

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Dr. Dér Henrietta**

**ANGIOLÓGIAI ELTÉRÉSEK ÉS IMMUNO-  
INFLAMMATORIKUS MECHANIZMUSOK PRIMER  
ANTIFOSZFOLIPID SZINDRÓMÁBAN**

*Témavezető:*

**Dr. Soltész Pál**



**Debreceni Egyetem  
Laki Kálmán doktori Iskola  
Debrecen, 2010.**

## Impresszum

Az értekezés címe: Angiológiai eltérések és immuno-inflammatorikus mechanizmusok primer antifoszfolipid szindrómában

Doktori Iskola: Laki Kálmán doktori Iskola

Témavezető: Dr. Soltész Pál

A szigorlati bizottság:	Elnöke:	Dr. Muszbek László, akadémikus
	Tagjai:	Dr. Pécsváradi Zsolt, Ph. D. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

A bíráló bizottság:	Elnöke:	Dr. Muszbek László, akadémikus
	Tagjai:	Dr. Boda Zoltán, az MTA doktora Dr. Gergely Péter, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2010, november 25. 14. 00 óra

## Bevezetés

Az antifoszfolid szindróma patológiai antitestek szerepével összefüggésbe hozható autoimmun-mediált thrombotikus tünetegyüttes, mely thrombotikus folyamat bármely szerv artériáit, vagy vénáit érintheti, illetve egy speciális formája, az antifoszfolid antitestek által előidézett vetélés. Az antifoszfolid szindróma diagnózisa akkor állítható fel, ha egy bizonyított thrombotikus folyamat mellett konzekvensen kimutatható autoantitest van jelen az alábbiak közül: lupus antikoaguláns, IgG és/vagy IgM típusú antikardiolipin antitest közepes, vagy magas titerben, illetve  $\beta$ 2-glycoprotein I ellenes antitest. Az antifoszfolid antitestek szerepet játszanak az atherosclerosis felgyorsításában, akcelerációjában. A legfontosabb autoantigén a hősokk protein és az oxidált LDL mellett, a B2GPI. A B2GPI a fő target az antifoszfolid antitestek számára, mely mind a primer-, mind a szekunder APS-ben jelen van. Az anti-B2GPI kötődése, B2GPI keresztreakciója az oxidált LDL ellenanyagokkal káros endothel aktivációt okozva egy prokoaguláns állapot létrejöttéhez vezet. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre az antifoszfolid antitestek korai atherosclerosis folyamatában betöltött kóros szerepére is. Mindezek alapján feltételeztük, hogy kapcsolat van az antifoszfolid antitestek jelenléte, az endothel diszfunkció és az atherosclerosis között. Számos különböző laboratóriumi és képalkotó, újonnan bevezetett vizsgálómódszer érhető el, mellyel a korai atherosclerotikus laesiók detektálhatók.

Az egyik ilyen mérési módszer melyet Celermayer és munkatársai 1992-ben közöltek, az artéria brachialis áramlás-, valamint a nitrát-mediált vasodilatációjának nagy felbontású ultrahang készülékkel történő detektálása. A módszer elve, hogy az artéria brachialisban kialakuló áramlásnövekedés folytán létrejövő nyíróerők következtében az endothelsejtekben aktiválódik a nitrogén-monoxid (NO) szintetáz, így NO szintetizálódik, mely elválasztásra kerülve az endothelsejtekből, létrehozza a vasodilatációt. Az áramlásnövekedés (flow-mediált vasodilatáció) következtében kialakuló dilatáció egészséges populációban százalékosan kifejezve mintegy 8%, azonban ha a vasodilatáció mértéke 5 % alatti, endothel diszfunkcióról beszélünk, mely már a szubklinikus atherosclerosis jelzi. Az atherosclerosis korai szakaszában elsőként az endothelsejtek ezen, a nyíróerők hatására létrejövő, NO szintetizáló funkciója károsodik, így a vizsgálattal az artéria csökkent tágulékonyága mutatható ki. Elérhető vizsgálati módszer, az artéria carotis intima-média falvastagságának detektálása, mely szintén nagy felbontású ultrahang segítségével végezhető és az atherosclerosis szempontjából már a korai morfológiai eltéréseket jelzi.

Újonnan bevezetett oszcillometriás non-invazív mérési módszer, az augmentációs index és a pulzushullám terjedési sebesség meghatározása is. Kutatásaink során 44 primer APS-es esetén végeztük el az artéria brachialis flow-mediált vasodilatációjának, a carotis IMT-nek a mérését, mellyel párhuzamosan, mint endothel aktivációt jelző paraméternek a von Willebrand faktor antigén plazmaszintjének a meghatározása is történt, a stiffness paraméterek meghatározása mellett.

Az antitestek mellett az APS pathogenezisében pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek is szerepet játszanak. Az IL-4, az adaptív immunitás kulcsfontosságú regulátora, az immunológiai inflammációt közvetlenül jelző marker, melyet elsősorban az aktivált T-sejtek (Th2), a B-limfociták biológiailag legaktívabb helper sejtjei termelnek. Számos biológiai szereppel bíró citokin, az aktivált B-sejtek proliferációjának, differenciálódásának és stimulációjának induktora, részt vesz a T-sejt proliferációban, valamint CD4+ T sejtek Th2 sejtévé történő differenciálódásában. Feltételezhető, hogy APS-ben a vénás és artériás oldalon egyaránt jelen lévő endothel diszfunkciót, fokozott mértékű atherosclerosist indukál, és szereppel bír az artériás és vénás trombózisok kialakulásában is. A másik fontos citokin az IL-6 legfőbb forrásai in vivo a stimulált monociták, fibroblastok, endothel sejtek, míg a makrofágok, a T-sejtek, a B-limfociták és a granulociták szintén termelnek IL-6-ot stimulációt követően. Az IL-6 képes, a megelőzően IL-4 által aktivált B-sejtek immunglobulint termelő plazmasejtté váló végső átalakulását -, és a plazmasejtek antitest szekrécióját indukálni. Másrészt a szérum IL-10 szint alacsonyabbnak bizonyult APS-ben. Az IL-10 hatása komplex és sokféle, nagymértékben befolyásolja a B-sejtek aktivációjának állapota. A kezdeti aktiváció során negatív regulátorként a B-sejt apoptózist támogatja, ugyanakkor B-sejt differenciálódást indukál az aktivációt követő későbbi immunválasz folyamán. Számos citokin termelődését - mint IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, növekedési faktor és kemokin szekrécióját képes gátolni, ez által az autoimmun folyamatok és az allergiás betegségek kulcsregulátora. A csökkent IL-10 szint, a proinflammatorikus citokinek elégtelen regulációját eredményezve, kapcsolatba hozható ezen gyulladásos autoimmun folyamatok fenntartásával.

Az APS-es betegek angiológiai paramétereinek meghatározását követően vizsgáltuk, hogy a perifériás vérben észlelhető egyes immuno-inflammatorikus eltérések összefüggést mutatnak-e az endothel diszfunkcióra utaló angiológiai eltérésekkel. Munkánk során meghatározásra került a T-helper (Th1/Th2), cytotoxikus T- sejt, aktivált CD4+ és CD8+ sejtek aránya, IFN- $\gamma$ , IL-4 és IL-10 expresszió mértéke, valamint szolubilis citokin szint: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-6, IL-1 és IL-8. Longitudinális vizsgálatunk során egyes gyógyszerek

endothel funkcióra gyakorolt hatását követtük, valamint két, primer APS-es terhes nő esetében lehetőségünk volt követni az endothel funkciós, valamint az érfali merevséget jelző angiológiai paraméterek változását terhességük alatt, valamint az antifoszfolipid antitest titer alakulását és esetleges összefüggését az előbbi paraméterekkel.

