

Az endotélium és az érrendszer érintettsége hereditár angioödémában

Doktori értekezés

Kajdácsi Erika

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Cervenak László, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Németh Péter, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Krasznai Magdolna, Ph.D., egyetemi adjunktus,

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet, az MTA doktora, egyetemi tanár,

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Józsi Mihály, Ph.D., egyetemi adjunktus,
Dr. Pós Zoltán, tudományos Ph.D., főmunkatárs,

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	7
2.1. A C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditér angioödéma	7
2.1.1 A C1-INH-HAE diagnosztikája	8
2.1.2. Az ödémás rohamok kialakulása.....	8
2.2. A C1-INH funkciója, szerepe a C1-INH-HAE patomechanizmusában.....	10
2.3. Az endotélsejtek	13
2.3.1. Eltérő funkció, eltérő permeabilitás	14
2.3.2. A bradikinin receptorok az endotélsejteken.....	16
2.3.3. Az endotélsejtek szerepe a C1-INH-HAE patomechanizmusában	18
2.3.4. Az endotélsejtek C1-INH termelése.....	19
2.3.5. Az endotélsejt aktiváció markerei	20
2.4. Vazoaktív peptidek	24
3. CÉLKITŰZÉSEK	28
4. MÓDSZEREK	30
4.1. A vizsgált betegcsoport és a kontrollok.....	30
4.1.1. Hereditér angioödémás betegek	30
4.1.2. Kontroll személyek	31
4.2. Alcsoportok vizsgálata.....	31
4.2.1. Endotélmarkerek vizsgálata	32
4.2.2. Vazoaktív peptidek vizsgálata.....	32
4.3. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata	32
4.3.1. Mintatárolás.....	33
4.3.2. A C1-INH aktivitás meghatározása.....	33
4.3.3. Az antigenikus C4 szint meghatározása.....	33

4.3.4. CRP szint meghatározás	34
4.3.5. C1-INH mérése szendvics ELISA módszerrel	34
4.4. Az endotélmarkerek és vazoaktív peptidek meghatározása	35
4.4.1. A VWF:Ag és VWF:CBA szintek meghatározása	35
4.4.2. A szolúbilis E-szelektin mérése szendvics ELISA módszerrel.....	35
4.4.3. A MR-proANP, MR-proADM, CT-proAVP és CT-proET-1 szintek mérése BRAHMS Kryptor módszerrel	36
4.4.4. A proANP fehérje vizsgálata.....	36
4.5. Sejtenyésztés és endotélsejtek vizsgálata	37
4.5.1. A kísérletek során használt médiumok és pufferek összetétele	37
4.5.2. HUVEC sejt kultúra készítése és tenyésztése	37
4.5.3. A HUVEC sejtek C1-INH tartalmának kimutatása Western blottal	38
4.5.4. mRNS mérések kvantitatív PCR technikával	38
4.6. Statisztikai analízis	39
5. EREDMÉNYEK	41
5.1. A vizsgálatban szereplő betegek és a kontrollok jellemzése (klinikai és laboratóriumi adatai)	41
5.2. Endotélsejt aktiváció kimutatása C1-INH-HAE rohamok alatt	44
5.3. Az endotélsejtek működését befolyásoló rizikótényezők hatása az endotélmarkerekre C1-INH-HAE rohamokban.....	45
5.4. Az endotélmarkerek változásai rohamonként	48
5.5. Vazoaktív peptidek szintjének összehasonlítása C1-INH-HAE betegekben és kontroll személyekben	50
5.6. A betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői, valamint a kardiovaszkuláris rizikó hatása a vazoaktív peptidek szintjére	51
5.7. A vazoaktív peptidek szintjeinek változása C1-INH-HAE rohamok alatt... 	55
5.8. A vazoaktív peptidek egymásra hatása.....	58

5.9. A proANP fehérje vizsgálata	59
5.10. A C1-INH kimutatása endotélsejtekben	62
6. MEGBESZÉLÉS	66
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	76
8. ÖSSZEFOGLALÁS	78
9. SUMMARY	79
10. IRODALOMJEGYZÉK	80
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	89
11.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk	89
11.2 A disszertációtól független publikációk	89
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	91

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADM	adrenomedullin
ANP	atriális nátriuretikus peptid
AVP	arginin vazopresszin
B1R	bradikinin 1-es receptor
B2R	bradikinin 2-es receptor
BK	bradikinin
C1-INH	C1-inhibitor
C1-INHa	C1-inhibitor koncentráció
C1-INHf	funkcionális C1-inhibitor aktivitás
CGRP	kalcitonin génnel rokon peptid (calcitonin gene related peptide)
CTproAVP	A proAVP C-terminális része
CTproET-1	A proET-1 C-terminális része
eNOS	endoteliális nitrogén oxid szintáz
ET-1	endotelin-1
ET-A	endotelin receptor A
ET-B	endotelin receptor B
FBS	fötális borjú szérum (fetal bovine serum)
FMD	áramlásmediálta dilatáció (flow mediated dilation)
GAG	glükózaminoglikán
C1-INH-HAE	C1-inhibitor hiány következtében kialakuló hereditér angioödéma
HBEC	humán agyi endotélsejt (human brain endothelial cell)
HUVEC	humán köldökzsínór véna endotélsejt (human umbilical vein endothelial cell)
ICAM	sejtközötti adhéziós molekula (intercellular adhesion molecule)
IL-1 β	interleukin 1 béta
KV	kardiovaszkuláris
LPS	lipopoliszacharid
MASP	MBL-asszociált-szerin-proteáz
MRproADM	a fehérje közepén elhelyezkedő proADM (midregional proADM)
MRproANP	a fehérje közepén elhelyezkedő proANP (midregional proANP)
NF κ B	nukleáris faktor kappa B

NO	nitrogén oxid
PGI ₂	prostaglandin I ₂ (proztaciklin)
TNF α	tumor nekrosis faktor alfa
TR	trombin
VEGF	endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VWF	von Willebrand faktor
VWF:Ag	von Willebrand faktor antigén
VWF:CBA	von Willebrand faktor kollagén kötő képesség

2. BEVEZETÉS

2.1. A C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditár angioödéma

A C1-inhibitor (C1-INH) hiány okozta hereditár angioödéma (C1-INH-HAE) egy ritka, domináns módon öröklődő betegség. A tünetek hátterében a 11-es kromoszómán kódolt *SERPING1* gén mutációja áll, mely gén 8 exont és 7 intront tartalmaz. Több mint 450 mutációt azonosítottak már, melyek kapcsolatba hozhatók a C1-INH-HAE-val, ezek a gén egészében elszórva találhatóak, de leggyakrabban a 8-as, az 5-ös és a 6-os exon érintett, illetve viszonylag kevesebb mutáció fordul elő az N-terminális részt kódoló részen (1).

Két típusát különíthetjük el: az I-es típus esetén az egyik kromoszómáról nem termelődik fehérje, a II-es típus esetén a mutáns génről termelődő fehérje inaktív. A betegek nagyobb része, kb. 85 %-a, az I-es típusba tartozik, míg a maradék kb. 15 % a II-es típusba. Minkét típusra jellemző, hogy ugyan az egyik kromoszómáról működőképes fehérje termelődik, a funkcionális C1-INH aktivitás átlagosan mégsem éri el az 50%-ot, hanem csak 5-30% közötti. A csökkent aktivitást a termelődő inhibitor folyamatos elhasználódásával magyarázzák (2, 3), illetve azzal, hogy a meglévő mutáns allél leszabályozza a normál allél működését (1).

A C1-INH-HAE jellemző tünetei a visszatérő, nem viszkető ödémák a bőrön és a szubmukózális szövetekben, melyeket kísérhet fájdalom, émelygés, hányás, hasmenés (4). Az ödémák érinthetik a törzset, a végtagokat, az arcot, a nemi szerveket (szubkután rohamok), a gasztrointesztinális traktust és a felső légutakat (szubmukózus rohamok) (5). A hasi ödémák indokolatlan hasi műtéthez vezethetnek, míg a felső légutakat érintő ödémák kezelés nélkül a beteg fulladását okozhatják (6, 7). Ritkán ugyan, de az angioödéma kialakulása okozhat a betegekben hipovolémiás sokkot is, mely szintén azonnali orvosi beavatkozást igényel (8, 9). Ugyanakkor a közvetlen életveszélyt nem okozó ödémák kezelés nélkül is elmúlnak 2-5 napon belül (2).

Érdekes, hogy a C1-INH-HAE klinikai megjelenésében nagy variabilitás figyelhető meg, még az azonos mutációt hordozó családtagok esetében is. Ezek a különbségek megmutatkozhatnak a betegség szinte bármelyik paraméterében, pl: az első tünetek megjelenésének idejében, a rohamok gyakoriságában, kiváltó okában, az ödéma

lokalizációjában és súlyosságában, prodrómális tünetek meglétében vagy hiányában vagy a hosszútávú kezelés szükségességében (1).

2.1.1 A C1-INH-HAE diagnosztikája

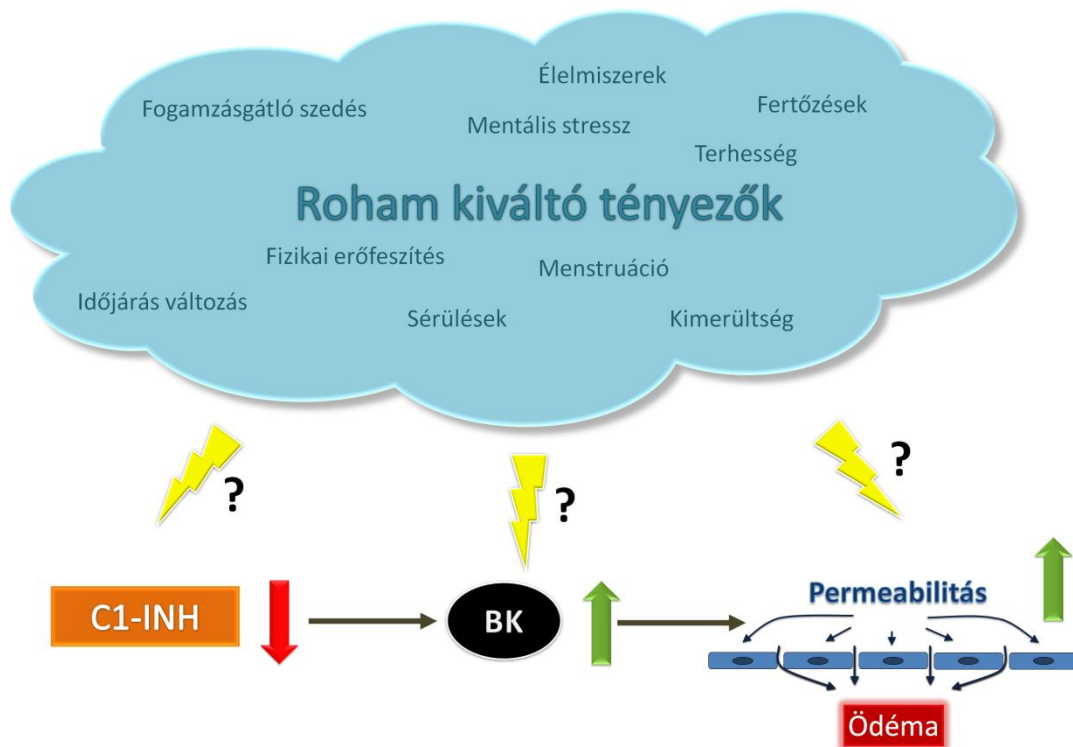
A hereditær angioödéma laboratóriumi diagnosztikája négy komplement-paraméter mérésén (C1-INH koncentráció-, C1-INH funkcionális aktivitás-, a C4-, valamint a C1q szint mérés) alapul, ezt egészíti ki a családi anamnézis és a C1-INH génben történő mutáció keresés. A csökkent C4 szint és a csökkent C1-INH aktivitás a betegség mindkét megjelenési formájára jellemző, míg a csökkent C1-INH koncentráció a C1-INH-HAE I-es típusnál figyelhető meg, a II-es típust ezzel szemben normál vagy emelkedett C1-INH szint jellemzi. A diagnózis alapját képező három komplement-paraméter szintjének változásainak összefoglalását a C1-INH-HAE két típusában az 1. táblázat tartalmazza. Ezen kívül a diagnosztizálást segítheti bizonyos biomarkerek vizsgálata is, melyek megkönnyíthetik a C1-INH-HAE elkülönítését más angioödémás kórképektől (4, 10).

1. táblázat. A C1-inhibitor hiányán alapuló hereditær angioödéma diagnosztikája.

C1-INH-HAE típusa	C1q	C4 szint	C1-INH funkcionális aktivitás	C1-INH koncentráció
I	normális	↓	↓	↓
II	normális	↓	↓	normális vagy ↑

2.1.2. Az ödémás rohamok kialakulása

A rohamok kiváltó tényezői jelentős eltérést mutatnak a különböző betegek esetén, illetve egy-egy beteg különböző rohamainál is eltérőek lehetnek. Sikerült már jó pár kiváltó faktort azonosítani, de még így is elmondható, hogy a rohamok egy jelentős százalékában nem nevezhető meg konkrétan a kiváltó ok (2, 3, 11). Néhány kiváltó tényezőt és a C1-INH-HAE vázlatos patomechanizmusát az 1. ábrán foglaltam össze.



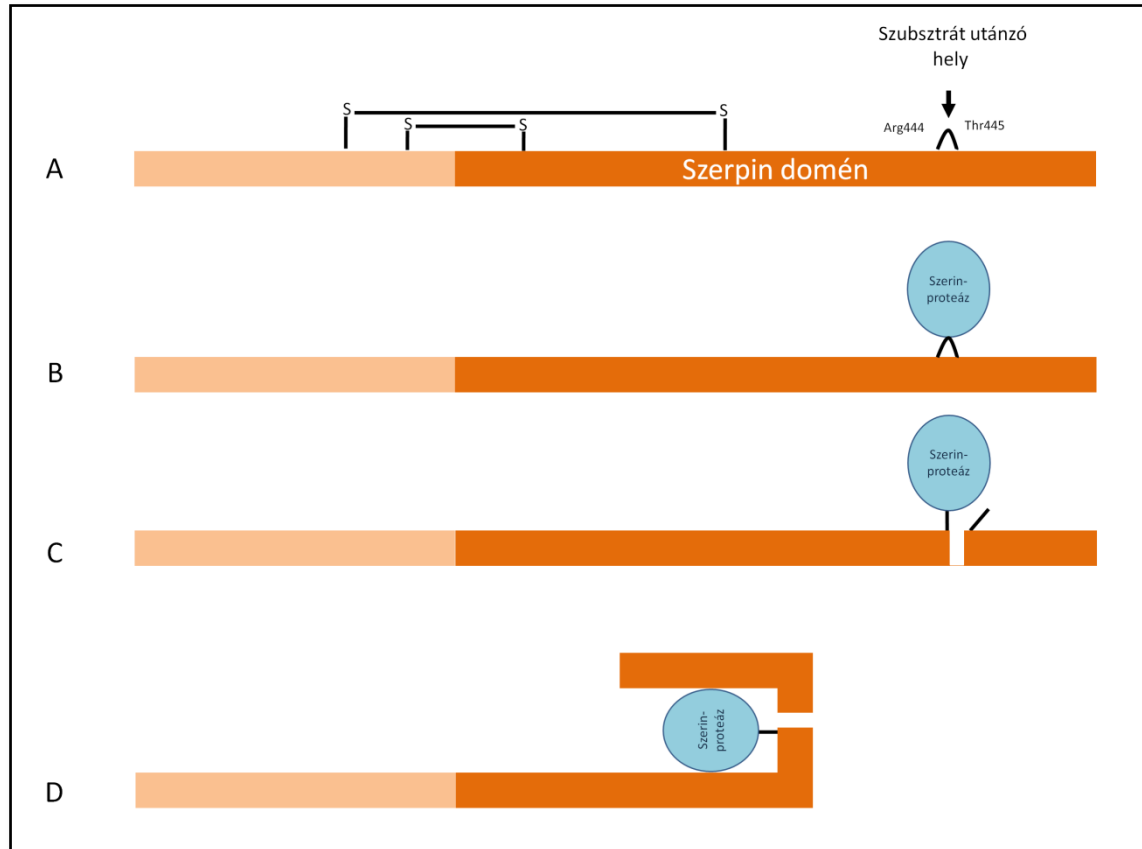
1. ábra. A C1-INH-HAE roham kiváltó tényezői és vázlatos patomechanizmusa. A kiváltó tényezők hatására megnövekedhet bizonyos szerin-proteázok aktivitása, melyet az eleve csökkent C1-INH aktivitás nem képes ellensúlyozni. Így a megnöveszik a bradikinin (BK) szintje, mely az endotélsejteken keresztül hatva az erek permeabilitásának fokozódásához és ödéma kialakulásához vezet. A kiváltó tényezők nem csak a C1-INH-on keresztül képesek hatni, közvetlenül befolyásolhatják a BK szintet és/vagy az erek permeabilitását is.

A betegség kapcsán ismert, hogy a BK hatására nő az erek permeabilitása és ödémák alakulnak ki bizonyos testtájakon. Továbbá az is, hogy a vérnyomás szabályozásban is lehetnek zavarok a megnövekedett BK mennyiség miatt –melyet *in vitro* állatkísérletek is alátámasztanak (12, 13) -, valamint, hogy azonos genetikai háttér és/vagy környezeti hatások mellett is nagyon különböző lehet a betegség manifesztációja. Azonban az endotélsejtek állapotát, a vazóaktív szabályozásban bekövetkező eltéréseket, illetve az egyéni fenotípus mögött álló tényezőket idáig nem vagy csak alig vizsgálták. Munkánk

során ezekre a még tisztázatlan, de a betegség szempontjából fontos kérdésekre próbáltunk válaszokat találni.

2.2. A C1-INH funkciója, szerepe a C1-INH-HAE patomechanizmusában

A C1-INH a szerpinek (szerin-proteáz inhibitorok) szupercsaládjába tartozó molekula. Az inhibitor funkcióért a 8-as exon által kódolt, a fehérje C-terminális végén elhelyezkedő rész a felelős. A szerin-proteázok hatásmechanizmusára jellemző, az úgynevezett „öngyilkos szubsztrát-utánzó” viselkedés, mely folyamat során egy irreverzibilis komplexképződés zajlik le a szerin-proteáz és az inhibitor között (1, 14, 15) (2. ábra).

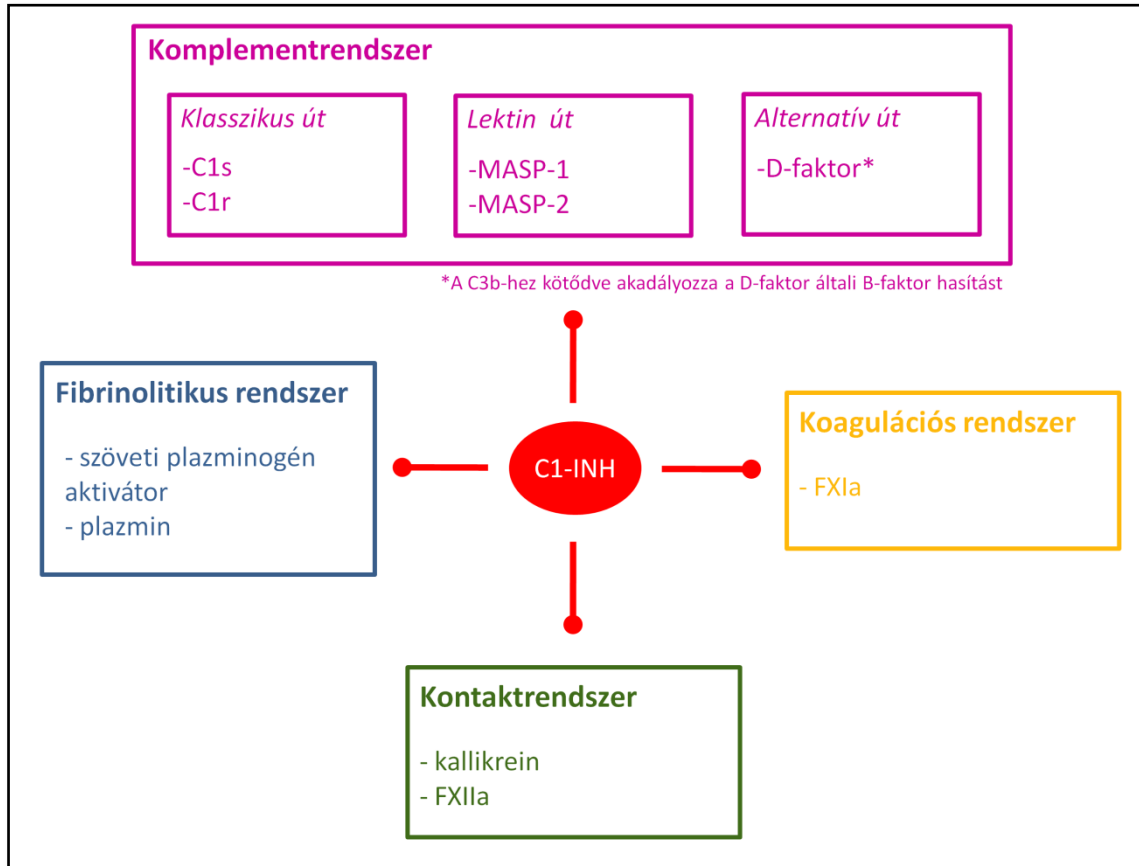


2. ábra. A C1-INH működési mechanizmusa. (A) A C1-INH molekula C-terminális vége felelős az inhibitor funkcióért és hordozza azt a helyet, ahová az általa gátolt szerin-proteázok kapcsolódni képesek. A molekula szerkezetét 2 diszulfid híd stabilizálja. Mivel a proteáz kötő hely a proteázok szubsztrátját utánozza ahová bekötődik a proteáz (B). A proteáz hasítja a C1-INH-t (C) és az így bekövetkező konformációs változás tulajdonképpen a szubsztrát „illúzióját keltve” csapdába ejti a proteázt és egy kovalens komplexet képeződik (D). (Zeerleder nyomán módosítva).

A fehérje N-terminális fele erősen glikozilált (az egész fehérjén található 13 glikozilációs helyből 10 itt található), de a cukor oldalláncok, illetve az első 98 aminosav eltávolítása az inhibitor funkciót nem befolyásolja, ugyanakkor egyéb, pl. anti-inflammatorikus folyamatokban kimutatták a szerepét. Továbbá a cukor oldalláncok eltávolítása gyorsítja a molekula kiürülését a szervezetből (1, 15, 16).

A C1-INH képes gátolni a komplement-, koagulációs-, fibrinolitikus és a kontaktrendszer egyes elemeit is (3. ábra) (15, 17). Ezekből az enzimaszkád

rendszerekből különböző proinflammatorikus, vazóaktív, illetve permeabilitást fokozó anyagok szabadulhatnak fel, melyek C1-INH hiányában szabályozatlanul, nagyobb mennyiségben keletkezhetnek.



3. ábra. A C1-INH által gátolt szerin-proteázok. A C1-INH által gátolt szerin-proteázok négy enzimaszkád rendszerbe sorolhatók. Ezalól a komplementrendszer alternatív útja kivételt képez, ugyanis ott nem enzim-inhibitor gátlásról van szó, hanem a C1-INH megakadályozza a B-faktor C3b-hez kötődését.

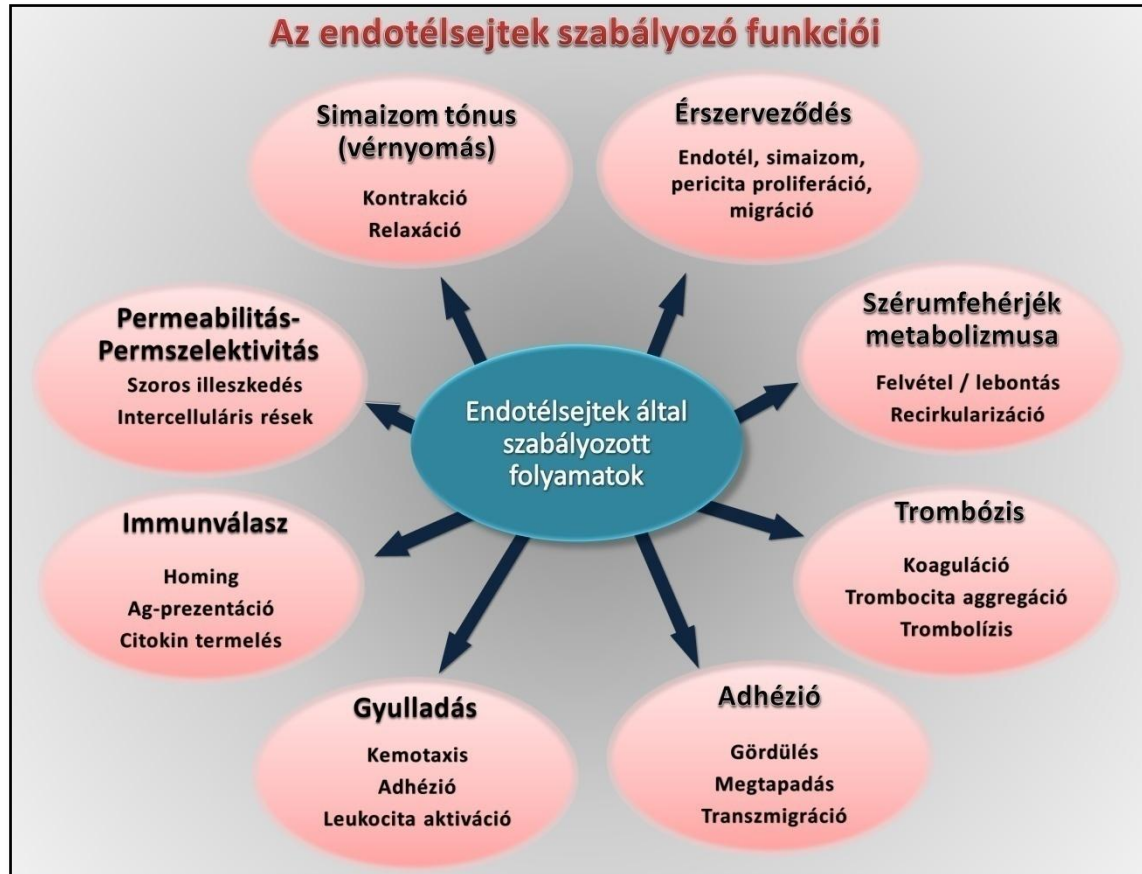
A komplementrendszerénél ezek az aktivációs termékek az anafilatoxinok (C3a, C4a, C5a), a koagulációs rendszerénél a trombin, a kontakt- és a fibrinolitikus rendszer esetén pedig a plazmin, a FXII és a kallikrein egymásra hatásának következményeként keletkező bradikinin (15). Azt azonban bebizonyították, hogy a C1-INH-HAE esetében bradikininmediálta permeabilitás-növekedés és ödémaképződés zajlik (18, 19), sőt terápiás szerként bradikinin 2-es receptor (B2R) gátló molekula is forgalomba került a betegek kezelésére (20). De nem zárható ki, hogy egy-egy roham bekövetkeztéhez a

megnövekedett bradikinin mennyiségen túl egyéb - akár a fentebb felsorolt - faktorok is közreműködnek. Így például azt már kimutatták, hogy a glükózaminoglikánok (GAG) növelik a C1-INH szerin-proteáz gátló hatását, ugyanakkor a gátló spektrumot is megváltoztatják. Azt tapasztalták, hogy a természetes GAG-ok a komplementrendszer és a koagulációs kaszkád gátlásának irányába tolják el a C1-INH gátló hatását, és nincs befolyásuk a kontaktrendszer enzimeire (FXIIa, kallikrein) (21).

