

# KUTATÓI ZÁRÓ JELENTÉS

## 2004-2007

### „A pathológiás thrombocyta aktiváció és az antithrombotikumok szerepe az ischaemiás szívbetegség különböző megjelenési formáiban „ című OTKA pályázathoz

**Készítette: dr.Tóth Zsámboki Emese**

A 2004-2007 között végzett kutatómunka fő tárgya a thrombocyták ischaemiás szívbetegségben, azaz a humán atherosclerosis akut és krónikus fázisaiban játszott pathológiás szerepének vizsgálata volt. Az atherosclerotikus plaque ruptúrája vagy eróziója során a vérlemezkék aktiválódása a létrejövő okkluzív thrombus képződésének központi lépése, így a thrombocyta gátló gyógyszerek jelenleg a kardiovaszkuláris medicina elengedhetetlen elemei. Jelen kutatómunka ezért kitért az antithrombotikus gyógyszerek hatékonyságának vizsgálatára, a gyógyszerrezisztencia lehetséges mechanizmusaira is. Emellett eredeti témakörünk kibővült az akut atherothrombózis (ennek kardiológiai manifesztációja, az akut myokardiális infarktus illetve akut koronária szindrómák) pathomechanizmusában szerepet játszó endothelialis károsodás és az oxidatív stressz szerepével is.

#### **I. A thrombocyták pathológiás szerepe ischaemiás szívbetegségben; a thrombocyta gátló gyógyszerek rezisztenciájának lehetséges mechanizmusai**

Jelenleg a kettős thrombocyta aggregáció gátlás (clopidogrel és aszpirin) a kardiovaszkuláris terápia fő eleme; hatékonysága jelentős individuális eltéréseket mutat (rezisztencia), nem megfelelő szintje növeli a kardiovaszkuláris rizikót. Az antithrombocyta kezelés hatékonyságának mérésére, a rezisztens betegek kiszűrésére klinikai igény van, az direkt terápiais konzekvenciával és reményeink szerint az adverz kardiális események számának csökkenésével, a kardiovaszkuláris halálozás mérséklődésével jár.

Célkitűzések, főbb eredmények:

- A standard aszpirin kezelés hatékonyságának felmérésére aggregációs tesztek kidolgozása (n=25) (1. pont).
- Az ADP EC50 értékének meghatározása a clopidogrel kezelés effektivitásának mérésére (n=86). Clopidogrel rezisztens betegek identifikálása (2. pont).
- A catecholaminok pathológiás aggregációban játszott szerepének tisztázása (n=124) ischaemiás szívbetegség miatt PCI-ra kerülő betegekben (3.pont).
- A pathológiás thrombocyta purinerg funkció (P2Y1 ADP receptor) hozzájárulására az atherothrombózis folyamatához (4. pont).
- Kizártuk a statinok és a P2Y12 receptor gátló clopidogrel közti negatív gyógyszer-interakciót és bizonyítottuk a statinok pleiotrop, aggregáció gátló hatását is (n=48)(5. pont).
- Adatbázisunk alapján kidolgoztuk a koronária stent thrombózis esetén javasolható alternatív thrombocyta gátló kezelés lépéseit is (n=10)(6. pont). Egy recidív koronária stent thrombózisos eset részletes molekulárgenetikai analízise.

#### *1. Az aszpirin (ASA) in vivo és in vitro trombocytagátló hatásának vizsgálata*

Az ASA trombocyta aggregáció-gátló képessége egyénenként különböző és befolyásolja a recidív kardiovaszkuláris események számát és a mortalitást. Célunk olyan in vitro trombocyta aggregációs tesztek kidolgozása volt, mely segítségével az aszpirin hatása felmérhető, a

rezisztens betegek kiszűrhetőek. Napi 100mg ASA per os szignifikánsan csökkentette az arachidonsav, az adrenalin és a kollagén indukálta trombocytá-aggregációt ( $p < 0,005$ ), míg az ADP, az U466613 (specifikus thromboxane receptor agonista) indukálta aggregációkra nem volt hatással. A fenti aggregációs paraméterek tehát alkalmazhatóak az ASA terápia követésére és a rezisztens betegek szűrésére. Ha in vitro aszpirinnel preinkubáltuk a trombocytákat, ASA nem szedőkön a kollagen indukálta aggregáció jelentősen csökkent tovább ( $p < 0,005$ ); aszpirin szedőkön az in vitro ASA csak parciális hatású ( $p = \text{NS}$ ), ezen betegek reziduális aggregációja magasabb, mint az aszpirint nem szedőké (30 versus 19,5%). Ez a jelenség az ASA rezisztencia egyéni mértékére utal és jelzi, hogy a krónikus aszpirin terápia alternatív, COX-1 independens aggregációs mechanizmusok aktiválódásához vezet.

