

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Katedra buněčné biologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Klinický význam antiendoteliálních protilátek

Iva Kašánková

Školitelka: MUDr. Helena Marečková, CSc.

ÚIM 1.LF UK Praha

2007/2008

Čestné prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala s použitím uvedené odborné literatury a že jsem respektovala autorská práva.

Srpen 2008

.....
Iva Kašánková

Poděkování

Děkuji MUDr. Heleně Marečkové CSc. za odborné rady a pomoc při vypracování bakalářské práce.

Obsah

1.	Abstrakt	5
2.	Abstract	6
3.	Seznam zkratek	7
4.	Úvod - Charakteristika protilátek	8
5.	Antigeny	11
6.	Stanovení protilátek	13
7.	Hypotézy o úloze AECA v patogenezi některých chorob	16
8.	Klinický význam stanovení AECA protilátek	21
9.	Závěr	26
10.	Seznam literatury	27

1. Abstrakt

Po svém objevení se antiendoteliální protilátky začaly studovat u řady autoimunitních i neautoimunitních nemocí, onemocnění cévních i jiných. Průkazy jejich významu v patogenezi naznačovaly možný diagnostický přínos pro řadu onemocnění. Nejvyšší množství protilátek je detekováno v aktivním stadiu nemoci, v období, kdy je pacient stabilizován a je tedy v remisi, dochází k významnému poklesu protilátek. Nežádoucí účinky protilátek byly odhaleny i u transplantací orgánů, kde přispívají k rejekcím transplantovaných štěpů. Bylo prokázáno, že antiendoteliální protilátky mají destruktivní účinek na cévní stěny a indukují apoptózu buněk a leze v tkáních. Prozatím nebyla objasněna patogenita u všech onemocnění, především však u onemocnění neautoimunitního typu, kde byla přítomnost AECA nalezena. Tento problém je způsoben expresí různých antigenů na endoteliálních buňkách, na které se AECA vážou a které nejsou zcela všechny definovány, tedy jejich heterogeností. Ze stejných důvodů je využití stanovení AECA v laboratorní imunologii diagnostické pouze u jednoho typu vaskulitidy (Kawasakiho syndrom). AECA nepatří mezi diagnostická kritéria ani u těch patologických stavů, kde již byl jejich význam v patogenezi prokázán.

Klíčová slova: antiendoteliální protilátky, endoteliální buňky, antigeny, autoimunitní choroby, onemocnění neautoimunitního původu, transplantace.

2. Abstract

Lot of studies in autoimmune, non autoimmune diseases, vasculitis and others were done after antiendothelial cells discovery. Documentation of their importance in pathogenesis signalized the possibility of diagnostic relevance for great amount of diseases. The highest amount of antibodies was detected in acute state of diseases, significant decreasing was found in remissions. Unwelcome action of antibodies was uncovered in transplantation, where they contribute to rejection. Antiendothelial cells can impair vessels and induce cell apoptosis and tissue damage. Pathogenity of all diseases, special non autoimmune, in which antibodies were found out, have not been explained. It could be caused by wide spectrum of antigen expression on endothelial cells and by the heterogeneity of AECA. This is the same reason that only one type of vasculitis – Kawasaki syndrome includes AECA as diagnostic criteria. Even in diseases, in which antibodies were uncovered as pathogenic, AECA were not diagnostic.

Keyword: antiendothelial antibodies, endothelial cell, antigen, autoimmune disease, disorder of non autoimmune origin, transplantation.

3. Seznam zkratek

AAECA	protilátky proti endoteliálním buňkám aorty
ADCC	buněčná cytotoxická reakce závislá na protilátkách
AECA	antiendoteliální protilátky
BAL	bronchoalveolární laváž
CDC	cytotoxická reakce způsobená komplementem
CSK-AECA	cytoskeletární antiendoteliální protilátky
EBV	virus Epsteina-Barrové
EC	endoteliální buňky
HCV	hepatitis C virus
HDEC	lidské dermální endoteliální buňky
HGEC	lidské glomerulární endoteliální buňky
HKMEC	lidské mikrovaskulární endoteliální buňky ledvin
Hsp60	protein teplotního šoku
HUVEC	lidské endoteliální buňky pupeční žíly
ICAM-1	mezibuněčná adhezivní molekula
MCP-1	monocytární chemotaktický protein
MICA	neklasická MHC molekula
SLE	systemový lupus erythematoses
VAP-1	vaskulární adhezivní protein
VCAM-1	cévní adhezní molekula

4. Úvod - Charakteristika protilátek

Antiendoteliální buňky byly poprvé popsány v roce 1970 metodou nepřímé imunofluorescence jako humánní protilátky vážící se na endoteliální protilátky ledvin potkana a prokázány se v izotypech IgG, IgM a IgA. Tyto protilátky se vážou na antigeny endoteliálních buněk přes F(ab)₂ fragmenty. Vazba protilátek na různé typy endoteliálních buněk koreluje dle literárních údajů s původem nemoci. Protilátky AECA můžeme klasifikovat podle toho, zda jsou namířené na mikrovaskulární nebo makrovaskulární endoteliální buňky. Mikrovaskulární protilátky se vážou například na endoteliální buňky ledvin, kůže, mozku, ale byly prokázány i u Behcetovy choroby, trombotické trombocytopenické purpury a překvapivě i u roztroušené sklerózy, onemocnění CNS, u kterého se nepředpokládá cévní postižení. **Makrovaskulární protilátky** interagují s aortou, pupečnickovou žilou a byly prokázány u pacientů s Takayasuovou arteritidou a Kawasakiho nemocí. U řady nemocí nejsou protilátky AECA klasifikované, např. zánětlivá střevní onemocnění, diabetes mellitus, Wegenerova granulomatosy, sklerodermie a další. Protilátky AECA nejsou druhově specifické, proto mohou reagovat s endoteliálními buňkami myši, skotu (Praprotník et al., 2001).

Patogenní role protilátek spočívá v mnoha různých mechanismech. Protilátky izotypu IgM a IgG mohou aktivovat komplement (CDC) u Kawasakiho choroby a u SLE. Protilátky AECA spouští cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC) u Wegenerovy granulomatosy. Tato reakce závisí na interakci NK-buněk a buněk, které jsou opsonizovány protilátkami. Dochází k vazbě Fc-receptoru (CD16) NK-buněk s Fc fragmenty protilátek. Po indukci signálů dochází k cytotoxické degranulaci (Belizna, et al., 2006).

Protilátky AECA mohou také aktivovat endoteliální buňky a indukují expresi adhezivních molekul, E-selektinu, ICAM-1 a VCAM-1, která zvyšuje leukocytární adhezi k endoteliálním buňkám, čímž napomáhá migraci leukocytů přes endotel do místa zánětu. Stimulují endoteliální buňky k sekreci prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6 a TNF- α) a chemokinů (IL-8 a MCP-1) (Praprotník et al., 2001)