A szervezetben a C1-INH legnagyobb része a májban termelődik, de sokféle egyéb sejttípus is termeli még, pl: monociták, mikroglia, fibroblasztok, illetve egyes kutatások alapján az endotélsejtek is (22).

2.3. Az endotélsejtek

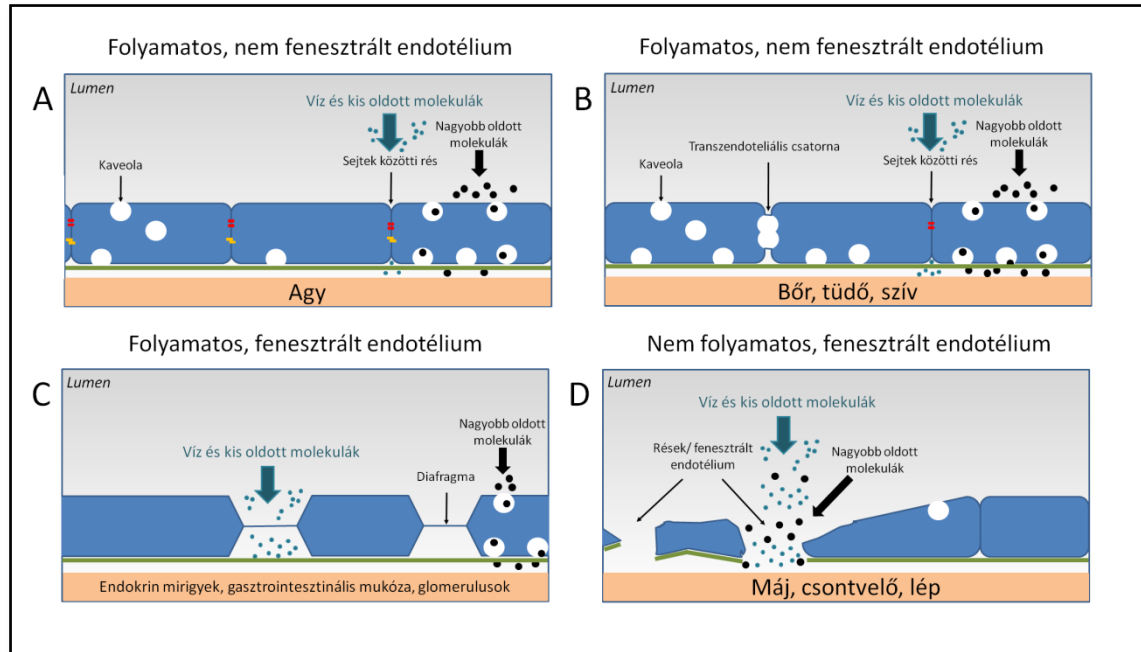
Az endotélsejtek alkotják az erek belső sejttrétegét az egész testben, összesen kb. 400-700 m²-nyi felületet borítanak be, össztömegük 1 kg körülire tehető. Az endotélium egy metabolikusan aktív, rendkívül sok fiziológiai folyamatban szerepet játszó, különböző mértékben összefüggő sejtek hálózatát jelenti. A sejtek általában laposak, 0,1 µm és 1 µm közötti vastagságú egyrétegű laphámot alkotnak, de méretük és alakjuk is eltérést mutat a szervezeten belüli elhelyezkedéstől és funkciójuktól függően. Részt vesznek a vazomotoros tónus szabályozásában, a szelektív permeabilitás fenntartásában, a hemosztatikus egyensúly fenntartásában, különböző immunológiai folyamatokban (antigén prezentálás, komplementrendszer szabályozása), az érképzésben, a gyulladás lefolyásában és a fehérvérsejtek szövetek közé történő kijutásában (23-25) (4. ábra).



4. ábra. Az endotélsejtek szabályozó funkciói. Cervenak nyomán módosítva (26)

2.3.1. Eltérő funkció, eltérő permeabilitás

A szervezetben az endotélsejtek többnyire összefüggő, de nem egységes fenotípusú és működésű rendszert alkotnak, hiszen attól függően, hogy hol helyezkednek el a szervezeten belül, más-más funkciókat látnak el, ez pedig különböző szerkezeti felépítést igényel (5. ábra). Ilyen kiemelt helyek - ahol nagyobb folyadékáteresztés szükséges - például az endokrin vagy exokrin mirigyek, a gyomor- vagy bélnyálkahártya, a glomerulusok és a vesecsatornák egy része (5. ábra C); illetve a máj szinuszoidok, lép, csontvelő (5. ábra D) (24).



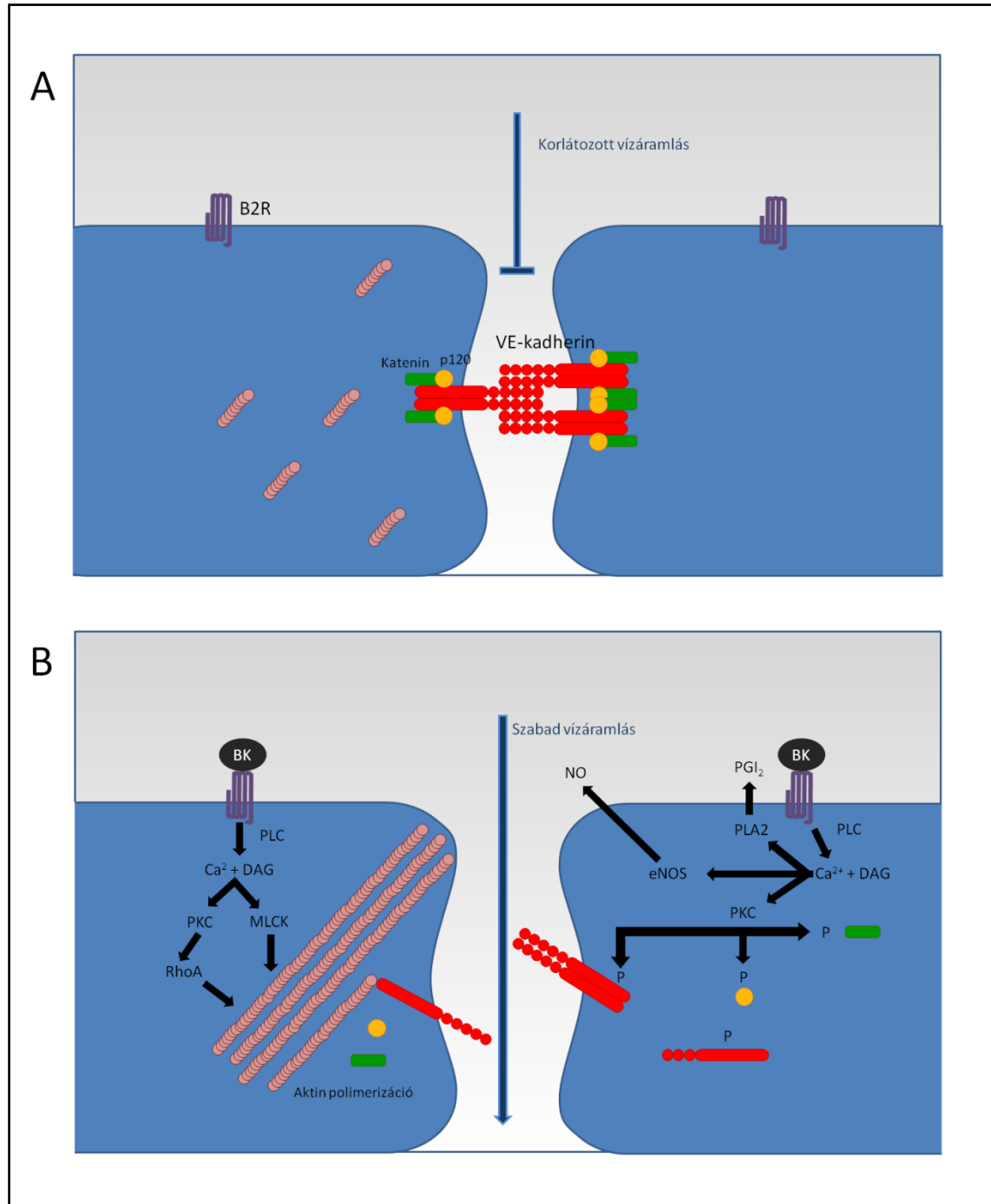
5. ábra A kapillárisok szerkezeti és permeabilitás különbségei. (A) Az agyban található folyamatos, nem fenesztrált endothéliumnál csak a víz képes a sejtek közötti réseken átjutni jól szabályozott mennyiségben, a nagyobb molekulák csak a a sejteken keresztüli transzporttal juthatnak át. (B) A folyamatos, nem fenesztrált endothéliumnál, amely nem az agyban található, csak a víz és a kis oldott molekulák ($r < 3$ nm) képesek a sejtek közötti réseken átjutni, ezek is jól szabályozott mennyiségben, a nagyobb molekulák csak a transzendenteliális csatornákon, illetve a kaveolákon keresztül juthatnak át. (C) A folyamatos, fenesztrált endothélium már átengedőbb a víz és a kis oldott molekulák kapcsán, mint a nem fenesztrált endothélium, de a nagyobb molekulák itt is csak sejteken keresztüli transzporttal juthatnak át, ugyanis a diafragmák molekulaszűrőként viselkednek velük szemben. Valamint itt még folyamatos a bazálmembrán (zölddel jelölve), melyhez a sejtek tapadnak. (D) A nem folyamatos, szinuszos endothélium, ahol diafragmák sincsenek, szabad áramlást enged a molekuláknak nagyságtól függetlenül, ebben a nem folyamatos bazálmembrán (zölddel jelölve) is nagy szerepet játszik, így lehetőség van arra, hogy sejtek is akadálytalanul kilépjenek az erekből. (Aird nyomán, módosítva)

A szervezet nagyobb részére (pl.: a bőr-, a szív-, a tüdő- és az agy artériáiban, vénáiban és kapillárisaiban) azonban a limitált folyadékáteresztés a jellemző, amit a sejtek közötti résekben található adhéziós molekulák alkotta sejtközötti kapcsolatok tesznek lehetővé (5. ábra A és B, piros és sárga színnel). Ilyenek a szoros kapcsolatok (*zonula occludens*) melyek kialakításában az okcludin, klaudin és junkcionális adhéziós molekulák (JAM) vesznek részt, valamint az adherens kapcsolatok (*zonula adherens*), melyeket a kadherine és kateninek alakítanak ki. Ezeknek a sejtközötti kapcsolatoknak a mennyisége és a minősége nagyon változatos az érrendszeren belül. Már az alap permeabilitásnál is megfigyelhetünk különbségeket a különböző anatómiai helyek között. A kis erek esetében például kevesebb szoros kapcsolatot figyeltek meg a kapillárisoknál, mint az arterioláknál, és még kevesebbet a venuláknál. Ami, végülis összefügg a posztkapilláris venulák funkciójával: a gyulladás során bekövetkező leukocita extravazációval. Nagyon sok szoros kapcsolat és ezzel összefüggésben alacsony permeabilitás figyelhető meg ugyanakkor a vér-agy gát esetében (24, 27).

A fentiekkel összefüggésben az erek permeabilitása különbözőképpen indukálható a kapilláris hálózaton belül. A gyulladás hatására bekövetkező permeabilitás-növekedés leginkább a posztkapilláris venulákra jellemző. Itt a legalacsonyabb a szoros kapcsolatok száma és a legmagasabb a hisztamin H₂-, szerotonin- és bradikinin receptorok száma, ahol az endotélsejtek összehúzódására ható anyagok képesek permeabilitás-növekedést kiváltani (pl. hisztamin, szerotonin, bradikinin, VEGF) (24).

2.3.2. A bradikinin receptorok az endotélsejteken

A bradikinin 1-es receptor (B₁R) a sejtek felszínén alap esetben nincsen jelen, csak proinflammatorikus citokinek hatására (pl: IL-1 β , TNF α) jelenik meg, szerepe egyelőre nem ismert. Ellenben az endotélsejteken konstitutív módon jelenlevő B₂R-nak bizonyítottan szerepe van a C1-INH-HAE patomechanizmusában (6. ábra) (18, 19, 28).

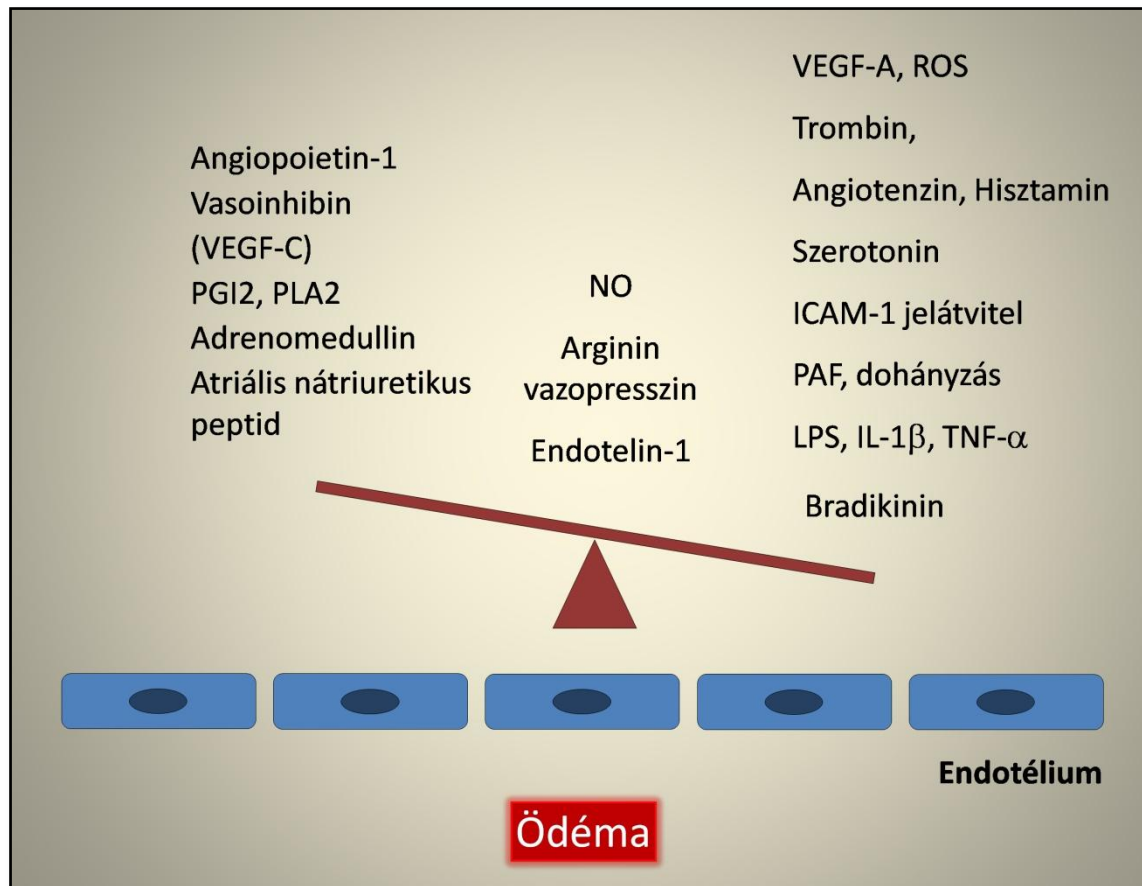


6. ábra. A bradikinin 2-es receptoron (B2R) keresztüli permeabilitás változás endotélsejtekben. (A) A paracelluláris folyadékáramlás az endotélsejtek között a VE-kadherin (pirossal jelölve) molekulák által korlátozott. A VE-kadherin extracelluláris részei egymással képesek kapcsolatot kialakítani, míg intracelluláris végei β kateninekhez (zölddel jelölve) és p120 kateninekhez (sárgával jelölve) kötődnek, melyek

segítségével kapcsolatban vannak a citoszkeletont alkotó aktinnal (rózsaszín), valamint stabilizálják a molekulákat. **(B)** Amikor BK kötődik a B2R-hoz a sejten belüli Ca^{2+} szint megnövekszik, aktiválódik a proteinkináz C (PKC), amely foszforillálja a VE-kadherin és a katenin molekulákat, ami a VE-kadherineknél internalizációjához és lebontásához vezet. Ezzel párhuzamosan a RhoA GTPáz és a miozin könnyűlánc kináz (MLCK) aktivációja az aktin citoszkeleton átrendeződését okozza, mely a sejtek összehúzódásához vezet. Így megnyílik az út a két szomszédos sejt közötti szabad folyadékáramlás felé. Mindeközben az eNOS enzim hatására nitrogén monoxid (NO), a foszfolipáz A2 (PLA2) hatására pedig prosztaglandin I₂ (PGI₂) szabadul fel a sejtekből (28), melyek a BK vazodilatatív hatásáért felelősek. *(Zuraw nyomán)*

2.3.3. Az endotélsejtek szerepe a C1-INH-HAE patomechanizmusában

Az egészséges endotélium egy aktív és adaptív rendszer, mely képes különböző ingerekre változatos válaszreakciókat produkálni. Egyfajta jelintegrátorként működik, a különböző hatásokra reagálva próbálja fenntartani a homeosztatisz egyensúlyt. Mivel a különböző hatások az endotélsejtek szintjén összegződnek, így előfordulhat, hogy az egyensúly felborul, és valamely funkció kárt szenved. Ezt láthatjuk pl. C1-INH-HAE esetén is. Az eleve csökkent C1-INH aktivitás mellé még egyéb, permeabilitás növekedés irányába mutató hatás(ok) (pl: fertőzés, mechanikai stressz) megjelenése kiválthatja az ödémás rohamot, és ezzel párhuzamosan az endotélsejtek válaszát is a megnövekedett permeabilitásra (7. ábra).



7. ábra. Az endotélium jelintegrátor szerepe a C1-INH-HAE patomechanizmusában. Az egyirányba (pl. permeabilitás növekedés irányába) ható események összeadódása okozhatja az egyensúlyi helyzet felborulását, és a permeabilitás megnövekedését, ödémaképződést. Ugyanakkor az egészséges endotélium válaszreakcióra is képes, amely az egyensúly visszaállítását célozza.

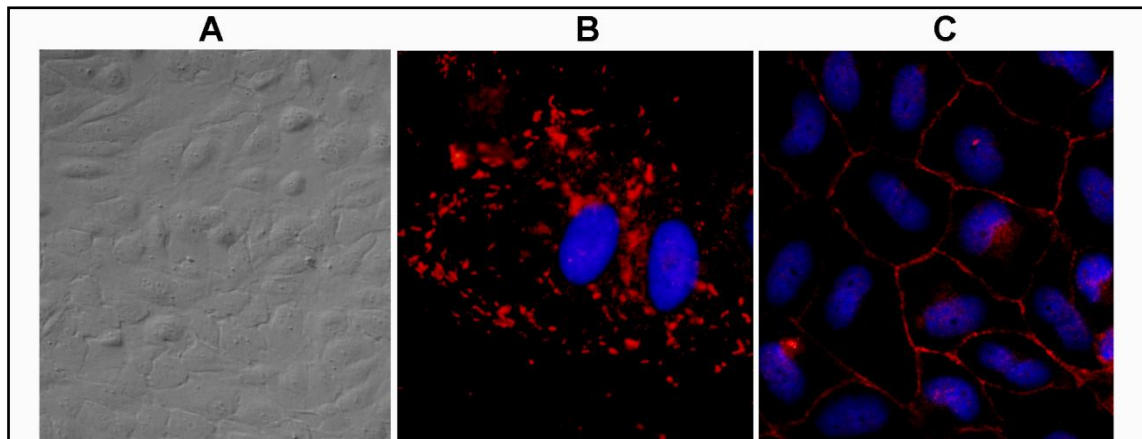
2.3.4. Az endotélisejtek C1-INH termelése

Az irodalmi adatok szerint a C1-INH legnagyobb forrása a máj, de abban is megegyeznek, hogy az endotélisejtek is termelnek C1-INH-t (15). Ennek ellenére ez utóbbi állítást nagyon kevés cikk támasztja alá, és nagyon kevésféle endotélisejt C1-INH termelését vizsgálták ezidáig (humán agyi eredetű (HBEC) és humán köldökzsinór véna eredetű (HUVEC)). Ráadásul ezeknek a vizsgálatoknak vannak olyan részletei, melyek megkérdőjelezik az eredményeket. A legtöbb cikk nem említi, hogy a használt ellenanyag mutat-e keresztreakciót a médiumkomponensként alkalmazott állati

szérumban (legtöbbször borjúsérum) található C1-INH-ral. Nem találtunk olyan vizsgálatot sem, amely egyszerre vizsgálta volna az mRNA termelést, a fehérje jelenlétét és annak sejten belüli lokalizációját.

In vitro sejtenyészetek esetén fontos még tisztában lennünk azzal, hogy mesterséges környezetben a sejtek az *in vivo* fenotípusukat csak bizonyos ideig képesek megőrizni (24). Ezért fontos, hogy tisztában legyünk azzal, hogy az általunk modellként használt sejtek mennyi ideig és milyen körülmények között őrzik meg a legjobban *in vivo* fenotípusukat. HUVEC sejtek esetén, ha a sejtek növekedése megáll a kontakt gátlás miatt (100%-os konfluencia), kimutatható a Weibel-Palade testekben tárolt von Willebrand faktor, és jelen van az adherens kapcsolatokat kialakító VE-kadherin molekula, akkor a sejtek reakciója még nagyrészt hasonlítani fog az *in vivo* állapotra (8. ábra). Ez azonban HUVEC sejtek esetén jellemzően csak 3-4 átoltásig van így.

Mivel az endotélsejtek fontos szerepet játszanak a C1-INH-HAE patomechanizmusában, így fontos lehet tisztázni, hogy valóban termelnek-e C1-INH-t, és vajon ez a mennyiség összevethető-e a máj által termelt mennyiséggel.



8. ábra. *In vitro* fenotípus HUVEC sejtek esetén. A HUVEC sejtek jellegzetes kockaó morfológiája (A) VWF (pirossal) (B) VE-kadherin (pirossal) (C) A magok kékkel jelölve (B, C). Az ábrán munkacsoportunk több hasonló kísérletéből egy-egy reprezentatív van feltüntetve.

2.3.5. Az endotélsejt aktiváció markerei

William C. Aird munkáiból látható, hogy a klinikai vizsgálatok nem nagyon foglalkoznak az endotéliummal, amit akár annak számlájára is lehet írni, hogy az

endotélium viszonylag kevésbé vethető alá *in vivo* vizsgálatoknak, mivel nem alkot egy egységet, mint a legtöbb szervünk. És talán azért is, mert az endotél diszfunkció mérésére nem igazán vannak még standardizáltan mérhető markerek. Ő úgy fogalmazza meg a különbséget az endotél aktiváció és a diszfunkció között, hogy az aktivált endotélium képes arra, hogy a különböző hatásokra, amik érik, különféle működési változással válaszoljon anélkül, hogy sérülne; az aktiváció mindig valamilyen előre meghatározott fenotípusa az endotélnek, ami helyét és idejét tekintve nagyon specifikus és reverzibilis. Általában valamilyen kombinációja a sejtadhézió megnövekedésének, a hemosztatikus egyensúly eltolódásának, gyulladós mediátorok termelésének, a sejtosztódásnak és a megnövekedett permeabilitásnak. Ezzel szemben az endotél diszfunkció a válasz hiányát, vagy éppen a térben és időben nem odaillő választ jelenti az endotélium részéről (23, 25).

Az endotélium állapotának vizsgálatára kidolgozott mérőmódszereket (a fent leírt standardizálhatóság hiánya miatt) jelenleg inkább a kutatásban használják. A legismertebb és legelfogadottabb ilyen módszer az áramlásmediálta vazodilatáció (flow-mediated dilatation, FMD) vizsgálat. Elve, hogy a brachialis artéria átmérőjét mérik ultrahanggal, miközben elszorítják majd felengedik az eret. A véráramlás újbóli megindulásának hatására felszabaduló NO vazodilatációt okoz. A standardizálás megoldatlanságán kívül további hátrányai, hogy képzett szakembert igényel a vizsgálat kivitelezése, a kiértékelés sokszor nem független a mérést végző személytől, elhízott betegek esetén az ultrahang vizsgálat nehézségekbe ütközhet és nehezen reprodukálható. Hátrányai ellenére az FMD módszer alkalmas annak mérésére, hogy az endotélsejtek adekvát választ adnak-e a behatásra (aktiváció) vagy éppen ellenkezőleg, nem tudnak megfelelően reagálni (diszfunkció). Néhol kiegészítő módszerként elérhető az úgynevezett alacsony áramlásmediálta konstriktió (low-flow-mediated constriction, L-FMC) módszer is, ami ellentétben az FMD-vel nem az erek dilatációját, hanem a kis nyírófeszültség miatt felszabaduló endothelin-1 által kiváltott konstriktóját méri (29).

Egy újabb módszer a perifériás artéria tonometria (peripheral arterial tonometry, PAT), mely térfogat változást detektál reaktív hyperaemia alatt. A kéz ujjain szokták alkalmazni, így a nem leszorított kézen egy ujj belső kontrollként használható, továbbá automatizált, hordozható és kevésbé függ a vizsgálatot végző személytől a mérési

eredmény. Az FMD-vel nem összevethető eredményeket ad, mivel itt kis ereket vizsgálnak és ezek dilatációja csak részben függ a NO-tól (29).

Az ujjbegy hőmérséklet mérés (digital thermal monitoring, DTM) az elszorított ujjhegy hőmérsékletének esését méri az elszorítás alatt, illetve az elszorítás utáni hőmérséklet normalizálódást. Előnyei, hogy a mérés egyáltalán nem igényel szaktudást, a végeredmény független a mérést végző személytől és az ismételhetősége kiváló, ugyanakkor a módszer még nem igazán terjedt el (29).