## Célkitűzések

1. Munkánk során célul tűztük ki primer antifoszfolipid szindrómás betegek komplex angiológiai vizsgálatát, mely során 44 primer APS-es beteg esetén végeztük el az artéria brachialis flow-mediált és nitrát-mediált vasodilatációjának mérését, valamint meghatároztuk esetükben az artéria carotis communis intima-média vastagságát. Emellett megtörtént a stiffness paraméterek, úgy, mint az augmentációs index és pulzushullám terjedési sebesség meghatározása is. Összefüggést kerestünk a stiffness-, valamint az endothel funkciós paraméterek, és az artéria carotis intima-média vastagság között.

2. A primer APS-ben észlelhető kezdeti angiológiai státusz rögzítése után longitudinális vizsgálatot indítottunk, abból a célból, hogy tanulmányozzuk egyes gyógyszerek endothel funkcióra gyakorolt hatását. A gondozott primer APS-es betegeinket, a társuló egyéb cardiovascularis szövődményektől függően különböző terápiás csoportokba osztva havonta, illetve 3 havonta kontrolláltuk az angiológiai paramétereik változását követve. Két, primer APS-es terhes nő esetében lehetőségünk volt követni az endothel funkciós, valamint az érfali merevséget jelző angiológiai paraméterek változását terhességük alatt, valamint az antifoszfolipid antitest titer alakulását és esetleges összefüggését az előbbi paraméterekkel.

3. Az APS-es betegek angiológiai paramétereinek meghatározásával párhuzamosan immunológiai vizsgálatokat végeztünk abból a célból, hogy kapcsolatot keressünk az immunológiai-, valamint az angiológiai eltérések között. Arra kerestük a választ, hogy a perifériás vérben észlelhető egyes immuno-inflammatorikus eltérések összefüggést mutatnak-e az endothel diszfunkcióra utaló angiológiai eltérésekkel.

## **Betegek és módszerek**

### **I. Angiológiai vizsgálatok primer antifosfolipid szindrómában**

44 primer antifosfolipid szindrómás beteg (25 nő és 19 férfi) angiológiai vizsgálatát végeztük el. A primer antifosfolipid szindróma diagnózisának felállításakor a módosított Sapporo kritériumrendszerét, a thromboembóliás manifesztációk besorolásakor a Bick és Baker-féle beosztást vettük figyelembe. A betegek átlagéletkora:  $52 \pm 15$  év (26-55) volt. 25 beteg esetében szerepelt vénás thromboembóliás esemény az anamnézisben, 19 beteg esetében artériás thrombotikus folyamat zajlott. A 25 primer APS-es nőbeteg nőgyógyászati anamnézisének tekintve, 10 esetben egészséges szüléssel végződő sikeres terhesség, 7 esetén vetélések és sikeres terhességek, 3 esetén csak vetélések szerepeltek az anamnézisben, míg 5 betegnek nem volt terhessége. A vénás érintettségű APS-es betegek közül 4 részesült acenokuramol kezelésben, 12 szedett aspirint, 9 beteg pedig mindkettőt. Az artériás thrombotikus események: 3 akut coronaria szindróma, 5 stroke, 11 perifériás artériás obliteratív érbetegség. Azon betegek, akiknél artériás érintettség fordult elő, mindegyikük statin, ACE-gátló és aspirin kezelésben részesült, valamint közülük 3 beteg emellett acenokumarol, 2 pedig clopidogrel terápiában részesült. Vascularis eseményük az elmúlt 3 hónapban nem volt. A kontroll csoport 36 egészséges, korban és nemből illesztett egyén volt.

A 44 primer APS-es esetén meghatároztuk a flow-mediált és nitrát-mediált vasodilatációt és artéria carotis intima-média vastagságot, mely mérésekkel párhuzamosan von Willebrand faktor antigén szint meghatározás is történt. Az APS-ben észlelhető angiológiai eltéréseket 36 egészséges kontroll személyt tartalmazó csoport endothel funkciós paramétereivel vetettük össze. Az egészséges kontrollszemélyek korban, nemből és cardiovascularis rizikófaktorok tekintetében illesztve voltak a primer APS-esekhez. Az endothel funkciós paraméterek mellett, a stiffness paraméterek vizsgálatát is elvégeztük.

### **II. Longitudinális vizsgálatba bevont betegek**

25 antifosfolipid szindrómás beteget (16 nő és 9 férfi) prospektív jellegű longitudinális vizsgálatba vontunk be. A betegek átlagéletkora  $53 \pm 10$  év (28-50) volt. Ezen betegeknél követtük az endothel diszfunkció és a stiffness paraméterek terápiás befolyásolhatóságát. A társuló egyéb cardiovascularis szövődményeket figyelembe véve, a

bevont betegeket különböző terápiás csoportokba osztottuk: statin (10 beteg), ACE-gátló (10 beteg), béta-blokkoló (2 beteg) és immunszuppresszív (3 beteg) kezelésben részesülők. Az első részletes angiológiai vizsgálatot követően megtörtént a terápiás besorolás, majd havonta, illetve 3 havonta kontrolláltuk az angiológiai paraméterek változását.

Két, primer antifoszfolipid szindrómás terhes nő esetében lehetőségünk volt követni az endothel funkciós, valamint az érfali merevséget jelző angiológiai paraméterek változását a terhességük alatt, melyekkel párhuzamosan laborvizsgálat is történt, az antifoszfolipid antitest titerben bekövetkező változások folyamatos követésére. A fiatal nőbetegek, a korábbi thrombotikus manifesztációktól függően thrombocyta aggregációt gátló aszpirint és/vagy acenokumarolt szedtek, azonban a terhesség tervbevétele követően, alacsony mólsúlyú heparinra állítottuk át őket. Az LMWH dózisának beállítása az anti-Xa faktor szintjének mérésével történt. Az első beteg 24 éves volt, akinek anamnézisében mélyvénás trombózis és ezzel szövődött masszív pulmonalis embólia szerepelt. Jelen vizsgált terhessége az első volt. A második, 28 éves gravida anamnézisében mélyvénás trombózis nem szerepelt, azonban jelen sikeres terhességét kettő habituális vetélés előzött meg.

### **III. Immuno-inflammatorikus mechanizmusok és az angiológiai eltérések összehasonlító vizsgálatába bevont betegek**

28 (12 nő és 16 férfi) újonnan diagnosztizált primer APS beteg bevonásával, az angiológiai vizsgálatok mellett, APS-es betegeink immunológiai státuszát is vizsgáltuk, mely során a következő paraméterek kerültek meghatározásra: T-helper (Th1/Th2), cytotoxikus T-sejt, aktivált CD4+ és CD8+ sejtek aránya, IFN- $\gamma$ , IL-4 és IL-10 exspresszió mértéke, valamint szolubilis citokin (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-6, IL-1 és IL-8) szint meghatározás is történt. A méréseket Coulter EPICS XL áramlási citométerrel végeztük.

Az APS-ben észlelhető immuno-inflammatorikus eltérések elemzésékor azonban már egy másik kontrollcsoport, 36 stabil coronaria beteg laboreredményeit használtuk kontrollként, akiknél az antifoszfolipid irányú vizsgálat az antitestek jelenlétét kizárta. A primer APS-ben észlelhető immuno-inflammatorikus eltérések megjelenítéséhez választott másik, stabil anginás kontrollcsoportra vonatkozó döntésünk alapját az adta, hogy a betegségben észlelhető immunológiai eltéréseket és ezzel kapcsolatba hozható akcelerált atherosclerosis kapcsolatát mindenképp egy olyan betegpopuláció immunológiai paramétereivel kívántuk összevetni, akik esetén bizonyítottan jelen van atherosclerosis, azonban szervezetükben akut gyulladásos folyamat nem zajlik. Ilyen szempontokat



figyelembe véve tűnt logikusnak egészséges kontroll személyek helyett - akiknél atherosclerosis nincs jelen - stabil coronaria betegek immunológiai paramétereinek összevetése a primer APS-es betegek immunológiai jellemzőivel. A vizsgálatok a III. sz Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumában történtek.