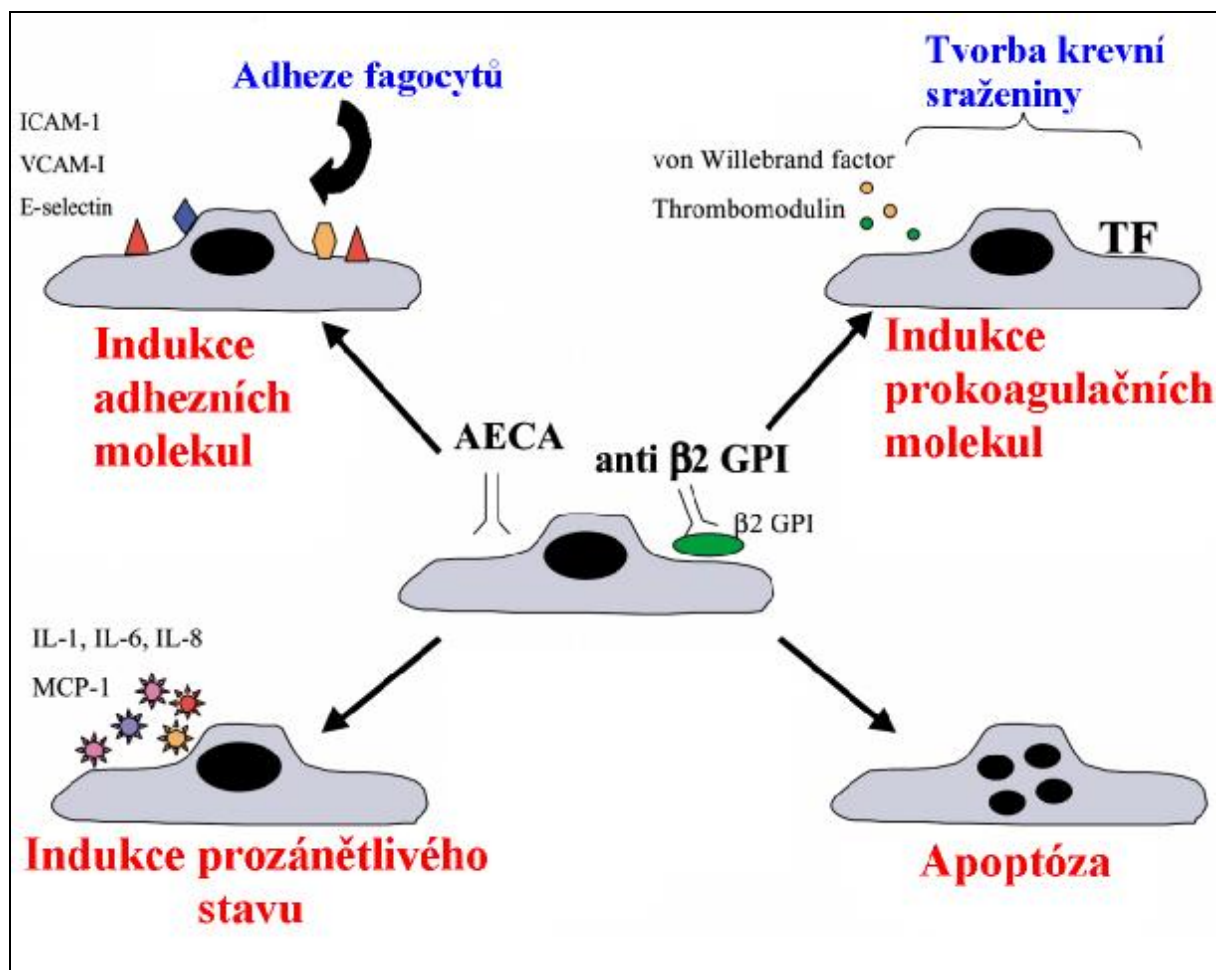
Signální cestu exprese adhezivních molekul indukují protilátky AECA přes MAP kinázovou kaskádu, která zahrnuje extracelulární kinázy JNK (c-Jun NH₂ terminální kináza, p38 (Holman et al., 2007). Další cesta může být zahájena aktivací transkripčního faktoru NF- κ B. V cytoplazmě se fosforyluje inhibitor transkripčního faktoru a degraduje se v proteazomu. Aktivovaný transkripční faktor NF- κ B se translokuje z cytoplazmy do jádra,

kde reguluje transkripci genů. Tato NF- κ B signální cesta indukuje prozánětlivou odpověď (Belizna, et al., 2006).

Protilátky AECA mají také schopnost indukovat syntézu tkáňových faktorů, které iniciují koagulaci.

V neposlední řadě mohou AECA indukovat apoptózu buněk např. u systémové sklerodermie, kde je apoptóza zprostředkovaná interakcí Fas receptoru a Fas ligandu. Ovlivnění apoptózy AECA hraje roli i u antifosfolipidového syndromu a u SLE (viz.dále)

V séru zdravých osob se vyskytují přirozené antiendoteliální protilátky. Tyto protilátky mají regulační a protektivní funkce. Přirozené protilátky rozpoznávají omezené množství endoteliálních antigenů. Mechanismy v protizánětlivé funkci přirozených protilátek spočívají v inhibici prozánětlivých molekul. Přirozené protilátky blokují tvorbu krevních sraženin (Ronda et al., 1999).



(přeloženo a upraveno podle Renaudineau et al., 2002)

Obrázek č. 1

Antiendoteliální protilátky se vážou na antigeny endoteliální buňky a působí na ně různými mechanismy. Mohou indukovat expresi adhezních molekul, které potřebují fagocytární buňky k adhezi a následné migraci skrz endoteliální buňky cév do tkání. Ve směru sekrece chemotaktických látek, IL-8 a MCP-1 se pohybují fagocytární buňky. Produkci cytokinů IL-1, IL-6, TNF a IL-12 se indukují prozánětlivý stav. Endoteliální buňky mohou po navázání AECA protilátek navodit stav programované buněčné smrti, apoptózy. Tvorba krevních sraženin se vytváří po sekreci molekul trombomodulinu a von Willebrandova faktoru.

5. Antigeny

Antiendoteliální protilátky se vážou k antigenům na endoteliálních buňkách nebo k molekulám, které se vážou k povrchu buněk a zprostředkovávají signalizaci po navázání protilátek. Mezi molekuly vážající se k endoteliálním buňkám a zastávající funkci antigenů patří β 2glykoprotein I (β 2GPI), DNA, DNA histonový komplex, faktor PF4 (faktor krevních destiček) a proteinasa 3 neutrofilů.

β 2 glykoprotein je plazmatický protein, který se váže na endoteliální buňky, monocyty, krevní destičky, trofoblast. Působí jako antikoagulační činidlo a je důležitý pro udržení funkcí endoteliálních buněk. Protein má povahu kationickou, váže se na anionické fosfolipidy. Na β 2 glykoprotein se vážou také antifosfolipidové protilátky, které tvoří komplex protilátek, který je studován u antifosfolipidového syndromu (APS). Aktivita protilátek u APS je závislá na přítomnosti tohoto antigenu.

Další významný antigen je HSP60 (60 kD). HSP60 je důležitý při foldingu, translokaci a assembly intracelulárních proteinů. Chrání proteiny před denaturací během stresu. HSP60 je exprimován na povrchu endoteliálních buněk po podnětech jako jsou hypoxie, teplo, a v určitém cytokinovém prostředí. Tento antigen váže řadu protilátek, které asociují s aterosklerózou. AECA protilátky pacientů SLE a systémových vaskulitid vazbou přes HSP indukují apoptózu endoteliálních buněk a tím indukují vaskulární poškození, prokoagulační fenotyp a odhalení intracelulárních epitopů. Protilátky proti HSP a protilátky proti cytomegaloviru jsou sekvenční homology a mohou zkříženě reagovat s HSP. Molekulární mimikry mohou být příčinou AECA aktivity u sklerodermie. Oba typy protilátek indukují apoptózu endoteliálních buněk.

Antigen PF4 (faktor krevních destiček) je protein vážající heparin. Je obsažený v α -granulech krevních destiček. Váže se k proteoglykanům endoteliálních buněk. Vazba na tento antigen je charakteristická pro heparin-indukovanou trombocytopenii, kdy nacházíme protilátky proti komplexu PF4 a heparinu nebo proti proteoglykanům endoteliálních buněk. Tyto protilátky mají aktivitu protilátek AECA. Indukují zánětlivé nebo koagulační procesy v mikrovaskulárních buňkách a buňkách HUVEC, které jsou stimulované pomocí cytokinu TNF- α (Shoenfeld, 2007).

Některé autoantigeny jsou exprimované endoteliálními buňkami na membránách po aktivaci prozánětlivými podněty, cytokiny. Na endoteliálních buňkách se exprimují sulfátové proteoglykany a heparinové molekuly, proti kterým může být sekretovaná část populace protilátek AECA (Praprotnik et al., 2001).

Antigeny endoteliálních buněk mohou být exprimovány i na fibroblastech, monocytech, krevních destičkách. Protilátky AECA mohou tedy reagovat s různými buněčnými typy. (Shoenfeld, 2007).

Při akutní rejekci po transplantaci srdce bylo prokázáno zvýšené množství cytoskeletárních protilátek AECA (CSK-AECA). Tyto protilátky se vážou k cytoskeletárním antigenům, tubulinu, aktinu, cytokeratinu a vimentinu (Alvarez-Marquez, A.A. et al., 2008).

AECA protilátky se vážou také na struktury extracelulární matrix, kolagen typu II, IV, VII, laminin, vimentin. (Belizna et al., 2006).

6. Stanovení protilátek

Obecně můžeme stanovit AECA stejnými metodami jako ostatní autoprottilátky - metody EIA, nepřímá imunofluorescence a dále imunoblotting a imunoprecipitace a v poslední době i průtoková cytometrie,

Z kapitoly o antigenech vyplývá problematičnost využití EIA metod pro stanovení AECA, tedy neexistence jasně definovaného antigenu. Při **testu ELISA** se používají jak fixované, tak nefixované endoteliální buňky nebo membránový extrakt. Tyto komponenty slouží jako nosič antigenů, na které se vážou protilátky. Fixace způsobuje permeabilizaci, což umožňuje navázání protilátek k intracelulárním strukturám, což významně ovlivňuje celý test, což prokázala studie, kde byla vyčleněna skupina pacientů, u kterých se aktivita protilátek AECA nesnižovala s poklesem použitých buněk, ale pokud byly použity nefixované endoteliální buňky, došlo k nejsilnější odpovědi ve srovnání s fixací glutaraldehydem nebo ethanolem. (Revelen et al., 2000).