Az erek merevségét vizsgáló módszerek már inkább kifejezetten az érkárosodás, endotél diszfunkció mérésére alkalmasak, és közvetlen nem mérik az endotélfunkciót, ellenben az ateroszklerózis kialakulását, illetve a már kialakult állapot nyomonkövetését elvégezhetjük velük (29).

Ugyanakkor találhatunk az endotélsejtek aktivációját/diszfunkcióját jelző egyéb markereket is, melyek egyszerűen mérhetőek vérmintából. Bár ezeknek a vérből mérhető paramétereknek megvan az a hátránya, hogy nem dönthető el belőlük, hogy endotél aktivációt vagy diszfunkciót látunk, de nem igényelnek speciális szaktudást, felszereltséget és a betegek roham alatti állapota is egyszerűen nyomonkövethető velük. Valamint C1-INH-HAE esetében már kimutatták, hogy a betegekben nincsenek jelen az ereket érintő kóros folyamatok, pl: ateroszklerózis (30).

Ilyen vérből mérhető marker például az erek sérülését is jelző von Willebrand faktor (VWF). Mivel csak a megakariociták és az endotélsejtek termelnek VWF-t, amennyiben nem áll fent a szervezetben trombózis, akkor a keringésben található VWF legnagyobb része az endotélsejtekből származik, így a VWF mennyiségének mérése egy általánosan elterjedt markere az endotélsejt aktivációnak. A VWF-nak két fő funkciója van: egyrészt a VIII-as véralvadási faktor stabilizáló molekulája, másrészt a vérlemezkék kikötését végzi egymáshoz és az extracelluláris mátrixhoz (31, 32). A VWF egyrészt konstitutívan termelődik és szekretálódik az endotélsejtekből (monomer forma), másrészt különböző stimulusokra (hisztamin, bradikinin, trombin, nyírófeszültség, infekció, gyulladás) szabályozott módon ürülhet az endotélsejtek Weibel-Palade testeiből (multimer forma). A VWF ligandkötő képessége nagyban összefügg a méretével és a multimerizáltságának fokával, így célszerű a keringő mennyiségen kívül (VWF antigén, VWF:Ag) a kollagénkötő képességét is lemérni (VWF:CBA). A két tulajdonság együttes mérése nem csak a mennyiségét adja meg a molekulának, de a

funkciójáról és a forrásáról is ad információt (33-35). Több enzim is képes a VWF multimerek feldarabolására (pl.: ADAMTS13- **a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13**), a feldarabolást követően a VWF, mint antigén változatlan mennyiségben megmarad, ellenben a VWF:CBA csökken. Ezért az emelkedett VWF:CBA endotelsérülést vagy a multimerek csökkent darabolását jelezheti (33, 36).

Az endotélsejt aktiváció kimutatásának egy másik elfogadott markere a szolúbilis E-szelektin szint mérése. Az E-szelektin csak az aktivált endotél felszínén található, és a leukocita transzmigrációban játszik szerepet (37). Enzimatis hasításra alakul ki a keringésbe kerülő szolúbilis formája, a szolúbilis E-szelektin, bár az, hogy melyik enzim hasítja le az endotélsejtek felszínéről még egyelőre tisztázatlan. Mivel a nyugalomban lévő endotélsejtek szinte egyáltalán nem fejeznek ki a felszínükön E-szelektint, így ha a keringésben mérhető szintje megnő, akkor az egyszerre jelzi az endotélsejtek aktivációját, illetve az E-szelektin lehasadásának beindulását is. Illetve a sejtmembrán integritásának elvesztése (nekrózis) következtében is növekedhet a szolúbilis E-szelektin szintje (38).

Az endotélmarkerek közé sorolják még a 21 aminosavból álló vazoaktív tulajdonságokkal rendelkező endotelin-1-et (ET-1) is, melyet legnagyobb részben az endotélsejtek termelnek (39, 40). Az ET-1 nagyon erős vazokonstriktor hatással bír, az ET-A receptorokon keresztül hatva az érsimaizmokra, illetve vazodilatátorként is működik, ha autokrin módon az endotélsejtek ET-B receptorain keresztül fejt ki a hatását (39). Hasonlóan a VWF-hoz az ET-1-nek is van egy konstitutív szekréciója az endotélsejtek bazolaterális oldalán, mely az alap értónus fenntartását célozza, és van egy indukálható, külső hatásokra (hipoxia, trombin, nyírófeszültség) beinduló szekréciója is (39-41). Nem csak a kétféle szekréciós mechanizmus kapcsolja össze a VWF-ral, hanem az is, hogy régebben úgy tartották az ET-1 is a Weibel-Palade testekben raktározódik a VWF mellett. Azonban manapság már azt feltételezik, hogy az érett Weibel-Palade testek a VWF-on kívül mást nem tartalmaznak, így valószínűsíthető, hogy a két faktor szekréciója elkülönülten (is) szabályozott (35, 42, 43).

2.4. Vazoaktív peptidek

A vérkeringés szabályozása nagyon összetett folyamat, hiszen a szervezet csak ritkán van nyugalmi állapotban, így a keringést fenntartó és szabályozó funkciók folyamatos korrekcióra szorulnak. Ennek részét képezik a véráramlás helyi szabályozó rendszerei; az idegi szabályozás, mely a gyorsan működésbe lépő, rövidtávú beavatkozást végzi; valamint a hormonális szabályozás, mely általában valamilyen „szükségállapotban” lép csak működésbe. A helyi szabályozás részét képezik az endotélsejtek és a belőlük felszabaduló vazoaktív anyagok, melyek vazodilatációt (pl. NO, PGI₂) vagy vazokonstriktiót (pl. ET-1) okoznak. Szintén a helyi szabályozás része a kinin-kallikrein rendszer, melyből pl. a szöveti trauma hatására felszabaduló BK a vazodilatáció és a permeabilitás növekedés irányába hat. Továbbá a gyulladás során az idegi szabályozás részét képező faktok (a bekapcsolódó polimodális afferens idegrostokból felszabaduló neuropeptidok: P-anyag, CGRP, neurokinin A) és a helyi immunsejt aktiválódás (a hízósejtek és az anafilatoxinok által felszabaduló hisztamin) hat a vérnyomásra és az erek permeabilitására.

A hormonális szabályozásban pl.: a keringő katekolaminok (adrenalin és noradrenalin), a renin-angiotenzin rendszer (angiotenzin II) és az arginin vazopresszin is részt vesznek, utóbbinak szerepe van a nagyobb vérzések utáni kompenzációs reakciókban, de legfőbb szerepe a vesén keresztüli vízvisszaszívás szabályozása, a folyadék-homeosztázis egyensúlyban tartása.

A C1-INH-HAE-ban ismerten érintett az endotélium, amely a helyi vérnyomásszabályozás része és közvetlen hatással van az értónusra (28). Ismert, hogy a C1-INH-HAE rohamok alatt növekszik a BK szintje, mely szintén részt vesz a helyi vérnyomás szabályozásában, növeli az endotélsejtek permeabilitását valamint nátriuretikus és diuretikus hatással is rendelkezik (44). Azt azonban eddig még nem vizsgálták, hogy vannak-e a betegekben a vérnyomásszabályozó rendszert is érintő eltérések. Ezért kerestünk a BK-en kívül még olyan faktorokat, melyek egyszerűen mérhetőek szérummintából, és a helyi vagy a hormonális vérnyomásszabályozásban részt vesznek, illetve hatással vannak az endotélpermeabilitásra.

Az egyik ilyen kis peptid az endotélmarkerek egyike: az ET-1, mely erős vazopresszor hatással rendelkezik.

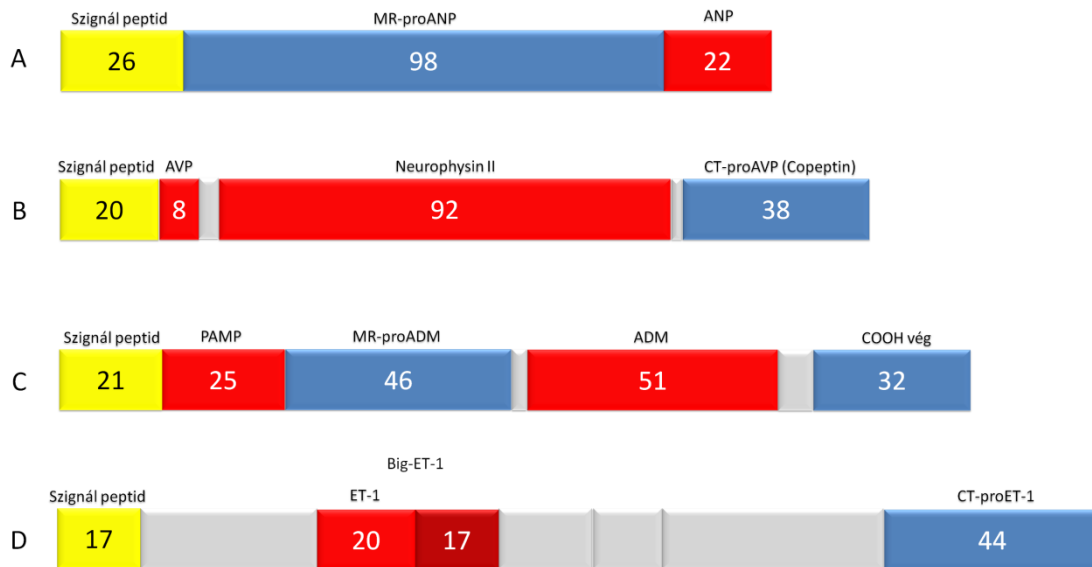
Az 52 aminosavból álló adrenomedullin (ADM), mely egy gyűrű struktúrájú, vazodilatatív peptid, mely hatását az endotélsejtek NO termelésén keresztül fejt ki, de közvetlenül is képes hatni az érsimaizomsejtekre a CGRP receptoron keresztül. Az ADM-et szokás endotélmarkernek is tartani, mert aktivált endotélsejtek is termelik, de ezen kívül még igen sok szerv és szövet részt vesz a termelésében (pl: a vesék, tüdő, központi idegrendszer, kardiovaszkuláris szövetek és érsimaizom). Továbbá az endotélsejtekre kifejtett túlélést segítő, apoptózist elnyomó hatása is ismert (45, 46).

Az arginin vazopresszin (AVP) szintén egy vazokonstriktor hatású nonapeptid, melyet a hipotalamusz termel. Elsődleges funkciói közé tartozik a fent említettekén kívül még a folyadék visszatartás szabályozása. Kiürülését az alacsony plazma térfogat és a magas plazma ozmolalitás indukálja (47).

Az atriális nátriuretikus peptid (ANP) pedig amellet, hogy szintén rendelkezik vazoaktív hatással (vazodilatátor), különböző hatással van az egyes anatómiai helyek permeabilitására. Az ödémák ellen hat a tüdőben és az agyban, míg más szervekben permeabilitásnövekedést okozhat (48-50).

Közös jellemzője ezeknek a kis vazoaktív peptideknek, hogy nem a funkcióképes forma, hanem annak egy előalakja (propeptid) egyszerűen detektálható a szervezetből (9. ábra).

Az imént felsorolt peptidek vazoaktív- és endotélsejtekre gyakorolt hatásainak összefoglalása a 2. táblázatban olvasható.



9. ábra. A BRAHMS-kryptor módszerrel mért vazoaktív peptidek. (A) Az ANP esetén a szekréció során a membrán kötött korin hasítja ketté a molekulát a 22 aminosavból álló vazoaktív hormonra és a stabilabb, hosszabb féléletidejű, ezért jobban detektálható pro-ANP szakaszra (51, 52). (B) Az AVP esetében a nagyobb méretű pre-fehérje 3 különböző peptiddé hasad, melyek közül a vérnyomás szabályozásában és a folyadékhomeosztázis fenntartásában csak az AVP-nek van szerepe (a neurophysin II-t az AVP carrierjének tartják, a copeptinnek pedig még nem tudták hatását kimutatni). Itt is a hosszabb féléletidejű peptidszakaszt, a copeptint detektáljuk (53, 54). (C) Az ADM esetében 2 vazodilatatív hatással bíró fehérje keletkezik az előalak hasítása során. Mivel az ADM igen rövid ideig marad szabadon a keringésben, ezért itt is egy lehasadó, hosszabban a keringésben maradó peptidszakaszt, a pro-ADM-et detektáljuk (55). (D) Az ET-1 esetén szintén egy a vazoaktív hatással rendelkező fehérjéről levágódó rész, a pro-ET-1-et lehet a keringésből mérni (56).

2. táblázat Vazoaktív peptidek összefoglaló táblázata

Név	Hatása az értónusra	Hatása az ér permeabilitásra	Egyéb hatása az endotélsejtekre	Vizsgálták-e C1-INH-HAE-ban?
BK	relaxáló	növeli	endotélsejt aktivációt okoz	igen, szintje emelkedett rohamok során
ET-1	kontraháló	nem ismert	túlélést segítő	igen, tünetmentes időszakban nincs eltérés a kontrolloktól
ADM	relaxáló	permeabilitás-növekedés ellen hat	túlélést segítő	nem
AVP	kontraháló	nem ismert	nem ismert	nem
ANP	relaxáló	anatómia helytől függően növeli vagy csökkenti	nem ismert	nem

BK: Bradikinin, ET-1: Endotelin-1, ADM: Adrenomedullin, AVP: Arginin vazopresszin, ANP: atriális nátriuretikus peptid

3. CÉLKITŰZÉSEK

A C1-INH-HAE rohamok gyakoriságának, súlyosságának és lokalizációjának változatossága miatt, a BK központi szerepének megkérdőjelezése nélkül, felmerül a kérdés, hogy egy-egy roham bekövetkeztekor a megnövekedett bradikinin mennyiségen túl lehetnek-e más hatások, tulajdonságok, amik befolyásolják az ödémaképződést. Mivel a fentiekből láthattuk, hogy az endotélsejtek állapotával csak kevés vizsgálat foglalkozott, melyek ráadásul csak a tünetmentes állapotot vizsgálták, így felmerült bennünk a következő kérdés:

- Van-e változás az endotélsejtek működésében C1-INH-HAE roham alatt, a tünetmentes időszakhoz képest és befolyásolja-e az endotélmarkerek szintjét a dohányzás vagy a dohányol szedés?

Mivel az endotélsejtek még egy szervezeten belül is rendkívüli heterogenitást mutatnak a működésük és a külső behatásokra való reakciójuk során, így érdekesnek tűnt a következő kérdés vizsgálata:

- Megfigyelhető-e valamilyen hasonlóság egy-egy C1-INH-HAE beteg rohamai között az endotélsejt markerek szintjén?

A vaszkuláris permeabilitás fokozásán túl a BK igen erős vazodilatatív hatással rendelkezik. Ez ellen hathatnak az endotélsejtek aktivációja során felszabaduló vazóaktív anyagok. Ezért érdemesnek tartottuk olyan anyagok vizsgálatát, melyek: a) a BK-hez hasonlóan kicsi, vazóaktív hatással bíró fehérjék, b) az endotélsejtek termelik őket és/vagy az endotélsejteken keresztül fejtik ki vazóaktív hatásukat c) a BK-hoz hasonlóan hatnak az erek permeabilitására és/vagy a vérnyomásra, d) egyszerűen mérhetőek. Ezért a választásunk négy kis vazóaktív peptidre, az endotelin-1-re, az adrenomedullinra, az arginin vazopresszinre és az atriális nátriuretikus peptidre esett, és a következő kérdéseket szeretnénk tisztázni:

- Eltér-e C1-INH-HAE betegekben a négy vazóaktív peptid szintje nem C1-INH-HAE kontrollokhoz képest?
- C1-INH-HAE rohamok alatt van-e további változás, illetve összefüggnek-e a változások egymással, vagy más, klasszikus vazoregulációt befolyásoló tényezőkkel (dohányzás, BMI, kor, nem)?

Szintén érdekes kérdésnek mutatkozott, hogy a vazóaktív peptidek szintjének változása mennyire követ egységes sémát a különböző betegek különböző rohamaiban, így vizsgáltuk, hogy

- Kimutatható-e egyénre jellemző változás-mintázat a vazóaktív peptidek szintjében egy-egy beteg több rohamát vizsgálva?

Mivel az endotélsejtek aktivációja valószínűleg központi szerepet játszik a C1-INH-HAE patomechanizmusában, és az eddigi vizsgálatok nem minden részletükben tűnnek megfelelőnek, ezért mindenképpen meg akartuk vizsgálni, hogy:

- Valóban termelnek-e a HUVEC sejtek C1-INH-t?

Mindezek a kérdések a C1-INH-HAE pathomechanizmusának egy új oldalával foglalkoznak: az endotélsejtek és a vazoreguláció szerepével.

4. MÓDSZEREK

4.1. A vizsgált betegcsoport és a kontrollok

Az általunk vizsgált betegpopuláció és a hozzájuk válogatott kontroll személyek jellemzése az alábbiakban került részletezésre.

4.1.1. Herediter angioödémás betegek

Vizsgálatainkhoz az Országos Angioödéma Központban nyilvántartott, 100 herediter angioödémás (C1-INH-HAE) beteg (47 családból, 43 férfi, 57 nő; medián életkor: 35,5 év) 2006 és 2010 között, tünetmentes időszakokban gyűjtött vérmintáját használtuk fel, akiknél az összes figyelembe vett klinikai paraméter is rögzítve volt. (Tudományos és Kutatás Etikai Bizottság engedély száma: TUKEB 65/2008). Az általunk vizsgált betegpopulációban az I-es típusú (89 fő) és II-es típusú (11 fő) C1-INH-HAE betegek laboratóriumi és klinikai adatait együtt elemeztük, csak a C1-INH koncentrációval kapcsolatos elemzések során zártuk ki a II-es típusú betegek értékeit, mivel a kórkép ezen formájában a C1-INH koncentráció normális, vagy esetenként emelkedett, de szintén csökkent aktivitással párosul. A betegek évente legalább egyszer kontroll vizsgálaton vettek részt, amelynek során vérvétel is történt, ez adott lehetőséget a szérum- és plazmabank létrehozására. Minden beteg esetében a klinikai és laboratóriumi kritériumok (pozitív családtörténet, angioödéma klinikai tünetei, csökkent funkcionális C1-INH aktivitás) alapján a C1-INH-HAE diagnózisa az Országos Angioödéma központban került felállításra, amelyet molekuláris genetikai vizsgálat is alátámasztott. A betegek klinikai tünetei folyamatosan kontrollálva voltak; hosszú távú profilaxisban danazol vagy tranexámsav alkalmazásával, míg az ödémás rohamok kezelése a humán plazma eredetű C1-INH-koncentrátum (Berinert[®], CSL Behring, Marburg, Németország) beadásával történt.

A fent bemutatott 100 beteg közül 18 betegtől az ödémás rohamok során, a C1-INH koncentrátum beadása előtt is lehetőségünk nyílt vérminták gyűjtésére, így tőlük összesen 46 roham alatt levett mintát vizsgáltunk. A tünetek első megjelenésétől a vérvétel időpontjáig eltelt idő medián értéke 3,25 óra volt (25 - 75. percentilisek: 2,0-7,5 óra; továbbá minimum 0,5 óra, maximum 72,0 óra).

A vizsgált betegpopulációban 13-an enyhébb szív- és érrendszeri rendellenességben (kontrollált magas vérnyomás, tachiaritmia vagy mindkettő), 3-an II-es típusú diabéteszben szenvedtek, valamint volt 1 Crohn beteg is (inaktív szakaszban a mintavételi időszak alatt). Mivel a C1-INH-HAE egy ritka betegség, kevés beteget érint, így ezeket az ismerten más betegségben szenvedő pácienseket sem zártuk ki a vizsgálati csoportból. Így a dolgozatomban bemutatott eredmények az összes beteg bevonásával készültek, azonban lefuttattuk az analíziseket ezen betegek kizárásával is, de ez nem módosította az eredményeket.

A betegekre jellemző rohamgyakorisságot 5 egymást követő év (2006-2010) átlagos rohamgyakorisága alapján állapítottuk meg.

4.1.2. Kontroll személyek

A korban és nemben illesztett kontroll csoportot 111 felnőtt (49 férfi, 62 nő, medián: 34,0 év) alkotta, akik írásos beleegyezésüket adták vizsgálatunkhoz (Tudományos és Kutatás Etikai Bizottság engedély száma: TUKEB 65/2008). A kontroll személyek egészségügyi szűrésen vettek részt, és informáltuk őket vizsgálatunkról. Egyik egyén esetében sem találtunk C1-INH-HAE-ra utaló klinikai vagy laboratóriumi adatot. A kontroll csoportban 6 személynek volt enyhe fokú szív- és érrendszeri betegsége (kontrollált magas vérnyomása, alsó végtagi vénás elégtelensége).

4.2. Alcsoportok vizsgálata

Vizsgálataink során többször előfordult, hogy szeretnénk volna megvizsgálni olyan faktorok hatását is az általunk vizsgált paraméterekre, melyek nem minden betegre jellemzőek, ezért ilyen esetekben alcsoportokat képeztünk a C1-INH-HAE és a kontroll csoporton belül is az alábbi szempontok szerint.

4.2.1. Endotélmarkerek vizsgálata

Dohányzók: azok a személyek, akik a mintavétel időpontjában rendszeresen dohányoztak, vagy kevesebb, mint 1 évvel a mintavétel előtt hagyták abba a dohányzást.

Nemdohányzók: azok a személyek, akik soha nem dohányoztak rendszeresen, vagy minimum 1 évvel a mintavétel előtt abbahagyták a dohányzást.

Danazol szedők: azok a betegek, aki rendszeresen a hosszútávú terápia részeként, profilaktikusan szedtek danazolt. Átlagos napi mennyiség 99 mg/nap (dózis tartomány: 30-260 mg/nap).

Danazolt nem szedők: azok a betegek, aki egyáltalán nem szedtek danazolt.

Volt néhány olyan beteg is, akik csak szükség esetén kaptak danazol terápiát, illetve szintén néhány betegnek nem voltak kideríthetőek a dohányzási szokásai, így ezeket a betegeket a vonatkozó (dohányzással kapcsolatos, illetve danazol szedéssel kapcsolatos) elemzésekből kizártuk.

4.2.2. Vazoaktív peptidek vizsgálata

Kardiovaszkuláris (KV) rizikós alcsoport: magas vérnyomás vagy dohányzás vagy 30-nál nagyobb BMI vagy 2-es típusú diabétesz vagy tachiaritmia vagy ha az illető férfi.

A KV rizikó nélküli csoport: nem volt magas vérnyomásuk és nem dohányoztak és a BMI-jük 30 alatti volt, nem volt hajlamosító betegségük, és ha az illető nő.

Tudatában vagyunk annak, hogy sokkal részletesebb rizikófelosztást is lehetne csinálni, de a rendelkezésünkre álló kis betegszám miatt kénytelenek voltunk ezt a nagyfokú egyszerűsítést elvégezni.

4.3. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata

A vizsgálataink során mért különböző paramétereket az alábbiakban részletezett módszerekkel mértük

4.3.1. Mintatárolás

A betegektől és a kontrolloktól levett mintákat (EDTA- és citrát-plazma, valamint teljes szérum) felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A méréseket olvasztatlan alikvótokból végeztük.

4.3.2. A C1-INH aktivitás meghatározása

A C1-INH aktivitást a MicroVue C1-Inhibitor Enzyme Immunoassay kittel (Quidel, San Diego, USA) határoztuk meg, a gyártó útmutatása szerint. Az első lépés során a standardokat, a kontrollokat és a szérum mintákat biotinilált, aktivált C1s-sel inkubáltuk 30 percig, szobahőmérsékleten (az inkubálás során a mintában lévő funkcionálisan aktív C1-INH az aktivált, biotinilált C1s-hez kötődve komplexeket képez). A második lépésben az előkezelt mintákat avidinnel fedett mikrotitráló lemezen inkubáltuk 10 percig, szobahőmérsékleten, így a mintákból a biotinilált C1s-sel alkotott komplexek kikötődtek a lemezre. Az aspecifikus kötődés kiküszöbölésére a lemezeket ötször mostuk, majd kecskében termelt, tormaperoxidázzal jelölt anti-humán-C1-INH ellenanyaggal inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően kromogénikus enzim-szubsztrátot alkalmaztunk, majd a színreakciót oxálsav oldattal állítottuk le. Az optikai denzitást – amely arányos a mintákban lévő funkcionális C1-INH koncentrációjával - 405 nm -en határoztuk meg.

4.3.3. Az antigenikus C4 szint meghatározása

A szérum antigenikus C4 koncentrációját radiális immundiffúzió alapuló módszerrel határoztuk meg (57). Tizenöt ml 1,5%-os töménységű agaróz oldatot (pH 8,6; 0,1 M EDTA, veronál pufferben oldva) $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra melegítettünk, majd hozzákevertünk $70\text{ }\mu\text{L}$ nyúlban termelt anti-humán-C4 ellenanyagot (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia). Az ellenanyagot tartalmazó gélt megfelelően zsírtalanított $10\times 10\text{ cm}$ -es üveglemezre öntöttük vízszintező asztalon, és miután a gél megdermedt, $2,5\text{ mm}$ átmérőjű lyukakat vágunk bele. A fiziológiás sóoldatban kihígított standardból, valamint az 1:2 arányban hígított alacsony és magas kontrollokból, továbbá a szérummintákból $5-5\text{ }\mu\text{L}$ -t mértünk be a lyukakba, majd a lemezeket vízszintező asztalon, szobahőmérsékleten 24 órán át inkubáltuk. A nem precipitálódott fehérjék eltávolítása érdekében a lemezeket

fiziológiás sóoldatban mostuk, a mosófolyadékot 2 óránként háromszor cserélve. Ezt követően a gélt nedves szűrőpapírral lefedtük, és szobahőmérsékleten rászárítottuk a lemezre. A precipitációs gyűrűket Amidofekete fehérjefestékekkel (2 g Amidofekete, 500 ml metilalkohol, 100 ml koncentrált ecetsav, 400 ml desztillált víz) tettük láthatóvá, a felesleges festéket festékmentesítő oldattal (500 ml metilalkohol, 100 ml koncentrált ecetsav, 400 ml desztillált víz) távolítottuk el, majd digitális tolóméterrel leolvastuk a precipitációs gyűrűk átmérőjét, amelynek négyzete egyenesen arányos a minták C4 koncentrációjával. A vizsgálandó szérumminták C4 koncentrációját a standardként bemért, ismert koncentrációjú kontrolloldat (Human Serum Protein Calibrator, DAKO AS, Glostrup, Dánia) hígítási sorából határoztuk meg.

4.3.4. CRP szint meghatározás

A betegek és a kontrollok CRP szintjét Roche Integra 800 analyzer automatával mértük.

4.3.5. C1-INH mérése szendvics ELISA módszerrel

A betegek és az egészséges kontrollok esetében is szérumból végeztük a mérést (a minták tárolását bővebben lásd fent a Mintatárolás részben).

