

## Projektets syfte och bakgrund

Åderförfattning och dess akuta tromboskomplikationer såsom hjärtinfarkt och stroke är den främsta dödsorsaken i den industrialiserade västvärlden. Syftet med detta forskningsprojekt har varit att klargöra signifikansen av den inflammatoriska biomarkören surt alpha1-glykoprotein (AGP) vid tidig progression av åderförfattning. Särskilt fokus har lagts på kartläggande av okända orsakssamband relaterat till pro-inflammatoriska mekanismer av AGP. Ökad kunskap från denna studie syftar att generera ny kunskap för att möjliggöra utveckling av ny diagnos och förbättrad terapi för att minska förekomsten av åderförfattningsrelaterade hjärt/kärlsjukdom.

## Projektets genomförande

Projektet har utgjorts av en **basvetenskaplig del** där AGP uppennats, till AGP bundna lipider extraherats och därefter separerats via tunnskitskromatografi. Specifika lipider (primärt bundna till AGP) har identifierats med masspektrometri. Pro-inflammatoriska effekter av lipider från AGP har kartlagts på neutrofila granulocyter och trombocyter. Aktivering av blodcellerna har främst analyserats via real-tids mätning av förändringar i cytosolisk Ca<sup>2+</sup> koncentration.

I en mer **klinisk orienterad del** av projektet har plasma AGP hos yngre (median 26 år) jämförts med blodlipidstatus, fettdepåernas storlek och fysisk aktivitet.

## Uppnådda resultat

Vi har kunnat identifiera ett tidigare okänt molekylärt/cellulärt orsakssamband som förklarar hur AGP aktiverar neutrofila granulocyter och trombocyter. Fyndet har sin grund i en internationellt uppmärksammat studie (Gunnarsson et al., 2007; FASEB J), där vi visade att sockerstrukturer (sialinsyra) på glykoproteinet AGP känns igen av specifika lektiner inom SIGLEC-familjen på ytan av neutrofila granulocyter. Det skall framhållas att cirkulerande neutrofiler inte reagerar för AGP; först efter "rolling" längs kärlväggens endotel (L-selektin aktivering) tycks AGP igenkännas av neutrofila granulocyter.

I detta projekt har vi kunnat påvisa att den pro-inflammatoriska effekten (**aktivering av neutrofila granulocyter**) av AGP nästa till sin helhet beror av lipider bundna till proteinet. Lipider bundna till AGP frigjordes via Folch extraktion och separerades med HPTLC (se Fig. 1; vänster). Inköpt AGP eller AGP som av oss uppennats (affinitetskromatografi) från blodgivare gav närmaste identiskt resultat. Ett lipidband efter HPTLC visade sig aktivera neutrofila granulocyter (mätt som mobilisering av cytosoliskt Ca<sup>2+</sup> (Fig. 1; vänster)). Ökad intracellulär Ca<sup>2+</sup> koncentration i neutrofiler resulterar bl.a. i degranulering av sekretoriska vesiklar och ökad förmåga till migration/kemotaxi. Ca<sup>2+</sup> höjningar representerar även ett klassiskt "priming stimulus", d.v.s. en påtagligt ökad inflammatorisk kapacitet hos neutrofiler som sekundärt reagerar för komplementfaktorer och bakteriella peptider.

Masspektrofotometrisk analys av det cellbiologiskt aktiva bandet efter HPTLC påvisade förekomst av ett flertal molekyler inom hydroxyecosatetraenoic acids (HETEs) familjen av

bioaktiva arakidonsyraderivat. Särskilt uttalat var förekomst av 12-HETE (se Fig.1; mitten). Våra data visar således att AGP är en carrier av denna grupp av bioaktiva fettsyror. Från vårt perspektiv indikerar resultaten, för en till stor del okänd fysiologi; HETEs produceras av många vävnader/celltyper och kan uppenbarligen binda till och transporteras av AGP i blodet och sannolikt kan HETEs frigöras lokalt, i en cellulär mikromiljö, då AGP igenkänns av neutrofila granulocyter.

Vidare kartläggning av AGP-deriverade HETEs visade att den intracellulära signalen som uppmättes nästan uteslutande var beroende av aktivering av BLT2 receptorer på ytan av neutrofiler (Fig 1; höger). BLT2 har primärt karakteriserats som en receptor för leukotrien B4 men har (högre) affinitet för flera HETEs molekyler. BLT2 receptorantagonisten LY255283 blockerade dosberoende Ca<sup>2+</sup> höjning i neutrofiler. Denna effekt var identiskt om nativt AGP (d.v.s. AGP med bundna lipider) eller lipidfraktionen från AGP användes. I båda fallen krävdes att neutrofiler först interagerat med kärlväggen via L-selektin.