## *2. Az ADP EC50 érték meghatározásának szerepe clopidogrel rezisztens betegek kiszűrésében percután koronária intervencióra (PCI) kerülő ischaemiás szívbetegekben.*

A P2Y12 ADP receptort gátló clopidogrel esetében hepaticus metabolizáció révén létrejövő aktív metabolit kialakulására van szükség a trombocytá aggregáció gátlás eléréséhez; a hatékonyság jelentős interindividuális eltéréseket mutat. Célunk a standard dózisu napi 75 mg clopidogrel és 100 mg ASA kezelés trombocytá gátló hatásának felmérése volt ischaemiás szívbetegség miatt PCI-ra kerülő betegekben ( $n=86$ ). Habár a P2Y12 ADP receptor EC50 értéke kísérletes rendszerekben az alacsony mikromoláris tartományban van, a legtöbb humán trombocytá vizsgálat eddig magas koncentrációjú ADP-t használt. Ezért a terápia hatékonyságának utánkövetésére meghatároztuk az ADP EC50 értéket is.

Az ADP EC50 értékét Born aggregometriás módszerrel, 0.164-10  $\mu\text{M}$  ADP induktossal mértük (ADP:  $1,99 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$  ADP aggr.:  $43 \pm 15\%$ ). Négy órával 300 mg clopidogrel bevétele után az EC50 értékek jelentősen emelkedtek ( $p < 0,05$ ). Az EC50 érték alapján a populáció 10,8%-a volt clopidogrel rezisztens (EC50 kevesebb, mint 10%-ot változott); e csoportban emelkedett CRP, sCD40L és vWF szinteket mértünk, jelezve, hogy a clopidogrel hatását az aktív metabolit képződésének mértéke mellett befolyásolja a háttérben zajló atherosclerotikus gyulladási folyamat intenzitása is. A 10  $\mu\text{M}$  ADP aggregációk alapján több (16%) a rezisztensek aránya ( $p < 0,05$ ), azaz magas ADP koncentrációkkal túlbecsüljük a terápia rezisztens egyének számát.

A fenti adatbázis segítségével identifikálhatóak a trombocytá gátló kezelésre az átlagosnál kevésbé reagáló betegek. Mivel a nem megfelelő antithrombocytá kezelés növeli a kardiovaszkuláris rizikót, további célunk a bizonyítottan elégtelen trombocytá gátló hatás kimutatása és klinikai kezelési algoritmus kidolgozása volt (6.pont).

## *3. A catecholaminok trombocytá aktivációban játszott szerepe*

Az epinephrin (EPI) egyedülállóan hat a trombocytákra, önmagában nem hoz létre sem aggregációt, sem „shape change”-et. A trombocytán alpha-2A adrenerg receptor (A2AR) található, mely gátolja az adenilát cikláz enzimet. A cAMP szint csökkenésének központi szerepe van egyéb, fiziológiás anyagok (kollagén (KOLL), ADP) által létrehozott stabil irreverzibilis aggregációk kialakulásában is. Célunk a vérlemezke adrenerg rendszerének vizsgálata volt kombinált antithrombocytá terápiaiban részesülő koronária betegek trombocytáit felhasználva. Aggregációs méréseink során egyrészt igen alacsony, közel fiziológiás koncentrációjú EPI (104pg/ml) és standard induktorok kombinációjának, másrészt az A2AR gátlószerének, az atipamezolnak (ATI, 2mM) hatását vizsgáltuk.

EPI hozzáadásával nagyobb aggregációkat mértünk ADP-t (0,32  $\mu\text{M}$ : 53,2% vs. 9,8%; 1,25  $\mu\text{M}$ : 64,4% vs. 28,6%; 5  $\mu\text{M}$ : 75,6% vs. 58,9%;  $p < 0,05$ ) és KOLL-t (1  $\mu\text{g/ml}$ : 63,6% vs. 36,7%;  $p < 0,05$ ) használva primer agonistaként ( $n=18$ ). Ugyanezt figyeltük meg egészséges donorok trombocytáin, ahol arachidonsavat (AA: 0,25mg/ml: 0%; AA+EPI: 52%) is használtunk ( $n=5$ ). ATI-val preinkubálva a trombocytákat az EPI indukálta aggregációk teljes mértékben gátlódtak (2  $\mu\text{g/ml}$  EPI: 14%; +ATI: 0%;  $p < 0,05$ ), ami a gátlószer specificitását jelzi. Az ATI kivédi az EPI és a többi agonista közti szinergista hatást is (0,25mg/ml AA: 0%, +EPI: 65%, +EPI+ATI: 0%; 1,25  $\mu\text{M}$  ADP: 27,4%, +EPI: 49,6%, +EPI+ATI: 21,2%; 1  $\mu\text{g/ml}$  KOLL: 36,7%, +EPI: 63,6%; +EPI+ATI: 43,8%;  $p < 0,05$ ). Az ATI gátló hatása az alap aggregációkra részleges (ADP 0,32  $\mu\text{M}$ : 11% vs. 8%; 1,25  $\mu\text{M}$ : 46% vs. 39%; 5  $\mu\text{M}$ : 66% vs. 64%; KOLL 1  $\mu\text{g/ml}$ : 76% vs. 69%; 2  $\mu\text{g/ml}$ : 91% vs. 93%) és magasabb induktor koncentrációnál kevésbé érvényesül.