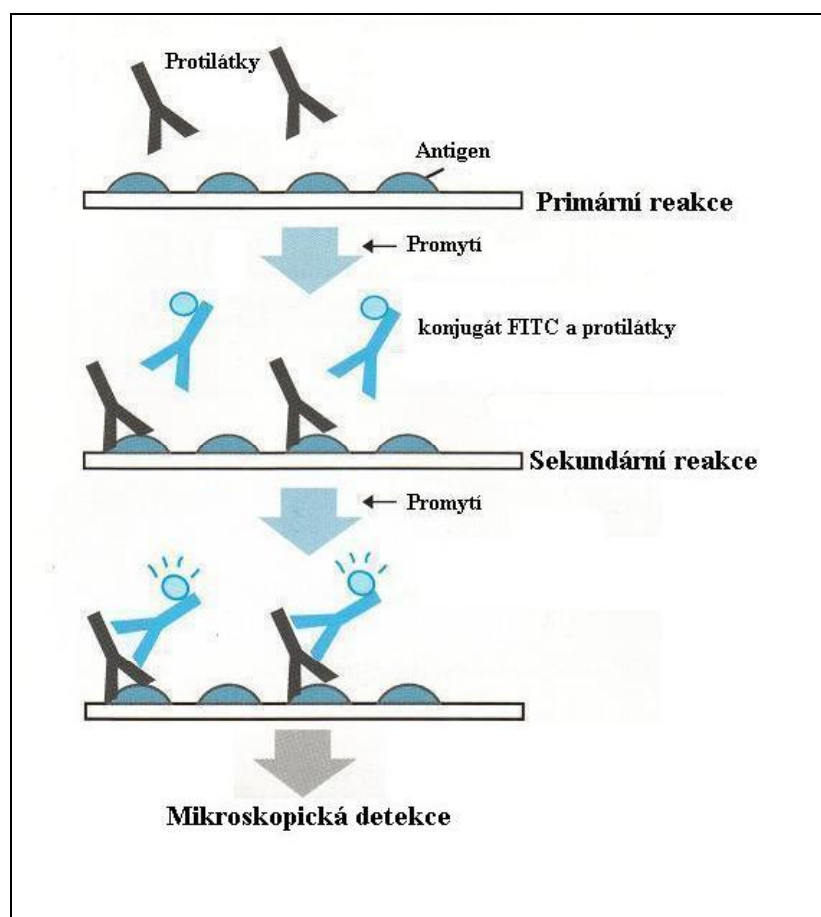
Při použití membránového extraktu může dojít k falešné pozitivitě reakcí na intracelulární epitopy vlivem cytoplazmatické a jaderné kontaminace. Metody EIA se používají spíše jen výzkumně, k detekci nízkých hladin AECA.

Průtoková cytometrie není obecně hlavní metodou pro stanovení protilátek, případě AECA je nevýhodou i velké spotřeba kultivovaných endoteliálních buněk pro stanovení. Metoda průtokové cytometrie také vykazuje nižší pozitivitu protilátek AECA ve srovnání s metodou ELISA (Révélén et al., 2002).

Nepřímá imunofluorescence je nazývaná „zlatým standardem“ pro stanovení autoprottilátek, a proto je pro AECA prozatím hlavní metodou, kterou se stanovuje koncentrace autoprottilátek za patologického stavu, kdy je množství autoprottilátek značně navýšen, tzn. v laboratorní imunologické diagnostice. Nejčastěji používané ředění séra 1:20 by mělo zajistit, aby tato metoda nedetekovala nízké fyziologické koncentrace autoprottilátek, které tvoří většinou přirozené autoprottilátky. Jestliže je diagnostikováno autoimunitní onemocnění, pak jsou autoprottilátky nacházené i v titrech 1:2560. K detekci autoprottilátek se používají tkáňové řezy, buněčné suspenze např. pankreatu, ovaria, krysích ledviny, jícnu, jater, také řezy z opičích tkání. Dále se používají buňky HUVEC, arteriální endoteliální buňky, mikrovaskulární endoteliální buňky mozku, kostní dřeně, ledvin, kůže a další buněčné linie (Eahy926, opičí virus-40 T antigen přenesený do lidských endoteliálních buněk pupeční šňůry). V průběhu vyšetření AECA metodou užití kombinace endotelových buněk různého

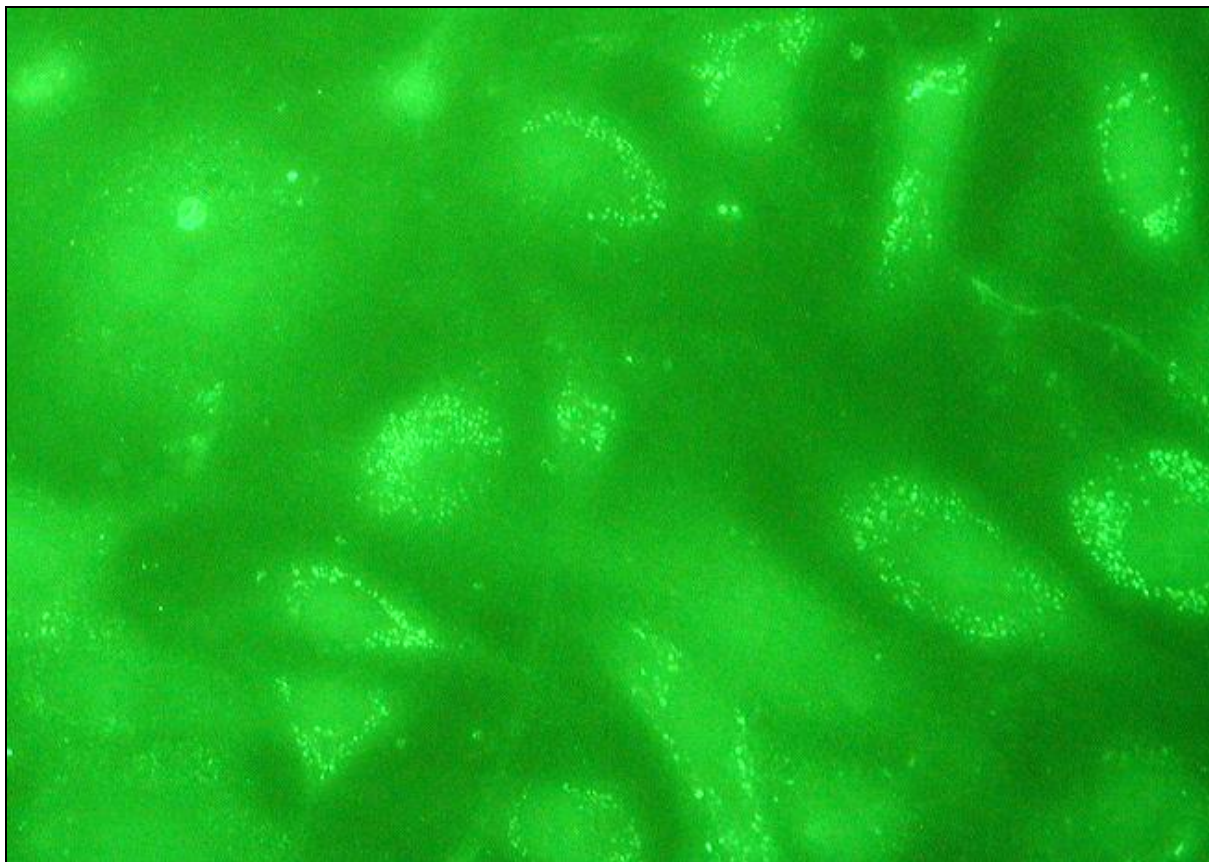
původu (pupečník, kostní dřeň, hybridom) stoupá procento záchytu až na dvojnásobek, tj. test získává vyšší pozitivní prediktivní hodnotu (Praprotník et al., 2001).

Na tkáňové řezy s antigeny se aplikuje sérum pacienta, pokud jsou přítomné AECA, dojde k navázání těchto protilátek ze séra na antigen a vytvoří se imunokomplex. Následuje odmytí nenavázaných protilátek a přidání konjugátu sekundární protilátky a s fluorochromem (fluorescein izothiokyanát). Sekundární protilátka je zvířecí (králičí, kozí, myší) a váže se na Fc fragment lidské protilátky. Tento komplex se inkubuje, promývá a ve fluorescenčním mikroskopu se detekují fluoreskující struktury, které nesou antigeny, na které jsou navázány protilátky.



Obrázek č.2 Schéma principu metody nepřímé imunofluorescence

Výběr substrátu výrazně ovlivňuje výsledek u některých onemocnění. Například protilátky pacientů s Takayasuovou arteritidou se vážou a aktivují pouze HUVEC a ne mikrovaskulární endoteliální buňky, AECA protilátky od pacientů s roztroušenou sklerózou se vážou k endoteliálním buňkám mozku, ale ne k HUVEC (Shoenfeld, 2007).