### **1. Az endothel funkció vizsgálata – flow-mediált (FMD) és nitrát-mediált vasodilatáció (NMD) meghatározása**

Az FMD és az NMD mérése a nemzetközi ajánlásoknak, és a hazai konszenzusnak megfelelő metodikával történt. A méréseket a betegek jobb karján Hewlett-Packard Sonos 5500 nagyfelbontású duplex készülékkel, 5-10 MHz-es lineáris transzducerrel végeztük, EKG kapuzás mellett. Az artéria brachialisról, a lineáris transducer segítségével az egyéni anatómiai viszonyoknak megfelelően, a könyökhajlattól proximálisan 4-7 cm-re hosszmetzeti képet nyertünk, és így meghatározzuk annak nyugalmi átmérőjét. Ezt követően a vizsgálat kezdetén, az alkaron elhelyezett vérnyomásmérő mandzsetta 4, 5 perces felfújásával, a szisztolés vérnyomást 50 Hgmm-rel meghaladó szupraszisztolés érték fenntartásával, az artériában pangást hoztunk létre. A 4, 5 perces pangást követően a mandzsetta hirtelen felengedésével az artériában reaktív hyperaemiát váltottunk ki, mely az artériában így nyíróerők keletkezését indukálta. A keletkező nyíróerők következtében az endothelsejtek NO-t szintetizálnak, mely mint vasodilatator, artériás vasodilatációt vált ki. Az áramlásnövekedés következtében kialakult vasodilatációt, azaz az artéria átmérőjében bekövetkezett változást, a mandzsetta felengedését követő 60. másodpercben digitálisan rögzítettük. A nyugalmi átmérő értékét elosztva a felengedést követő 60. másodpercben rögzített átmérővel, ezt százzal felszorozva megkapjuk a dilatáció mértékét százalékosan kifejezve. Megtartott endothel kapacitás esetén a dilatáció értéke 8 %, vagy azt meghaladó. Öt százalék alatti érték esetén beszélhetünk endothel diszfunkcióról. A nitrát-mediált vasodilatáció meghatározása során 15 perces pihenést követően ismét lemértük az artéria brachialis méretét, ezt tekintve kiindulási átmérőnek, majd 0,4 mg sublingualis nitroglicerinnel adására került sor, és 3 perces várakozást követően ismét detektáltuk az artéria méretét. A korábbiakhoz hasonlóan a nitrát adását követően detektált értéket elosztva a kiindulás értékkel és megszorozva százzal, megkaptuk az endothel-independens, azaz a nitrát mediált vasodilatációt. A vizsgálati eredményeket digitálisan rögzítettük, azaz az artériáról minden esetben digitális, a számítógépes adatbázisban tárolt kép készült, és mindig utólag történt meg a nyugalmi, a deflációt követő 60. másodperces, a 15 perces pihenést követő ismételt

nyugalmi, illetve a nitroglicerín adása utáni 3-4 perces átmérők meghatározása AVITA kiértékelő szoftverrel. Az átlagos átmérőt, 3 egymást követő szív ciklus R szinkron mért eredményeinek átlagaként adtuk meg.

Az átmérőváltások abszolút értéként (milliméter) és az alapátmérőhöz viszonyítva százalékos formában kerültek leírásra. Az artéria brachialis az endothel-dependens vasodilatációt reaktív hyperaemia kiváltásával, majd az endothel-independens értágulatot sublingualis nitroglicerín adagolásával értük el, a nemzetközi és hazai konszenzusnak megfelelően. Minden mérést ugyanazon személy végzett a délelőtti órákban, állandó hőmérsékletű, légkondicionált, 21°C-os helyiségben, a beteg egyéjszakás éhezését és 30 perces nyugodt fekvését követően. A vizsgálatban résztvevők a vizsgálat reggelén nem dohányoztak, kávé, teát, valamint antioxidáns vitaminokat nem fogyasztottak, 24 órája vasoaktív készítményeket nem vettek be. Az endothel funkció ilyen módon történő detektálásának reprodukálhatósága igen jónak bizonyult. Az interobserver analízist elvégezve 20 betegnél a variációs koefficiens 8,95 % volt. Az intraobserver analízist 10 egészséges egyén esetén végeztük el. Három alkalommal ismételtük meg a vizsgálatot, melyek között 30 perc szünetet tartottunk. A variációs koefficiens ebben az esetben 4,6 % volt. Az artéria brachialis kiindulási átmérőjének meghatározása esetén is elvégeztük a variabilitás vizsgálatát 20 esetben, mely 0,86 % lett. Eredményeink a vizsgáló módszer reprodukálhatóságára vonatkozóan nem különböztek a nemzetközi ajánlástól.

## **2. Artéria carotis communis intima-média vastagság – carotis IMT vizsgálata**

HP Sonos 5500 UH készülékkel duplex ultrahang vizsgálatot végeztünk, 5-10 MHz-es lineáris transzducerrel. Longitudinális és transzverzális metszeteket készítettünk a carotis rendszerről. Plakk hiányában medio-laterális szondaállással hosszmetzeti képet nyertünk az artéria carotis communisokról, majd EKG-kapuzás mellett, végdiasztolében rögzített nagy nagyítású képen 10 mm-re proximalisan a carotis bulbustól online carotis IMT méréseket végeztünk. A carotis IMT-t a vizsgálófejjel szemben lévő falon megjelenő első (lumen-intima határ) és második (média-adventitia határ) echogen vonal távolságaként adtuk meg a leading edge módszert követve. Mindkét oldalon 10-10 mérést végeztünk, a mérési eredményeket átlagoltuk, az eredményeket milliméterben adtuk meg.

### **3. Stiffness paraméterek meghatározása – augmentációs index (AIx) és pulzushullám terjedési sebesség (PWV)**

A stiffness paraméterek, mint az augmentációs index és pulzushullám terjedési sebesség meghatározása a TensioClinic arteriográf segítségével történt. A mérési módszer a perifériás pulzusnyomás görbe függvényanalízisén alapszik, mely az egész artériás rendszerre érvényes információtartalmat, és az érlemezéssel kapcsolatos összefüggéseket hordoz. Az augmentációs index mérése azon a törvényszerűségeken alapszik, hogy a szív összehúzódásának hatására, a szisztolében keletkező első pulzushullám (P1) az aorta oszlásának magasságból visszaverődik (P2), az aorta rugalmasságától függő idő elteltével, valamint a perifériás erek tónusától függő amplitúdóval, és ráakad az első, kezdeti hullámra, így alakítva az eredő pulzushullám görbét. Morfológiáját tekintve, az eredő pulzushullám görbe, az érrendszer rugalmasságától függően eltérően alakul optimális augmentációs indexet (kevesebb, mint 0, akár negatív is lehet), valamint merev falú érrendszerben emelkedett (0%-30%), illetve kóros (30 % fölött) augmentációs indexet eredményezve attól függően, hogy a visszaverődő hullám milyen idő elteltével és mekkora amplitúdóval emeli meg, azaz augmentálja az első hullám amplitúdóját. A reflektált, azaz a késői szisztolés- (P2), és az első hullám (P1) amplitúdójának ismeretében kiszámítható az augmentációs index, mely az ejekció okozta korai szisztolés hullám és a késői, azaz a reflektált hullám amplitúdója közötti különbségnek és a pulzusnyomás hányadosának százalékban kifejezett értéke:

$$AIx (\%) = (P2 - P1)/PP \times 100$$

Egészséges esetben a visszavert hullám (P2) nagysága mindig kisebb, mint a kiindulási szisztolés hullám (P1), ezért  $P2-P1/PP$  negatív értéket ad. Kóros esetben a reflexiós hullám megnövekszik, eléri, illetve meghaladja (augmentálja) az eredeti szisztolés hullámot, így a számított érték nullává, illetve pozitívvá válik.