Mivel a szervezetben keringő catecholaminok 80%-a noradrenalin (NA), összefüggést kerestünk a NA szint és a trombocita reaktivitás (flowcytometria:P-szelektin és CD40 ligand pozitív trombociták aránya) között is. Stabil koronária betegekben magas plazma NA szint esetén a nagyobb a P-szelektin és a CD40L pozitív aktivált trombociták aránya ( $p=0,01$ ); a NA szint és a P-szelektin pozitív aktivált trombociták aránya között erős pozitív korrelációt találtunk ( $R=0,53$ ). Vizsgálataink alapján az adrenerg rendszer potenciózza a valódi thrombocytágonisták hatását, akár effektív antithrombocytá terápia mellett is. Mivel az A2AR aktiválódása a cAMP szint csökkenéséhez vezet, ezzel megkerüli a P2Y12 receptor jelpályáját. Az adrenerg rendszernek in vivo így fontos szerepe lehet az akut koronária szindrómában központi szerepet játszó thrombocytá „over”aggregációban/aktivációban. Ez a jelenség - a gátlószerek mechanizmusait kikerülve - aszpirin és/vagy clopidogrel rezisztencia kialakulásához és az atherotrombotikus kockázat emelkedéséhez vezethet.

#### 4. A thrombocytá P2Y1 ADP receptor funkciójának analízise

A P2Y12 ADP receptor gátló clopidogrel a terápia kötelező eleme PCI-ra kerülő ischaemiás szívbetegekben. Mivel a thrombocyták mindkét ADP receptorának (clopidogrel-target P2Y12 és a P2Y1) együttes aktiválódása hozza létre az aggregációt, célunk a P2Y1 receptor egyéni variabilitásának és ezen receptor aggregációban játszott szerepének vizsgálata volt PCI-on átesett kettős antithrombocytá kezelésben részesülő betegekben ( $n=143$ ).

A thrombocytá aggregáció mértékét ADP, kollagen, epinephrin induktorokat és a P2Y1 receptor specifikus gátlóját (MRS2179) használva határoztuk meg; mértük a kizárólagosan P2Y1-mediált ADP-indukálta shape change (SC) reakció mértékét is. Az 5mM ADP indukálta SC amplitúdója az egészséges kontroll ( $n=10$ ) és a vizsgált beteg populációban azonos volt (M:-7.8%, IQR:-6- -10%, vs.M:-8.43%, IQR:-10- -6%); 40mM MRS2179 teljes gátlást hozott létre egészségesekben míg betegekben csak részleges gátlást alakított ki (M:-4.0%, IQR:-1- -6%,  $p<0.05$ ), alacsonyabb EC50 értékre utalva. A betegeket a SC érték alapján kvartilisekre osztva, a legalacsonyabb és a legmagasabb kvartilis között nem volt szignifikáns különbség az ADP (M:58%, IQR:49-67% vs. M:52%, IQR:38-67%), a collagen (M:22,8%, IQR: 9-32% vs M:22,8% IQR:6-30%) és epinephrin-indukálta (M:31.4% vs. IQR:21-36% vs. M:26,4%, IQR:14-35%) aggregáció tekintetében. Az aggregációs paraméterek és a SC reakció nagysága között nem találtunk korrelációt. MRS2179 hatására mind az ADP (5mM: M:52,3%, IQR:39-66% vs. M:23%, IQR:11-30%,  $p<0.05$ ) és a kollagen-indukálta aggregációban (M:24,6% IQR:6-32% vs. M:10,7%, IQR:2-14%,  $p<0.05$ ) szignifikáns, jelentős gátlás alakult ki. Az ADP aggregációk alapján legmagasabb kvartilisbe tartozó, magas reaktivitású clopidogrellel kezelt betegekben az MRS2179 hatékonysága szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a legalacsonyabb kvartilisbe tartozókban (átlagos gátló hatás: 1.25 mM ADP: 68% vs.78.5%,  $p<0.005$ ; 5mM ADP: 50%vs. 70%,  $p<0.005$ ).