Obrázek č.3 Vyšetření AECA metodou nepřímé imunofluorescence (foto KIA UKBLD VFN)

Důležitost výběru metodiky i substrátu prokázal Dugue (Dugué et al., 2004), který vyšetřoval pacienty s leprou a malárií metodou ELISA a pomocí průtokové cytometrie. Při těchto imunologických testech dochází k rozporu. Při ELISA se identifikovaly AECA u 52% pacientů s leprou a u 88% pacientů s malárií. Ve srovnání s testem FACS, kdy analyzoval protilátky AECA u 41% pacientů s leprou a u 9% pacientů s malárií. Tento rozpor může být způsoben odlišností testů. U ELISY se endoteliální buňky permeabilizují a při průtokové cytometrii se používají živé buňky. Protilátky od pacientů s leprou a malárií mají odlišné specifity. Séra od pacientů s malárií obsahují protilátky proti cytosolickým strukturám, u pacientů s leprou se jedná o protilátky navázané na membrány endoteliálních protilátek.

Stejně jako u jiných autoproti látek, fyziologicky výskyt AECA koreluje s věkem. U starších osob je koncentrace fyziologických protilátek vyšší, i když výskyt autoimunitních onemocnění je vzácnější. Heterogenita AECA byla potvrzena imunoblottovými technikami.

7. Hypotézy o úloze AECA v patogeneze některých patologických stavů

Přítomnost AECA v séru pacientů byla prokázána u řady onemocnění, ale jako diagnostické protilátky je byly prokázány pouze u **Kawasakiho syndromu**, systémového zánětu cév, postihujícího pacienty v raném dětství. Toto onemocnění se projevuje dlouhodobým zánětem očních spojivek, zduření lymfatických uzlin a kožní vyrážkou.

Akutní nemoc se projevuje deficiencí supresorových a cytotoxických buněk. Zvyšuje se počet monocytů a pomocných T-lymocytů, což vede k polyklonální aktivaci B-lymfocytů a produkci cytotoxických protilátek proti endoteliálním buňkám. Byla prokázána zvýšená sekrece cytokinů IL-1, TNF- α , IFN- γ , a IL-6 (Fujieda et al., 1997)

Studium AECA prokázalo pozitivní korelaci IgM AECA u pacientů s Kawasakiho syndromem s cytotoxicitou závislou na komplementu (CDC-complement-dependent cytotoxicity). Vědci ve studii dokázali, že TNF- α může zvyšovat cytotoxicitu, ale AECA nutně nevyžadují TNF-aktivované buňky pro cytotoxickou aktivitu. Zaznamenali, že séra bohatá na IgM AECA vyvolají cytotoxickou reakci komplementu na endoteliální buňky, na rozdíl od sér obsahujících protilátky IgG AECA s nízkou koncentrací IgM AECA. Gamaglobulin působí jako inhibitor při navázání AECA k endoteliálním buňkám a suprimuje komplementový systém (Fujieda et al., 1997).

Protilátky AECA patří mezi heterogenní autoprottilátky, které jsou namířené proti širokému spektru antigenů. U **Takayasuovy nemoci** se vážou na antigeny endoteliálních buněk aorty. Vědci pro výzkum antigenů aorty pro prottilátky použili immunoblotting. Jako antigeny použili lyzát endoteliálních buněk aorty. Třetí až pátý proteinový band o velikosti 18-200 kD byl rozeznán prottilátkami AAECA (prottilátky proti aortě). Trojice proteinových pásů o velikosti 60-65 kD byla rozeznána prottilátkami AECA všech pacientů s Takayasuovou nemocí. Protože bylo prokázáno, že vazba AECA na protein endoteliálních buněk Hsp60 indukuje apoptózu endoteliálních buněk, je pravděpodobné, že prottilátky AAECA vázající se na antigen o stejné velikosti 60-65 kD tvoří další skupinou prottilátek vyvolávajících apoptózu. (Chauhan et al., 2006).

Navázání prottilátek AAECA na antigen aktivuje endoteliální buňky k expresi adhezních molekul VCAM-1, E-selektinu a produkci cytokinů. Přes adhezní molekuly se leukocyty vážou k endoteliálním buňkám. Následuje migrace přes endoteliální stěnu ve směru chemokinového gradientu. Produkce zánětlivých cytokinů prottilátkami stimulovanými endoteliálními buňkami je velice důležitá. Například cytokin IL-4 je důležitý v regulaci

VCAM-1 a chemokinů jako je monocytární chemotaktický protein 1 (Rollins et al., 1999). Cytokin IL-4 zvyšuje aktivitu enzymu caspázy-3 a tímto indukuje apoptózu lidských endoteliálních buněk (Lee et al., 2000). U pacientů s Takayasuovou chorobou je také zvýšená exprese cytokinu IL-6 (Seko et al., 1996).

Zvýšené množství **protilátek AECA s vazbou na Hsp60** byl zaznamenán u dalších chorob jako je revmatoidní artritida, SLE, diabetes mellitus a koronárních srdečních onemocnění, infarktu myokardu a hypertenze. Bakterie indukují vznik protilátek proti Hsp65. Tyto protilátky mohou zkříženě reagovat s antigenem Hsp60 přítomný na lidských endoteliálních buňkách např. SLE. Protein Hsp60 (protein teplotního šoku) má funkci chaperonu ve foldingu, translokaci a sbalení proteinů do komplexu během posttranslační maturace. Na různé podněty - hypoxie, teplotní šok, vliv cytokinů, zánět - indukují expresi Hsp60 u endoteliálních buněk. Jedná se o obranný mechanismus zajišťující homeostázu. Hsp60 se uvolní z mitochondriální matrix do cytosolu a při přetrvávání stresu putuje k membráně, kde se na ně mohou navázat protilátky AECA (Jamin et al., 2005). Po jejich vazbě dochází k apoptóze a uvolnění IL-1, superoxidů a tvoří se prokoagulační molekuly. Proces apoptózy rozruší buněčnou membránu a způsobí vylití aPL (antifosfolipidické protilátky) a navázání k anionickým fosfolipidům na povrch apoptotických buněk. Tento jev spustí trombotickou kaskádu, která je charakteristická pro APS (antifosfolipidový syndrom) a je jedním z projevů SLE (Dieudé et al., 2004).

Protilátky AECA byly také prokázány u **hepatitidy C asociované s kryoglobulinemií**, ale nebyly detekovány u jiných virových onemocnění nebo chronických jaterních onemocnění způsobené virem HCV (Cacoub et al., 1999). Přítomnost AECA je vysoce asociovaná s dobou infekce, věkem, genotypem a rozsáhlostí jaterního poškození a kryoglobulinem indukujícím endoteliální poškození. AECA jsou více zastoupeny u pacientů s kryoglobulinemií v porovnání s pacienty bez kryoglobulinemie. Kryoglobuliny o vyšší molekulární hmotnosti aktivují endoteliální buňky. Zvýší se vaskulární permeabilita, dojde k migraci neutrofilů a poškození cév. Další mechanismus poškození může být způsoben tím, že endoteliální buňky mají na povrchu antigen podobný HCV antigenu. Protilátky proti antigenu HCV se vážou na endoteliální buňky a aktivují je. Aktivované buňky exprimují adhezní molekuly nebo indukují apoptózu.

Další studie prokazuje úlohu AECA v patogenezi **trombocytopenické purpury**, kde aktivují endoteliální buňky ke zvýšení sekrece trombomodulinu. Trombomodulin indukuje

apoptózu buněk a poškození endotelia a spolu s von Willebrand faktorem způsobí trombózu (Praprotonic et al., 2001). Bylo prokázáno, že inkubace protilátek AECA s mikrovaskulárními endoteliálními buňkami zvýší expresi IL-6 a von Willebrand faktoru (Praprotnik et al., 2001).

Úloha AECA je studována i u další vaskulitidy převážně dětského věku - **Henoch-Schönlein purpura**, kdy imunitní odpovědi vyvolá zkřížená reakce mikroorganismus s podobnými antigeny jako na endoteliálních buňkách malých cév hostitele. Tyto protilátky jsou v izotypu IgA, aktivují komplement a přes Fc α receptor se vážou ke granulocytům. Poškození endotelia se děje přes cytotoxicickou reakci komplementu nebo přes cytotoxicickou reakci závislou na protilátkách (ADCC).

Protilátky AECA IgA se vážou na mikro a makrovaskulární cévy, dochází k infiltraci polymorfonukleárních neurofilů a zvyšuje se produkce prozánětlivých cytokinů. Studie prokázaly, že schopnost IgA AECA vázat se k HUVEC je posílena v přítomnosti TNF- α . Tento cytokin může přizpůsobit při zánětu endoteliální antigeny k interakci s IgA AECA. Tyto antigeny jsou zřejmě za normálních okolností nefunkční. Protilátky AECA IgA jsou detekovány u většiny pacientu s touto nemocí doprovázenou nefritidou, avšak není zahájena reakce komplementem proti endoteliálním glomerulárním buňkám. U pacientů bez nefritidy se IgA AECA nenašly (Yang et al., 2002).

IgG protilátky AECA u pacientů s dalším typem vaskulitidy - Wegenerova granulomatoza - zvyšují expresi molekul VAP-1 a MICA na ledvinných mikrovaskulárních endoteliálních buňkách (HKMEC).