Nátrium-bikarbonát pufferben (pH 9,6) oldott 5 µg/ml-es koncentrációjú kecske anti-humán C1-INH ellenanyaggal (Quidel, San Diego, CA) 4 °C-on, egy éjszakán át fedtünk egy 96-lyukú lemezt (Nunc Maxisorp). Ezt követően 2% BSA tartalmú TBS-sel blokkoltuk a lemezt 1 órán át szobahőmérsékleten, hogy elkerüljük az esetleges aspecifikus kötődést. Az egészséges kontrollok szérumát 1:160000-ben, míg a HAE-C1-INH-HAE betegek szérumát 1:40000-ben hígítottuk 1 % BSA tartalmú TBS-Tweenben, majd a lemezre való felvitel után 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. TBS-Tween-es mosást követően kecske anti-humán biotinilált ellenanyaggal (Quidel, San Diego, CA) inkubáltuk a lemezt 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Mosás után 1:200 hígításban sztreptavidin konjugált tormaperoxidázzal (SouthernBiotech, San Diego CA) jelöltük a lemezt 30 percig, majd tetrametil-benzidin (TMB, Sigma-Aldrich) szubsztráttal hívtuk elő. A reakciót kénsavval állítottuk le, és Hidex Chameleon ELISA-lemez leolvasón mértük le 450-620 nm-en.

4.4. Az endotélmarkerek és vazóaktív peptidek meghatározása

Az endotélmarkerek és a vazóaktív peptidek szintjének meghatározásához használt módszerek leírása az alábbiakban kerül részletezésre.

4.4.1. A VWF:Ag és VWF:CBA szintek meghatározása

Az általunk vizsgált csoportok VWF:Ag és VWF:CBA szintjét szendvics ELISA módszerrel, citrátos plazmából mértük. Nátrium-bikarbonát pufferben (pH 9,6) oldott 3,1 µg/ml-es koncentrációjú nyúl-anti-humán VWF ellenanyaggal (Dako), vagy 10 µg/ml kollagén III-mal (Sigma-Aldrich) 4 °C-on egy éjszakán át fedtünk egy 96-lyukú lemezt (Nunc Maxisorp). Ezt követően 2% BSA tartalmú TBS-sel blokkoltuk a lemezt 1 órán át szobahőmérsékleten, hogy elkerüljük az esetleges aspecifikus kötődést. A mintákat VWF:Ag mérés esetén 1:1500-ban, VWF:CBA mérés esetén 1:500-ban hígítottuk 0,1 % BSA tartalmú TBS-Tweenben, majd a lemezre való felvitel után 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Standardként a VWF:Ag esetében ismert VWF koncentrációjú humán mintát hígítottunk ki 1000 ng/ml koncentrációban, majd felező hígítást alkalmaztunk 7 lépésen keresztül, míg a VWF:CBA esetén a kevert humán citrát plazma 2%-os hígításából induló 7 lépéses felező hígítási sort használtunk. TBS-Tween-es mosást követően mindkét esetben 0,52 µg/ml koncentrációjú nyúl anti-humán VWF tormaperoxidázzal konjugált ellenanyaggal (Dako) inkubáltuk a lemezt 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, mindkét esetben. Mosás után a reakciót TMB (Sigma-Aldrich) szubsztráttal tettük láthatóvá. A reakciót kénsavval állítottuk le, és Hidex Chameleon ELISA-lemez leolvasón mértük le 450-620 nm-en.

4.4.2. A szolúbilis E-szelektin mérése szendvics ELISA módszerrel

A betegek és az egészséges kontrollok szolúbilis E-szelektin szintjét a Human E-Selectin/CD62E DuoSet kit-tel mértük a gyártó utasításai szerint (R&D Systems), citrát-plazmából. Az ELISA lemezt (NUNC Maxisorp) egy éjszakán át 4 °C-on fedtük a kitben található egér anti-humán E-szelektin ellenanyaggal 6 µg/ml koncentrációban. Mosópufferrel történő mosás után a lemezt 3 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 2% BSA tartalmú TBS pufferrel. Újabb mosás után a lemezre mértük a mintákat 1:10-ben hígítva, és 2 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, standardnak a

kit-ben található rekombináns humán E-szelektint használtunk. A mosási lépés után biotinilált egér anti-humán E-szelektin ellenanyagot mértünk a lyukakba 0,5 µg/ml koncentrációban, és szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül. Az újabb mosási lépés után, a kitben található, 1:200-ban hígított, sztreptavidinnel konjugált tormaperoxidázt mértünk a lyukakba, és 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd TMB (Sigma-Aldrich) szubsztráttal hívtuk elő. A reakciót kénsavval állítottuk le, és Hidex Chameleon ELISA-lemez leolvasón mértük le 450-620 nm-en.

4.4.3. A MR-proANP, MR-proADM, CT-proAVP és CT-proET-1 szintek mérése BRAHMS Kryptor módszerrel

A vazóaktív peptidek pro-alakjának (MR-proANP, MR-proADM, CT-proAVP és CT-proET-1) mérését a BRAHMS GmbH-nál Jan Kunde végezte Kryptor technológiával EDTA-plazmából. A Kryptor módszer egy TR-FRET (Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer) szendvics immunológiai módszer, ahol a detektálni kívánt propeptid szekvenciájában kiválasztott két rövid (10-16 aminosav) szakaszhoz ellenanyagot termeltetnek. Az ellenanyagok egyike szilárd hordozóhoz kötött, a másik enzimmel jelölt. A minták felvitele zárt rendszerben történik.

4.4.4. A proANP fehérje vizsgálata

A mérést TECAN M1000-es gépen 384 lyukú fekete ELISA lemezen végeztük 25 µl 60 nM-os szubsztrát (szekvenciája: ac-ggalgr-AMC, Biocenter Kft., a továbbiakban proANP szubsztrát) és 25 µl 2-szeresen hígított EDTA plazma vagy megfelelően hígított enzim összekeverésével. 20 percen keresztül mértük a szubsztráthasítás kinetikáját (excitációs hullámhossz 370 nm, emissziós hullámhossz 475 nm, erősítés 55), majd a kinetikus mérés lineáris szakaszára egyenest fektetve a meredekségekből következtettünk az mintákban lévő enzim(ek) aktivitására.

4.5. Sejtenyésztés és endotélsejtek vizsgálata

Az endotélsejtek vizsgálatához használt oldatok és protokollok az alábbiakban kerülnek részletezésre.

4.5.1. A kísérletek során használt médiumok és pufferek összetétele

K2 médium: M199 médium (Gibco/Invitrogen), 10% FCS (Gibco/Invitrogen), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich)

Comp-AIM-V médium: AIM-V médium (Gibco/Invitrogen), 1% FCS, 7,5 U/ml heparin (Sigma-Aldrich), 2 ng/ml EGF (R&D Systems) és 250 pg/ml β-ECGF (BioSource)

ECP: Fiziológias sóoldat, 1% FCS, 10 mM TrisCl (pH 7.4), 2 mM CaCl₂

TBS-Tween: Fiziológias sóoldat, 0,05% Tween (Sigma-Aldrich), 10 mM TrisCl

4.5.2. HUVEC sejt kultúra készítése és tenyésztése

Sejtes kísérleteinket humán köldökzsinór véna endotél (HUVEC) sejt kultúrán végeztük (Etikai engedély száma TUKEB 64/2008). A köldökzsinórt fiziológias sóoldatban tároltuk +4 °C-on az izolálás megkezdéséig. Steril fiziológias sóoldatban mostuk, 70%-os etanolban fertőtlenítettük, majd szintén steril fiziológias sóoldattal öblítettük a köldökzsinórt. Ezután a lefogásmentes, ép köldökzsinór vénát mindkét végén kanuláltuk, steril PBS-sel (Gibco/Invitrogen) mostuk, vérmentesítettük az eret, majd kollagenáz oldattal (1mg/ml, Gibco/Invitrogen) 20 percig +37 °C-on inkubáltuk. A már sejteket is tartalmazó kollagenáz oldatot K2 médiummal mostuk ki. A kinyert folyadékot 1200 rpm-en 8 percig centrifugáltuk. A felülúszó óvatos leöntése után a pelletben található sejteket Comp-AIM-V médiumban szuszpendáltuk, majd az előzőleg 15 percig 0,5% zselatinnal (Sigma-Aldrich) fedett sejtenyésztő flaskába (Corning) szélesztettük. Végül 500 ng/ml fibronektint (Sigma-Aldrich) adtunk a sejt kultúránkhoz, hogy elősegítsük a letapadásukat.

A sejt kultúrákat folyamatos mikroszkópos ellenőrzés mellett Comp-AIM-V médiumban tenyésztettük egészen addig, amíg a sejtréteg konfluens nem lett, ezután vagy a kísérlethez megfelelő lemezre, vagy háromszoros alapterületű flaskába passzáltuk őket. A passzálás során először eltávolítottuk a sejtekről a Comp-AIM-V médiumot, majd

steril PBS oldattal átöblítettük a flaskát, ezután Tripszin-EDTA (Gibco/Invitrogen) hozzáadásával megszüntettük a sejtek közötti, illetve a sejtek és a hordozó közötti szoros tapadást, így a sejtek feljöttek a flaska aljáról. Tízszeres térfogatú K2 médiummal állítottuk le a reakciót, amivel kimostuk a sejteket a flaskából, majd 1200 rpm-en centrifugáltuk és szélesztettük őket. A sejteket kísérleteinkben a 2-4. passzázatok között használtuk fel, hogy elkerüljük az endotelsejtek dedifferenciációját.

4.5.3. A HUVEC sejtek C1-INH tartalmának kimutatása Western blottal

HUVEC sejteket 6-lyukú lemezre szélesztettünk Comp-AIM-V médiumban, konfluens koncentrációban 1 napra. A sejteket jéghideg PBS-sel mostuk, majd lízispuffer (30 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20mM NaF, 1% Triton-X100, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ és 2% proteáz inhibitor koktél) segítségével felkapartuk őket a lemez aljáról. A sejtörmelékeket centrifugálással (13,000g, 5 perc, 4 °C) távolítottuk el, majd a felüliszót -70 °C-on tároltuk. A minták fehérjetartalmát Roti Nanoquant reagenssel (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany) határoztuk meg.

Laemmler pufferrel (20% glicerin, 4% β-merkaptoetanol, 0.3% brómfenolkék) 1:1 arányban keverve a mintákat 95 °C-on 5 percig melegítettük őket, majd a 8 vagy 10%-os SDS-PAGE segítségével szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át. A membránokat egy éjszakán át blokkoltuk 2% BSA tartalmú TBS-ben, 4 °C-on. Majd másnap 2 órán át inkubáltuk nyúlban termeltetett affinitás-tisztított poliklonális anti-humán C1-INH ellenanyaggal (Immunogenes Kft.) 0,6 µg/ml koncentrációban vagy egérben termeltetett monoklonális anti-humán C1-INH (28-11-12) ellenanyaggal (58) 0,5 µg/ml koncentrációban, szobahőmérsékleten. Mosások után 1 órán át szobahőmérsékleten alkalikus foszfátázzal konjugált kecske anti-nyúl vagy kecske anti-egér másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a membránt, majd újabb mosást követően BCIP/NBT oldattal (Sigma-Aldrich) hívtuk elő. A denzitometriás kiértékelést Syngene GeneTools szoftver segítségével végeztük (Synoptics Ltd., Cambridge, UK).

4.5.4. mRNS mérések kvantitatív PCR technikával

HUVEC sejteket 6-lyukú lemezre szélesztettünk Comp-AIM-V médiumban, konfluens koncentrációban 1 napra. Majd a HUVEC sejteket TRI[®]-reagensben lizáltuk és tároltuk.

A teljes RNS tisztítás, a cDNS szintézis, a GAPDH és β -aktin génekre specifikus primer szekvenciák és a LightCycler[®] analízis Megyeri és mtsi. (59) által leírt protokoll alapján készült. A vizsgált génekre specifikus primereket az NCBI adatbázisa alapján terveztük és a Bio Basic Canada Inc.-vel szintetizáltattuk, összefoglalva a 3. táblázatban láthatóak. A PCR termékek tisztaságát olvadáspont (melting curve) analízissel és agaróz gél-elektroforézissel végeztük. A mintaelőkészítést és az adatok elemzését laboratóriumunkban munkacsoportunk végezte el, a qPCR reakciót Doleschall Zoltán (Országos Onkológiai Intézet) végezte.

3. táblázat A qPCR reakciókhoz használt primerek

C1-INH	forward	5' -ccagagtcctaagcaacaacagt- 3'
	reverse	5' -ttggcactcaggtagatagcatt- 3'
Interleukin-6	forward	5'-ctgcaggacatgacaactcatc-3'
	reverse	5'-atctgaggtgcccatgctac-3'
Plazminogén-aktivátor inhibitor-1	forward	5'-catccacagctgtcatagtctca-3'
	reverse	5'-ttcggagtttcttcttcccgat-3'
Endotelin-1	forward	5'-ctggacatcattgggtcaacac-3'
	reverse	5'-atgtcttcagccctgagttctt-3'

4.6. Statisztikai analízis

Statisztikai számításainkat a Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, www.graphpad.com) elnevezésű statisztikai program felhasználásával végeztük. Abban az esetben, ha egy beteghez több tünetmentes időszakban, illetve több roham során gyűjtött minta is tartozott, kiszámítottuk az egyes paraméterek átlagát, és az átlagértékeket használtuk a statisztikai elemzések során, -amennyiben csoport összehasonlításról volt szó- tehát minden beteghez egy-egy tünetmentes időszakban mért, illetve roham alatt mért érték tartozott paraméterenként. Amennyiben két paraméter között fennálló korrelációt vizsgáltuk, úgy minden egyes betegnél egy véletlenszerűen kiválasztott mintavételi időponthoz tartozó vizsgálati mintában mért értékeket használtunk az elemzéshez. Betegcsoporton belüli összehasonlításhoz – ugyanahhoz a beteghez tartozó roham alatt mért és tünetmentes időszakban mért értékek összehasonlításakor- kétmintás párosított Wilcoxon-tesztet használtunk, amennyiben a

mért paraméterek nem normál eloszlásúak voltak; és parametrikus párosított t-tesztet, ha normál eloszlásúak voltak. Az egészséges kontroll csoport és a betegcsoport összehasonlításához Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. Korrelációk számításakor Spearman-féle Rho-teszt használtunk. Egy kategórián belüli változókat Khí-négyzet próbával hasonlítottunk össze. Minden statisztikai elemzés kétoldalas volt, és $p < 0,05$ jelentett szignifikáns különbséget vagy korrelációt. Az eredményeinkben feltüntetett értékek medián (interkvartilis tartomány) értékeknek felelnek meg, ettől eltérő esetben ezt a szövegben feltüntettem.

A Linear Mixed Model-lel a vazóaktív peptidek esetében betegcsoporton belüli összehasonlításhoz –ugyanahhoz a beteghez tartozó roham alatt mért és tünetmentes időszakban mért értékek összehasonlításakor használtuk.

A lineáris regressziót a tünetmentes időszakban mért ANP szintek esetén használtuk a betegek és a kontrollok között szignifikáns eltérést mutató BMI-re és dohányzásra adjusztálva

Ez utóbbi két módszerhez az IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Corp.) programot használtuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A vizsgálatban szereplő betegek és a kontrollok jellemzése (klinikai és laboratóriumi adatai)

A vizsgálatokat C1-INH-HAE betegek tünetmentes időszakból származó, valamint roham alatt levett mintáiból, illetve kontroll személyektől vett mintákban mért paraméterek összehasonlításával végeztük. Ahhoz, hogy kiderítsük, a betegek valamint a kontrollok csoportja mennyire különbözik egymástól, összehasonlítottunk néhány alapvető paramétert mindkét csoportra vonatkozóan. Ugyanilyen összehasonlítást végeztünk a betegek tünetmentes, illetve roham alatti általános állapotával kapcsolatban. A vizsgálat első felében szereplő 18 beteg általunk felhasznált klinikai és laboratóriumi adatait a 4. táblázatban tüntettem fel. A táblázat tartalmazza a tünetmentes időszakban és a roham alatt mért értékeket is.

4. táblázat. **Roham alatt levett mintákkal rendelkező C1-INH-HAE betegek klinikai és laboratóriumi adatai.** A táblázatban szereplő értékek mediánok (interkvartilis tartomány) vagy százalékok (számok). A *-gal jelölt paraméterben a C1-INH-HAE I-es és C1-INH-HAE II-es típusa ismerten különbözik, ezért a táblázatban csak a C1-INH-HAE I-es betegek adatai szerepelnek (n=14).

	C1-INH-HAE betegek (n=18)		
Kor (évek)	35,50 (27,75-42,75)		
Férfiak/Nők % (n)	26/74 (5/13)		
Aktívan dohányzók % (n)	27,8 (5)		
BMI	25,00 (21,75-34,00)		
Danazol kezeltek % (n)	37 (7)		
C1-INH-HAE I/ C1-INH-HAE II típus % (n)	79/21 (14/4)		
	tünetmentes időszak	roham alatti időszak	P-érték
CRP (mg/L)	1,67 (1,00-5,55)	3,49 (1,68-4,94)	ns
C4 (g/l)	0,062 (0,036-0,11)	0,044 (0,023-0,084)	ns
C1-INH a (µg/ml)*	24,75 (14,36-48,28)	18,78 (11,15-28,47)	ns
C1-INH f %	10,06 (1,00-19,00)	24,55 (13,95-37,50)	0,0176

A vizsgálat második felében szereplő 100 C1-INH-HAE beteg és a hozzájuk korban és nemből illesztett 111 kontroll személy a vizsgálatok során felhasznált klinikai és laboratóriumi adatai az 5. táblázatban kerültek összegzésre.

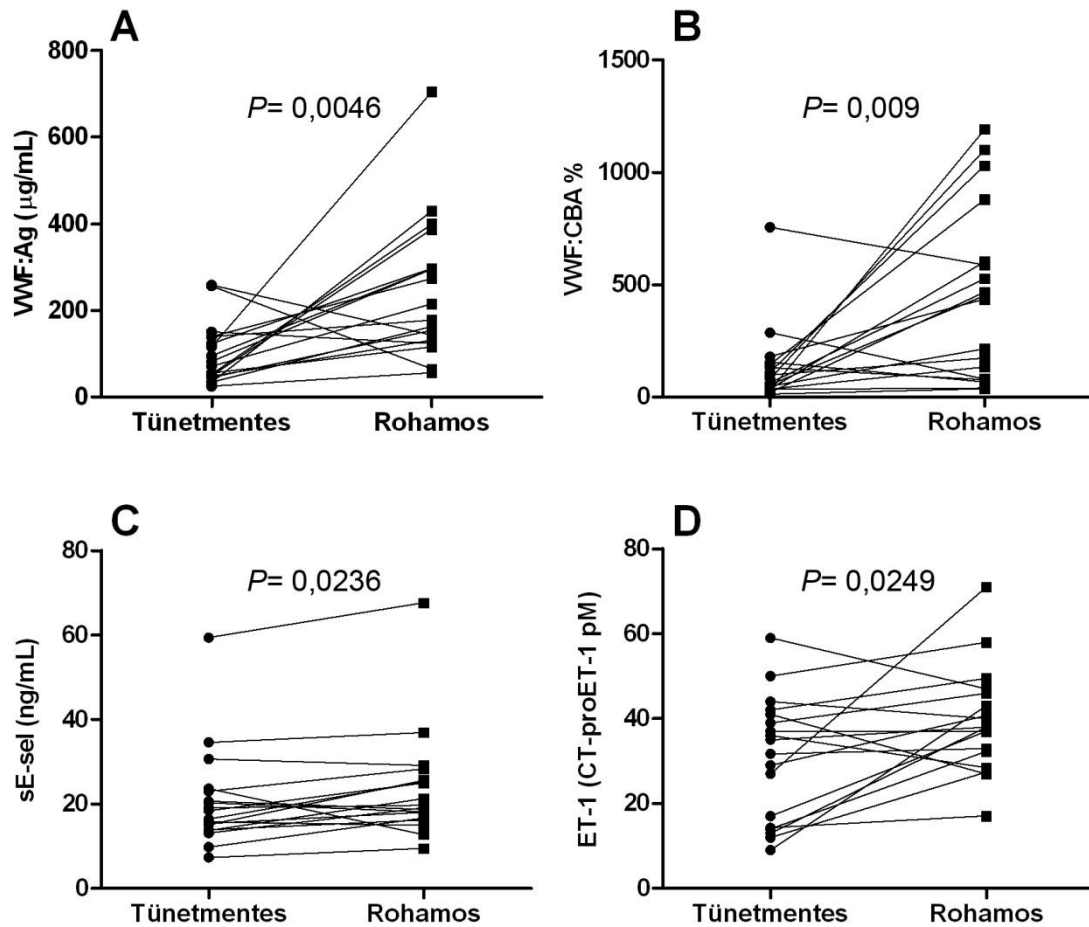
5. táblázat. **Kontrollok és C1-INH-HAE betegek klinikai és laboratóriumi adatai.** A táblázatban szereplő értékek mediánok (interkvartilis tartomány) vagy százalékok (számok). A *-gal jelölt paraméterben a C1-INH-HAE I-es és C1-INH-HAE II-es típusa ismerten különbözik, ezért a táblázatban csak a C1-INH-HAE I-es betegek adatai szerepelnek (n=89). **Nem minden C1-INH-HAE beteg dohányzási szokásait sikerült kiderítenünk, így azokat a betegeket, akikről nem volt pontos adatunk kihagytuk azokból az elemzésekből, ahol a dohányzási szokások alapján alcsoportokat képeztünk (n=13).

	Kontrollok (n=111)	C1-INH-HAE betegek (n=100)	P-érték
Kor (évek)	34,00 (28,00- 43,00)	35,50 (23,00- 47,75)	ns
Férfiak/Nők % (n)	44/56 (49/62)	43/57 (43/57)	ns
Aktívan dohányzók % (n)**	15,2 (17)	31,0 (27)	0,0099
BMI	23,00 (21,00- 26,00)	25,00 (22,00- 29,00)	0,0487
Danazollal kezelték % (n)	-	42 (42)	-
C1-INH-HAE I/ C1-INH-HAE II típus % (n)	-	89/11 (89/11)	-
CRP (mg/L)	1,44 (0,81-2,70)	1,59 (0,65-4,02)	ns
C4 (g/l)	0,30 (0,24-0,36)	0,06 (0,04-0,10)	P<0,0001
C1-INH a (µg/ml)*	94,26 (77,24- 24,00)	14,11 (6,35- 22,63)	P<0,0001
C1-INH f %	-	19,00 (5,75- 42,00)	-

5.2. Endotélsejt aktiváció kimutatása C1-INH-HAE rohamok alatt

Az irodalomban többször felmerül az endotél aktiváció/diszfunkció kifejezés a C1-INH-HAE rohamok kapcsán, ennek ellenére az aktivációt/diszfunkciót alátámasztó vizsgálat eddig nem készült. Tény, hogy a C1-INH-HAE rohamok során kialakuló ödéma az endotél aktiváció egyik jele lehet, de hogy ezt kimondhassuk, szükségesnek éreztük más, korábban már endotél aktivációt jelző faktorok, endotélmarkerek (VWF:Ag, VWF:CBA, szolúbilis E-szelektin és ET-1) szintjének mérését is a rohamok alatt.

Ezért 18 betegből származó, rohammentes időszakban levett mintákban mért endotélmarkerek szintjét hasonlítottuk össze, ugyanezen betegekből származó roham alatt levett mintákban mért marker szintekkel. Mind a 4 endotél marker esetén szignifikáns növekedést tapasztaltunk a betegek roham alatt levett mintáiban (10. ábra).

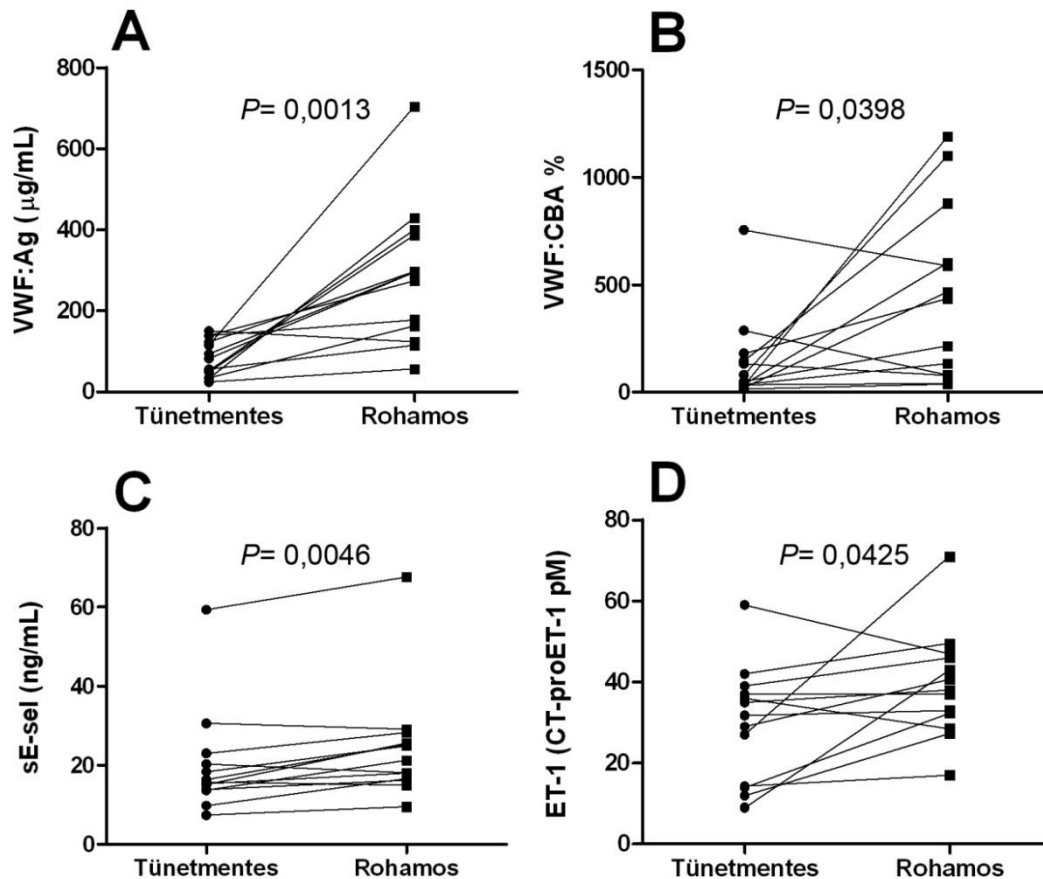


10. ábra. Endotélmarkerek szintjének összehasonlítása tünetmentes és roham alatt levett betegmintákban. 18 C1-INH-HAE beteg tünetmentes és roham alatt levett mintáiban hasonlítottuk össze a VWF:Ag (A), VWF:CBA% (B), szolúbilis E-szelektin (C) és ET-1 (D) szinteket. Az összehasonlításhoz kétmintás párosított Wilcoxon-tesztet (A, B, C) valamint parametrikus párosított t-tesztet (D) alkalmaztunk.