A pulzushullám terjedési sebesség meghatározása azon fizikai törvényen alapszik, mely szerint a sebesség a megtett út, valamint a megtételéhez szükséges idő hányadosa. Ez alapján az aortában ejektált szisztolés volumen keltette első, és a visszaverődő második szisztolés görbe megjelenése között eltelt idő a reflexiós idő, mely az első és a reflektált hullám által megtett idő összege. A reflexiós idő fele így megegyezik azon idővel, mely ahhoz szükséges, hogy a pulzushullám az aortagyöktől az aortabifurcatiohoz jusson. Invazív vizsgálatok

igazolták, hogy a non-invazív módon mérhető jugulum-symphysis távolság gyakorlatilag ezzel a távolsággal egyezik meg. Így a szegycsont és a szeméremcsont felső széle közötti távolságot elosztva a reflexiós idő felével, meghatározható a pulzushullám terjedési sebesség az aortában.

#### **4. Von Willebrand faktor antigén (vWF<sub>Ag</sub>) kvantitatív meghatározása immunturbidimetriás módszerrel**

A vérminták a vizsgálatba bevont 44 primer APS-es és 36 egészséges kontroll személytől származtak. A 0,105 M nátrium-citráttal alvadásgátolt teljes vérből thrombocytaszegény plazmát nyertek, a vér-citrát arány 9:1 volt. A von Willebrand faktor antigén szint kvantitatív meghatározás immunturbidimetriás módszerrel történt a Klinikai Biokémia és Molekuláris Patológiai Intézetben STA-Liatest vWF kittel (Diagnostica Stago, Asnieres, France) STA-Compact automatán. Az STA-Liatest vWF<sub>kit</sub> (Diagnostica Stago, Asnieres, France), 3 különböző reagenst tartalmazott. Glicin puffert, humán vWF-ellenes antitestekkel fedett mikrolatex partikulákat és a reagens hígítására szolgáló glicin tartalmú puffert. A vWF-ellenes antitestekkel fedett mikrolatex partikulák a vWF, mint antigén jelenlétében agglutinálódtak és az így kialakuló aggregátumok a nagyobb méretük miatt a mintára vetülő fény nagyobb hányadát nyelték el. A mérés 540 nm-en történt. A műszer a mért optikai denzitásokat a vWF<sub>Ag</sub> szintjének függvényében ábrázolta, majd ez alapján határozta meg a 2x hígításban mért minták vWF<sub>Ag</sub> szintjét. Az agglutináció és ez által a fényelnyelés mértéke a mintában jelenlévő vWF mennyiségével volt arányos. A von Willebrand faktor antigén szint kvantitatív meghatározása során a referencia tartomány 50-160 % volt.

#### **5. Limfocita szubpopulációk és aktivált T-sejtek vizsgálata áramlási citométerrel**

A limfocita szubpopulációk (T helper, citotoxikus T, natural killer T sejt) és az aktivált T-sejtek vizsgálata sejtfelszíni markereik ellen termelt monoklonális antitestek (CD3, CD4, CD8, CD19 és CD56) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA és Immunotech, Marseille, Franciaország) felhasználásával, heparinnal alvadásgátolt vérmintából történt. Vizsgálták a T-limfocita aktivációs markereket, úgy mint HLA-DR és CD69 expressziójának mértékét is a CD3+ sejteken (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). A mérések Coulter EPICS XL áramlási citométerrel történtek (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA), Coulter Q-PREP protokoll és rendszer alapján. A limfociták, a monociták és a granulociták szeparálása méret

és granuláltság alapján történt, minden mérés során ötezer limfocitát értékelve. A limfocita szubpopulációk aránya százalékban lett megadva.

## **6. Intracitoplazmatikus citokin meghatározás**

CD4+ and CD8+ sejtek izolálása heparinnal alvadásgátolt teljes vérből történt, az intracitoplazmatikus citokin meghatározás során. A CD4 pozitív Th1, Th2 és Th0 sejtek jellegzetes citokin profiljuk alapján jellemezhetők és különíthetők el. A Th1 sejtek elsősorban IFN- $\gamma$ -t, TNF- $\alpha$ -t, IL-2-t és IL-12-t termelnek, míg a Th2 sejtek dominálónan IL-4-t, IL-5-t, IL-6-t, IL-10-t és IL-13-t termelnek, a progenitor el nem kötelezett Th0 sejtek mind Th1, mind Th2 citokinek termelésére képesek. Ma már - hasonlóan a T helper sejtekhez - egyre inkább elfogadott a CD8+ citotoxikus T sejtek differenciációja is a termelt citokinprofil alapján, de ezzel kapcsolatban kevés irodalmi adat áll még rendelkezésünkre. Mivel a nyugvó limfociták citokin tartalma igen nehezen detektálható, a meghatározás előtt a sejteket steril körülmények között, 25 ng/ml phorbol-myrisztát-acetát – PMA (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) és 1 ng/ml ionomycin (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) hozzáadásával stimulálják, mely során a mintát tartalmazó csövet 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> mellett 4 órán át inkubálják, óránként 1-2 alkalommal keverve. A Golgi apparátusból felszabaduló citokineknek, a sejtből történő kiürülésének gátlása céljából 10  $\mu$ g/ml brefeldin-A-t (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) mérnek a rendszerhez. A festés során normál kísérleti körülmények között, a CD4 és CD8 sejtfelszíni antigének jelöléséhez kvantum-vörös konjugált specifikus monoklonális anti-CD4 és anti-CD8 antitesteket használnak (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA). A rendszert 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubálják.

A vörös vértetek eliminálása FACS lizáló oldattal (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) történik majd a leukociták sejtmembránját permeabilizáló oldattal (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) átjárhatóvá teszik. Mindkét folyamat során 10 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubálnak. Ezután következik mosás, és az intracitoplazmatikus citokinek jelölése specifikus monoklonális antitestekkel: FITC-jelölt anti-humán-IFN- $\gamma$ , phycoerythrin-konjugált anti-humán-IL-4 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), PE-konjugált anti-humán-IL-10 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) 30 percen át sötétben, szobahőmérsékleten. A festési eljárás utolsó lépéseként a sejtek fixálását 500 ml 1 %-os paraformaldehiddel végzik. A minták kiértékelése azonnal megtörténik áramlási citométerrel. Az áramlási citométerrel történt mérések során, a CD4+/CD8+ limfocitákra kapuzva, ötezer

sejt leszámlolása történt meg. A limfociták, monociták és granulociták kapuzását, valamint szeparálását morfológiai jellegzetességeik alapján végzik.

## **7. A szérum szolubilis citokinek detektálása**

A szérum IL-4, IL-10 és IFN- $\gamma$  méréséhez BD OptEIA ELISA kitteket (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) alkalmaztak, a gyártó előírásait követve.