A fentiek alapján, a P2Y1 receptor specifikus farmakológiai gátlása szignifikánsan csökkenti a thrombocytá aggregációt, jelezve, hogy ezen receptor – akár P2Y12 gátlással kombinálva – potenciális target lehet az antithrombocytá kezelésben. A P2Y1 receptor az ADP-indukálta aggregáció elengedhetetlen résztvevője, mindazonáltal egyéni aktivitása nem határozza meg alapvetően a clopidogrel-kezelt betegek thrombocytá reaktivitását, annak elsődleges determinálója a P2Y12 receptor gátoltsági foka. A jövőben az ADP-indukálta shape change EC50 értékének meghatározása segíthet az egyéni P2Y1 variabilitás további felmérésében.

#### 5. A statinok és a P2Y12 ADP receptor gátló clopidogrel közti gyógyszer-interakció vizsgálata percután koronária intervencióra kerülő ischaemiás szívbetegekben.

A cardiovascularis medicinában thrombocytá aggregáció gátló szerként széles körben alkalmazott P2Y12 gátló thienopyridinek (clopidogrel és ticlopidin) a szervezetben az enterohepatikus keringésbe kerülve metabolizálódnak a májban, majd rövid féleletidejű, aktív metabolitjuk hozza létre a thrombocytá P2Y12 receptor gátló hatást. A clopidogrel a citochrom P450 enzimrendszer P450 3A4-es izoenzime által kerül oxidációra, ez a thrombocytá gátlásért felelős aktív metabolit termelődésnek kulcslépése. Irodalmi adatok szerint két, klinikailag szintén széles körben alkalmazott lipidcsökkentő gyógyszer, az atorvastatin és a simvastatin lebontása szintén ezen az izoenzimen át történik. In vitro kísérletes eredmények alapján felmerül,

hogy az enzimért való versengésből kifolyólag a clopidogrel hatékonysága a fenti statinokat szedő betegeken csökkent lehet. Így a clopidogrel thrombocytá aggregáció gátló hatása nem, vagy csak később alakul ki. Ennek az interakciónak klinikai következménye is lehet, különösen sürgősségi, pl. coronaria stent beültetés eseteiben. Ezért megvizsgáltuk 48 stabil koronária-beteg ADP (0,32; 0,64; 1,25; 2,5; 5; 10 $\mu$ M) és kollagén (1; 2 $\mu$ g/ml) indukálta thrombocytá aggregációjának mértékét Born aggregométerrel citrátos thrombocytá dús plazmában. A betegek a standard 300 mg telítő dózisu, majd napi 75 mg clopidogrelt kapták. A vizsgált 48 beteg közül a korábban statint szedő 20 beteg clopidogrel telítés mellett 40 mg simvastatint, 8 atorvastatint kapott; 20 beteg nem kapott statint. Az aggregációkat a clopidogrel bevétele előtt, majd 4, 24, 96 óra elteltével mértük.

A clopidogrel bevétele után 4 órával mindhárom csoportban szignifikáns aggregáció csökkenés volt észlelhető (ADP 0.32 $\mu$ M: 6.71% versus 0.72%, 0.64 $\mu$ M: 18.37% v. 11.28%, 1.25 $\mu$ M: 47.1% v. 32.4%, 2.5 $\mu$ M: 59.2% v. 45.5%, 5 $\mu$ M: 63.1% v. 50.8%, 10 $\mu$ M: 74.4% v. 64.8%, Coll 1  $\mu$ g/ml: 39,3% v. 28,9%, 2 $\mu$ g/ml: 57,2% v. 43.9%,  $p < 0.005$ ). A thrombocytá aggregáció gátlás mértékében a statin és a kontroll alcsoportok között nem volt szignifikáns különbség a gyógyszerek bevétele után 4 órával ( $p$  értékek  $> 0.15$ , NS). A statin csoport aggregációs értékei alacsony koncentrációjú ADP-vel stimulálva a kiinduláskor szignifikáns mértékben alacsonyabbak voltak, mint a kontroll csoportéi (0.32 $\mu$ M: kontroll 8.6% v. statin csoport 5.9%,  $p = 0,037$ ; 1.25 $\mu$ M: 57.3% v. 42.4%  $p = 0,012$ ).

A fentiek alapján a PCI kapcsán kötelezően adott telítő dózisu clopidogrel thrombocytá aggregáció gátló hatását a statin előkezelés nem befolyásolta hátrányosan, a clopidogrel és statinok együtt adása biztonságos, interakciójuk klinikailag jelentéktelen. A tartós statin kezelés kedvezően befolyásolja a thrombocytá aggregációt, ami független a clopidogrel hatásától és a statinok hosszútávú gyulladásgátló, pleiotrop hatásával függhet össze.