VAP-1 je molekula s enzymatickou a adhezivní funkcí. Je exprimovaná na endoteliálních buňkách, ale chybí na leukocytárních buňkách. Zprostředkovává interakce mezi leukocyty a endoteliálními buňkami, adhezi, transport leukocytů do zánětlivých tkání (Salmi et al., 2001). VAP-1 má amino oxidasovou aktivitu. Produkuje zánětlivé mediátory jako jsou peroxid vodíku, aldehydy, amoniak. Peroxid vodíku zvyšuje sekreci adhezních molekul a molekul oxidativního stresu podněcující zánětlivé reakce. Aldehydy glykosylují proteiny.

MICA má funkci ligandu k receptoru NKG2D, jenž je exprimován na CD8⁺ T-buňkách a $\gamma\delta$ T buňkách

Zvýšení exprese MICA na endoteliálních buňkách způsobí teplotní šok nebo virová infekce. (Groh et al., 2001) CD8⁺ a $\gamma\delta$ T bb. byly nalezeny v infiltrátu v renální biopsii pacientů s Wegenerovou granulomatózou (Holmen et al., 2007). Stimulaci renálních buněk protilátkami IgG AECA vyvolá otevření vápníkového kanálu. Jestliže stimulujeme AECA celkovým IgG, pak k žádnému otevření nedojde. Také buňky HUVEC nejsou citlivé k těmto stimulům.

AECA u pacientů se **SLE (systémový lupus erthematodes)** asociují s neuropsychickými projevy. Působení autoprotilátek může vyvolat neurální dysfunkce, onemocněním cév a narušením koagulace (viz výše APS). Zatím se neprokázala žádná korelace mezi jinými protilátkami a psychickými komplikacemi SLE (Conti et al., 2004).

IgG AECA jsou více zastoupeny u pacientů, kteří jsou v aktivním stadiu nemoci a současně trpí nefritidou. U pacientů s aktivní nemocí a nefritidou protilátky rozeznávají jiné antigeny endoteliálních buněk než u pacientů s aktivní nemocí bez nefritid. U pacientů s aktivní nemocí a nefritidou jsou rozeznány proteiny protilátkami AECA o velikosti od 35 do 110 kD. Je jich rozeznáno nejméně 10. U pacientů s aktivní nemocí bez nefritid protilátky rozeznávají proteiny od 30 do 200 kD (více než 16 proteinů) (Frampton et al., 2000).

Protilátky AECA se vyskytují spolu s protilátkami ACA (autoprotilátky proti centromeře) u pacientů s lokalizovanou kožní formou **sklerodermie**. AECA s protilátkami proti topoizomeráze I (anti-Scl-70 protilátky) řídí genovou expresi caspasy 3 a fibrilinu-1 v dermálních endoteliálních buňkách (HDEC) (Ahmed et al., 2006).

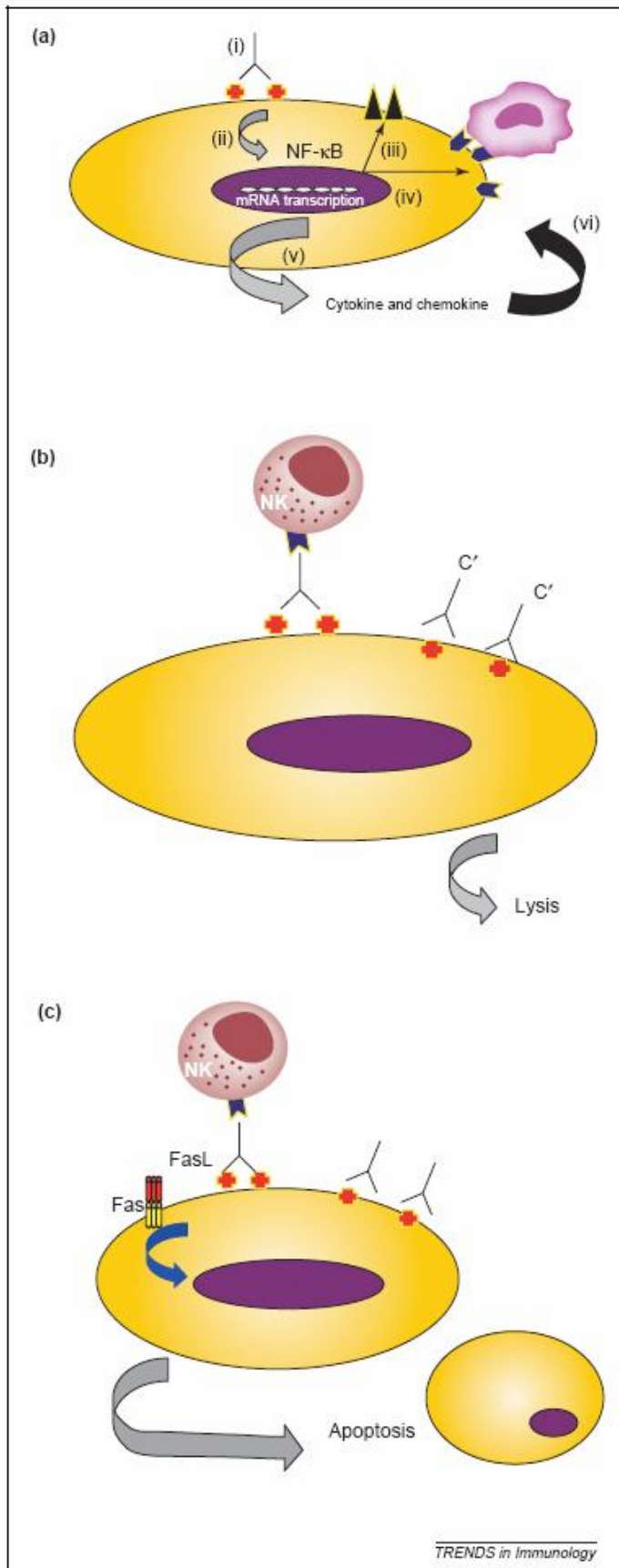
Caspasa 3 je enzym s proteázovou aktivitou regulující apoptózu. Fibrilin -1 je glykoprotein 350 kD. Tvoří větší část mikrofibril extracelulárního matrixu. Může mít důležitou funkci při fibróze. Kontroluje aktivaci TGFb (Kaartinen et al., 2003).

IgG AECA od pacientů s lokalizovanou sklerodermií se vážou na mikrovaskulární endoteliální buňky. U lokalizované kožní formy nemoci se rozvíjí hypertenze plicní arterie. Studie ukázaly, že protilátky IgG AECA od pacientů s idiopatickou hypertenzí plicní arterie nebo hypertenzí plicní arterie asociovanou se sklerodermií vážou antigeny endoteliálních buněk makrovaskulárních a mikrovaskulárních cév (Tamby et al., 2005). U pacientu se sklerodermií mohou protilátky AECA v séru indikovat plicní fibrózu. (Ihn et al., 2000).

Preeklampsie je poměrně častá komplikace těhotenství s otoky horních a dolních končetin, hypertenzí a přítomností bílkoviny v moči. Dochází také k poruchám srážlivosti krve, v pokročilém stadiu pak vznikají křečovitě stavy. U preeklampsie byly detekovány protilátky AECA izotypů IgG a IgM, přičemž IgM AECA se vyskytují v menší míře (Yamamoto et al., 1997). Protilátky se vážou na receptory dosud ještě neprozkoumané. Yamamoto ukázal, že IgG AECA pozitivní séra pacientů s preeklampsii indukují endoteliální buňky k uvolnění endotelinu-1.

Endotelin-1 má vazokonstrikční účinky. Mezi další faktory uvolňující endotelin-1 patří TNF-a, IL-1b, TGF-b, trombin, angiotensin II, vasopresin a activin-A. Endotelin-1 může vyvolat poškození ledvin a placenty. Endoteliální buňky také uvolňují vazodilatátor prostaglandin I₂.

Významné rozdíly ve výskytu prostaglandinu v sérech AECA pozitivních a AECA negativních prokázány nebyly (Yamamoto et al., 1997).



a) Vazba protilátek AECA (i) na antigeny endoteliálních buněk spouští signalizační kaskádu zahájenou aktivací transkripčního faktoru a následnou translokací z cytoplazmy do jádra (ii). Je exprimován tkáňový faktor (iii), který má důležitou funkci v koagulační dráze (černý trojúhelník). Sekrece adhezních molekul (iv) je důležitá při migraci leukocytů (modré značení). Dochází k indukci syntézy a sekrece prozánětlivých cytokinů a chemokinů (v), které působí autokrinně (vi). Mohou však působit i na jiné blízké buňky (parakrinně) nebo při transportu krevním řečištěm na vzdálené buňky (endokrinně).

b) Vazba protilátek AECA aktivuje cytotoxické reakce. Aktivuje se komplement (C') a buněčná cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC). Princip reakce ADCC spočívá v interakci stimulačního receptoru Fc NK-buněk a Fc části protilátek, které opsonizují buňky. Dochází k cytotoxické degranulaci a k lyzi buněk.

c) Protilátky AECA indukují po navázání na antigeny EC apoptózu. Dále se apoptóza může spustit přes interakci Fas ligandu na NK-buňce a Fas receptoru na cílové buňce (žluté a červené značení).