## **8. Statisztikai analízis**

Statisztikai számításainkhoz a StatSoft Version 6. szoftvert alkalmaztuk. Kvantitatív adatainkat eloszlás szempontjából Kolmogorov-Smirnov, valamint Lilliefors teszttel elemeztük. 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. Angiológiai vizsgálatok primer antifosfolipid szindrómában

Elvégezve a 44 primer APS-es beteg, és a korban, nemben, cardiovascularis rizikófaktorokat tekintve a betegcsoporthoz illesztett 36 egészséges kontroll személy esetén a flow-mediált és nitrát-mediált vasodilatáció, az artéria carotis intima-média falvastagság meghatározását, valamint az augmentációs index és pulzushullám terjedési sebesség mérését, eredményeink a következők lettek:

Az artéria brachialis flow-mediált vasodilatációjának kifejezett károsodását detektáltuk primer APS-ben, összevetve az egészséges kontrollcsoporttal ( $3,43 \pm 2,86 \%$  vs.  $7,96 \pm 3,57 \%$ ;  $p < 0,0001$ ). A nitrát-mediált vasodilatáció tekintetében nem mutatkozott lényeges különbség a két csoport között ( $13,71 \pm 6,98\%$  vs.  $12,63 \pm 9,88\%$ ). Vénás és artériás érintettség szempontjából megbontva az antifosfolipid szindrómás betegeinket azt találtuk, hogy mindkét alcsoportban - artériás APS (19 beteg), és vénás APS (25 beteg) - szignifikánsan alacsonyabb az FMD, mint az egészséges kontroll csoportban (vénás APS:  $3,71 \pm 2,77 \%$  és artériás APS:  $3,21 \pm 2,96 \%$  vs. kontroll:  $7,96 \pm 3,57 \%$ ), azonban a két csoport FMD-je között nem volt érdemi különbség.

Az APS-ben a carotis IMT jelentős megvastagodását találtuk az egészséges kontroll csoporthoz képest. ( $0,74 \pm 0,2 \text{ mm}$  vs.  $0,58 \pm 0,085 \text{ mm}$ ,  $p=0,037$ ). A kontroll csoport egyetlen tagja esetén sem detektáltunk plakkot az artéria carotis communison. Az APS-ek közül 23 személy esetén találtunk carotis plakkot, azonban egy sem okozott szignifikáns stenosiszt. Az IMT az artériás és vénás alcsoportokban jelentősen meg volt vastagodva a kontroll csoporthoz viszonyítva (artériás APS:  $0,7 \pm 0,22 \text{ mm}$  és vénás APS:  $0,72 \pm 0,18 \text{ mm}$  vs. kontroll:  $0,54 \pm 0,085 \text{ mm}$ ,  $p=0,044$  ill.  $p=0,074$ ), azonban a két csoport IMT-je között lényegi különbség már nem volt.

A betegcsoportban az FMD és a carotis IMT között negatív, lineáris korreláció volt kimutatható ( $R = -0,4725$ ,  $p=0,002$ ).

Az angiológiai vizsgálatokkal párhuzamosan vonWillebrand faktor antigén plazma szint meghatározás is történt mindkét csoportban. A vWF antigén szintje szignifikánsan magasabb volt a primer APS-es betegek plazmájában az egészséges kontrollokhoz képest ( $157,91 \pm 52,5\%$  vs.  $125,87 \pm 32,8\%$ ;  $p=0,012$ ). További összefüggést keresve az endothel diszfunkció és egyes endothel aktivációs paraméterek között, emelkedett vWF antigén szintet találtunk

azon primer APS-es betegek esetében, akiknél a vénás oldalon alakult ki trombózis, és ezen emelkedett szint korrelált az endothel diszfunkció mértékével ezen alcsoporton belül.

## **II. Longitudinális vizsgálatok primer antifoszfolipid szindrómában**

Az egyes gyógyszerek endothel funkcióra gyakorolt hatását vizsgálva, azon terápiás alcsoportban, ahol ACE-gátló került bevezetésre, a kiindulási 2,6 %-os FMD 4,7%-ra, az AIX 3,2 %-ról -18,1 %-ra történő jelentős javulását tapasztaltuk, míg a statint szedők csoportjában az FMD 3,8 %-ról, 7 %-ra nőtt. Ebben az alcsoportban az AIX jelentős javulást nem mutatott, azonban kiindulási értéke eleve normál tartományban volt.

Kettő primer APS-es terhes nőt folyamatosan követtünk a terhességüket megelőzően, az alatt és a gyermekágyi szak első 6 hetében. Az egyik gravida 24 éves volt, akinek anamnézisében mélyvénás trombózissal szövődött tüdőembólia szerepelt, terhességét megelőzően aszpirint, valamint acenokumarolt szedett, azonban a terhesség tervbevitelét követően, LMWH-ra állítottuk át. A terhessége alatt a CL és B2GPI pozitivitást mutatott (a CL: 14,1 U/ml; B2GPI: 8,1 U/ml), LA negativitás mellett. Az FMD értéke normál tartományban volt (9,24 % - 10,77%) azonban szülést megelőzően a meglévő antitestek titere markánsan megemelkedett (a CL: 59,61 U/ml; B2GPI: 42,56 U/ml) és LA pozitívitás jelent meg, emellett vasculitise alakult ki. Ezzel párhuzamosan az FMD jelentős hanyatlását (3,2 %) detektáltuk. Terhessége 32 hetében preeclampsia tünetei jelentek meg, melyekre tekintettel a graviditás terminálása mellett döntöttek. A gyermekágyi szakban nagy dózisu szteroidban részesült, mely hatására klinikai tünetei mérséklődtek, antitest titerei csökkenő tendenciát mutattak. A kóros FMD értéke is normalizálódott, 8,7 %-ra emelkedett heteken belül. Ezt követően a szteroidot, - dózisének fokozatosan csökkentve - elhagytuk.

A második, 28 éves gravida anamnézisében többszörös vetélés szerepelt. A terhessége alatt konzekvensen anti CL pozitív (9,1 U/ml) volt. Az endothel funkciós paraméterei mindvégig normál tartományban voltak (8,36 % - 10,94 %). Az utolsó trimeszterben megjelenő B2GPI antitest pozitívitás mellett, a meglévő a CL titer emelkedést tapasztaltunk, mivel párhuzamosan egy jelentős FMD csökkenést is sikerült kimutatnunk. Tekintettel, hogy egyéb klinikai tünete nem volt, csak szorosabb követés mellett döntöttünk. A szülés a 39. héten történt komplikációmentesen.



### **III. Immunológiai paraméterek vizsgálata primer antifoszfolipid szindrómában**

#### **III/1. T-sejtes vizsgálatok primer APS-ben**

A vizsgálat során 28 frissen diagnosztizált primer antifoszfolipid szindrómás beteg immunológiai paramétereit vetettük össze 36 stabil coronaria beteg immunológiai laborparamétereivel. A következő paraméterek kerültek meghatározásra: T-helper (Th1/Th2), cytotoxikus T- sejt, aktivált CD4+ és CD8+ sejtek aránya, IFN- $\gamma$ , IL-4 és IL-10 expresszió mértéke, valamint szolubilis citokin szint: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-6, IL-1 és IL-8. Az APS-es betegeket vascularis érintettség tekintetében vénás és artériás alcsoportra bontottuk. A betegeink immunológiai paramétereit összevetettük az esetükben észlelt angiológiai eltérésekkel.

##### ***Primer APS vs. stabil coronaria***

A CD4+/ IL10+ ( $17,63 \pm 12,97$  % vs.  $4,32 \pm 5,83$  %,  $p < 0,001$ ) és a CD8+/ IL10+ ( $17,9 \pm 10,76$  % vs.  $6,44 \pm 17,24$  %,  $p=0,011$ ) sejtek aránya, szignifikánsan magasabbnak adódott a primer APS-es betegek esetén, a kontroll stabil anginás betegekhez képest, azonban a CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ és CD 56+ sejtek arányát tekintve nem volt lényeges különbséget a két csoport között.