#### *6. Pathológiás thrombocytá P2Y<sub>12</sub> purinerg funkció ischaemiás szívbetegekben: Rekurráló stent thrombosis és bizonyított clopidogrel rezisztencia esete struktúráisan ép P2Y<sub>12</sub> receptorral. Funkcionális, biokémiai és genetikai analízis.*

Az akut intracoronariás stent thrombosis a perkután koronaria intervenciók (PCI) egyik legsúlyosabb szövődménye, háttérben pathológiás vaszkuláris és thrombocytá funkcióval. Mivel a clopidogrel thrombocytá gátló hatékonyságában jelentős, a PCI szempontjából rizikófaktorként szereplő interindividuiális különbségek vannak, célunk az 1. és 2. pontban kialakított adatbázis segítségével antithrombocytá kezelés hatékonyságának ellenőrzése volt, stent thrombózison átesett betegek körében.

Prospektíve identifikáltunk 10 olyan beteget, akiknél a standard terápia mellett acut/subacut stent thrombosis miatt ismételt PCI-ra került sor és terápia rezisztensnek bizonyultak (ADP EC<sub>50</sub>: 1,05 $\pm$ 0,3 $\mu$ M, aggregáció 5 $\mu$ M ADP: 69 $\pm$ 11%,  $p < 0,05$ ). Ezt követően napi egyszeri 150 mg clopidogrelt adtunk, hatására a betegek 50%-ban az aggregációs értékek a kívánt tartományba kerültek (ADP 5 $\mu$ M: 45 $\pm$ 6%); további 20%-ban részleges hatás mutatkozott. A fennmaradó 30% kezelését napi 2x250 mg ticlopidinnel folytattuk, mivel ennek metabolizmusa eltér a clopidogrelétől. Ezután mindössze egyetlen olyan beteg volt, aki rezisztensnek bizonyult (ADP 5 $\mu$ M: 64%). Ebben az esetben ASA helyett napi 2x200 mg dipyridamol+25mg ASA és 2x250mg ticlopidin kezelést követően már effektív thrombocytá gátlás volt észlelhető (ADP 5 $\mu$ M: 32%).

A fentiek alapján az antithrombocytá kezelés hatékonyságának mérésére klinikai igény van, terápiás konzekvenciával jár. A rezisztens betegek identifikálása megkívánja az aggregációs labor saját standard értékeinek megállapítását (lsd. 1. 2. pont). A rezisztens esetek kezelési algoritmus: 150mg clopidogrel+ 100mg ASA; ezután 2x250 mg ticlopidin+100mg ASA; további ineffektivitás esetén 2x250 ticlopidin és 2x 200 mg dipyridamol+25 mg ASA. Az identifikált betegek a személyre szabott antithrombocytá kezeléssel reszponderré tehetőek! Nagyobb esetszámú vizsgálat dönti el, hogy az algoritmus alkalmazásával az adverz kardiális események száma csökkenthető, a cardiovascularis halálozás mérsékelhető-e?

A fenti vizsgálat mellett egy 5 ízben recidív stent thrombózison átesett férfi esetét részletesen vizsgáltuk. Az 59 éves férfi betegnél sikeres RDA stent beültetés után öt alkalommal

alakult ki angiográfiával bizonyított, anterior ST elevációval járó recidív stent thrombosis és myocardialis infarktus 6 hónapon belül. Az ASA kezelés gastrointestinalis mellékhatásai miatt clopidogrel monoterápia mellett (75, később napi 150 mg) elvégzett thrombocytá aggregációs teszt során a standard inductor koncentrációkat használva effektív thrombocytá gátlást nem találtunk (ADP 5 uM:78%, kollagen 2ug/ml: 74%, epinephrine 10uM:74% and arachidonsav 0,5 mM 71% max.aggregációk). Ezeken a klinikai és laboratóriumi adatokon alapulva teljes clopidogrel rezisztenciát igazoltunk és ennek hátterében a thienopyridinek által gátolt P2Y<sub>12</sub> ADP receptor szerkezeti vagy működésbeli defektusát feltételeztük. A pathológiás eltérések biokémiai mechanizmusát tovább vizsgálva, thrombocytá aggregációs vizsgálatokat végeztünk a P2Y<sub>12</sub> receptort in vitro szelektíven gátló ARC-69931MX jelenlétében (ARC, 5 ug/ml koncentráció). Az egészséges kontrollhoz hasonlóan, ARC jelenlétében az ADP indukálta thrombocytá aggregáció gátolt volt (max. aggregációk ADP: clopidogrellel ARC nélkül: 75%, clopidogrellel ARC jelenlétében: 30%), ezzel bizonyítva, hogy betegünk esetén a P2Y<sub>12</sub> receptor alapvető purinerg ligand kötő struktúrája intact. Ezt követően a clopidogrel aktív metabolitja és a receptor fehérje közti interakció zavarát feltételeztük. Mivel az interakcióért felelős aminosavak ismertek, analizáltuk a beteg P2Y<sub>12</sub> receptort kódoló cDNS szekvenciáját (Együtműködés keretében a Leuveni Katolikus Egyetemen). Ebben a thrombocytá cDNS szekvenciában eltérést, mutációt, polymorphismust nem találtunk. Ezeken az adatokon alapulva a beteg teljes clopidogrel rezisztenciáját vagy a gyógyszer felszívódásának súlyos zavara, vagy pedig a clopidogrel aktív metabolitját előállító hepatikus microsomalis cytochrom rendszer funkció zavara magyarázhatja. A fentiek felhívják a figyelmet, hogy a kardiovaszkuláris betegek thrombocytá gátló kezelésének ellenőrzése egyes esetekben elengedhetetlen.