5.3. Az endotélsejtek működését befolyásoló rizikótényezők hatása az endotélmarkerekre C1-INH-HAE rohamokban

Az endotélsejtek működését ismertén befolyásolják kardiovaszkuláris rizikótényezők. Az egyik ilyen tényező a dohányzás. A 18 beteget nem dohányzó ($n=13$) és jelenleg dohányzó ($n=5$) alcsoportokra osztva azt kaptuk, hogy a nemdohányzók alcsoportjában

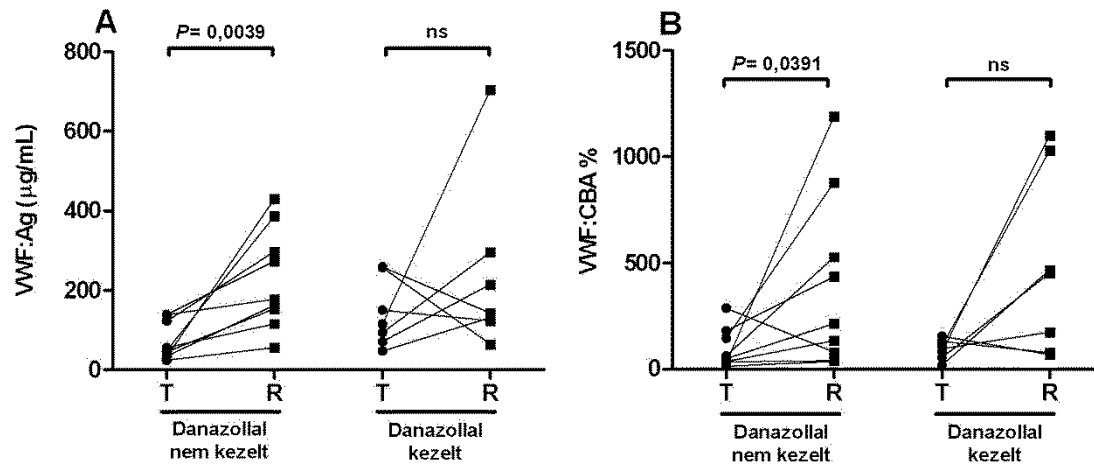
mind a 4 endotél marker szignifikánsan emelkedett (11. ábra). A jelenleg dohányzókat magában foglaló alcsoportban ez az emelkedés nem volt szignifikáns (nem bemutatott eredmény).



11. ábra Endotélmarkerek szintjének összehasonlítása tünetmentes és roham alatt levett mintákban, nemdohányzó C1-INH-HAE betegek esetében. 13 nemdohányzó C1-INH-HAE beteg tünetmentes és roham alatt levett mintáiban hasonlítottuk össze a VWF:Ag (A), VWF:CBA% (B), szolúbilis E-szelektin (C) és ET-1 (D) szinteket. Az összehasonlításhoz kétmintás párosított Wilcoxon-tesztet (B, C, D), valamint parametrikus párosított t-tesztet (A) alkalmaztunk.

A dohányzás mellett az endotélsejtek működését befolyásoló tényező még a betegek danazolal történő kezelése is. A hosszútávú danazol kezelés ismertén csökkenti a HDL és az Apo A-I szintet, míg emeli az LDL és az Apo B-100 szintet, de nem befolyásolja sem a összkoleszterol, sem a triglicerid valamint az Lp(a) szintet sem. Az emelkedett

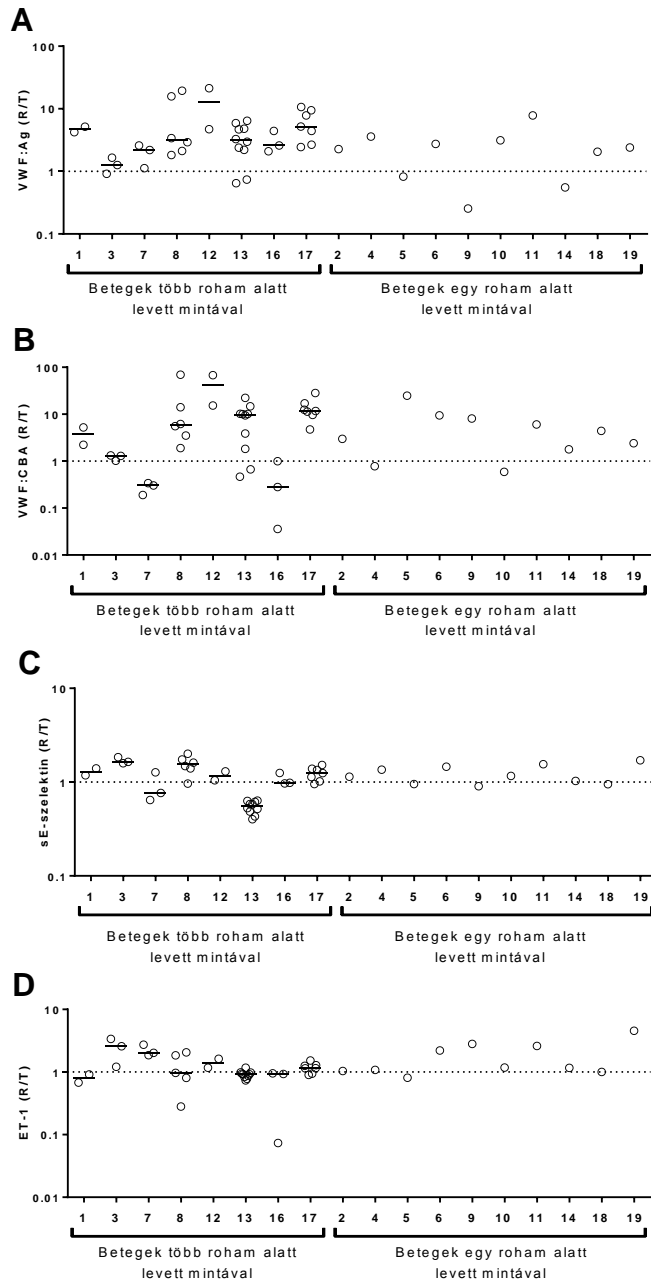
LDL/HDL arány (és az Apo B-100/Apo A-I arány) fokozza az ateroszklerózis kockázatát (60), úgy, hogy az LDL szint emelkedése károsan befolyásolja az endotélsejtek normális funkcióit: csökken az NO termelés, ezáltal csökken az erek relaxációs képessége, beindul a gyulladásos citokinek termelése, valamint megváltozik a normál antikoagulációs endotél sejtfelszín. Mivel ezzel párhuzamosan a HDL koncentráció csökken, így az nem képes ellensúlyozni az LDL feljebb kifejtett hatásait (61). Ezért a 18 beteget két csoportra osztottuk a rendszeresen danazolt szedőkre (n=7) és a danazolt nem szedőkre (n=9) (a danazolt csak szükség esetén szedő két beteget kizártuk ebből az analizisből) és vizsgáltuk, van-e változás az endotélmarkerek szintjében a két alcsoportban. A VWF:Ag és a VWF:CBA% esetében szignifikáns eltérést kaptunk a danazolt nem szedő alcsoportban a rohamok alatt (12. ábra).



12. ábra. A danazol kezelés hatásának vizsgálata az endotélmarkerek szintjének változására. 18 C1-INH-HAE beteg tünetmentes és roham alatt levett mintáiban hasonlítottuk össze a VWF:Ag (A) és VWF:CBA% (B) szinteket. Az összehasonlításhoz mindkét esetben kétmintás párosított Wilcoxon-tesztet alkalmaztunk.

5.4. Az endotélmarkerek változásai rohamonként

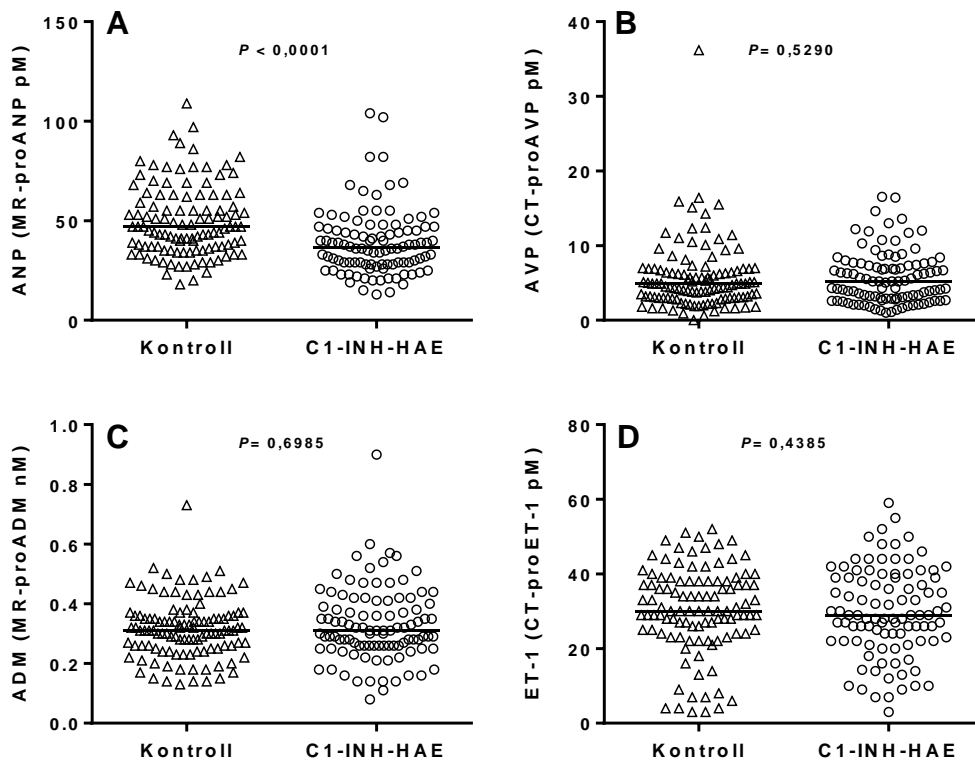
Az ödémás rohamokat kiváltó tényezők a rohamok nagy százalékánál még nem teljesen tisztázottak. Valamint a rohamok gyakorisága, súlyossága és lokalizációja nagyon különbözik az egyes betegeknél, de akár még egy beteg rohamait évenként összehasonlítva is. Így felmerült a kérdés, hogy az endotélmarkerek roham alatt mért szintjeiben találunk-e különbségeket más-más rohamok vagy személyek esetén. Összehasonlítva a 8, több rohammal rendelkező beteg összes rohamában mért endotél marker szinteket azt szűrtük le, hogy a markerek változása nem függ a roham lokalizációjától, kiváltó tényezőjétől, és leginkább az egyénre jellemző irányba és mértékben változik a különböző rohamok során (13. ábra).



13. ábra **Az endotélmarkerek szintjének változásai egyénenként.** Nyolc, több roham alatt levett mintával rendelkező, és 10, egy roham alatt levett mintával rendelkező HAE-C1-INH beteg roham alatt levett mintáiban mért VWF:Ag (A), VWF:CBA% (B), szolúbilis E-szelektin (C) és ET-1 (D) szinteket hasonlítottuk a betegek saját tünetmentes mintáiban mért értékeihez. A szaggatott vonal az egyes arányt, a rövid vízszintes vonalak a több roham alatt levett mintával rendelkező betegekben mért értékek mediánját jelzik.

5.5. Vazoaktív peptidek szintjének összehasonlítása C1-INH-HAE betegekben és kontroll személyekben

Annak ellenére, hogy a C1-INH-HAE patomechanizmusában legfőbb szerepet egy vazoaktív peptid játszik (BK), a betegséget más vazoaktív peptidek szempontjából még nem vizsgálták. Mivel a BK szintje ismertén megemelkedik a C1-INH-HAE rohamok alatt, felmerül a kérdés, hogy esetleg más vazoaktív hatással bíró peptidek szintje is változik-e a betegekben a rohamok során. Ezért vizsgálatunkban összehasonlítottuk 4 vazoaktív peptid szintjét a C1-INH-HAE betegek rohammentes mintáiban és kontroll személyekben. A vizsgált fehérjék közül, csak az ANP szintje tért el az egészségesekben mérttől (14. ábra).



14. ábra Vazoaktív peptidek szintjének összehasonlítása kontrollokban és C1-INH-HAE betegekben. 111 kontroll és 100 C1-INH-HAE beteg tünetmentes időszakból származó mintájában hasonlítottuk össze az ANP (A), AVP (B), ADM (C) és ET-1 (D) szintjét. Az összehasonlításban mind a négy esetben Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. A vízszintes fekete vonal a mediánt jelzi.

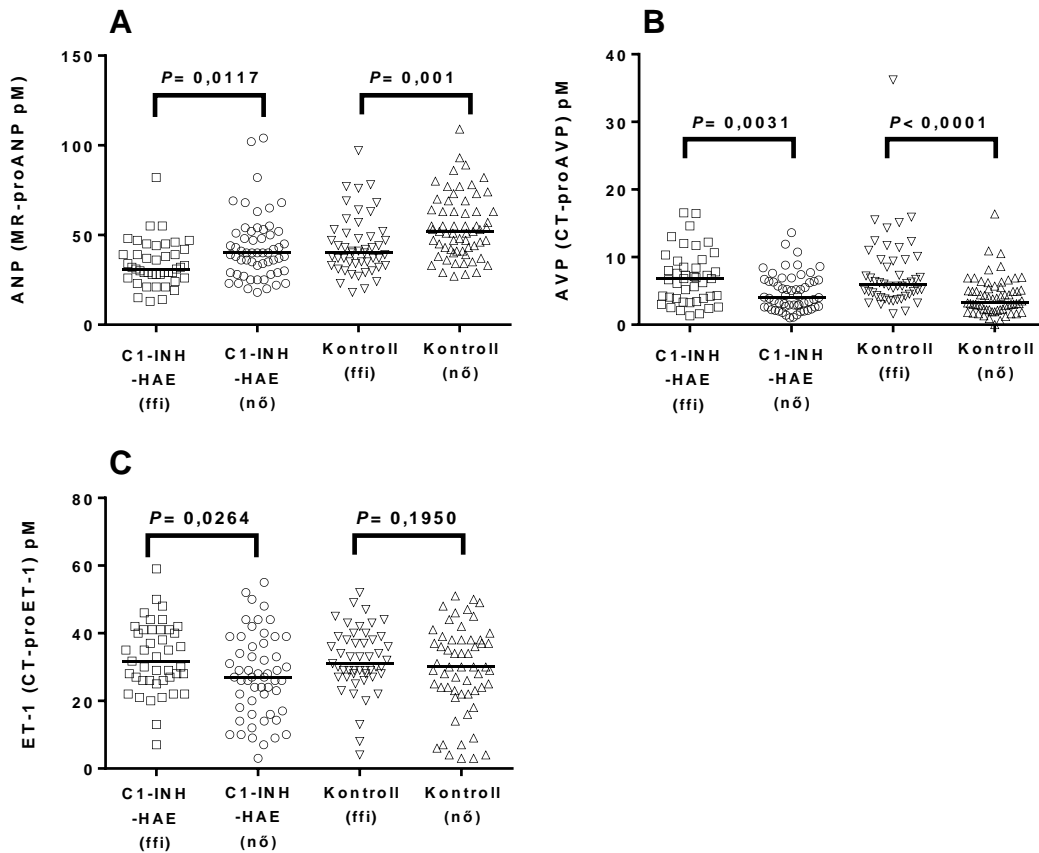
5.6. A betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői, valamint a kardiovaszkuláris rizikó hatása a vazoaktív peptidek szintjére

Megnéztük, hogy az általunk vizsgált vazoaktív peptidek összefüggnek-e valamely alapparaméterrel (nem, kor, BMI, stb.) a kontroll személyekben és a betegekben. Az ET-1 semmilyen alapparaméterrel nem korrelált, a másik három vizsgált peptiddel kapott összefüggéseket pedig az 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat **Összefoglaló táblázat a vazoaktív peptidek és az alapparaméterek közötti korrelációkról.** Az összefüggések vizsgálatához a Spearman korrelációt használtuk. Zöld szín jelöli a pozitív korrelációkat, kék a negatív korrelációt.

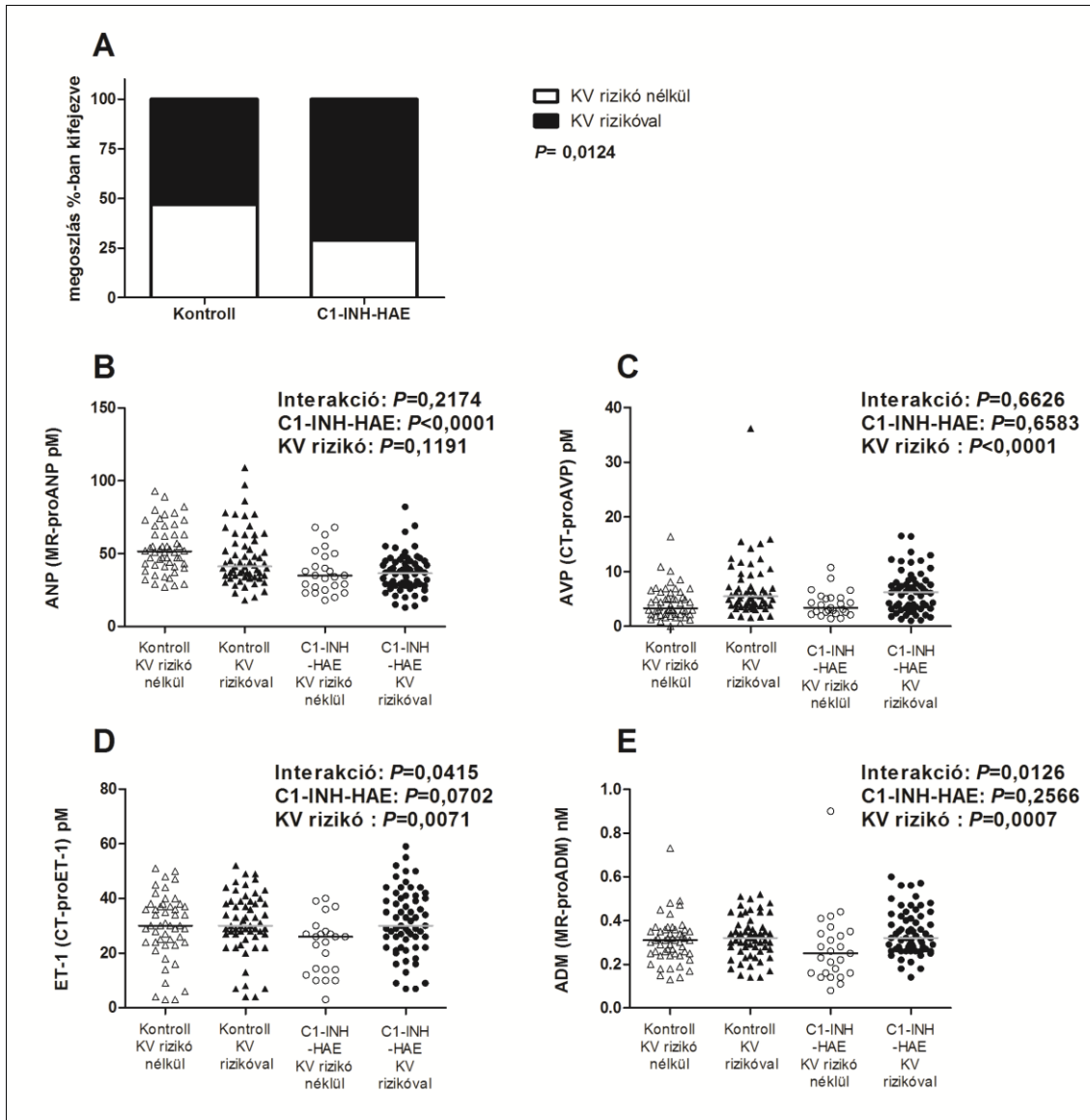
Kontroll (n=111)	Kor	BMI	CRP	C1-INHa	
ANP	R=0,4509 P<0,0001				
AVP				R=0,2173 P=0,0267	
ADM	R=0,2745 P=0,0035	R=0,2721 P=0,0039			
C1-INH-HAE (n=100)	Kor	BMI	CRP	C1-INHa	átlagos rohamszám
ANP	R=0,4385 P<0,0001				
AVP				R=0,2635 P=0,0136	R=-0,3023 P=0,0026
ADM	R=0,3522 P=0,0003	R=0,4049 P<0,0001	R=0,3543 P=0,0003		

Az ANP, az AVP és az ET-1 szintje is különbözött a férfiakban és a nőkben, bár az ET-1 esetében ez a különbség csak a betegekben volt meg (15. ábra).



15. ábra. Nemek közti eltérés az ANP, AVP és az ET-1 szintjében C1-INH-HAE betegekben és kontrollokban. Az ANP esetében mindkét vizsgált csoportban a férfiakban mért ANP szintek alacsonyabbak voltak, mint a nőkben mértek (A). Az AVP esetében a férfiakban mértünk magasabb peptid szinteket (B). Míg az ET-1 esetében csak a betegekben volt szignifikáns különbség a két nemből mért értékek között (C). Az összehasonlításban az ANP és az AVP szintek összehasonlításánál Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, az ET-1 esetében párosítatlan t-tesztet. A vízszintes vonalak a mediánt jelzik.

Mivel különböző rizikófaktorok befolyásolják a vasoaktív peptidek szintjét, ezért a betegeket és a kontrollokat is két alcsoportra osztottuk: betegek vagy kontrollok kardiovaszkuláris (KV) rizikóval és betegek vagy kontrollok KV rizikó nélkül. A C1-INH-HAE betegek között nagyobb arányban találtunk KV rizikós betegeket (n=62), mint a kontrollok között (n=59) (16. ábra, A). Az ANP esetében azt tapasztaltuk, hogy az ANP szint változása csak a C1-INH-HAE-hoz volt köthető, a KV rizikó nem befolyásolta azt (16. ábra, B). Az AVP esetén viszont a KV rizikó hatással van az AVP szintre, ugyanis a KV rizikós alcsoportoknak mind a betegekben, mind a kontrollokban magasabb az AVP szintje, mint a rizikó nélküli alcsoportoknak (16. ábra, C). Az ADM és az ET-1 esetén viszont azt tapasztaltuk, hogy a C1-INH-HAE és a KV rizikó interakciója határozza meg a peptidek szintjét a betegekben (16. ábra, D és E).



16. ábra A kardiovaszkuláris (KV) rizikó hatása a vazoaktív peptidek szintjére kontrollokban és C1-INH-HAE betegekben. A KV rizikósok aránya a kontrollokban és a C1-INH-HAE betegekben (A). Az ANP (B), AVP (C), ET-1 (D) és ADM (E) szintjei a kontrollok és a C1-INH-HAE betegek KV rizikós és rizikó nélküli alcsoportjaiban. Az (A) panelen látható adatok elemzéséhez Fisher's exact tesztet, a (B), (C), (D) és (E) ábrán látható elemzésekhez parametrikus kétszemponos ANOVA-t használtunk. Az ANP, AVP és ADM esetében logaritmizált értékekkel számoltunk, mert az eredeti értékek nem normál eloszlásúak voltak. A vízszintes vonalak az alcsoportok mediánját jelzik.

Mivel a beteg és a kontroll csoport a BMI-jükben és a dohányzók számában tért el szignifikánsan egymástól azokon a paramétereken kívül, ami a C1-INH-HAE-hoz kapcsolható, ezért logisztikus regressziót végeztünk a BMI-re, valamint a dohányzási szokásokra adjusztálva (7. táblázat); majd megállapítottuk, hogy az alacsony ANP szint továbbra is összefüggést mutat a betegséggel.

7. táblázat Az ANP szint és a C1-INH-HAE összefüggése logisztikus regresszióval vizsgálva. Az összefüggések vizsgálatához logisztikus regressziót használtunk, a BMI-re és a dohányzási szokásokra adjusztáltunk.

Modell	Exp(B)	95% CI	P-érték
ANP alacsony/magas*	0,302	0,164-0,558	<0,0001
BMI	1.092	1,022-1,166	0,009
Dohányzás igen/nem	0,424	0,206-0,875	0,020

* Az alacsony és a magas ANP szint között a vágópont az ANP szint mediánja volt, így az „alacsony” ≤ 41 pM , a „magas” >41 pM ANP szintet jelent

5.7. A vazóaktív peptidek szintjeinek változása C1-INH-HAE rohamok alatt

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy van-e különbség a betegek vazóaktív peptid szintjeiben rohamok alatt a tünetmentes állapothoz képest. Ehhez az Linear Mixed Model módszert használtuk, amely alkalmas arra, hogy egy beteghez több roham alatt levett mintában mért értéket is rendelhessünk. Így az AVP, ADM és az ET-1 esetében kaptunk szignifikáns emelkedést, míg az ANP szint nem változott a rohamok alatt (8. táblázat).

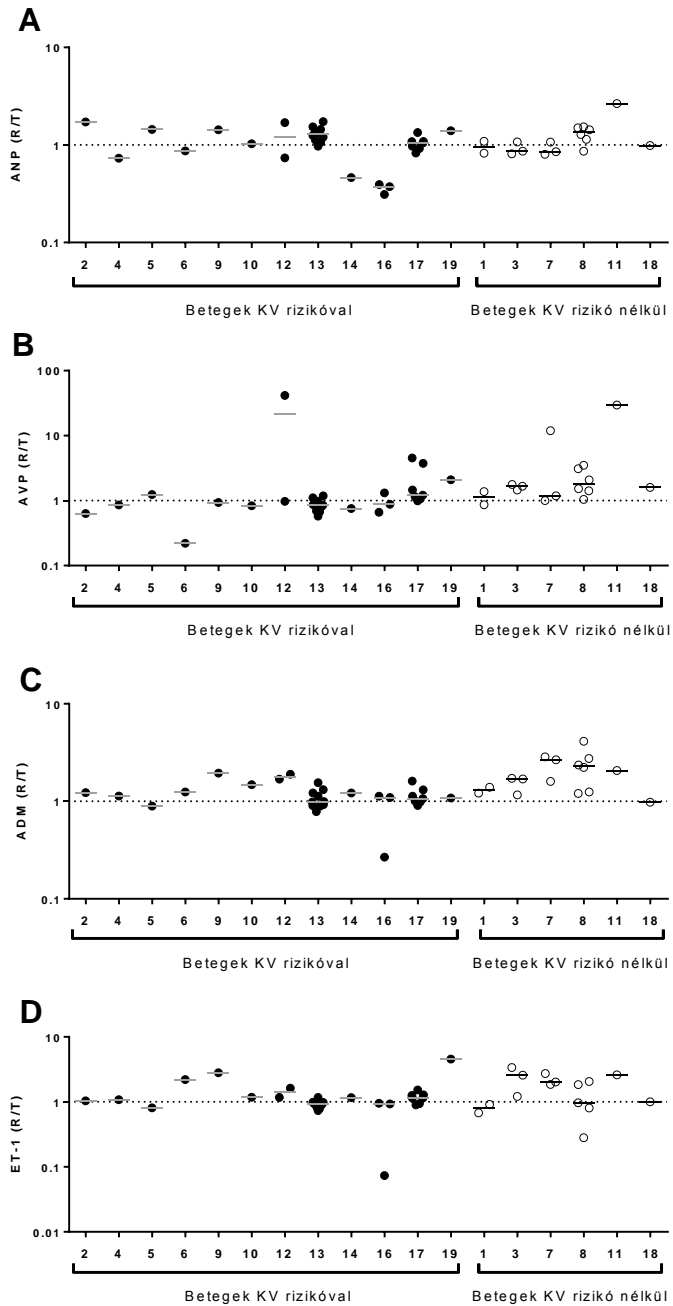
8. táblázat. A vazóaktív peptid szintek változása C1-INH-HAE rohamok alatt.