Obrázek č. 4 (Meroni et al., 2005)

8. Klinický význam stanovení AECA

Jak již bylo uvedeno v kapitole o patogenezi AECA, jejich pozitivita je jedním z diagnostických kritérií pro diagnózu Kawasakiho syndromu (sensitivita 60%), systémového zánětu cév, zvláště koronárních tepen, postihujícího pacienty v raném dětství.

V kapitole o patogenetickém významu AECA jsou citovány studie u různých nemocí, výskyt AECA byl ale prokázán i u dalších klinických jednotek bez jasného vztahu k jejich patogenезi, na druhé straně nepatří mezi diagnostická kritéria u žádné další nemoci než již Kawasakiho syndromu.

Protilátky AECA byly prokázány u **akutní virové nemoci epidemická nefropatie**. Epidemickou nefropatii vyvolává Puumala virus, který patří do rodu Hantaviry v rodině Bunyaviridae. Způsobuje hemoragickou horečku s renálním syndromem dalšími symptomy jako jsou vysoká horečka, bolesti hlavy, malátnost, akutní selhání ledvin, proteinurie, hematurie (výskyt proteinů a krve v moči).

Přítomnost protilátek AECA také byla nalezena také u jiných akutních, horečnatých infekčních nemocí např. influenza A, B a infekční mononukleóza zapříčiněná virem EBV (Wangel et al., 1992). Také některé bakteriální (rikettsia) nebo virové (HIV, CMV-cytomegalovirová infekce) chronické infekce mohou indukovat endoteliální poškození většina asociované s klinickými projevy typu kožních nebo systémových vaskulitid (Cacoub et al., 1999)

U alergických reakcí je vždy vyšetřován IgE, proto se výzkum AECA u alergických pacientů zabývá vyšetřením těchto protilátek v izotypu IgE. Přítomnost **AECA u astma bronchiale** se liší v izotypech u dospělých a u dětí. Protilátky v izotypu IgE byly detekovány ve větší míře u dětí mladších čtyř let (Harada et al., 2002). U dospělých pacientů se převážně vyskytují protilátky typu IgG AECA. Tento rozdíl je způsoben odlišnými vlastnostmi astma u lidí a dětí. Astma u dospělých je neatopické, má horší průběh než u dětí. Dětské astma je atopické a má genetické předpoklady předurčující zvýšenou expresi IgE. U astmatických dětí byl objeven antigen na endoteliálních buňkách o velikosti 75 kD pro protilátky IgE AECA (Harada et al., 2002). U dospělých pacientů se IgG AECA vážou na antigen 55 kD na krevních destičkách a endoteliálních buňkách. (Lassalle et al., 1993).

Protilátky AECA mají zřejmě důležitou roli i při počátcích **aterosklerózy a hypertenze**. Takzvaná maskovaná hypertenze znamená, že pacient u lékaře má krevní tlak v mezích normy a doma má krevní tlak vyšší, v hodnotách hypertenze. Pacienti s maskovanou hypertenzí jsou více predikováni ke kardiovaskulárním nemocem. Studie prokázaly u pacientů

s maskovanou hypertenzí vyšší množství AECA než u lidí s normálním krevním tlakem (Papadopoulos et al., 2008). Pacienti s hodnotami krevního tlaku při horní hranici normy (systolický tlak 130-139 mm Hg a diastolický tlak 85-89 mm Hg) mají vyšší IgG a IgM AECA ve srovnání s lidmi, kteří mají zcela normální krevní tlak. (Papadopoulos et al., 2006).

Mechanický stres a hypertenze mohou indukovat protein Hsp. Stresově aktivované endoteliální buňky cévních stěn exprimují Hsp60, proti kterému se produkují protilátky, což může vysvětlovat přítomnost AECA u pacientů s **neautoimunitním kardiovaskulárním onemocněním** (Frostegård et al., 1997).

Při **endokarditidě** a následném poškození srdečních chlopní infekce adherují patogenní mikroorganismy na povrchu endokardia. Přilnutí bakterií jako jsou Staphylococcus aureus, streptokoky, enterokoky podpoří mechanické poškození tkáně a srdeční onemocnění. Protilátky AECA se mohou vyvinout po poškození endoteliálních buněk endokardia (Portik et al., 2001). Korelace mezi AECA a poškozenými chlopněmi, izolovanými mikroorganismy, nebo poškozeními kůže a ledvin nebyla zjištěna. Protilátky AECA sice byly detekovány u několika pacientů s endokarditidou, ale nebyla prokázána patogenita, i když můžeme předpokládat, že protilátky proti endoteliálním buňkám také naruší povrch a na tato místa pak nasednou bakterie.

Zvýšené hladiny protilátek AECA byly nalezeny u všech stupňů nemoci postihující klouby zvláště u dětí – **juvenilní chronická artritida**, ale největší stupeň AECA se vyskytl u systémové formy. Úloha AECA protilátek v patogenzi juvenilní idiopatické artritidy není objasněna, ale předpokládá se, že podobně jako u jiných onemocnění mohou zapříčinit poškození endoteliálních buněk (Bloom et al., 2007).

Pacienti se **sarkoidózou** (systémové granulomatózní postižení plic neznámé etiologie) měli vyšší množství AECA v séru a BALu (tekutina získaná z bronchoalveolární laváže) v porovnání se zdravými lidmi. Vyšší výskyt AECA měli pacienti s mnohočetnými lézemi než pacienti bez lézí. U pacientů, kterým byly aplikovány kortikosteroidní léky, se vyskytlo vyšší množství AECA protilátek, v porovnání s pacienty bez nutné léčby. Protilátky AECA mohou být důležitým markerem při stanovení diagnózy sarkoidózy (Inui et al., 2008).

Byla prokázána vysoká úroveň antiendoteliálních protilátek v sérech žen s **hyperprolaktinemií**. Protilátky reagovaly s mikrovaskulárními i makrovaskulárními antigeny endoteliálních buněk (Krause et al., 1998).

Přítomnost protilátek AECA koreluje s humorální rejekcí štěpu, ale ne s buněčnou rejekcí komplikujícím stav **po transplantaci**. U pacientů s ischemickou chorobou srdeční diagnostikovanou před transplantací záleží na tom, zda jsou AECA negativní nebo AECA

pozitivní. U pacientů negativních na protilátky AECA se méně vyskytuje ischemická choroba srdeční ve srovnání s pacienty pozitivní na AECA. Může se rozvíjet rejekce pouze humorální, buněčná nebo se vyskytují obě současně. Šance na přijetí transplantátu a přežití je daleko vyšší u pacientů AECA negativních (Fredrich et al., 1999).

Protilátky AECA také hrají roli v rejekci ledvin po transplantaci. AECA protilátky reagují s glomerulárními endoteliálními buňkami (HGEC). Odhojení transplantátu je vyšší u pacientů, kteří měli vyšší sérové hladiny AECA před transplantací. Testy pacientů s akutní rejekcí v prvním dnu po transplantaci ukazují vyšší AECA v porovnání s pacienty bez akutní rejekce v prvním dnu po transplantaci. Protilátky AECA proti mikrovaskulárním endoteliálním buňkám nemají vliv na akutní odhojení transplantované ledviny. Vyšší reaktivita AECA k mikrovaskulárním buňkám byla prokázána až po několika týdnech. Příjemci transplantátu s mnohočetnými rejekcemi měli vyšší hladiny AECA v pretransplantační i postransplantační péči než pacienti s jednou rejekcí (Nakagawa et al., 2002).