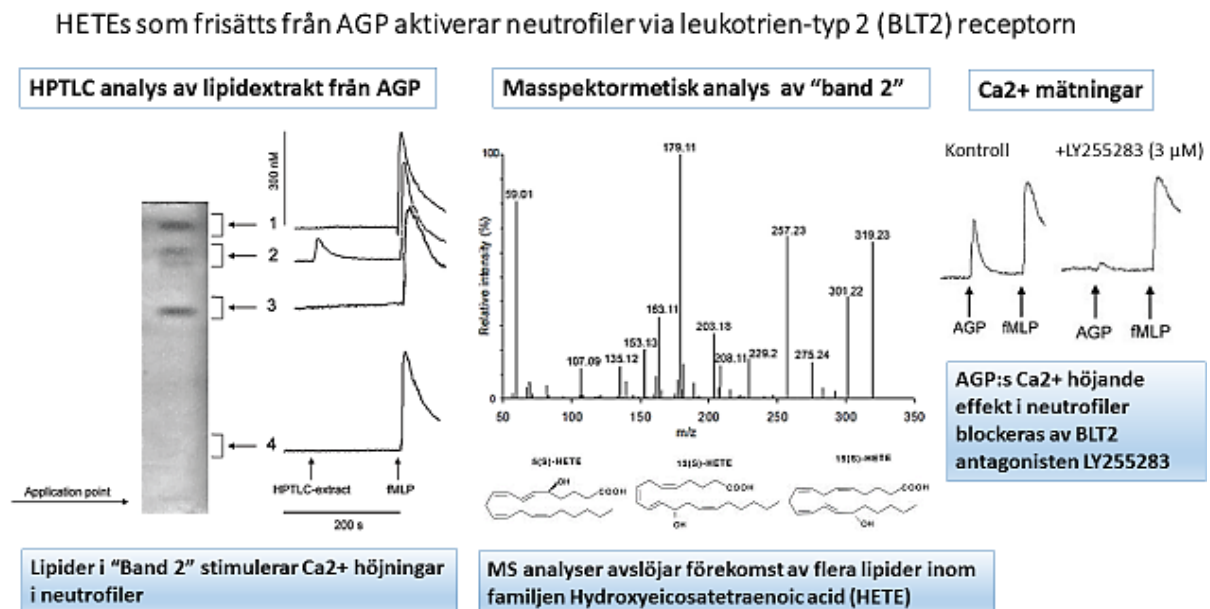


Fig. 1 Bioaktiva lipider bundna till AGP. Extraktion och HPTLC separation av lipider från AGP uppvisade ett "band" med förmåga att aktivera neutrofiler (vänster). Som kontroll aktiverades neutrofiler med syntetisk bakteriepeptid (fMLP). MS analys av lipidband "2" indikerade för förekomst av olika HETEs molekyler och där 12-HETE var särskilt förekommande (mitten). Aktiveringen av neutrofiler blockerades dosberoende, och vid µM koncentrationer närmast fullkomligt av leukotrien typ 2 receptor antagonisten LY255283 (höger).

Viktiga kontrollförsök visade att lipider från carrier-proteinet albumin saknade biologisk effekt på neutrofiler. Det skall även framhållas att andra akutfas-protein som CRP saknade cellbiologisk effekt. Vidare har vi kunnat påvisa att AGP/lipider från AGP orsakar ytförändringar (flödescytometri) på neutrofiler och snabbt cellulärt upptag (endocytos) av AGP (immunocyto kemi).

Sammantaget visar våra fynd att den cellbiologiska (och pro-inflammatoriska) effekten av AGP i all väsentlighet beror att HETEs molekyler. Detta projekt tillsammans med våra tidigare publicerade data pekar mot att: i) sialinsyra på AGP känns igen av SIGLEC-5 på

neutrofiler; ii) inbindning av AGP resulterar i frisättning av HETEs molekyler; iii) biologiskt tillgängligt HETEs aktiverar neutrofiler via receptorn BLT2; iv) efterföljande intracellulär signalering omfattar bl.a. Ca<sup>2+</sup> mobilisering. Vi bedömer dessa fynd varandes väsentliga och att de kan öppna upp ett nytt fönster av kunskap kring fysiologiska och patofysiologiska roller för pro-inflammatoriska/pro-aterogena arakidonsyrametaboliter och akutfas-proteinet AGP.

Genomförd forskning inom projektet har även kunnat påvisa att AGP:s aktivering av **trombocyter** (och därmed pro-trombotiska effekt) till sin helhet beror av lipider, bundna till och frisatta från, AGP. Våra fynd visar att det är en helt annan klass av lipider som ansvarar för den trombocytaktiverande förmågan. Trombocytaktivering (mätt som höjningar i cytosoliskt Ca<sup>2+</sup>, morfologisk förändring och mikroaggregation) tillskillnad mot neutrofiler var beroende av lyso-lipider så som LPA. Den primära interaktionen mellan AGP och trombocytens plasmamembran (resulterande i lipidfrisättning) har under projektets gång inte kunnat identifieras.