Függő változó	Becsült változás*	95% Konfidencia intervallum		P-érték
		Felső határ	Alsó határ	
ANP	2,99 pM	3,018 pM	2,961 pM	0,263
AVP	6,440 pM	11,799 pM	1,095 pM	0,019
ADM	0,095 nM	0,096 nM	0,094 nM	<0,0001
ET-1	7,540 pM	7,634 pM	7,445 pM	0,005

*Estimate: az átlagos eltérést mutatja a roham alatti és a tünetmentes állapot között.

A roham alatti és a tünetmentes időszakban mért vazóaktív peptid szintek közti különbségek meghatározásához a Linear Mixed Model módszert használtuk, ami képes ismételt mérések és random hatások kezelésére. Így minden beteg esetében meghatározható a különbség a roham alatti és a tünetmentes állapot között úgy, hogy minden mérést felhasználunk. Mivel az AVP esetében az értékek nem normál eloszlást mutattak, így ahhoz, hogy a statisztikai módszer követelményeinek megfeleljünk logaritmizált értékeket kellene használnunk. A táblázatban a mért értékekkel számolt becsült különbség szerepel, a könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért. Amennyiben elvégezzük a statisztikailag korrekt számolást, úgy azt kapjuk, hogy az AVP szint 1,590-szeresére nő a rohamok alatt ($p=0,007$).

Mivel a vizsgálat első feléből már tudjuk, hogy a KV rizikó befolyásolja az általunk vizsgált peptidek közül háromnak is a szintjét, így megnéztük, hogy rohamok alatt vajon van-e különbség a vazóaktív peptidek szintjében KV rizikós és rizikó nélküli betegek között (17. ábra). Azt láthatjuk, hogy az AVP, ADM és ET-1 esetén is a KV rizikó nélküli betegekben látható inkább emelkedés a peptidek szintjében rohamok alatt. Sajnos a rendelkezésre álló adatok mennyisége statisztikai elemzést nem tesz lehetővé. Ugyanakkor ezen az ábrán is megfigyelhető, hogy a vazóaktív peptidek szintjének változása is inkább az egyénekre jellemző, nem pedig az egyes rohamokra, mint ahogyan az endotélmarkerek esetén is.



17. ábra. A vazoaktív peptidek szintjének változása C1-INH-HAE rohamok alatt. A vazoaktív peptidek szintjének változását minden beteg esetében a tünetmentes állapotban mért értékhez viszonyítva ábrázoltuk (roham alatt mért értékek/tünetmentes állapotban mért értékek). Minden beteg összes roham alatt levett mintájában mért értéket ábrázoltuk. Az ábrán feltüntettük, hogy mely betegek tartoznak a kardiovaszkuláris (KV) rizikós csoportba. A vízszintes vonalak a mediánokat jelölik minden beteg esetében.

5.8. A vazóaktív peptidek egymásra hatása

Mivel az általunk vizsgált vazóaktív peptidek mind rendelkeznek vérnyomásszabályozó hatással, így megnéztük, hogy szintjük, vagy a szintjük változása összefügg-e egymással a vizsgált csoportokban. Mindhárom vizsgált csoportban nagyon szorosan korrelált egymással az ADM és az ET-1 szintje (valamint a roham alatti és tünetmentes időszakban mért különbségük is). Míg a többi peptid szintje (vagy a roham alatti és tünetmentes időszakban mért különbségeik) esetén csak jóval gyengébb korrelációt találtunk (9. táblázat).

9. táblázat. A vazóaktív peptid szintek korrelációja a vizsgált csoportokban.

Kontrol (n=111)	ANP	AVP	ADM
AVP	ns		
ADM	<i>P</i> = 0,0042 <i>R</i> = 0,2695	<i>P</i> = 0,0309 <i>R</i> = 0,2050	
ET-1	<i>P</i> = 0,0303 <i>R</i> = 0,2105	ns	<i>P</i> < 0,0001 <i>R</i> = 0,8060
C1-INH-HAE (n=100)	ANP	AVP	ADM
AVP	ns		
ADM	<i>P</i> = 0,0027 <i>R</i> = 0,2969	<i>P</i> = 0,0008 <i>R</i> = 0,3310	
ET-1	ns	<i>P</i> = 0,0127 <i>R</i> = 0,2509	<i>P</i> < 0,0001 <i>R</i> = 0,6641
C1-INH-HAE (R-T) (n=18)	ΔANP	ΔAVP	ΔADM
ΔAVP	ns		
ΔADM	ns	<i>P</i> = 0,0075 <i>R</i> = 0,6078	
ΔET-1	<i>P</i> = 0,0424 <i>R</i> = 0,4829	ns	<i>P</i> = 0,0021 <i>R</i> = 0,6754

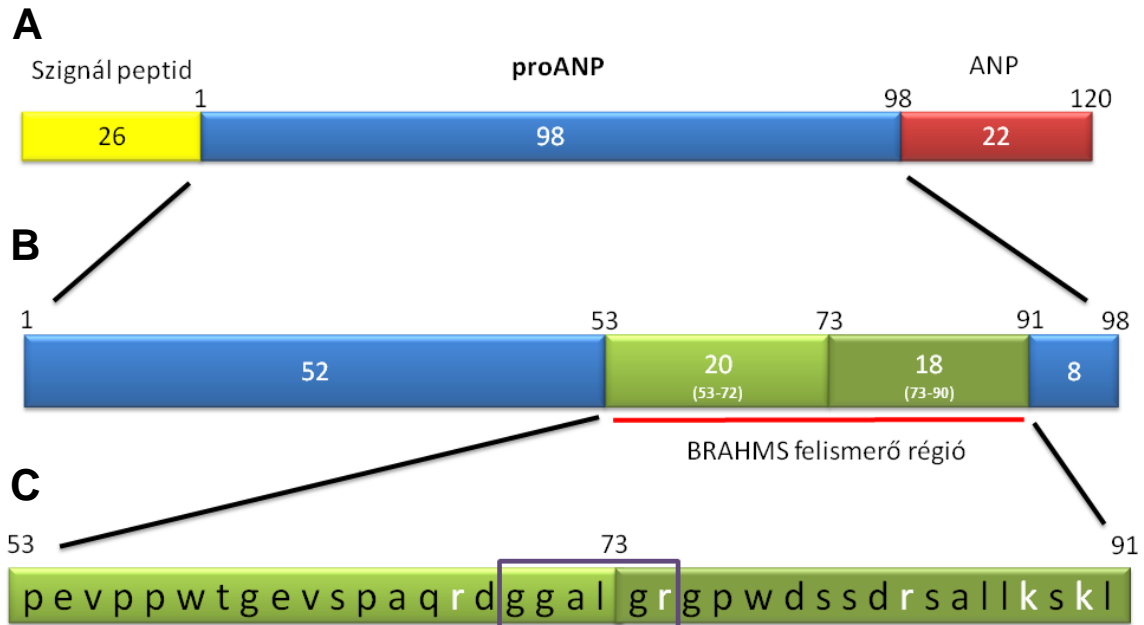
A kontrollokban és a C1-INH-HAE betegekben tünetmentes időszakban mért szintek közötti korrelációk esetén a Spearman's tesztet használtunk (felső és középső panel). A roham alatt mért (egy random értéket választottunk) és a tünetmentes időszakban mért értékek különbségét véve meghatároztuk a ΔANP, ΔAVP, ΔADM és ΔET-1 értékeket, és az ezek közötti korrelációkat is meghatároztuk (alsó panel). A sötétebb színű háttér jelöli az erősebb korrelációkat ($R < 0,3$: gyenge korreláció, $0,3 < R < 0,6$: közepesen erős korreláció, $R > 0,6$: erős korreláció).

5.9. A proANP fehérje vizsgálata

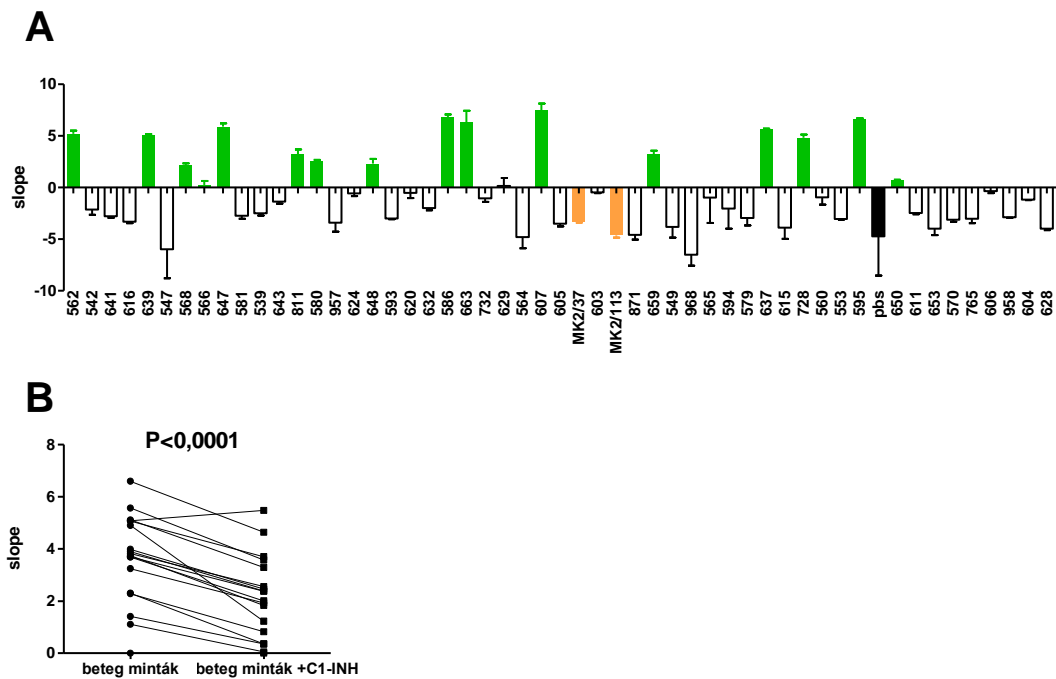
A betegekben jóval alacsonyabb ANP szinteket mértünk, mint a kontrollokban, ezért megvizsgáltuk, mi lehet ennek az oka. Az alacsony ANP szintet eddig csak anyagcsere betegségekkel hozták összefüggésbe, mint pl inzulinrezisztencia, diabétesz, zsíryanagcsere zavarai (62, 63). Az általunk vizsgált C1-INH-HAE betegek közül információink szerint a mintavétel időpontjában csak 3 betegnek volt diabétesze, és ha őket kizártuk az elemzésből, akkor is megmaradt a kontrollokhöz képest szignifikánsan alacsonyabb ANP szint, így ezzel nem tudtuk megmagyarázni a kontrollokhöz képest csökkent ANP szintet. Továbbá semmilyen a C1-INH-HAE-hoz köthető paraméterrel sem tudtuk azt összefüggésbe hozni, valamint eddigi ismereteink a C1-INH-HAE patomechanizmusáról nem támasztják alá, hogy ebben a betegségben kevesebb ANP termelődné.

Felmerült viszont, hogy a C1-INH-HAE betegekben ismerten csökkent aktivitással jelenlévő C1-INH által normál esetben gátolt enzim hasíthatja el azt a fehérjét, amit a BRAHMS Kryptor módszerrel mérünk. A módszer ugyanis nem a funkcióképes fehérjét méri ténylegesen, hanem mind a 4 fehérje esetében a nagyobb méretű előalakból (prepeptid) lehasadó stabilabb, de külön funkcióval nem rendelkező pro formát (propeptid) detektálja (9. ábra).

Ezért a Merops Peptidáz adatbázisban (64) megnéztük a C1-INH által gátolt enzimeket, illetve ezen enzimek tipikus szubsztrátjait és a hasítóhelyeket. Az itt található adatok, valamint egyéb szerin-proteáz szubsztrátok (65) összehasonlítása után megvizsgáltuk, hogy a mérési módszerben érintett fehérjeszakaszon találhatóak-e potenciális szerin-proteáz hasító helyek. Több valószínűsíthető hasítóhelyet is találtunk a BRAHMS Kryptor módszerben használt ellenanyagok felismerési helyein, majd kiválasztottuk a feljebb említett összehasonlítás alapján legvalószínűbbnek tűnő hasítóhelyet, és megszintetizáltattuk ezt a kis fehérjeszakaszt (ac-ggalgr-AMC, a továbbiakban proANP szubsztrát (18. ábra). Az általunk végzett kísérletekben több szerin-proteáz is hasította a proANP szubsztrátot, ez a szubsztráthatás némelyik enzim esetén C1-INH-ral gátolható volt (10. táblázat). A betegek mintáinak egy részében is sikerült ilyen szubsztrátható aktivitást kimutatnunk (19. ábra).



18. ábra. A **proANP fehérje vizsgálata**. A teljes ANP fehérje (**A**), a 98 aminosavas proANP szekvenciával (kék). A proANP szakasz (**B**) benne a két BRAHMS Kryptor módszerben használt ellenanyag által felismert régióval (zölddel kiemelt részek). Az ellenanyagok által felismert részek aminosav sorrendje (**C**), fehérrel kiemelve a lehetséges szerin-proteáz hasító helyek. Kerettel jelölve a legvalószínűbb hasító hely.



19. ábra A proANP szubsztrát hasítása betegek szérummintáiban és ennek gátlhatósága C1-INH-ral. (A) ProANP szubsztrátható képességet mértünk ugyanazokban a betegmintákban, amelyekből az ANP szinteket határoztuk meg. A 100 betegből 50 esetében volt már csak elérhető minta, melyek közül 16 esetben volt mérhető a szubsztrátható képesség. (proANP hasító képesség nélküli beteg minták: üres oszlopok, proANP hasító képességgel rendelkező beteg minták: zöld oszlopok, kontroll minták: narancssárga oszlopok, PBS puffer: fekete oszlopok), (B) A proANP szubsztrát tekintetében hasítási aktivitást mutató betegek szérumaiban a szubsztráthatóság szignifikánsan gátlható C1-INH-ral (párosított t-teszt).

10. táblázat Szerin-proteázok proANP szubsztráthasító képessége, és a hasítás gátlása C1-INH-ral

enzim neve (koncentrációja)	szubsztráthasítás mértéke (slope)	C1-INH-ral gátolt enzim szubsztráthasításának mértéke (slope)	P-érték
MASP-1 (300 nM)	90,16 ± 2,46	0,96 ± 0,30	0,0004
Trombin (300 nM)	7,08 ± 0,24	5,89 ± 0,28	0,0451
XII-es faktor (300 nM)	3,99 ± 0,3	0,004 ± 0,000	0,029
C1s (285 nM)	0,43 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,0047

Az értékek után ± jellel a szórás került feltüntetésre. A C1-INH gátlás statisztikai kimutatására t-tesztet használtunk.

5.10. A C1-INH kimutatása endotélsejtekben

A C1-INH HAE-ban betöltött patofiziológiai szerepe és a HAE rohamokban általunk újonnan leírt endotélsejt aktiváció miatt szerettük volna tisztázni, hogy az endotélsejtek valóban termelnek-e C1-INH-t, hiszen ezt átfogóan és minden kétséget kizáróan eddig még nem vizsgálták meg.

Ezért vizsgáltuk, hogy HUVEC sejtekből mRNS szinten kimutatható-e a C1-INH. Eredményeink alapján elmondható, hogy a sejtekben a C1-INH mRNS termelés a GAPDH (mint háztartási gén, pozitív kontroll) $2 \pm 0,45\%$ -a volt. Ez a mennyiség az endotélsejtek által ismert termelt fehérjék mRNS termeléséhez hasonló nagyságrendű (11. táblázat).

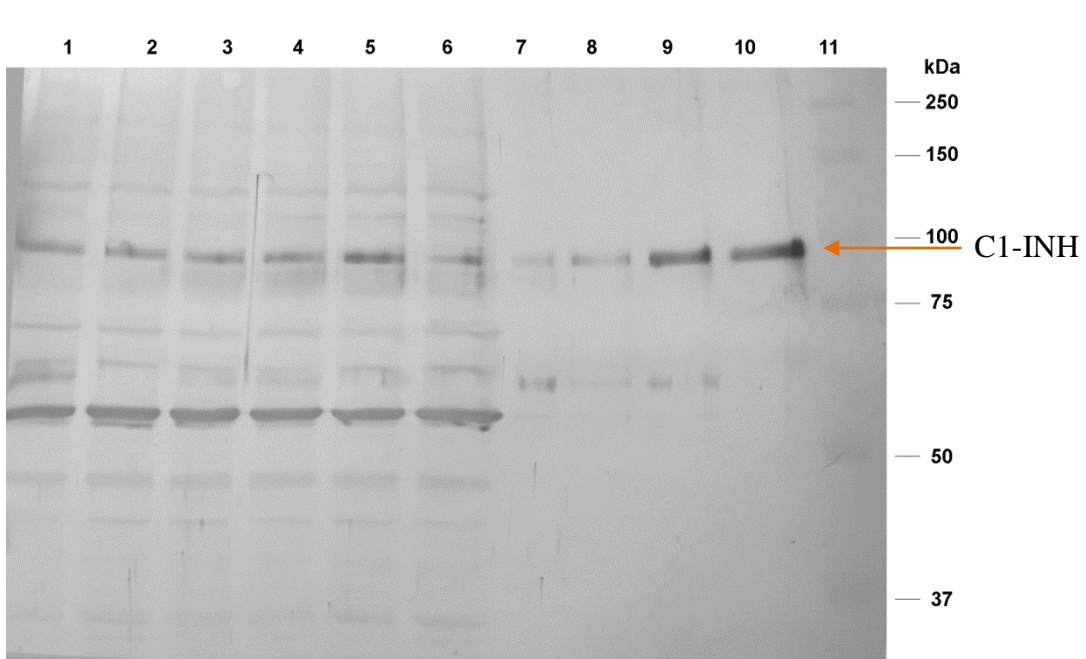
11. táblázat Néhány endotélsejtek által termelt faktor mRNS termelésének mértéke a GAPDH génhez képest

Név	IL-6	PAI-1	ET-1	C1-INH
mRNS termelés mértéke %-ban kifelyezve a GAPDH génhez képest	5,5	0,63	1373,7	2,0

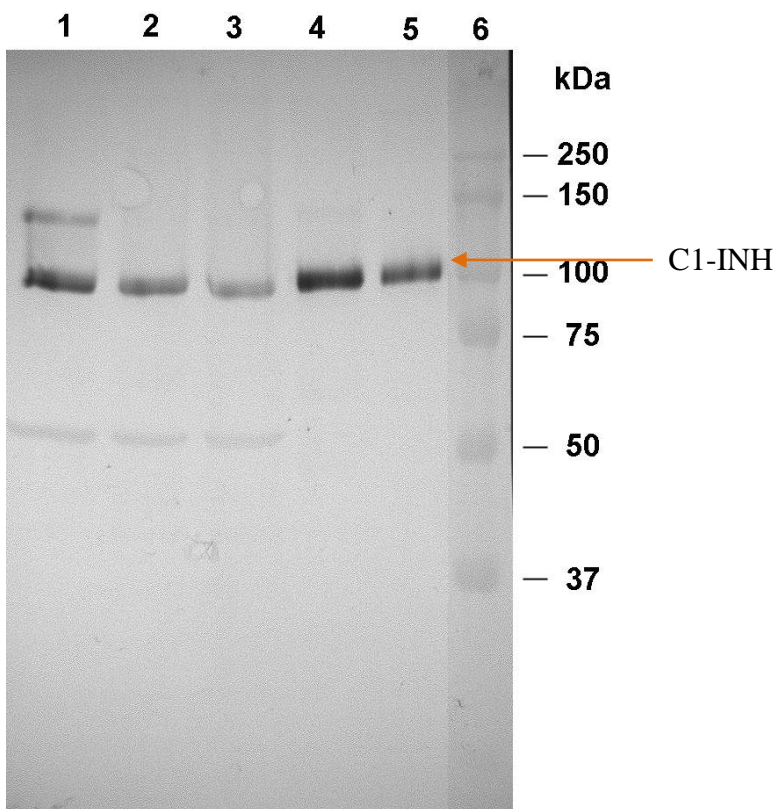
IL-6: Interleukin-6, PAI-1: Plasminogén-aktivátor inhibitor-1, ET-1: Endotelin-1, C1-INH: C1-inhibitor

Ez után Western blot technikával ellenőriztük, hogy fehérje szinten is megjelenik-e a C1-INH a HUVEC sejtekben, valamint tisztított humán plazma eredetű C1-INH standardként való használatával az aktin fehérjére (mint háztartási fehérje) korrigálva 3 független kísérletből megállapítottuk, hogy a HUVEC sejtek átlagosan 1,84 ng/100000 sejt mennyiségű C1-INH-t termelnek. Ugyanakkor érdekes, hogy a legáltalánosabb endotélsejt stimuláló faktorokkal (BK, trombin, cPT-cAMP (cAMP analóg), hisztamin) kezelve a sejteket, nem tapasztaltunk változást a sejtek által termelt C1-INH szintjében, így ezek a kísérletek továbbra is folyamatban vannak (20. ábra A).

A



B



20. ábra. C1-INH kimutatás HUVEC sejtlizátumból Western blot technikával.

(A) Különböző endotélsejt stimuláló anyagokkal kezeltünk 6 lyukú sejtenyésztő lemezen 100%-ban konfluens sejteket 1 óráig, majd lízis pufferrel leemésztettük a sejteket és 8%-os akril-amid gélben futtattuk, nitrocellulóz membránra blottoltuk. Kezelések: 1) bradikinin 2 μM , 2) bradikinin 0,2 μM , 3) hisztamin, 4) cPT-cAMP, 5) trombin, 6) kontroll. Standardnak tisztított humán plazma eredetű C1-INH-t (Berinert) használtunk kétszeres sorozat hígításban 10 ng/csíkból kiindulva (10, 9, 8, 7). A 11. oszlopban a Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard mólsúly marker látható. Az ábrán egy reprezentatív blot képet tüntettünk fel. A C1-INH fehérje 100 kDa körüli mólsúlynál fut a gélen. (B) 10%-os akrilamid gélben futtattunk HUVEC sejtlizátumokat (1-3), normál humán szérumot (400-szoros hígításban, 10 ng/csík) (4) és tisztított humán plazma eredetű C1-INH-t (Berinert) 10 ng/csík koncentrációban (5) és a kaleidoscope standardot (6).

Illetve ellenőriztük még a sejtes mintánkat egy monoklonális egérben termeltetett anti-C1-INH ellenanyaggal is, amely szintén a megfelelő helyen, 100 kDa körüli molekulásúlynál jelezte a C1-INH jelenlétét a HUVEC sejtekben. (14. ábra B)

6. MEGBESZÉLÉS

Napjainkban, ha végignézzük C1-INH-HAE-val kapcsolatos szakirodalmat, akkor azt tapasztaljuk, hogy a kutatókban nemzetközi szinten is jelentkezik igény arra, hogy a betegséget ne csak a közvetlen kiváltó tényezők szemszögéből vizsgálják. Ugyanis a már jól ismert patomechanizmus (BK hatására bekövetkező ödéma) több kérdésre sem ad választ, pl: miért tér el azonos mutációt hordozó betegek rohamgyakorisága, miért jelentkeznek bizonyos betegekben csak meghatározott helyen a rohamok, miért vannak egyes betegeknek prodromális tünetek, míg másoknak nincsenek, mik lehetnek a rohamok kiváltó okai egyes betegekben? Az itt felmerült kérdések közül van olyan, amelynek megválaszolására már készült is vizsgálat (pl: kiváltó tényezők (11)), de ezen kérdések legtöbbször még nincs válasz. Viszont új biomarkerek vizsgálata, segíthet abban, hogy újabb részleteket értsünk meg a betegség patomechanizmusával kapcsolatban (10). Ilyen, egyelőre még nem vizsgált, de a patomechanizmusban vélhetően szerepet játszó faktorok vizsgálatával kapcsolódtunk be a C1-INH-HAE vizsgálatokba.

Az endotélsejtek szerepe a betegségben megkérdőjelezhetetlen. Az endotélsejtek állapotát célzó vizsgálatok eddig azonban csak a tünetmentes állapotra korlátozódtak (66), illetve azt próbálták kideríteni, hogy van-e káros következménye a betegekre nézve a hosszútávú danazol terápiának (60, 67).

Az endotélsejt aktiváció és diszfunkció az irodalomban is két eléggé összemossott fogalom. A nagy beteglétszámú, kardiovaszkuláris betegségeket vizsgáló kutatások legtöbbször már meglévő betegségek (szívelégtelenség, ateroszklerózis) különböző fázisait próbálják egymástól elkülöníteni, és ugyanazokat a markereket, amiket mi is mértünk a betegek mintáiban az endotél diszfunkcióval kötik össze. Ellenben mi Aird levezetéséből indultunk ki (23, 24), mely szerint a külső behatásokra adekvát választ adó endotélium legfeljebb aktiváltnak tekinthető, és csak a nem megfelelő válasz jelenti a diszfunkciót. Mivel ezek az előzőekben említett vizsgálatok azt mutatták, hogy bár jelen vannak a betegekben olyan faktorok (magas BMI, eltolódott lipid profil), melyek akár az endotélsejtek károsodását és funkcióvesztését, valamint ateroszklerózis korai kifejlődését is okozhatnák, ez mégsem történik meg a betegekben, így a C1-INH-HAE esetében endotélsejt aktivációról beszélhetünk csak, és nem diszfunkcióról. Az, hogy

ennek mi az oka, még nem tisztázott, de egyelőre az alacsonyabb C1-INH aktivitás által kifejtett védő hatásnak tulajdonítják a jelenséget (30, 60, 67).