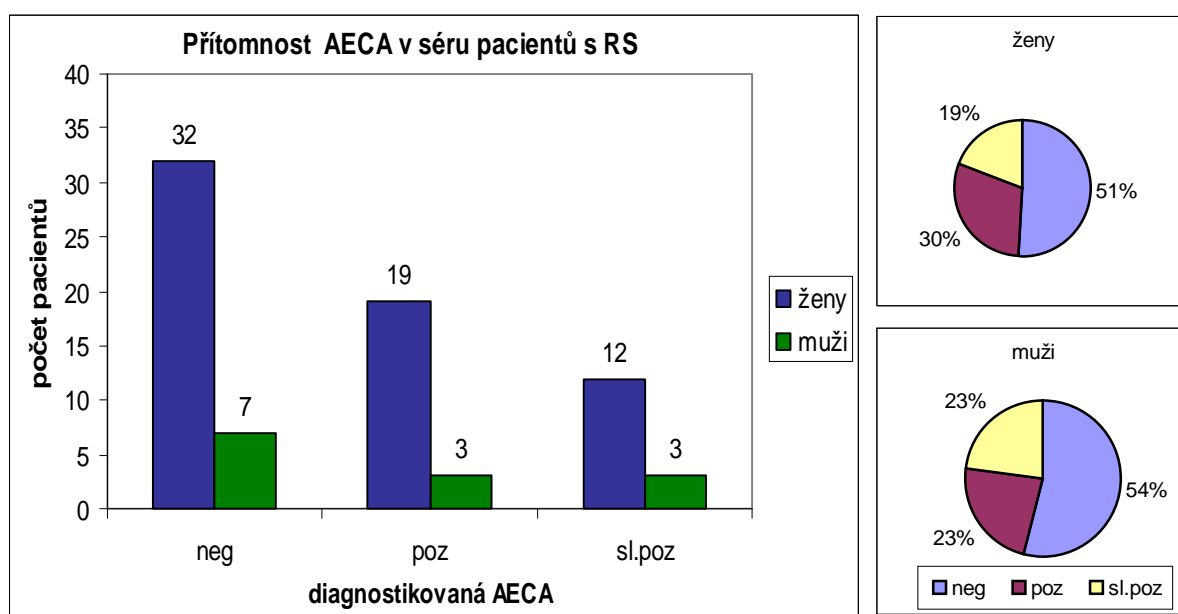
Pacienti s **aftózní stomatitidou** (opakuujícími se ústní vředy) mají vyšší hladinu IgG AECA. Tyto protilátky se vážou s vyšší aviditou k endoteliální buněčné linii ECV 304 v porovnání s kontrolními liniemi. Protilátky k ECV 304 se téměř neliší u pacientů s aktivními ústními vředy a bez nich. AECA také reagují s více buňkami HUVEC. Pacienti v aktivním stavu stomatitidy mají vyšší sérové hladiny AECA než pacienti v klidovém stadiu nemoci (Healy et al., 1996)

Protilátky AECA jsou zvýšeny u pacientů s **Crohnovou chorobou i ulcerózní kolitidou** (neinfekční střevní zánětlivé stavy). Vyšší hladiny AECA protilátek byly prokázány i u jedinců blízké příbuzným pacientům se zánětlivými onemocněními a u pacientů s infekčními enterokolitidami (Folwaczy et al., 2000).

Při studiu protilátek AECA izotypů IgG podtříd IgG₁, IgG₂, IgG₃ a IgG₄ byly také prokázány rozdíly. Například u Crohnovy choroby je zvýšena podtřída IgG₁ oproti ulcerózní kolitidě. Naopak hladiny protilátek podtříd IgG₂, IgG₄ se zvýšily u ulcerózní kolitidy. Imunoglobuliny IgG₃ jsou srovnatelné u obou zánětlivých onemocnění, ale v porovnání se zdravými lidmi jejich hladina je nižší. Hladina protilátek izotypů IgG nekoreluje s relapsem Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy (Aldebert et al., 1997).

Podnětem pro vypracování této bakalářské práce byla problematická klinická interpretace výsledků vyšetření AECA v sérech pacientů školitelky, vyšetřovaných v laboratoři Klinické imunologie a alergologie Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze metodou nepřímé imunofluorescence - firma Euroimmun, Lübeck, SRN. Firma využívá EC z primokultur HUVEC, součástí suplementace použitého tkáňového média bylo bovinní sérum (přítomnost β 2GP I v kultuře).

Zvláště vysoká frekvence pozitivity těchto protilátek u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) je překvapivá, i když byla prokázána vazba AECA na neuroendotel, a tím i ovlivnění migrace autoreaktivních T lymfocytů do CNS. Dle literatury by pozitivita AECA měla být zachycena při použití endoteliálních buněk mozku, nikoli HUVEC. Z počátku jsme se tedy zaměřili na pacienty s roztroušenou sklerózou.



Graf č. 1.

Grafický rozbor detekce protilátek u pacientů s roztroušenou sklerózou ilustruje, že tato choroba postihuje především ženy. Rozdíl procentuálního zastoupení protilátek AECA mezi ženami a muži je minimální, téměř polovina vzorků byla alespoň slabě pozitivní.

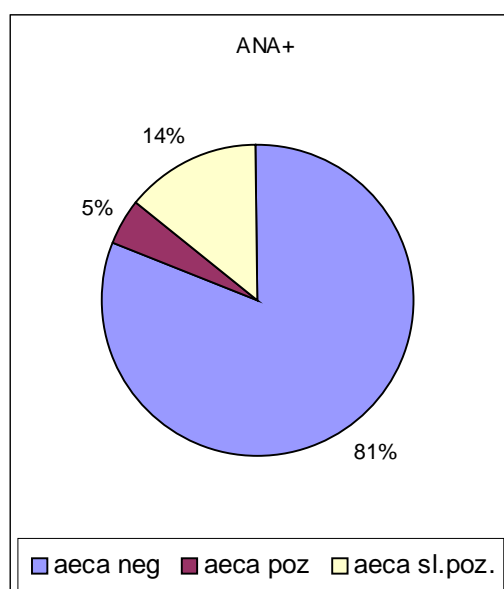
		IgE	C3	CIK	RF	ANA	SMA	APS
AECA-neg	zvýšené hodnoty	18	15	12				
	negativní				81	58	4	1
	pozitivní					17	5	5
	slabě pozitivní				3	24	7	4
	silně pozitivní				1			
AECA-poz	zvýšené hodnoty	12	7	2				
	negativní					46		1
	pozitivní				1	1	3	3
	slabě pozitivní				1	8		
	silně pozitivní							
AECA-sl.poz.	zvýšené hodnoty	7	4	1				
	negativní					20		
	pozitivní					3		2
	slabě pozitivní					4	2	
	silně pozitivní							

Tabulka č. 1

Tuto tabulku jsem sestrojila z údajů získaných z databáze pacientů s různými imunologickými diagnózami, ale bez jasného autoimunitního onemocnění. Sledovali jsme IgE, C3 složku komplementu, cirkulující imunokomplexy (CIK), eozinofilní kationický protein (ECP), C-reaktivní protein (CRP), revmatoidní faktoru (RF), C3 složku komplementu a další autoprotiilátky – antinukleární (ANA), protiilátky proti hladkým svalům (SMAb) a antifosfolipidové protiilátky (APS) – ve srovnání s pozitivitou AECA. Překvapivě nejvíce „patologických“ výsledků jsme našli ve skupině AECA neg.

Graf č. 2

Tento graf ukazuje velmi slabou až zanedbatelnou závislost ANA pozitivních protiilátek na protiilátkách AECA. Obecně se spíše dá říci, že pacienti, u kterých jsou detekovány protiilátky ANA, nejsou pozitivní na protiilátky AECA.



9. Závěr

Závěry studií citovaných v této práci potvrzují a vysvětlují diagnostické rozpaky při využití vyšetřování antiendoteliálních protilátek v klinické imunologii. Heterogenita těchto autoprotilátek je tak velká, že nelze využít pouze jeden typ testu (EIA nebo imunofluorescence) pro všechna onemocnění, u kterých se AECA účastní v patogeneze. Na druhé straně korelace jejich hladin s aktivitou onemocnění by měla být důvodem k bližšímu studiu těchto autoprotilátek za využití různých substrátů.

10. Seznam literatury

- Ahmed, S.S., Tan, F.K., Arnett, F.C., Jin, L., and Geng, Y.J. (2006). Induction of apoptosis and fibrillin 1 expression in human dermal endothelial cells by scleroderma sera containing anti-endothelial cell antibodies. *Arthritis Rheum* 54, 2250-2262.
- Aldebert, D., Masy, E., Reumaux, D., Lion, G., Colombel, J.F., and Duthilleul, P. (1997). Immunoglobulin G subclass distribution of anti-endothelial cell antibodies (AECA) in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 42, 2350-2355.
- Alvarez-Marquez, A., Aguilera, I., Blanco, R.M., Pascual, D., Encarnacion-Carrizosa, M., Alvarez-Lopez, M.R., Wichmann, I., and Nunez-Roldan, A. (2008). Positive association of anticytoskeletal endothelial cell antibodies and cardiac allograft rejection. *Hum Immunol* 69, 143-148.
- Belizna, C., Duijvestijn, A., Hamidou, M., and Cohen Tervaert, J.W. (2006). Antiendothelial cell antibodies in vasculitis and connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 65, 1545-1550.
- Bloom, B.J., Toyoda, M., Petrosian, A., and Jordan, S. (2007). Anti-endothelial cell antibodies are prevalent in juvenile idiopathic arthritis: implications for clinical disease course and pathogenesis. *Rheumatol Int* 27, 655-660.
- Cacoub, P., Ghillani, P., Revelen, R., Thibault, V., Calvez, V., Charlotte, F., Musset, L., Youinou, P., and Piette, J.C. (1999). Anti-endothelial cell auto-antibodies in hepatitis C virus mixed cryoglobulinemia. *J Hepatol* 31, 598-603.
- Conti, F., Alessandri, C., Bompane, D., Bombardieri, M., Spinelli, F.R., Rusconi, A.C., and Valesini, G. (2004). Autoantibody profile in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations: a role for anti-endothelial-cell antibodies. *Arthritis Res Ther* 6, R366-372.
- Dieude, M., Senecal, J.L., and Raymond, Y. (2004). Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 50, 3221-3231.
- Dugue, C., Perraut, R., Youinou, P., and Renaudineau, Y. (2004). Effects of anti-endothelial cell antibodies in leprosy and malaria. *Infect Immun* 72, 301-309.
- Folwaczny, C., Loeschke, K., Schnettler, D., Jager, G., Wiebecke, B., Hoelscher, M., Sauer, T., Konig, A., Endres, S.P., and Fricke, H. (2000). Endothelial cell autoantibodies are a marker of disease susceptibility in inflammatory bowel disease but apparently not linked to persistent measles virus infection. *Clin Immunol* 95, 197-202.
- Frampton, G., Moriya, S., Pearson, J.D., Isenberg, D.A., Ward, F.J., Smith, T.A., Panayiotou, A., Staines, N.A., and Murphy, J.J. (2000). Identification of candidate endothelial cell autoantigens in systemic lupus erythematosus using a molecular cloning strategy: a role for ribosomal P protein P0 as an endothelial cell autoantigen. *Rheumatology (Oxford)* 39, 1114-1120.