## **II. A koronária áramlási sebesség és szisztémás serum markerek kapcsolata.**

A koronária áramlási sebesség komplex szabályozási folyamata atherosclerosisban zavart szenved. Ezért célunk a lokális koronária áramlási sebesség (corrected TIMI frame count, CTFC) és az atherosclerosis során szerepet játszó szisztémás serum markerek (solubilis intercelluláris adhéziós molekula-1, interleukin-6, high sensitivity C-reactive protein, von Willebrand factor) közti összefüggés meghatározása volt stabil ischaemiás szívbetegségben (n=96), akut koronária szindrómában (n=27) és negatív koronarográfiás eredményt mutató betegeken (n=68). Az akut fázis fehérjék szintjének emelkedésén túl a betegcsoportok csupán marginális eltérést mutattak. Azonban betegekre lebontva, pozitív korrelációt találtunk az individuális CTFC és a sICAM szint között (r=0.33). Hasonló összefüggés az IL-6, hsCRP és vWF szintek és a CTFC között nem volt kimutatható. A korreláció független több rizikófaktoroktól (nem, életkor, BMI, dohányzás, hypertónia, diabetes), gyógyszeres kezeléstől, a hsCRP, IL-6, vWF szinttől. A fenti eredmények jelzik a koronária áramlási sebesség és a szisztémás adhéziós molekulatermelés közötti összefüggést.

## **III. Oxidatív stresszfolyamatok atherothrombotikus állapotokban:**

A fenti téma eddig nem szerepelt a kutatócsoport eredeti célkitűzései között - a PARP aktiváció vizsgálata ígéretes új területe a kardiovaszkuláris kutatásoknak. A témát 2004. kezdete óta a Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató Intézetrel és a szelektív PARP inhibitor gyártó Inotek Pharmaceuticals Corporation- nal közös együtműködés keretében vizsgáljuk (Dr. Szabó Csaba).

### *1. DNS károsodás vizsgálata kardiovaszkuláris betegeken*

Az oxidatív/antioxidáns mechanizmusok felborult egyensúlya révén keletkező szabadgyökök direkt sejtkárosító hatásúak, DNS töréseket és lipidperoxidációt hozva létre. Az oxidatív stressz mértékét serum teljes peroxid szint mérésével határoztuk meg stabil angina pectorisban (CAD). Ezután a perifériás leukocytákban létrejövő DNS károsodást Comet assay segítségével analizáltuk. A plazma teljes peroxid koncentráció magasabb volt a CAD betegcsoportban (n=21) az egészséges egyénekhez képest (p=0,023), igazolva a fokozott lipidperoxidációt. A Comet index stabil angina pectorisban szintén emelkedett (0,29±0,3) volt a kontrollhoz hasonlítva (0,12±0,1, p=0,11). A rizikófaktorok tekintetében a DNS törések mértéke összefüggést mutatott a diabetes mellitussal (p=0,05) és a hypertóniával (p=0,016); hyperlipidaemia esetén trend volt

kimutatható ( $p=0,27$ ). Vizsgálataink rámutatnak az oxidatív mechanizmusok jelentőségére atherosclerotikus állapotokban, az emelkedett plazma teljes peroxid koncentráció mellett a kóros Comet index direkt DNS károsodást bizonyít. Az izolált keringő leukocyták érzékeny markerei az oxidatív stresszállapotnak; a jövőben a DNS törés mértékének meghatározása az atherosclerotikus megbetegedések rizikóbecslésében szerepet kaphat.

## 2. PARP aktiváció vizsgálata kardiovaszkuláris betegségekben és diabetes mellitusban

A fokozott szabadgyök termelés kiemelkedő jelentőségű a szöveti hypoxia-reperfúzió következtében fellépő károsodások kialakulásában. DNS károsító hatása révén a poly (ADP-riboz) polimeráz-1 enzim aktiválódásához, ezzel nekrotikus sejthalál elindításához vezet. Célunk a fenti oxidatív/nitrozatív stressz folyamatok vizsgálata myokardiális ischaemia/reperfúzió illetve diabetes mellitus kórállapotaiban. A PARP-1 enzim fiziológias esetben a sejtek túlélését, a DNS repair folyamatokat szabályozza, de reperfúzió kapcsán létrejövő kóros aktivációja kimeríti a sejt ATP és  $NAD^+$  készleteit, energiadeficithez s elméletileg miokardiális sejtpusztuláshoz vezetve. Ez a mechanizmus adhatja a primer perkután koronária intervenció (PCI)-indukálta reperfúziós miokardium károsodás alapját.

