearon, U.:  
Toll-Like Receptor 2 Induced Angiogenesis and Invasion Is Mediated through the Tie2  
Signalling Pathway in Rheumatoid Arthritis.  
*PLoS One.* 6 (8), 1-8, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023540>  
IF: 4.092
12. Szentpétery, Á., **Balogh, E.**, Gulyás, K., Horváth, Á., Juhász, B., Szekanecz, Z.: Az anti-RANK  
ligand antitest denosumab törésmegelőző hatása postmenopausalis osteoporosisban a  
FREEDOM vizsgálat alapján.  
*Immunol. Szle.* 2 (4), 67-70, 2010.
13. Galajda, Z., Dér, H., **Balogh, E.**, Szentkirályi, I., Tóth, Z., Soltész, P., Szentmiklósi, J. A.:  
Standardizált polifenol-koncentrátum keringési hatásai koszorúérműtéten átesett betegeken:  
randomizált, kettős vak-, placebokontrollos vizsgálat.  
*Magyar Seb.* 61 (Suppl.), 41-44, 2008.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 46,988**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
8,524**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.07.22.