- Fredrich, R., Toyoda, M., Czer, L.S., Galfayan, K., Galera, O., Trento, A., Freimark, D., Young, S., and Jordan, S.C. (1999). The clinical significance of antibodies to human vascular endothelial cells after cardiac transplantation. *Transplantation* 67, 385-391.
- Frostegard, J., Wu, R., Gillis-Haegerstrand, C., Lemne, C., and de Faire, U. (1998). Antibodies to endothelial cells in borderline hypertension. *Circulation* 98, 1092-1098.
- Fujieda, M., Oishi, N., and Kurashige, T. (1997). Antibodies to endothelial cells in Kawasaki disease lyse endothelial cells without cytokine pretreatment. *Clin Exp Immunol* 107, 120-126.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2, 255-260.
- Harada, W., Toyabe, S., Uchiyama, M., (2002). Anti-endothelial cell IgE antibodies in children with bronchial asthma. *Allergology International* 51, 113-119.
- Healy, C.M., Carvalho, D., Pearson, J.D., and Thornhill, M.H. (1996). Raised anti-endothelial cell autoantibodies (AECA), but not anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA), in recurrent oral ulceration: modulation of AECA binding by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interferon-gamma (IFN-gamma). *Clin Exp Immunol* 106, 523-528.
- Holmen, C., Elsheikh, E., Christensson, M., Liu, J., Johansson, A.S., Qureshi, A.R., Jalkanen, S., and Sumitran-Holgersson, S. (2007). Anti endothelial cell autoantibodies selectively activate SAPK/JNK signalling in Wegener's granulomatosis. *J Am Soc Nephrol* 18, 2497-2508.
- Chauhan, S.K., Tripathy, N.K., and Nityanand, S. (2006). Antigenic targets and pathogenicity of anti-aortic endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 54, 2326-2333.
- Ihn, H., Sato, S., Fujimoto, M., Igarashi, A., Yazawa, N., Kubo, M., Kikuchi, K., Takehara, K., and Tamaki, K. (2000). Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 119, 203-209.
- Inui, N., Matsui, T., Suda, T., and Chida, K. (2008). Anti-endothelial cell antibodies in patients with sarcoidosis. *Chest* 133, 955-960.
- Jamin, C., Dugue, C., Alard, J.E., Jousse, S., Saraux, A., Guillevin, L., Piette, J.C., and Youinou, P. (2005). Induction of endothelial cell apoptosis by the binding of anti-endothelial cell antibodies to Hsp60 in vasculitis-associated systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 52, 4028-4038.
- Kaartinen, V., and Warburton, D. (2003). Fibrillin controls TGF-beta activation. *Nat Genet* 33, 331-332.
- Krause, I., Blumenfeld, Z., Malchinsky, M., Cohen, S., Blank, M., Eldor, A., Weksler, B., Schweitzer, K., and Shoenfeld, Y. (1998). Anti-endothelial cell antibodies in the sera of hyperprolactinemic women. *Lupus* 7, 377-382.

- Lassalle, P., Delneste, Y., Gosset, P., Gras-Masse, H., Wallaert, B., and Tonnel, A.B. (1993). T and B cell immune response to a 55-kDa endothelial cell-derived antigen in severe asthma. *Eur J Immunol* 23, 796-803.
- Lee, Y.W., Kuhn, H., Hennig, B., and Toborek, M. (2000). IL-4 induces apoptosis of endothelial cells through the caspase-3-dependent pathway. *FEBS Lett* 485, 122-126.
- Meroni, P., Ronda, N., Raschi, E., and Borghi, M.O. (2005). Humoral autoimmunity against endothelium: theory or reality? *Trends Immunol* 26, 275-281.
- Meroni, P.L., Ronda, N., Raschi, E., Borghi M.O. (2007). Anti-endothelial cell autoantibodies. In Shoenfeld, Y., Gershwin, M.E., Meroni, P.L. (eds): *Autoantibodies*. 2nd Edition. Elsevier, B.V. 725-731
- Nakagawa, Y., Saito, K., Morioka, T., Tomita, Y., Takahashi, K., and Oite, T. (2002). The clinical significance of antibody to vascular endothelial cells after renal transplantation. *Clin Transplant* 16 Suppl 8, 51-57.
- Papadopoulos, D.P., Makris, T.K., Krespi, P., Papazachou, U., Stavroulakis, G., Hatzizacharias, A., and Votteas, V. (2006). Antiendothelial cell antibody levels in healthy normotensives with high normal blood pressure. *Clin Exp Hypertens* 28, 663-667.
- Papadopoulos, D.P., Makris, T.K., Papazachou, U., Daskalaki, M., Sanidas, E., and Votteas, V.E. (2008). Antiendothelial cell antibody levels in patients with masked hypertension. *Int J Cardiol*.
- Portig, I., Beck, V., Pankuweit, S., and Maisch, B. (2001). Antiendothelial antibodies in sera of patients with infective endocarditis. *Basic Res Cardiol* 96, 75-81.
- Praprotnik, S., Blank, M., Levy, Y., Tavor, S., Boffa, M.C., Weksler, B., Eldor, A., and Shoenfeld, Y. (2001). Anti-endothelial cell antibodies from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura specifically activate small vessel endothelial cells. *Int Immunol* 13, 203-210.
- Praprotnik, S., Blank, M., Meroni, P.L., Rozman, B., Eldor, A., and Shoenfeld, Y. (2001). Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells: the pathogenic and diagnostic implications. *Arthritis Rheum* 44, 1484-1494.
- Renaudineau, Y., Dugue, C., Dueymes, M., and Youinou, P. (2002). Antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 1, 365-372.
- Revelen, R., Bordron, A., Dueymes, M., Youinou, P., and Arvieux, J. (2000). False positivity in a cyto-ELISA for anti-endothelial cell antibodies caused by heterophile antibodies to bovine serum proteins. *Clin Chem* 46, 273-278.
- Revelen, R., D'Arbonneau, F., Guillevin, L., Bordron, A., Youinou, P., and Dueymes, M. (2002). Comparison of cell-ELISA, flow cytometry and Western blotting for the detection of antiendothelial cell antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 20, 19-26.

- Rollins, B.J., and Pober, J.S. (1991). Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 138, 1315-1319.
- Ronda, N., Leonardi, S., Orlandini, G., Gatti, R., Bellosa, S., Bernini, F., and Borghetti, A. (1999). Natural anti-endothelial cell antibodies (AECA). *J Autoimmun* 13, 121-127.
- Salmi, M., and Jalkanen, S. (2001). VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol* 22, 211-216.
- Seko, Y., Sato, O., Takagi, A., Tada, Y., Matsuo, H., Yagita, H., Okumura, K., and Yazaki, Y. (1996). Restricted usage of T-cell receptor Valpha-Vbeta genes in infiltrating cells in aortic tissue of patients with Takayasu's arteritis. *Circulation* 93, 1788-1790.
- Tamby, M.C., Chanseaud, Y., Humbert, M., Fermanian, J., Guilpain, P., Garcia-de-la-Pena-Lefebvre, P., Brunet, S., Servettaz, A., Weill, B., Simonneau, G., et al. (2005). Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 60, 765-772.
- Wangel, A.G., Temonen, M., Brummer-Korvenkontio, M., and Vaheri, A. (1992). Anti-endothelial cell antibodies in nephropathia epidemica and other viral diseases. *Clin Exp Immunol* 90, 13-17.
- Yamamoto, T., Takahashi, Y., Kuno, S., Geshi, Y., Sasamori, Y., and Mori, H. (1997). Effects of anti-endothelial cell antibody in pre-eclampsia on endothelin-1 release from cultured endothelial cells. *Immunol Cell Biol* 75, 340-344.
- Yang, Y.H., Wang, S.J., Chuang, Y.H., Lin, Y.T., and Chiang, B.L. (2002). The level of IgA antibodies to human umbilical vein endothelial cells can be enhanced by TNF-alpha treatment in children with Henoch-Schonlein purpura. *Clin Exp Immunol* 130, 352-357.