Az aktivált T-sejtek közül, a CD3+/HLADR+ és a CD3+/CD69+ sejtek százalékos aránya magasabbnak bizonyult a primer APS-esek esetében ( $10,4 \pm 7,73$  % vs.  $12,23 \pm 10,93$  %,  $p=0,63$  és  $1,66 \pm 1,61$  % vs.  $1,16 \pm 1,01$  %,  $p=0,27$ ), azonban ez nem volt szignifikáns.

##### ***Vénás APS és artériás APS vs. stabil coronaria***

A dupla pozitív T-limfociták (CD4+/IL10+ és CD8+/IL10+) tekintetében, ugyan nem volt szignifikáns különbség a primer APS vénás-, és artériás alcsoportjai között, azonban külön-külön, mindkettő esetén szignifikánsan magasabbnak adódott a CD4+ (vénás:  $14,61 \pm 13,42$  % és artériás:  $19,31 \pm 12,39$  % vs. stabil angina:  $4,32 \pm 5,83$  %,  $p=0,0014$  és  $p < 0,0001$ ) és CD8+ sejtek aránya, a kontroll stabil anginás betegcsoporthoz képest (vénás:  $17,82 \pm 12,42$  % és artériás:  $17,82 \pm 10,56$  % vs. stabil angina:  $6,44 \pm 7,24$  %,  $p=0,0014$  és  $p < 0,001$ ).

### **III/2. Tc0/Th0/Th1/Th2 sejt arány vizsgálata – intracellularis citokin profil alapján**

#### ***Primer APS vs. stabil angina***

Az APS-es betegcsoportban a Th0 (CD4+/IFN $\gamma$ +/IL4+) és a Tc0 (CD8+/IFN $\gamma$ +/IL4) sejt arány ( $0,54 \pm 0,85$  % vs.  $1,4 \pm 1,68$  %,  $p=0,008$  és  $0,49 \pm 0,47$  % vs.  $1,46 \pm 2,08$  %,  $p=0,01$ ) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint stabil coronaria esetén, ugyanakkor a Th1 ( $22,78 \pm 11,65$  % vs.  $24,98 \pm 9,48$  %) és Th2 ( $0,31 \pm 0,35$  % vs.  $0,45 \pm 2,08$  %) sejtek százalékos arányát tekintve nem volt lényeges különbség a két csoport között.

#### ***Vénás APS és artériás APS vs. stabil coronaria betegség***

A Th0, Tc0, Th1, Th2 sejtek arányát tekintve nem volt szignifikáns különbség az artériás és vénás APS-es alcsoportok között. Ugyanakkor stabil coronariával összehasonlítva az artériás-, és vénás alcsoportra bontott betegpopulációt, azt találtuk, hogy, a Th 0 (CD4+/IFN $\gamma$ +/IL4+) és a Tc0 (CD8+/IFN $\gamma$ +/IL4) sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt ezen alcsoportokban stabil coronariahoz képest ( $0,29 \pm 0,27$  % és  $0,72 \pm 1,05$  % vs.  $1,4 \pm 1,68$  %,  $p=0,01$  és  $p=0,045$ ) és ( $0,5 \pm 0,58$  % és  $0,46 \pm 0,39$  % vs.  $1,46 \pm 2,08$  %,  $p=0,039$  és  $p=0,031$ )

### **III/3. Keringő citokinek**

#### ***Primer APS vs. stabil angina***

A szérum citokinek közül az IFN- $\gamma$  ( $99,89 \pm 243,98$  pg/ml vs.  $31,03 \pm 69,05$  pg/ml) és az IL-1 ( $9,18 \pm 20,2$  vs.  $4,89 \pm 10,93$  pg/ml) magasabb, míg az IL-4 ( $31,46 \pm 60,69$  pg/ml vs.  $1,4 \pm 3,23$  pg/ml,  $p=0,015$ ) és IL-6 ( $24,76 \pm 13,94$  pg/ml vs.  $10,23 \pm 11,97$  pg/ml,  $p < 0,05$ ) szignifikánsan magasabb titere volt kimutatható APS-ben. A szérum IL-10 ( $8,18 \pm 10,21$  pg/ml vs.  $27,03 \pm 70,18$  pg/ml) és IL-8 ( $79,28 \pm 37,7$  pg/ml vs.  $128,65 \pm 241,5$  pg/ml) szint is jelentősen ugyan, de nem szignifikáns mértékben volt alacsonyabb primer APS-ben, stabil coronaria betegséggel összehasonlítva

### ***Vénás APS és artériás APS vs. stabil coronaria***

A keringő citokinek szintjében nem volt jelentős különbség a két alcsoport között, azonban érdekesség, hogy a szérum IL-1 ( $18,36 \pm 27,73$  pg/ml vs.  $4,89 \pm 10,93$  pg/ml,  $p < 0,05$ ) és IL-4 ( $48,71 \pm 80,05$  pg/ml vs.  $1,4 \pm 3,23$  pg/ml,  $p = 0,031$ ) szint artériás érintettségű APS-es betegcsoportban szignifikánsan magasabb volt a stabil coronaria betegek szérumszintjéhez viszonyítva.

### **III/4. Az immunstátusz és az angiológiai paraméterek kapcsolata**

A primer APS-es betegcsoport esetén talált angiológiai eltérések esetleges összefüggését vizsgálva az immuneltérésekkel, bizonyos immunparaméterek esetén statisztikailag viszonylag kevés mintaszám állt rendelkezésre, de emellett is a carotis IMT, az AIx és a PWV erős pozitív, lineáris összefüggését találtuk az IL-4 szérumszintjével ( $R = 0,7$  és  $p = 0,015$ ;  $R = 0,64$  és  $p = 0,015$ ;  $R = 0,899$  és  $p < 0,001$ ).

Igen érdekes a PWV és a CD8+/IL10+, valamint a CD8+/IL10- sejt arány kapcsolata is, mely szerint a PWV és a CD8+/IL10+ sejt arány között negatív lineáris ( $R = -0,395$ ;  $p = 0,045$ ) összefüggést találtunk, ugyanakkor a PWV és a CD8+/IL10- sejt arány pozitív lineáris összefüggést mutatott egymással ( $R = 0,46$ ;  $p = 0,015$ ).

### **IV. Stiffness paraméterek összefüggései az endothel funkciós paraméterekkel primer antifosfolipid szindrómában**

Az endothel funkciós paraméterek kapcsolatát vizsgálva a stiffness paraméterekkel az FMD erős negatív lineáris korrelációját találtuk az augmentációs indexszel (FMD–AIx:  $R = -0,594$ ,  $p < 0,001$ ), valamint a pulzushullám terjedési sebességgel (FMD–PWV:  $R = -0,655$ ,  $p = 0,0002$ ). Az artéria carotis intima-média falvastagság pozitívan korrelált a stiffness paraméterekkel (IMT–AIx:  $R = 0,59$ ,  $p = 0,0012$ ; IMT–PWV:  $R = 0,6$  és  $p < 0,001$ ).