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy C1-INH-HAE rohamok alatt nem csak a VWF:Ag, vagyis a VWF mennyisége nő meg a keringésben, hanem a VWF kollagénkötő képessége (VWF:CBA) is jelentősen növekszik. A BK VWF kiürülést okozó hatását már *in vitro* kísérletben is megfigyelték (68). Így feltételezhetjük, hogy a rohamok alatt a receptoraihoz kötődő BK miatt a sejten belül kialakuló Ca^{2+} mobilizáció (19) nemcsak a sejtek összehúzódását és a permeabilitás növekedését, de a Weibel-Palade testekből történő ultra nagy VWF kiürülését is kiváltja (32, 35, 42).

A sejt felszíni E-szelektin szintjének növelését leginkább a különböző proinflammatorikus faktorok, mint $TNF\alpha$, IL-1, LPS által beindított NF κ B útvonalhoz kötik (69, 70). Ugyanakkor, bár kisebb hatékonysággal, de a C1-INH-HAE patomechanizmusában szerepet játszó faktorok, mint a BK és a TR is képesek növelni az E-szelektin expressziót (71, 72).

Ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre arról, hogy a BK milyen hatással van az ET-1 szekrécióra. Míg Mardsen és mtsai (73) azt találták, hogy a BK fokozza az ET-1 termelését, addig Momose és mtsai (74) azt állapították meg, hogy a BK a megnövelt NO termelésen keresztül visszaszorítja az ET-1 termelést. Saját vizsgálatunkban növekedett ET-1 szintet találtunk a C1-INH-HAE betegek rohamai során, sőt lehet, hogy ez az általunk mért növekedés, még jóval alá is becsüli a ténylegesen felszabaduló ET-1 mennyiségét, ugyanis az ET-1 szekréció nagy része a sejtek bazolaterális felszínén zajlik (75). A megnövekedett ET-1 mennyiség pedig egyrészt vazokonstriktorként ellentétes hatást válthat ki, mint a BK vazodilatatív hatása (39), másrészt az ET-1 endotélstabilizáló hatású is, gátolja az endotélsejtek apoptózisát (76).

Mivel a betegek hosszútávú kezelése még sok esetben rendszeres danazol szedéssel jár, és az előzőekben már említettem, hogy a danazolnak vannak az endotélsejtek működését befolyásoló mellékhatásai, így mindenképpen fontos volt vizsgálni, hogy a danazol kezelés hat-e az endotélsejtek működésére a rohamok alatt. Továbbá, a betegek jelentős része dohányzik, amiről szintén bebizonyították, hogy direkt módon képes befolyásolni az endotélsejtek működését (77), így ennek a faktornak a vizsgálatát sem hagyhattuk ki. A danazol szedő betegekben csak a VWF szintjében és kollagénkötő képességében volt megfigyelhető a rohamok alatti endotélsejt aktiváció, mely csökkent

mértékűnek tekinthető a danazolt nem szedő betegekben megfigyelhető változásokhoz képest. Ez ugyan nem jelenti azt, hogy a danazol terápia endotél diszfunkciót okozna, de azt mindenképpen meg kell jegyezni, hogy csökkenti az endotél válaszképességét, legalábbis az ödémás rohamok esetén. A dohányzás hatásáról ilyen kis létszámú alcsoport esetén pedig nem lehet helytálló következtetést levonni.

Összehasonlítva egy-egy beteg több rohamát, nagyon hasonló változásokat láttunk az endotélmarkerek változásának irányában és mértékében is. Ez nagyon jól összhangban van Aird megállapításával, miszerint az endotélium aktivációja mindig valamilyen meghatározott fenotípust jelent (23, 24), mely a C1-INH-HAE rohamok esetében úgy tűnik, hogy az egyénre jellemző. Valószínűleg ez a genetikai és környezeti hatások kombinációjából kialakuló egyénre jellemző válaszreakció összefügg a kiváltó tényezők változékonyságával (11) és a betegre jellemző tünetgyakorisággal, valamint a súlyossággal is. Ugyanakkor külön kell választani a súlyosság kérdését orvosi és biológiai szempontból. Orvosi szempontból legsúlyosabbnak a potenciálisan életet veszélyeztető gégeödéma (vagy az arcon, a gégehez helyileg közel kialakuló ödéma) tekinthető, mely a leggyorsabb orvosi/gyógyszerezési beavatkozást igénylő tünet. Ezt követik a hasi ödémák, melyek hányással, hasmenéssel járhatnak együtt, illetve az akut has tüneteit produkálva sokszor indokolatlan hasi műtéthez vezethetnek, míg a végtagon kialakuló szubkután ödémák a kevésbé súlyos tünetek közé sorolhatóak. Ugyanakkor biológiai szempontból, a gége ödéma nagyon kis területet érint, és az érpályából viszonylag kevés folyadék lép csak ki. Ezzel szemben egy combot vagy akár az egész lábat, kart érintő ödémák nagy területen, sok folyadék kilépésével járnak. Bár ezidáig sajnos nincs megfelelő módszer az érintett érszakasz, valamint az érpályából kilépő folyadékmennyiség objektív mérésére, de az belátható, hogy minél nagyobb érszakasz érintett, annál nagyobb fokú endotélaktivációval kell számolnunk. Így az is belátható, hogy a roham lokalizációja és biológiai értelemben vett súlyossága is meghatározza az egyéni válaszreakciókat, és azok mértékét az endotélmarkerek szintjén is.

Kifejezetten a vérnyomás szabályozását érintő zavart eddig nem írtak le C1-INH-HAE betegekben, leszámítva a ritka esetekben előforduló hipovolémiás sokkot, melyet a BK emelkedett mennyisége okozhat (8, 9, 12, 13). De az általunk kimutatott, a rohamok során jelenlévő endotélsejt aktiváció következtében felszabaduló, a helyi vérnyomásszabályozást befolyásoló faktorok, valamint az ödémát kiváltó, szintén

emelkedett mennyiségben jelenlévő BK indukálhatnak változásokat más vérnyomást befolyásoló faktorokban is. Ez tette indokolttá olyan molekulák vizsgálatát, melyek egyrészt képet adhatnak a C1-INH-HAE-ban esetleg fennálló vérnyomás változásokat kompenzáló mechanizmusokról, másrészt a folyadékháztartás egyensúlyának fenntartásában játszanak szerepet, vagy az ödémaképződés ellen hatnak. A lokális értágulat visszaszorítása nem csak a vérnyomásszabályozás szintjén hathat a betegek állapotára, hiszen minél kisebb a kapillárisok perfúziója, annál kevesebb folyadék léphet ki az ér pályából, és így kisebb mértékű ödéma alakulhat ki.

A régebb óta ismert összefüggéseket (korral, nemmel, BMI-vel), melyeket a legtöbb esetben mi is megtaláltunk mind a beteg, mind a kontroll csoportban; az általunk vizsgált populációk validálására használtuk (53, 55, 78-81). Bár az igaz, hogy az ADM és a CRP szintek betegekben látható pozitív korrelációjához hasonló jelenséget írtak le szepszisben és kardiovaszkuláris betegségekben (82-84). Azonban az, hogy nem találtunk a betegekben kardiovaszkuláris diszfunkcióra utaló jeleket, illetve az, hogy az AVP, az ADM és az ET-1 szintje a betegek tünetmentes mintáiban nem tért el a kontroll csoportban mért értékektől, inkább azt erősíti meg, hogy a betegek tünetmentes periódusa egyensúlyi állapotnak tekinthető, mint az endotélmarkerek esetében, ahol endotél aktivációnak tekinthető eltérés nincs, így jelentős kompenzációra nincs is szükség. Az AVP szint és a rohamgyakoriság közötti negatív összefüggés a betegekben, illetve az AVP szintek és a C1-INH aktivitás közötti összefüggések, melyek mind a betegekben, mind pedig a kontrollokban megfigyelhetők az AVP rohamok során kifejtett szabályozó szerepére utalhatnak vagy esetleg arra, hogy az AVP szint és a rohamok azonos faktorok szabályozása alatt állnak.

Mivel már az endotélmarkerek szintjét is befolyásolták a kardiovaszkuláris rizikófaktorok (mint a dohányzás), a vazoaktív peptidek esetén pedig ez a befolyás még erősebb lehet, így a vazoaktív peptidek esetében egy egyszerűsített modell szerint szétbontottuk a csoportjainkat kardiovaszkuláris rizikós és rizikó nélküli alcsoportokra. Mivel a betegek nagyobb arányban dohányoztak, és a BMI-jük átlagosan magasabb volt, mint a kontroll csoportot alkotóké, így nagyobb arányban voltak jelen a betegcsoportban KV rizikósok. Ezt a fokozott KV rizikót több kutatás is kimutatta a C1-INH-HAE betegek esetében (30, 67), de egyelőre nem mutattak ki nagyobb incidenciát kardiovaszkuláris megbetegedésekre a betegekben. Az alcsoportokra bontás után

láthattuk, hogy az AVP szintje tünetmentes időszakban összefügg a kardiovaszkuláris rizikóval, míg a C1-INH-HAE-től függetlenül tűnik. Mivel ez a faktor függ a legjobban a vérnyomástól, és a nemek között is eltérést mutat a szintje, így ez a jelenség nem meglepő (85). Az endotélsejtek által termelt vazóaktív peptidok, az ET-1 és az ADM szintjét azonban együttesen alakította a KV rizikó megléte vagy nemléte, és a C1-INH-HAE megléte. A KV rizikóval rendelkező betegekben tünetmentes időszakban mért magasabb ADM és ET-1 és az, hogy a rohamok során bennük kevésbé emelkedett a két peptid szintje arra utalhat, hogy a meglévő kardiovaszkuláris rizikó hatással van a roham során kialakuló kompenzációs mechanizmusra, és csökkenti ezek mértékét.

Az ANP-ről a vazóaktív hatásán kívül ismertek az erek permeabilitására is, ráadásul ez a hatása eltérő lehet a különböző anatómiai helyeken. A tüdőben és az agyban az ödémák ellen hat, míg máshol éppen serkenti az erekből történő folyadékkiáramlást (48-50). Mivel C1-INH-HAE esetében nem alakulnak ki ödémák sem az agyban, sem a tüdőben, így felmerült bennünk a kérdés, hogy ennek háttérében állhat-e az ANP emelkedett szintje a betegekben, mely a test többi részén viszont a BK hatásával összeadódva növeli az ödémák kialakulásának valószínűségét.

És valóban, az ANP esetében már a tünetmentes időszakban is jelentős különbség mutatkozott a betegek és a kontrollok között, azonban ellentétes irányban, mint ahogyan azt előzetesen vártuk.

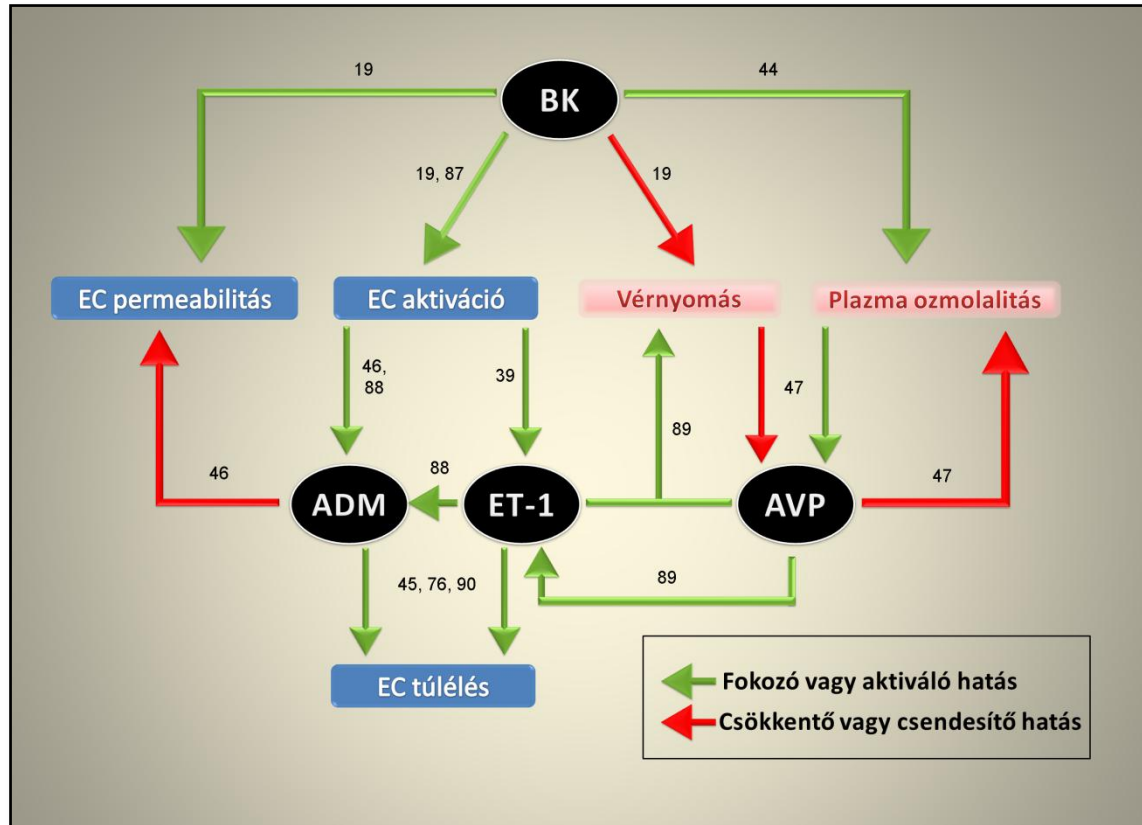
Dacára annak, hogy az ANP szintjét is befolyásolja a nem, a kor, a BMI és a kardiovaszkuláris diszfunkció (62, 86), nem volt különbség az ANP szintben a betegek esetén a KV rizikós és nem rizikós alcsoport között. Azonban a kontroll csoportban a KV rizikósokban kissé alacsonyabb értékeket mértünk, ami valószínűleg a nemi eltéréssel és a BMI különbséggel magyarázható. Mivel a betegek között nagyobb volt a magasabb BMI-vel rendelkezők és a dohányzók aránya, így elvégeztünk egy logisztikus regressziót, amelyben a BMI-re, valamint a dohányzásra adjusztáltunk. Az adjusztálás után is szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben az ANP szint, így úgy tűnik, hogy a C1-INH-HAE betegekben, valamilyen betegség-asszociált körülmény csökkenti le az ANP szintet, már a tünetmentes időszakban is.

A vazóaktív peptidok roham alatti szintjének elemzéséhez használt Linear Mixed Modell módszer előnye az előzőekben használt statisztikai módszerekhez képest az, hogy minden beteg, minden rohamából származó adatot figyelembe véve tudjuk

elemezni, hogy a vizsgált faktor miként változik a rohamok során. Ezzel a módszerrel az tapasztaltuk, hogy az ET-1, az ADM és az AVP szintje is emelkedett a rohamok során, míg az ANP szint nem változott.

Nem csak az endotélmarkerek esetén, hanem a vazoaktív faktoroknál is látható, hogy a betegek válaszreakciói különböznek egymástól, de egyéenként a betegekre egy „reagálási séma” jellemző, mely az adott egyén különböző rohamainál is hasonló változásokat okoz. Itt is, csak azt tudom elképzelni, mint az endotélmarkerek esetében, hogy ez valószínűleg a genetikai és környezeti hatások kombinációjából kialakuló, az egyénre jellemző válaszreakció. Mivel az ADM is az endotélsejtek által termelt faktor, így beleillik az Aird féle „reakció fenotípus” elméletbe. Az AVP esetén pedig nagy befolyása lehet a biológiai értelemben vett súlyosságnak, hiszen minél nagyobb terület érintett, és minél több folyadék lép ki az érpályából, annál nagyobb mértékű kompenzációt igényel a folyadékháztartás egyensúlyban tartása.

Azt, hogy ezek a változások egyfajta kompenzációs séma részei lehetnek az is alátámasztja, hogy miként korrelálnak egymással a különböző vazoaktív peptidek szintjei, illetve roham alatt a szintek változásai. Láthatjuk, hogy a betegek tünetmentes időszakában és a kontrollokban nagyon hasonlóak az összefüggések, azonban roham alatt ezek megváltoznak (9. táblázat). Az általunk mért változások, valamint az eddigi irodalmi ismeretek alapján az alábbi ábrán vázoltunk egy lehetséges modellt arra, hogy mi állhat az ET-1, az AVP és az ADM szintjének C1-INH-HAE rohamok során mért változásai mögött (22. ábra).



22. ábra. A vasoaktív peptidek hatásának összefoglalása C1-INH-HAE rohamok alatt. A C1-INH-HAE rohamok alatt megemelkedő BK szint növeli az endotélium permeabilitását (19), endotélaktivációt okoz (19, 87), csökkenti a vérnyomást (19) és növeli az ozmolalitást (44). Az endotélaktiváció következtében nő az ET-1 (39) és az ADM szintje (46, 88), míg a csökkenő vérnyomás és a növekvő plazma ozmolalitás AVP szekréciót okoz (47). Az AVP tovább növelheti az ET-1 szintjét (89), ami viszont az ADM szintézist segíti elő (88). Az ADM a megnövekedett permeabilitás ellen hat (46), míg az ET-1-el közösen növelik az endotélsejtek túlélését (gátolják az apoptózist) (45, 76, 90). Az AVP stabilizálja a folyadékháztartást a plazma ozmolalitás csökkentésével (47), és az ET-1-el közösen növeli a vérnyomást (89). Az ábrán a számok az adott hatást leíró referenciát jelölik.

A betegekben mért alacsonyabb ANP szintet két módon lehet magyarázni: csökkent szintézissel vagy megnövekedett lebontással. Mivel az ismert, hogy a betegekben a csökkent C1-INH aktivitás miatt megnövekedhet különböző szerin-proteázok aktivitása,

viszont semmilyen irodalmi adatot nem találtunk, ami arra utalna, hogy a HAE patomechanizmusa az ANP csökkent termeléséhez vezethetne, így a megnövekedett lebontás oldaláról próbáltuk megközelíteni a kérdést, figyelembe véve azt is, hogy az ANP esetében a pro-formából képződő funkcionális fehérjét egy szerin-proteáz, a korin hasítja el (51). Az általunk használt mérési módszer alapja, hogy az ANP keletkezésekor lehasadó 98 aminosavból álló fehérjeszakasz mennyiségét határozzák meg, mely peptid darab szekvencia elemzésekor kiderült, hogy hordoz potenciális szerin-proteáz hasítóhelyeket. Ezért megvizsgáltuk, hogy lehet-e a betegek plazma mintáiban olyan enzimaktivitást mérni, amely összefüggésbe hozható lehet a proANP molekula hasításával. Találtunk több olyan beteget is, akinek a mintájában tényleg hasította valami az általunk tervezett szubsztrátot, ami a legtöbb esetben C1-INH-ral csak részlegesen volt gátolható; ez arra utalhat, hogy nem csak egy enzim lehet felelős a szubsztráthatásért, és ezek némelyike nem tartozik a C1-INH célpontjai közé. Azonban nem minden beteg esetében volt meg ez a hasító képesség. Azoknak a betegeknek, akiknek egy adott mintájában volt ilyen enzimaktivitás, előfordult, hogy egy másik időpontban levett mintájában már nem volt kimutatható. Ezért egyértelműen nem tudjuk kijelenteni, hogy a betegekben a C1-INH csökkent aktivitása miatt megnövekedett szerin-proteáz aktivitás lenne felelős a csökkent ANP szintért. Ez a kérdés még további vizsgálatokat igényel, melyek nem csak a növekedett lebontást, hanem a csökkent termelődést is magukba foglalhatnák. Valamint az ANP szint nem változott a rohamok alatt, és nem volt összefüggésbe hozható a betegek rohamgyakoriságával sem, így egyelőre a szintjében bekövetkező változást nem tudtuk összekötni az ödéma kialakulásával. Ellenben azt kijelenthetjük, hogy az alacsony ANP szint egy önálló biomarkere lehet a C1-INH-HAE-nak. Addig is, míg az ANP pontos szerepe tisztázódik a betegség patomechanizmusában, érdemes fokozottabban figyelni a C1-INH-HAE betegek diabétesz szűrésére, mivel az alacsony ANP szint ismerten hajlamosít a 2-es típusú diabéteszre (63). Bár eddig nem mutatták ki, hogy C1-INH-HAE esetében nagyobb arányban lenne jelen a 2-es típusú diabétesz, mint a nem C1-INH hiányos populációban, így felmerülhet, hogy itt is jelen van valamiféle védő hatás, mint ahogy azt a kardiovaszkuláris rizikó esetében az előbbieken leírtam. Mivel a C1-INH-HAE egy ritka betegség, ezért egy-egy vizsgálat lebonyolításához nincs lehetőségünk több 100 beteg bevonásához. Ennek ellenére munkacsoportunk

mindig törekszik arra, hogy a lehető legtöbb rendelkezésre álló betegmintából végezzük a méréseket és így minél több adatból tudjunk következtetéseket levonni. Továbbá fontosnak tartjuk azt is, hogy a tünetmentes és a roham alatti vizsgálatok esetén minden esetben a betegek saját mintáit tudjuk összehasonlítani a két állapotban. Ugyanakkor azzal is tisztában vagyunk, hogy bizonyos következtetéseink (pl: nagyon kisszámú alcsoportok esetén) mindenképpen további megerősítést igényelnek. Ezen nézeteinket kifejtettük a munkacsoportunk által írt összefoglaló cikkben is, amelyben igyekeztünk ezen kritériumok fontosságára a nemzetközi C1-INH-HAE kutatóközösség figyelmét is felhívni (10).

Az, hogy az endotélsejtek képesek-e C1-INH termelésre, már többször is vizsgálták különböző rendszerekben (91-94). C1-INH-HAE-ban ez azért fontos, mivel az ödémaképződés során bebizonyítottuk, hogy endotélaktiváció történik a szervezetben, amely különböző faktorok pl: VWF, ET-1, ADM, szolúbilis E-szelektin endotélsejtekből való kiürüléséhez vezet. Így érdekes lenne vizsgálni, hogy a C1-INH-HAE rohamok során lezajló endotélaktiváció képes-e mobilizálni a sejteken belüli C1-INH-t. Ez a sejtekből felszabaduló C1-INH mennyiség pedig akár a helyi vérnyomásszabályozásban részt vevő vasoaktív peptidek szintjét is befolyásolhatja, amennyiben a pro-alakból az érett peptid kialakítását szerin-proteázok végzik. Sajnos a legtöbb esetben olyan sejttenyésztési körülmények között írták le ezt a felismerést, ami kétséges teszi, hogy pontosan mit is mértek az adott rendszerben. Valamint nincs megemlítve, hogy a kísérletekben használt ellenanyagok mutatnak-e keresztreakciót a sejttenyésztő médium komponenseként alkalmazott állati szérumokban található C1-INH-ral.

Így először is azt szeretnénk volna tisztázni, hogy valóban termelnek-e C1-INH-t az endotélsejtek laboratóriumi modelljeként használt HUVEC sejtek.

Első lépésként kimutattuk, hogy a C1-INH mRNS-e jelentős mennyiségben termelődik az endotélsejtekben. A kontroll GAPDH mRNS-éhez viszonyított 2% körüli C1-INH mRNS mennyiség jelentősnek mondható, a fehérjeszinten kimutatott, ismertén endotélsejtek által termelt plazminogén-aktivátor inhibitor-1 mRNS-e például csak néhány tized százaléknyi mennyiségben van jelen (59).

A fehérjeszintű kimutatásnál figyeltünk arra, hogy az általunk használt affinitás tisztított elleanyag ne reagáljon a sejtenyésztéshez használt médiumban jelen levő szarvasmarha szérumban előforduló C1-INH-ral.

A Western blot technikával kimért, HUVEC sejtek által termelt C1-INH mennyiség összevethetőnek tűnik a szervezetben jelenlévő, és túlnyomó részt a máj által termeltnek gondolt C1-INH mennyiséggel. Ha alapul vesszük, hogy kb. $6 \cdot 10^{13}$ endotélsejt található a testünkben (25), és 1,84 ng C1-INH-t termel 100000 endotélsejt, az azt jelenti, hogy a szervezetben található összes endotélsejt 1104 mg, vagyis 1 g körüli C1-INH-t termel. A keringésben átlagosan 200 µg/ml C1-INH található, ami szintén összesen kb. 1g C1-INH-nak felel meg. Bár sem a plazma C1-INH féléletideje, sem az endotélsejtek által termelt C1-INH szekréciós rátája nem pontosan ismert, látható, hogy az endotélsejtek által feltehetően termelt C1-INH mennyiség összevethető a szervezet össz-C1-INH mennyiségével. Persze azzal is tisztában vagyunk, hogy ez egy eltúlzott becslés, hiszen egyelőre nincs kimutatva, hogy a szervezeten belül minden endotélsejt termel C1-INH-t, és mind ilyen mennyiségben termeli, ugyanakkor arra rávilágít, hogy az endotélsejtek C1-INH termelése nagyon fontos szerepet játszhat a C1-INH-HAE patomechanizmusában. Részt vehet a rohamok spontán elmúlásában, illetve fontos terápiás célpontot kínálhat a gyógyszerfejlesztőknek. Jelenleg még csak elkezdtek az endotélsejtek C1-INH termelésének vizsgálatát, fluorescens mikroszkópiával nem is tudtuk még kimutatni a sejtekből az általunk használt ellenanyagok egyikével sem. Ennek oka lehet, hogy a sejtek fixálása során az ellenanyagok által felismert epitópok olyan módon roncsolódnak, hogy az ellenanyag már nem képes hozzájuk kötődni. További terveink között szerepel azonban, hogy vizsgáljuk, milyen faktorok hatnak a C1-INH endotélsejtekből való felszabadulására. Illetve fontos kérdés lehet még, hogy befolyásolható-e a C1-INH termelés mennyisége, vagy időben gyorsítható-e a termelés és/vagy a kiürülés. Szintén nagyon fontos vizsgálni, hogy vajon a különböző anatómiai helyzetű endotélsejtek egyforma mennyiségben termelik-e a C1-INH-t, hasonló stimulusok hatnak-e a sejtekből történő kiürülésükre. Ez az összehasonlító elemzés különösen fontos lenne agyi eredetű, illetve tüdő eredetű endotélsejtek esetén, ugyanis ezek a területek, minden jel szerint, védve vannak a C1-INH-HAE rohamok során az ödémaképződéstől.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

1) C1-INH-HAE-s betegekben az ödémás rohamok alatt emelkedett VWF:Ag, VWF:CBA, szolúbilis E-szelektin és ET-1 szintet figyeltünk meg (11.1.1). Ennek hátterében az endotélsejtek aktivációja áll, és a markerek emelkedése válaszreakció lehet az endotél-permeabilitás növelő faktorok megemelkedett szintjére. Az endotélsejtek válaszreakcióját bizonyos mértékben csökkenthetik olyan, az endotélsejtek működésére ható egyéb faktorok (dohányzás, danazol szedés), melyek szintén képesek az endotélsejtek működésének megváltoztatására. Az endotél aktiváció egyéni mintázat szerint zajlik, a betegeknek inkább jellemző, mint az egyes rohamokra. (11.1.1)

2) Rohamentes időszakban a C1-INH-HAE betegek szervezetében a kontrollokhoz képest nem emelkedett sem az ET-1, sem az ADM, sem pedig az AVP vazóaktív peptidek szintje (11.1.2). A rohamok során azonban szignifikáns emelkedés figyelhető meg. (11.1.2). A vazóaktív peptidek szintjének változása is egyénre jellemző, és a kardiovaszkuláris rizikó jelenléte pedig visszafoghatja ezeket a kompenzáló reakciókat. Az endotélmarkerek és a vazóaktív peptidek szintjének ödémás rohamok alatti emelkedése részt vehet az ödéma megszüntetésében, a normál mértékű érpermeabilitás visszaállításában, így a rohamok spontán megszűnésében (11.1.1 és 11.1.2).