Ennek igazolására ST-elevációs akut miokardiális infarktus miatt primer PCI-on átesett betegek serum peroxid koncentrációját ( $[H_2O_2]$ ), keringő leukocytáiban a reaktív szabadgyökök hatását jelző tirozin-nitrozilációt és következményes PARP-1 aktivációt vizsgáltuk ELISA, immuncitokémia és Western blott módszerek segítségével. A fenti paraméterek meghatározására a PCI előtt, közvetlenül PCI után, majd 24 illetve 96 óra múlva került sor.

A serum  $[H_2O_2]$  PCI előtt ( $363,6 \pm 245 \mu\text{mol/l}$ ) és után ( $353,4 \pm 254,2 \mu\text{mol/l}$ ) emelkedett volt, krónikus koronária betegek értékeihez hasonlítva ( $332,5 \pm 235,3 \mu\text{mol/l}$ ;  $n=11$ ;  $p>0,05$ ). A leukocyták immuncytokémiai analízise során enyhe tirozin-nitroziláció volt észlelhető PCI előtt, mely PCI után kifejezetté vált, és intenzitása a 4. napra sem csökkent. A PAR (poli-ADP-riboz, a PARP-1 végterméke) festődés már PCI előtt látható, közvetlenül PCI után a legintenzívebb, a 4. napra jelentősen gyengül. Hasonlóképp, a leukocyták Western blott analízise során a PARP-1 enzim fokozott aktivitását jelző PAR protein mennyisége pre-PCI  $32 \pm 8$ , post PCI kiemelkedően a legmagasabb,  $61 \pm 8$ , 24 óra múlva  $35 \pm 8$ , 96 óra múlva pedig  $43 \pm 9$  denzitometriás egység volt. Eredményeink alapján az ST-elevációs miokardiális infarktus során már a PCI előtt oxidatív károsodás, következményes PARP-1 aktiváció alakul ki. Ezt a patológias aktivációt a PCI során elért reperfúzió jelentős mértékben fokozza. A jövőben a primer PCI előtt alkalmazott gyógyszeres PARP-1 enzim gátlás, s ezzel a miokardiális sejtek reperfúziós oxidatív károsodásának megelőzése e betegcsoport terápiájának fontos része lehet.

## IV. A keringő endothelsejtek számának meghatározása zajló humán atherothrombotikus folyamatokban

### 1. Az endothel sérülés vizsgálata akut ST elevációs miokardiális infarktus és percutan coronaria intervenció esetén: korreláció a myocardialis és endothel sérülés között

Az akut koronária esemény, valamint az azt követő perkután koronária intervenció (PCI) során endothelsérülés jön létre, mely a keringő endothelsejtszám (CEC) illetve a von Willebrand faktor (vWF) és egyes adhéziós molekulák (solubilis intercelluláris adhéziós molekula-1, sICAM-1) szintjének elemzésével nyomon követhető. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy vajon van-e összefüggés a CEC szám, a vWF és sICAM-1 szint időbeli változása között és milyen klinikai jelentőséggel bírnak ezen endothel sérülésre utaló markerek.

A vWF, sICAM-1 plazma szintjét, valamint a CEC számát az általunk honosított metodika segítségével (anti-CD146, immunomágneses gyöngyök) határoztuk meg 19 akut miokardiális infarktusban (AMI) szenvedő, PCI-on átesett betegben PCI előtt, közvetlenül utána, valamint 24 és 96 óra múlva.

A pre-PCI mintákból meghatározott AMI-ban szenvedő betegekben a CEC száma szignifikánsan magasabb volt (medián (M): 9,5/ml, interquartile range (IQR): 3,0-19,0/ml;  $p=0,014$ ) a kontroll stabil angina (SA) csoporthoz képest; a sejtszám közvetlenül a PCI után tovább emelkedett (M: 12,12/ml, IQR: 4,0-23,0/ml), majd 24 óra múlva érte el a legmagasabb szintjét (M:14,856/ml,