## Megbeszélés

A hagyományos rizikófaktorok mellett, az atherosclerosis pathogenezisében a nem tradicionális, immun-inflammatorikus faktorok is előtérbe kerültek, melynek figyelembe vétele a terápiás beavatkozások során nagyon fontos az atherothrombotikus események megelőzésében. Autoimmun betegségben, mint az SLE, APS, vagy RA jellemző az atherosclerosis akcelerációja és ezen betegek esetén emelkedett a cardiovascularis események rizikója. Az APS-ben észlelhető akcelerált atherosclerosis egyértelmű példája a nem tradicionális rizikófaktorok által előidézett atherothrombosisnak. Számos kísérleti állatmodell és humán vizsgálat igazolta az antifoszfolipid antitestek pathológiai szerepét az atherosclerosisban. Az antifoszfolipid antitestek képesek az endothel sejteket proinflammatorikus és prokoaguláns irányban aktiválni, hatásukra az adhezív molekulák, citokinek, a szöveti faktorok aktiválódnak, kulcsfontosságú szerepet betöltve ezáltal az atherosclerotikus folyamat elindításában, pathogenezisében. Az APS antitestek által mediált kóros endothel aktivációnak kritikus szerepe van az APS-asszociált vasculopathiában. A krónikusan jelen lévő endothel diszfunkció a vascularis károsodás preklinikai stádiumát jelzi, az UH-al detektálható morfológiai eltérések, -úgy mint az artéria carotis IMT megvastagodás-megjelenését megelőzően. Számos tanulmány igazolt megvastagodott carotis IMT-t APS-ben. Az antifoszfolipid szindróma egy autoantitestes patomechanizmusú szerzett thrombophil állapot. A patológiás autoantitestek különösen az anti B2GPI ellenes ellenanyag hatását endothel ellenes aktivitással hozza létre. Az endothelhez kötődve prothrombotikus és proinflammatorikus irányba tolja el annak funkcióját. Ezen funkcióváltozások olyan érzékeny angiológiai módszerekkel detektálhatóak, mely módszerek klinikai hasznosíthatósága napjaink orvosi diagnosztikájában már jelen van.

Vizsgálatunk során ezért tűztük ki azt a célt, hogy primer antifoszfolipid szindróma immuno-inflammatorikus eltéréseit döntően az aktivációs citokinek elemzésével modellezzük, illetve párhuzamosan vessük össze az endothel diszfunkciót jelző angiológiai paraméterekkel. Csökkent endothel-dependens vasodilatációt, valamint ezzel összefüggésben emelkedett carotis IMT igazoltunk ezen betegeink esetében. Eredményeinkhez hasonlóan egyéb kutatások is igazoltak emelkedett artéria carotis IMT-t primer APS-ben, alátámasztva ezzel az antifoszfolipid antitestek atherogén szerepét. Az antitestek által előidézett kóros endothel aktiváció jeleként pedig emelkedett vWF antigén szintet is igazoltunk. Egyes gyógyszerek endothel funkcióra gyakorolt hatását követve az ACE-gátló bevezetésével jelentős endothel

funkció-, valamint augmentációs index javulás volt elérhető, valamint két, primer antifoszfolipid szindrómás terhes nő esetében az endothel funkció romlásával párhuzamosan jelentős antitest titer emelkedést sikerült kimutatnunk.

Kutatásaink eredményeként olyan új adatokat nyerünk a primer antifoszfolipid szindrómáról, mely segít egyfelől a patomechanizmus feltárásban, másfelől a klinikai tünetek alapját képező angiológiai elérések megismerésében. Igazolni tudtuk a T-sejtes aktivációt, az aktiváció irányultságában pedig, a Th2 dominanciát. A párhuzamosan végzett funkcionális és morfológiai vizsgálatainkkal pedig, endothel diszfunkcióra jellemző kóros artériás tágulékonytságot, korai atherosclerosisra már jellemző kóros érfali merevséget, az atherosclerosis korai manifesztációját jelző carotis IMT megvastagodását észleltük. Az immuno-inflammatorikus és az angiológiai paraméterek között összefüggést is találtunk, a szolubilis IL 4 és a carotis IMT, illetve pulzushullám terjedési sebesség és augmentációs index tekintetében. Hasonlóan összefüggést találtunk a CD8 pozitív sejtek aránya és a pulzushullám terjedési sebesség értéke között, illetve ezen esetekben kettős festéssel, az IL10 reguláló hatását is be tudtuk mutatni. Az eredmények hasznosak lehetnek a későbbi biológiai terápiák megtervezésénél.

## Új eredmények

1. Primer antifoszfolipid szindrómában 44 beteg esetén vizsgáltuk az endothel funkciós paramétereit, és új eredményként mutattuk ki ezen betegcsoportban az artéria brachialis flow-mediált vasodilatációjának kifejezett károsodását, valamint a kórosan megnövekedett artéria carotis intima-média falvastagságot. Az angiológiai paraméterek kapcsolatát tekintve a flow-mediált vasodilatáció és a carotis IMT között negatív lineáris korreláció igazolódott.

2. Az angiológiai vizsgálatokkal párhuzamosan vonWillebrand faktor antigén szérumszint meghatározását is elvégeztük, és primer APS-ben szignifikánsan magasabb szintjét igazoltuk.

3. Antifoszfolipid szindrómában longitudinális vizsgálatokat végezve, az egyes gyógyszerek endothel funkcióra gyakorolt hatását követve 25 beteg esetén, azt találtuk, hogy azon terápiás alcsoportban, ahol ACE-gátló került bevezetésre, jelentős endothel funkció-, valamint augmentációs index javulás volt elérhető.

4. Két, primer antifoszfolipid szindrómás terhes nő esetében folyamatosan követtük az endothel funkciós, valamint az érfali merevséget jelző angiológiai paraméterek változását a terhességük alatt, melyekkel párhuzamosan laborvizsgálatot is végeztünk az antifoszfolipid antitest titerben bekövetkező változások folyamatos követésére. Mindkét gravida esetén az endothel funkció romlásával párhuzamosan jelentős antitest titer emelkedést sikerült kimutatnunk.

5. A primer antifoszfolipid szindróma immunológiai sajátosságait vizsgálva szignifikánsan magasabb CD4+/IL10+ és CD8+/IL10+ sejt arányt mutattunk ki. Az antifoszfolipid szindrómás betegek fokozott immuno-inflammatorikus aktivitására utal, hogy a CD4 pozitív és CD8 pozitív sejt arány már a korai, még el nem kötelezett stádiumban is magasabb. A keringő citokinek közül APS-ben az IL-4 és az IL-6 szintje bizonyult szignifikánsan magasabbnak stabil coronariahoz képest, míg artériás érintettségű APS-es betegek esetén az IL-1 is jelentősen emelkedett volt.

**6.** Primer antifoszfolipid szindrómában észlelt angiológiai eltéréseket elsőként vetettük össze a betegek jellemző immunológiai eltéréseivel. Azt találtuk, hogy a carotis IMT, az AIX és a PWV erős pozitív, lineáris összefüggést mutatott az IL-4 szérumszintjével. Figyelemre méltó volt pulzushullám terjedési sebesség negatív lineáris kapcsolata a CD8+/IL10+ sejt aránnyal, valamint pozitív lineáris összefüggése a CD8+/IL10- sejt aránnyal.

**7.** Az endothel funkciós paraméterek kapcsolatát vizsgálva a stiffness paraméterekkel primer APS-ben, az FMD erős negatív lineáris korrelációját találtuk az érfali merevséget jelző augmentációs indexszel, valamint a pulzushullám terjedési sebességgel. A funkcionális károsodást jelző endothel diszfunkció mellett, a definitív érfali károsodásra utaló carotis IMT is pozitív lineáris összefüggést mutatott a stiffness paraméterekkel.