3) Szemben a többi általunk vizsgált vazóaktív peptiddel, az ANP szintje tünetmentes időszakban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrolloké, és a rohamok alatt sem változott (11.1.3). Egyelőre nem tudjuk, hogy eleve alacsonyabb mennyiségben termelődik ANP a betegekben, vagy a mérés során detektált pro-ANP lebomlási sebessége nőtt meg. Egy szubsztráthasítási kísérletben találtunk olyan beteget, akiknek a szérummintájában jelen volt olyan szerin-proteáz aktivitás, ami összefüggésbe hozható az alacsony ANP szinttel, de a tényleges bizonyossághoz még további vizsgálatok szükségesek. Ugyanakkor az alacsony ANP szint egy új biomarkere lehet a C1-INH-HAE betegségnek. Illetve, mivel az alacsony ANP szint a 2-es típusú diabétesz egyik markere, így mindenképpen figyelmet kell fordítani a betegek rendszeres diabétesz szűrésére, még akkor is, ha eddig nem mutattak ki emelkedett diabétesz előfordulást C1-INH-HAE betegekben. Ez utóbbi adat felveti a lehetőségét annak, hogy a csökkent C1-INH aktivitás (illetve várhatóan annak következményei)

nem csak a kardiovaszkuláris betegségek ellen, hanem anyagcsere-betegségek (2-es típusú diabétesz, inzulin rezisztencia) ellen is védelmet nyújt (11.1.3).

4) Sikerült átfogó módon kimutatnunk, hogy a HUVEC sejtek képesek C1-INH-t termelni. A fehérjetermelést Western blot technikával bizonyítottuk, valamint mRNS szinten is kimutattuk a C1-INH termelést. A Western blottal készült mérések alapján úgy tűnik, hogy az endotélsejtek által termelt C1-INH mennyisége hasonló nagyságrendű lehet a máj által termelt C1-INH mennyiséghez. Mivel ez csak egy durva becslés, ezért mindenképpen felveti a további vizsgálatok létjogosultságát, melyek tisztáznák a C1-INH kibocsátás körülményeit, illetve azt, hogy a szervezeten belül pontosan hol és mennyi C1-INH-t termelnek az endotélsejtek (különös tekintettel a tüdő- és az agyi erekre). A C1-INH-HAE-ben profilaktikusan alkalmazott danazol kezelés, amelynek számos mellékhatása ismert, fokozza a máj C1-INH termelését. Eredményeink felvetik, hogy esetleg az endotélsejtek C1-INH termelését is lehetne gyógyszeresen stimulálni, és ez esetleg jóval kevesebb mellékhatással járhatna, mint a jelenleg alkalmazott terápiás protokoll.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A C1-INH hiány okozta hereditár angioödémában (C1-INH-HAE) az időközönként fellépő ödémás rohamok hátterében a C1-INH hiányában kontrollálatlanul aktiválódó plazma-enzimrendszerek által felszabadított bradikinin (BK) áll. A BK az endotélsejteken található B2R receptorához kötődik és a sejtek összehúzóását okozza, ezáltal fokozva az erek permeabilitását. Az érpermeabilitás növekedése miatt kialakuló ödémák kapcsán akár hirtelen vérnyomásesés is bekövetkezhet (hipovolémiás sokk). Minthogy eddig az irodalomban nem foglalkoztak a vazoreguláció kérdésével C1-INH-HAE-ban, sem az endotélsejt működés megváltozásával a rohamok alatt, ezért célul tűztük ki ezen paraméterek részletes vizsgálatát.

Munkánk során sikerült kimutatni, hogy a C1-INH-HAE betegek rohamai alatt a 4 általunk mért endotélmarker szintjének megemelkedése endotélaktivációra utal. Az általunk vizsgált vérnyomásra ható vazoaktív peptidek közül az ADM, AVP és az ET-1 szintje tünetmentes időszakban nem tért el a betegekben és a kontrollokban, de a rohamok alatt szignifikánsan megemelkedett. Bár a betegekben nem volt jelen mérhető kardiovaszkuláris diszfunkció, voltak olyanok betegek, akik kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal rendelkeztek. Kimutatható volt, hogy ezek a rizikófaktorok befolyásolják mind az endotélsejtek reakcióképességét, mind pedig a vazoaktív peptidek szintjén bekövetkező kompenzáló mechanizmusokat. A vazoaktív peptidek szintjében bekövetkező változások a rohamok során erősen korreláltak, így feltételezhetjük, hogy ezek a változások összefüggenek, és egy kompenzációs mechanizmus részei lehetnek, mely az ödéma megszüntetésére és a homeosztázis helyreállítására irányul. A betegekre már a tünetmentes időszakban jellemző alacsony ANP szint független biomarkere a C1-INH-HAE-nak és jelezheti a betegek 2-es típusú diabéteszre való hajlamát. Végül sikerült kimutatnunk HUVEC sejtekben mRNS és fehérje szinten is a C1-INH-t, olyan affinitás tisztított ellenanyagokkal is, melyek csak a humán C1-INH-t ismerik fel. Vizsgálatunkból kiderült, hogy a sejtek termelnek C1-INH-t de a sejtekből történő kiürülést előidéző faktorok feltérképezése még további kísérleteket igényel.

A roham alatt bekövetkező endotélsejt aktiváció és vazoaktív peptid szintek változása, valamint az endotélsejtek C1-INH termelése együttesen megerősítik az endotélium és a vazoreguláció kiemelt szerepét a C1-INH-HAE betegségben.

9. SUMMARY

Increased bradykinin (BK) generation from the uncontrolled plasma-enzyme cascades is in the background of the edematous attacks in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency (C1-INH-HAE). BK causes increased vascular permeability acting on B2R receptors on the endothelial cells. Hypovolemic shock is a rare, but serious consequence of the decreased blood pressure due to increased vascular permeability and edema. Both endothelial function and vasoregulation were barely studied in C1-INH-HAE, hence we aimed to investigate endothelial functions during attacks and vasoregulation in inter attack periods and also during attacks in C1-INH-HAE.

We found increased levels of the endothelial markers (E-selectin, ET-1, vWF), which confirms endothelial activation during edematous attacks. The level of vasoactive peptides ADM, AVP and ET-1 was similar in controls and the patients in inter attack periods but significantly increased during attacks. Some of the patients have cardiovascular risk factors (but not cardiovascular dysfunction) and we found that the presence of cardiovascular risk affects both endothelial function and vasoactive compensatory mechanisms. We found tight correlation between the change of the levels of vasoactive peptides during attacks. This suggests, that vasoactive peptides are involved in a compensatory mechanism to counterbalance the effect of BK, moreover, they can even facilitate the termination of attacks. The decreased level of ANP even in inter attack periods is an independent marker of C1-INH-HAE and it proposes regular medical check-up for type 2 diabetes. We also demonstrated C1-INH mRNA and protein expression in HUVEC cells, and found that C1-INH is localized in the perinuclear zone of the cells. We used affinity purified antibody against C1-INH to avoid cross-reactivity with bovine C1-INH. To identify the triggers of the C1-INH release from HUVEC cells, require further investigation.

Taken together, endothelial activation and elevated vasoactive peptide levels during attacks, as well as endothelial production of C1-INH underline that endothelium and vasoregulation play an important role in C1-INH-HAE.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Germenis AE, Speletas M. (2016) Genetics of Hereditary Angioedema Revisited. *Clin Rev Allergy Immunol*.
2. Nzeako UC, Frigas E, Tremaine WJ. (2001) Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. *Arch Intern Med*. 161 20:2417-29.
3. Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, et al. (2004) Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol*. 114 3 Suppl:S51-131.
4. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, et al. (2010) 2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 6 1:24.
5. Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J. (2006) Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med*. 119 3:267-74.
6. Agostoni A, Cicardi M. (1992) Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)*. 71 4:206-15.
7. Farkas H. (2010) Management of upper airway edema caused by hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 6 1:19.
8. Cohen N, Sharon A, Golik A, Zaidenstein R, Modai D. (1993) Hereditary angioneurotic edema with severe hypovolemic shock. *J Clin Gastroenterol*. 16 3:237-9.
9. Nielsen EW. (2005) Hypotensive shock and angio-oedema from angiotensin II receptor blocker: a class effect in spite of tripled tryptase values. *J Intern Med*. 258 4:385-7.
10. Farkas H, Veszeli N, Kajdacs E, Cervenak L, Varga L. (2016) "Nuts and Bolts" of Laboratory Evaluation of Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol*.
11. Zotter Z, Csuka D, Szabo E, Czaller I, Nebenfuhrer Z, Temesszentandras G, et al. (2014) The influence of trigger factors on hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet journal of rare diseases*. 9:44.
12. Bjorkqvist J, Lecher B, Maas C, Renne T. (2013) Zinc-dependent contact system activation induces vascular leakage and hypotension in rodents. *Biol Chem*. 394 9:1195-204.

13. Fryer RM, Segreti J, Banfor PN, Widomski DL, Backes BJ, Lin CW, et al. (2008) Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema. *Br J Pharmacol.* 153 5:947-55.
14. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 276 36:33293-6.
15. Zeerleder S. (2011) C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin Thromb Hemost.* 37 4:362-74.
16. Davis AE, 3rd, Cai S, Liu D. (2007) C1 inhibitor: biologic activities that are independent of protease inhibition. *Immunobiology.* 212 4-5:313-23.
17. Bock SC, Skriver K, Nielsen E, Thogersen HC, Wiman B, Donaldson VH, et al. (1986) Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry.* 25 15:4292-301.
18. Bossi F, Fischetti F, Regoli D, Durigutto P, Frossi B, Gobeil F, Jr., et al. (2009) Novel pathogenic mechanism and therapeutic approaches to angioedema associated with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 124 6:1303-10 e4.
19. Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, et al. (2011) New topics in bradykinin research. *Allergy.* 66 11:1397-406.
20. Caballero T, Baeza ML, Cabanas R, Campos A, Cimbollek S, Gomez-Traseira C, et al. (2011) Consensus Statement on the Diagnosis, Management, and Treatment of Angioedema Mediated by Bradykinin. Part I. Classification, Epidemiology, Pathophysiology, Genetics, Clinical Symptoms, and Diagnosis. *J Invest Allerg Clin.* 21 5:333-47.
21. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. (2000) C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacological reviews.* 52 1:91-112.
22. Prada AE, Zahedi K, Davis AE, 3rd. (1998) Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology.* 199 2:377-88.
23. Aird WC. (2004) Endothelium as an organ system. *Crit Care Med.* 32 5 Suppl:S271-9.

24. Aird WC. (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 100 2:158-73.
25. Aird WC. (2005) Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost.* 3 7:1392-406.
26. Cervenak L. (2007) Az endothelsejtek immunológiai funkciója. *Magyar Immunológia.* 6 5:7-15.
27. Mehta D, Malik AB. (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 86 1:279-367.
28. Zuraw B, Christiansen S. Angioedema Asymmetric, non-dependent, non-pruritic, swelling involving cutaneous or mucosal surfaces *Middleton's Allergy Principle and Practice* 8th edition. Elsevier Saunders, 2014.
29. Frolow M, Drozd A, Kowalewska A, Nizankowski R, Chlopicki S. (2015) Comprehensive assessment of vascular health in patients; towards endothelium-guided therapy. *Pharmacol Rep.* 67 4:786-92.
30. Demirturk M, Polat N, Guz G, Gurdal A, Altun I, Gelincik A, et al. (2012) There is an increased risk of atherosclerosis in hereditary angioedema. *Int Immunopharmacol.* 12 1:212-6.
31. Lip GY, Blann A. (1997) von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res.* 34 2:255-65.
32. Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ. (2012) von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol.* 128 3:158-69.
33. Fischer BE, Thomas KB, Dorner F. (1998) Collagen covalently immobilized onto plastic surfaces simplifies measurement of von Willebrand factor-collagen binding activity. *Ann Hematol.* 76 3-4:159-66.
34. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 34 12:1508-12.
35. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. (2011) Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 117 19:5033-43.
36. Popov J, Zhukov O, Ruden S, Zeschmann T, Sferruzza A, Sahud M. (2006) Performance and clinical utility of a commercial von Willebrand factor collagen binding assay for laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Clin Chem.* 52 10:1965-7.

37. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9 10:866-73.
38. Roldan V, Marin F, Lip GY, Blann AD. (2003) Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Haemost.* 90 6:1007-20.
39. Davenport AP, Maguire JJ. (2006) Endothelin. *Handb Exp Pharmacol.* 176 Pt 1:295-329.
40. Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. (2010) Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med.* 4 3:351-60.
41. Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon RO, 3rd, Panza JA. (1999) Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension.* 33 2:753-8.
42. Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE, Hamm HE. (2006) Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood.* 107 7:2736-44.
43. Knipe L, Meli A, Hewlett L, Bierings R, Dempster J, Skehel P, et al. (2010) A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells. *Blood.* 116 12:2183-91.
44. Lortie M, Regoli D, Rhaleb NE, Plante GE. (1992) The role of B1- and B2-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am J Physiol.* 262 1 Pt 2:R72-6.
45. Kato H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. (1997) Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology.* 138 6:2615-20.
46. Kuwasako K, Kida O, Kitamura K, Kato J, Eto T. (1997) Plasma adrenomedullin in cerebrovascular disease: a possible indicator of endothelial injury. *Int Angiol.* 16 4:272-9.
47. Caldwell HK, Young WSI, . *Oxytocin and Vasopressin: Genetics and Behavioral Implications.* Springer, Berlin, 2006.
48. Rosenberg GA, Estrada EY. (1995) Atrial natriuretic peptide blocks hemorrhagic brain edema after 4-hour delay in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 26 5:874-7.

49. Sabrane K, Kruse MN, Fabritz L, Zetsche B, Mitko D, Skryabin BV, et al. (2005) Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation*. 115 6:1666-74.
50. Tian X, Tian Y, Gawlak G, Sarich N, Wu T, Birukova AA. (2014) Control of vascular permeability by atrial natriuretic peptide via a GEF-H1-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 289 8:5168-83.
51. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 15:8525-9.
52. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, Bergmann A. (2004) Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem*. 50 1:234-6.
53. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. (2006) Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem*. 52 1:112-9.
54. Christensen JH, Siggaard C, Corydon TJ, deSanctis L, Kovacs L, Robertson GL, et al. (2004) Six novel mutations in the arginine vasopressin gene in 15 kindreds with autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus give further insight into the pathogenesis. *Eur J Hum Genet*. 12 1:44-51.
55. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. (2005) Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem*. 51 10:1823-9.
56. Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. (2006) Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin Chem*. 52 6:1144-51.
57. Kohler PF, Muller-Eberhard HJ. (1967) Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of healthy adults. *J Immunol*. 99 6:1211-6.
58. Cervenak L. (2007) Az endothelsejtek immunológiai funkciója *Magyar Immunológia*. 6 5:7-15.
59. Megyeri M, Mako V, Beinrohr L, Doleschall Z, Prohaszka Z, Cervenak L, et al. (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4

activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol.* 183 5:3409-16.

60. Szeplaki G, Varga L, Valentin S, Kleiber M, Karadi I, Romics L, et al. (2005) Adverse effects of danazol prophylaxis on the lipid profiles of patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 115 4:864-9.

61. Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, Orford JL, Ganz P, Selwyn AP. (2000) Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. *Annu Rev Med.* 51:149-67.

62. Gruden G, Landi A, Bruno G. (2014) Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research. *Diabetes care.* 37 11:2899-908.

63. Magnusson M, Jujic A, Hedblad B, Engstrom G, Persson M, Struck J, et al. (2012) Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 97 2:638-45.

64. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. (2016) Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 44 D1:D343-50.

65. Presanis JS, Hajela K, Ambrus G, Gal P, Sim RB. (2004) Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol.* 40 13:921-9.

66. Czucz J, Schaffer G, Csuka D, Walentin S, Kunde J, Prohaszka Z, et al. (2012) Endothelial cell function in patients with hereditary angioedema: elevated soluble E-selectin level during inter-attack periods. *Journal of clinical immunology.* 32 1:61-9.

67. Szegedi R, Szeplaki G, Varga L, Prohaszka Z, Szeplaki Z, Karadi I, et al. (2008) Long-term danazol prophylaxis does not lead to increased carotid intima-media thickness in hereditary angioedema patients. *Atherosclerosis.* 198 1:184-91.

68. Booth F, Allington MJ, Cederholm-Williams SA. (1987) An in vitro model for the study of acute release of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Br J Haematol.* 67 1:71-8.

69. Czucz J, Cervenak L, Forhecz Z, Gombos T, Pozsonyi Z, Kunde J, et al. (2011) Serum soluble E-selectin and NT-proBNP levels additively predict mortality in diabetic patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 100 7:587-94.

70. Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, Sachais BS. (2005) Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. *Blood*. 105 9:3545-51.
71. Dias JP, Couture R. (2012) Suppression of vascular inflammation by kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol*. 60 1:61-9.
72. Uzonyi B, Lotzer K, Jahn S, Kramer C, Hildner M, Bretschneider E, et al. (2006) Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly correlated early genes in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103 16:6326-31.
73. Marsden PA, Dorfman DM, Collins T, Brenner BM, Orkin SH, Ballermann BJ. (1991) Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. *Am J Physiol*. 261 1 Pt 2:F117-25.
74. Momose N, Fukuo K, Morimoto S, Ogihara T. (1993) Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin. *Hypertension*. 21 6 Pt 2:921-4.
75. Fan J, Unoki H, Iwasa S, Watanabe T. (2000) Role of endothelin-1 in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 902:84-93; discussion -4.
76. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. (2005) Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol*. 145 3:323-33.
77. Ross R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340 2:115-26.
78. Kato J, Kitamura K, Uemura T, Kuwasako K, Kita T, Kangawa K, et al. (2002) Plasma levels of adrenomedullin and atrial and brain natriuretic peptides in the general population: their relations to age and pulse pressure. *Hypertens Res*. 25 6:887-92.
79. Nomura I, Kato J, Tokashiki M, Kitamura K. (2009) Increased plasma levels of the mature and intermediate forms of adrenomedullin in obesity. *Regul Pept*. 158 1-3:127-31.

80. Vila G, Riedl M, Maier C, Struck J, Morgenthaler NG, Handisurya A, et al. (2009) Plasma MR-proADM correlates to BMI and decreases in relation to leptin after gastric bypass surgery. *Obesity (Silver Spring)*. 17 6:1184-8.
81. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Leip EP, Benjamin EJ, Wilson PW, et al. (2002) Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am J Cardiol*. 90 3:254-8.
82. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Muller B. (2005) Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care*. 9 6:R816-24.
83. Nishida H, Horio T, Suzuki Y, Iwashima Y, Kamide K, Kangawa K, et al. (2008) Plasma adrenomedullin as an independent predictor of future cardiovascular events in high-risk patients: comparison with C-reactive protein and adiponectin. *Peptides*. 29 4:599-605.
84. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Muller B. (2007) Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium*. 14 6:345-51.
85. Bolignano D, Cabassi A, Fiaccadori E, Ghigo E, Pasquali R, Peracino A, et al. (2014) Copeptin (CTproAVP), a new tool for understanding the role of vasopressin in pathophysiology. *Clin Chem Lab Med*. 52 10:1447-56.
86. Then C, Kowall B, Lechner A, Meisinger C, Heier M, Koenig W, et al. (2013) Plasma MR-proANP levels are associated with carotid intima-media thickness in the general community: the KORA F4 study. *Atherosclerosis*. 230 2:235-41.
87. Kajdacs E, Jani PK, Csuka D, Varga LA, Prohaszka Z, Farkas H, et al. (2014) Endothelial cell activation during edematous attacks of hereditary angioedema types I and II. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 133 6:1686-91.
88. Eto T, Kato J, Kitamura K. (2003) Regulation of production and secretion of adrenomedullin in the cardiovascular system. *Regul Pept*. 112 1-3:61-9.
89. Balakrishnan SM, Gopalakrishnan V, McNeill JR. (1997) Endothelin contributes to the hemodynamic effects of vasopressin in spontaneous hypertension. *Eur J Pharmacol*. 334 1:55-60.

90. Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y. (1997) Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension*. 30 5:1198-203.
91. Gulati P, Lemercier C, Guc D, Lappin D, Whaley K. (1993) Regulation of the synthesis of C1 subcomponents and C1-inhibitor. *Behring Inst Mitt*. 93:196-203.
92. Lappin D, Whaley K. (1989) Regulation of C1-inhibitor synthesis by interferons and other agents. *Behring Inst Mitt*. 84:180-92.
93. Schmaier AH, Murray SC, Heda GD, Farber A, Kuo A, McCrae K, et al. (1989) Synthesis and expression of C1 inhibitor by human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*. 264 30:18173-9.
94. Vastag M, Skopal J, Kramer J, Kolev K, Voko Z, Csonka E, et al. (1998) Endothelial cells cultured from human brain microvessels produce complement proteins factor H, factor B, C1 inhibitor, and C4. *Immunobiology*. 199 1:5-13.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1) Kajdacs E, Jani PK, Csuka D, Varga LA, Prohaszka Z, Farkas H, et al. Endothelial cell activation during edematous attacks of hereditary angioedema types I and II. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(6):1686-91.

IF: 11,476 (2014)

2) Kajdacs E, Jani PK, Csuka D, Varga L, Prohaszka Z, Farkas H, et al. Novel Vasoregulatory Aspects of Hereditary Angioedema: the Role of Arginine Vasopressin, Adrenomedullin and Endothelin-1. *J Clin Immunol.* 2016;36(2):160-70.

IF: 3,184* (2014)

3) Kajdacs E, Varga L, Prohaszka Z, Farkas H, Cervenak L. Atrial natriuretic peptide as a novel biomarker of hereditary angioedema. *Clin Immunol.* 2016;165:45-6. **

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **18,332.**

**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el.*

***A folyóirat IF értéke 2014-ben 3,672, mely a közlemény besorolása miatt nem került feltüntetésre*

11.2 A disszertációtól független publikációk

1) Sipiczki M, Kajdacs E. *Jaminaea angkorensis* gen. nov., sp. nov., a novel anamorphic fungus containing an S943 nuclear small-subunit rRNA group IB intron represents a basal branch of Microstromatales. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59(Pt 4):914-20.

IF: 2,113 (2009)

2) Cervenak L, Kajdacs E, Farkas H. Reply: To PMID 24522092. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(1):241-2

3) Jani PK, Kajdacs E, Megyeri M, Dobo J, Doleschall Z, Futosi K, et al. MASP-1 induces a unique cytokine pattern in endothelial cells: a novel link between complement system and neutrophil granulocytes. *PLoS One.* 2014;9(1):e87104.

IF: 3,234 (2014)

4) Megyeri M, Jani PK, Kajdacs E, Dobo J, Schwaner E, Major B, Rigo J Jr, Zavodszky P, Thiel S, Cervenak L, Gal P. Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells. MOLECULAR IMMUNOLOGY 59:(1) pp. 39-45. (2014)

IF: 2,973(2014)

5) Farkas H, Veszeli N, Kajdacs E, Cervenak L, Varga L. "Nuts and Bolts" of Laboratory Evaluation of Angioedema. Clin Rev Allergy Immunol. 2016.

IF: 5,463*(2014)

6) Jani PK, Schwaner E, Kajdacs E, Debreczeni ML, Ungai-Salánki R, Dobó J, Doleschall Z, Rigó J Jr, Geiszt M, Szabó B, Gál P, Cervenak L. Complement MASP-1 enhances adhesion between endothelial cells and neutrophils by up-regulating Eselectin expression. Mol Immunol. 2016

IF: 2,973*(2014)

A disszertáció témájától független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **16,756.**

**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el.*

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném megköszöni főnökömnek és konzulensemnek Dr. Cervenak Lászlónak, hogy részt vehettem és a mai napig részt vehetek az endotélmunkacsoport mindennapjaiban illetve a sok segítséget, amit a dolgozatom elkészítéséhez nyújtott.

Szintén köszönettel tartozom a Kutatólabor vezetőjének, Prof. Dr. Prohászka Zoltánnak, hogy rám esett a választásuk, amikor az éppen futó pályázatukhoz kerestek munkatársat. Hálás vagyok továbbá Dr. Farkas Henriette professzorasszonynak az Országos Angioödéma Központ vezetőjének, amiért részt vehettem illetve részt vehetek a rendkívül izgalmas C1-INH-HAE-val kapcsolatos vizsgálatokban, illetve Dr. Varga Liliannak, a Füst György Komplement Diagnosztikai Laboratórium vezetőjének a munkám során nyújtott segítségével.

Köszönöm továbbá kollaborációs partnereinknek (Dr. Dobó Józsefnek, Dr. Gál Péternek, Doleschall Zoltánnak és az Immunogenes Kft.-nek), hogy munkájukkal hozzájárultak vizsgálataink sikeréhez.

Köszönettel tartozom még az endotélmunkacsoport jelenlegi és volt tagjainak: Debreczeni Márta Lídiának, Schwaner Endrének és Dr. Jani Péter Károlynak amiért egy igazi jó csapatként tudunk/tudtunk együtt dolgozni.

Illetve a Kutatólabor összes jelenlegi és volt munkatársának (Dr. Szilágyi Ágnesnek, Dr. Csuka Dorottyának, Dr. Gombos Tímeának, Szarvas Nórának, Veszeli Nórának, Dr. Kőhalmi Kinga Viktóriának, Takács Beának, Szabó Edinának, Mező Blankának, Dr. Mikes Bálintnak, Dr. Sinkovits Györgynek, Dóczy Andrásné Mártinak, Szendrei Zsuzsannának, Szigeti Antalné Ilikének, Kertész Lászlóné Erának, Holeczky Rudolfné Magdinak) szeretném megköszönni a jó hangulatot és azt, hogy bármilyen problémával fordultam is hozzájuk mindig kaptam segítséget.

És végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek, hogy mindig támogatták a továbbtanulással kapcsolatos döntéseimet és lehetővé tették számomra az egyetem elvégzését és Szomorjai Péternek a türelmet, amivel a dolgozat elkészültét végigasszisztálta mellettem.