IQR: 11,8-53,0/ml;  $p=0,024$ ). Ezzel párhuzamosan azonban a sICAM-1 és a vWF közvetlenül a PCI után csökkenő tendenciát mutatott. A vWF plazma szintje az AMI csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontroll SA csoporthoz hasonlítva ( $211,28\% \pm 88,7\%$  vs.  $149,94\% \pm 67,5\%$ ;  $p=0,027$ ), majd közvetlenül a beavatkozás után lecsökkent ( $178,15\% \pm 77,3\%$ ), azonban a PCI-t követő 24 óra múlva újra emelkedett ( $210,21\% \pm 76,8\%$ ,  $p=0,043$ ) és a szignifikáns maximumot a PCI-t követő 96 óra múlva érte el ( $256,23\% \pm 84,3\%$ ;  $p=0,036$ ). A sICAM-1 plazma szintje vWF-hoz hasonló kinetikát mutatott, a betegek felvételekor magasabb volt a kontroll SA csoporthoz képest ( $233,64 \pm 65,6$  ng/ml vs.  $228,23 \pm 39,9$  ng/ml), majd közvetlenül a PCI után csökkenés volt tapasztalható ( $220,51 \pm 77,8$  ng/ml). Emellett szignifikáns negatív korreláció volt megfigyelhető a PCI előtti, valamint utáni CEC sejtszámok és a vWF pre- és post-PCI szintjének változása ("acute release") között ( $r=-0,74$ ,  $r=-0,69$ ;  $p<0,05$ ). Klinikai jelentőséggel bír azon megfigyelés, hogy a kreatinkináz MB izoenzim (CK-MB) PCI előtt mért szintje és az 1. napon meghatározott CEC sejtszámok között szignifikáns pozitív korrelációt ( $r=0,695$ ,  $p<0,05$ ) találtunk.

Összefoglalva, az AMI-ban szenvedő betegekben talált magas keringő endothelsejt szám erős korrelációt mutat a szívizom károsodás mértékével és így prognosztikai értéke lehet a kardiovaszkuláris rizikót illetően. Az akut coronaria intervenciót követő plazma vWF és sICAM-1 csökkenésének mechanizmusa és pathofiziológiai jelentősége még nem ismert, tisztázásra vár.

## *2. Clopidogrel kezelés szignifikánsan csökkenti a keringő endothelsejtek számát ischaemias szívbetegekben*

Amint azt korábbi adatok igazolják, a keringő endothelsejtek (CEC) száma az endothel sérülés direkt markere. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a kardiovaszkuláris kockázati tényezők jelenléte, ill. a terápiás beavatkozások milyen hatást gyakorolnak az endothelre és a CEC számra stabil anginában szenvedő betegekben.

A vizsgálatainkba 82 koronarográfiával igazolt stabil angina pectorisban (AP) szenvedő beteget (63.4% férfi, 36.6% nő; átlag életkor  $61.5 \pm 9.7$  év) vontunk be. Az ismert kardiovaszkuláris kockázati tényezők előfordulása a következő volt: a betegek 82.9%-a hipertóniában (HT), 48.7%-a hiperlipidémiában (HL), 39.0%-a diabetes mellitusban (DM) szenvedett, 24.4%-a aktív dohányos (AD) volt.

A CEC száma AP betegekben szignifikánsan magasabb volt az egészséges egyénekhez képest (median(M):8.4/ml, IQR:3.0-17.0 vs. M:3.2/ml, IQR:1.9-9.0,  $p=0.032$ ). Hipertóniában, hiperlipidémiában, diabéteszben szenvedő, illetve dohányzó betegekben emelkedett CEC számot találtunk; az összefüggés a szignifikáns mértéket azonban nem érte el (HT: $p=0.256$ , HL: $p=0.34$ ; DM: $p=0.14$ , AD: $p=0.28$ , NS). A gyógyszeres kezelés hatásait illetően, a clopidogrellel (CLO) kezelt betegekben szignifikánsan alacsonyabb CEC számot találtunk (M:4.0/ml, IQR:4.0-8.0 vs. M:11.6/ml, IQR:5.0-18.0,  $p<0.005$ ). Szignifikánsan alacsonyabb CEC számot találtunk azon betegekben is, akik korábban PCI-on estek át, mely jelenséget ezen betegek CLO kezelésével hozhatunk összefüggésbe ( $p<0.005$ ). A statinnal kezelt betegekben hasonló endothel protektív tendencia volt megfigyelhető (M:7.5/ml, IQR:3.5-14.0 vs. M:12.0/ml, IQR:7.0-20.0,  $p=0.07$ ). A fentiek alapján stabil anginában szenvedő betegekben az endothel sérülés mértékét az emelkedett keringő endothel sejtszám jelzi; a kardiovaszkuláris rizikófaktorok szerepe további, nagyobb esetszámú beteganyagban még tisztázásra vár. A clopidogrel szignifikáns mértékben, az ismert kockázati tényezőktől függetlenül csökkenti a keringő endothelsejtszámot; az endothel protektív hatás mechanizmusa további vizsgálatokat igényel.