## PUBLIKÁCIÓ

### A Phd értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Dér Henrietta**, Kerekes György, Veres Katalin, Szomják Edit, Soltész Pál.  
**Arteria brachialis flow-mediált vasodilatáció, carotis intima-média vastagság és augmentációs index (AIx) összehasonlító vizsgálata.**  
Érbetegségek 2006, 3: 79-86.
2. **Henrietta Der**, Gyorgy Kerekes, Katalin Veres, Peter Szodoray, Gabriella Lakos, Judit Toth, Gyula Szegedi, Pal Soltesz.  
**Impaired endothelial function and increased carotid intima-media thickness in association with elevated von Willebrand antigen level in primary antiphospholipid syndrome.**  
Lupus 2007, 16 (7): 497-503.  
**IF: 2, 4**
3. Henrietta Der\*, Pal Soltesz\*, Katalin Veres, Renata Laczik, Sandor Sipka, Gyula Szegedi, Peter Szodoray.  
**Immunological features of primary anti-phospholipid syndrome in connection with endothelial dysfunction.**  
Rheumatology (Oxford) 2008, 47 (11): 1628-34.  
**IF: 4, 052**  
\* egyenrangú elsőszerzők
4. Pal Soltesz, **Henrietta Dér**, Gyorgy Kerekes, Peter Szodoray, Gabriella Szucs, Katalin Danko, Yehuda Shoenfeld, Gyula Szegedi, Zoltan Szekanecz.  
**A comparative study of arterial stiffness, flow-mediated vasodilation of the brachial artery, and the thickness of the carotid artery intima-media in patients with systemic autoimmune diseases.** Clin Rheumatol. 2009, 28 (6): 655-62.  
**IF: 1, 459**



**Az értekezésben fel nem használt közlemények jegyzéke:**

1. Veres K., Szomják E., Kerekes Gy., **Dér H.**, Szerdahelyi Sz., Tumpek J., Soltész P.  
**Foszfolipid ellenes antitestek alsó végtagi perifériás érbetegekben.**  
Érbetegségek 2006, 1: 21-26.
2. Szomják Edit, **Dér Henrietta**, Veres Katalin, Kerekes György, Tóth Judit, Ifj. Péter Mózés, Bakó Gyula, Soltész Pál.  
**Perifériás érbetegeink klinikai adatainak elemzése, különös tekintettel a kor- és nembeli sajátosságokra, valamint az intervenciós radiológiai beavatkozások késői eredményeire** Magyar Belorvosi Archívum 2006, 59: 260-266.
3. P. Szodoray, O.Timar, **H. Der**, E: Szomjak, G. Lakos, M. Aleksza, B. Nakken, G. Szegedi, P. Soltesz.  
**Th1/Th2 Imbalance, Measured by Circulating and Intracytoplasmic Inflammatory cytokines – Immunological Alterations in Acute Coronary Syndrome and Stable Coronary artery Disease**  
Scandinavian Journal of Immunology 2006, 64: 336-344.  
**IF: 1,912**
4. Emese Kiss M.D., Ph.D., Pal Soltesz M.D., Ph.D., **Henrietta Der M.D.**, Zsolt Kocsis M.D., Tunde Tarr M.D., Harjit Bhattoa M.D., Ph.D., Yehuda Shoenfeld M.D., FRCP and Gyula Szegedi M.D., D.Sc.  
**Reduced flow-mediated vasodilation is a good marker of cardiovascular complications in lupus patients**  
Autoimmun. 2006, 27: 211-7.  
**IF: 2,491**
5. Soltész Pál, Prohászka Zoltán, Füst György, **Dér Henrietta**, Kerekes György, Szodoray Péter, Zeher Margit, és Szekanecz Zoltán  
**Vasculopathiák autoimmun vonatkozásai.**  
Orv. Hetilap 2007, 148: 53-57.

6. Gabriella Szűcs, Orsolya Tímár, Zoltán Szekanecz, **Henriett Dér**, György Kerekes, Szilvia Szamosi, Yehuda Shoenfeld, Gyula Szegedi, Pál Soltész.  
**Endothelial dysfunction precedes atherosclerosis in systemic sclerosis: relevance for prevention of vascular complications**  
Rheumatology (Oxford) 2007, 46 (5): 759-62.  
**IF: 4, 22**
7. Szekanecz Z, Kerekes G, **Dér H**, Sándor Z, Szabó Z, Végvári A, Simkovics E, Soós L, Szentpétery A, Besenyei T, Szűcs G, Szántó S, Tamási L, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltész P.  
**Accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis.**  
Ann N Y Acad Sci. 2007, 1108: 349-58. Review.  
**IF: 1, 93**
8. Pal Soltesz MD PhD, Katalin Veres MD PhD, Renata Laczik, **Henrietta Der** MD, Istvan Csipo PhD, Judit Tumpek MD, Orsolya Timar MD, Edit Szomjak MD, Gyula Szegedi MD, PhD and Peter Szodoray MD PhD  
**Evaluation of antibodies to oxidized low-density lipoprotein,  $\beta$ 2-glycoprotein I and assessment of C-reactive protein in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease.**  
Thromb Haemost. 2007, 98: 413-9.  
**IF: 2, 80**
9. Soltész P, Veres K, Szomják E, Kerekes G, **Dér H**, Sándor Z, Dezsó B, Dévényi K, Szekanecz Z.  
**Catastrophic antiphospholipid syndrome (Asherson's syndrome) associated with cytokeratin 7-positive endometrial cancer.**  
Isr Med Assoc J. 2007, 9: 891-3.  
**IF: 0, 51**
10. Kerekes G, Szekanecz Z, **Dér H**, Sándor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipő I, Sipka S, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Szomják E, Veres K, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltész P.

**Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity.**

J Rheumatol. 2008, 35: 398-406.

**IF: 2, 94**

11. Orsolya Tímár, Zoltán Szekanecz, **Henriett Dér**, György Kerekes, Szilvia Szamosi, Yehuda Shoenfeld, Gyula Szegedi, Pál Soltész, Gabriella Szűcs.

**Increased arterial stiffness as the marker of vascular involvement in systemic sclerosis**

J Rheumatol. 2008, 35: 1329-1333.

**IF: 2, 94**

12. Szomják Edit, **Dér Henrietta**, Kerekes György, Veres Katalin, Dezső Balázs, Takács István, Tóth Judit, Péter Mózes, Soltész Pál.

**Megoldatlan terápia - komplex kezelés Buerger-kór esetén**

LAM 2008 18 (6/7): 493-497.

13. Szomják Edit, **Dér Henrietta**, Kerekes György, Veres Katalin, Tóth Judit, Olvasztó Sándor, Herczku Csaba, Soltész Pál.

**Multiplex obliteratív érbetegség – kihívás a diagnosztikában és a kezelésben**

Orv. Hetil. 2008, 45: 2135-2140.

14. György Kerekes, Pál Soltész, **Henriett Dér**, Katalin Veres, Zoltán Szabó, Anikó Végvári, Yehuda Shoenfeld, Zoltán Szekanecz.

**Effects of rituximab treatment on endothelial dysfunction, carotid atherosclerosis and lipid profile in rheumatoid arthritis.**

Clin Rheumatol. 2009, 28: 705-10.

**IF: 1, 958**

15. Szomjak E, Der H, Kerekes G, Veres K, Csiba L, Toth J, Peter M, Soltesz P, Szodoray P.

**Immunological parameters, including CXCL8 (IL-8) characterize cerebro- and cardiovascular events in patients with peripheral artery diseases.**

Scand J Immunol. 2010, 71: 283-91.

**IF: 1, 912**

16. Soltesz P, Bereczki D, Szodoray P, Magyar MT, Der H, Csipo I, Hajas A, Paragh G, Szegedi G, Bodolay E.

**Endothelial cell markers reflecting endothelial cell dysfunction in patients with mixed connective tissue disease.**

Arthritis Res Ther. 2010, 2: R78.

**IF: 4, 49**

### **Szcientometria**

Értekezés alapjául szolgáló közlemények száma: 4

Egyéb közlemények száma: 16

Az értekezést megalapozó közlemények impakt faktora: 7,911

Az értekezésben fel nem használt közlemények impakt faktora: 28, 111

Összesített impakt faktor: 36,022

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó idézhető absztraktok száma: 8

Az értekezés témájában elhangzott egyéb előadások és poszterek száma: 17

Egyéb előadások és poszterek száma: 28