I den **kliniska delen** av projektet har plasma AGP analyserats hos unga frivilliga ingående i den så kallade "Lifestyle, Biomarker and Atherosclerosis" (LBA) studien. Syftet med LBA studien är att identifiera tidigaste tecken/riskfaktorerna vid atherogenes. Analys av data från 800 försökspersoner uppvisar överraskande fynd (se Tabell 1). I denna del av projektet har AGP konsekvent jämförts med akutfasproteinet CRP, då sistnämnda protein utgör (tillsammans med negativ lipoprotein-status) en betydande risk för progression av ateroskleros. Positiva korrelationer påvisades mellan fettdepåernas storlek och plasma AGP/CRP. Sambandet var särskilt starkt hos kvinnor och starkare för AGP jämfört CRP. Överraskande visade dataanalys på ett negativt samband mellan lipoproteinet HDL och AGP. Denna korrelation ses enbart hos kvinnor och påvisas inte i jämförelse mellan HDL/CRP. Således finns ett statistiskt samband mellan lågt HDL och högt AGP hos kvinnor men inte män. Slutligen visar data att kardiovaskulär aerob förmåga (maximal syreupptagningsförmåga) har negativ korrelation med plasma AGP. Även i detta fall är sambandet statistiskt säkerställt hos kvinnor men inte hos män och ses inte vid jämförelse med CRP.

Vi drar slutsatsen att AGP uppvisar statistiskt särställda samband med fysiologiska parametrar hos kvinnor och som bara delvis ses hos män. En möjlig koppling till övervikt (BMI/Body Fat %/ Waist Circumference) är att fettvävnad även är en källa för AGP biosyntes. Vidare stärker resultaten ytterligare sambanden mellan övervikt, tidiga tecken på metabolt syndrom/typ II diabetes mellitus (se t.ex. HOMA-IR) och pro-inflammatorisk risk. Slutligen visar våra data att, åtminstone hos kvinnor, kan fysisk (aerob) träning påverka plasma AGP och därmed den pro-inflammatoriska miljön.

Sammantaget visar våra studier för första gången på en molekylär/cellulär mekanism där AGP, via bundna lipider, kan aktivera både neutrofila granulocyter och trombocyter. Detta akutfas-protein tycks därmed kunna utöva både pro-inflammatoriska och pro-trombotiska effekter. Högt AGP associerar till ökade fettdepåer, insulinresistens och fysisk inaktivitet. Sambandet är särskilt uttalade hos kvinnor. Vidare har vi identifierat ett samband mellan lågt HDL och AGP som även i detta fall bara ses hos kvinnor.

**Table 1** Pearson correlation coefficient (r) between AGP and CRP respectively, and different biomarkers and lifestyle factors in women and men in the LBA study. Test subjects with CRP >10 mg/L (n=24) are excluded in the correlation analyses with CRP (n=798)

Variables	Orosomukoid				CRP			
	Women		Men		Women		Men	
	r	P	r	P	r	P	r	P
Height (cm)	-0.066	0.120	0.055	0.384	-0.053	0.215	-0.054	0.395
Weight (kg)	0.285	<0.001	0.183	<0.01	0.258	<0.001	0.140	<0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.346	<0.001	0.184	<0.01	0.318	<0.001	0.194	<0.01
Body fat (%)	0.346	<0.001	0.203	<0.01	0.292	<0.001	0.203	<0.01
Waist circumference (cm)	0.357	<0.001	0.229	<0.001	0.292	<0.001	0.169	<0.01
ApoA1 (g/L)	-0.279	<0.001	-0.075	0.232	0.078	0.067	-0.128	<0.05
ApoB (g/L)	-0.004	0.919	0.132	<0.05	0.136	<0.01	-0.019	0.766
Apokvot	0.198	<0.001	0.185	<0.01	0.086	<0.05	0.095	0.132
Glukos (mmol/L)	0.150	<0.001	0.057	0.370	0.015	0.727	-0.003	0.959
Insulin (mU/L)	0.291	<0.001	0.180	<0.01	0.239	<0.001	0.124	0.051
HOMA-IR	0.295	<0.001	0.178	<0.01	0.234	<0.001	0.118	0.067
HDL (mmol/L)	-0.245	<0.001	-0.101	0.106	-0.097	<0.05	-0.079	0.211
LDL (mmol/L)	-0.018	0.672	0.091	0.395	0.101	<0.05	-0.018	0.782
Kolesterol (mmol/L)	-0.047	0.265	0.053	0.145	0.043	0.313	-0.009	0.891
Triglycerider (mmol/L)	0.104	<0.05	0.113	0.071	0.392	<0.001	-0.021	0.737
CRP (mg/L)	0.172	<0.001	0.510	<0.001	1		1	
AGP (g/L)	1		1		0.172	<0.001	0.510	<0.001
Systolic BP (mm Hg)	0.127	<0.01	0.071	0.256	0.252	<0.001	0.007	0.911
Diastolic BP (mm Hg)	0.044	0.293	0.151	<0.05	0.186	<0.001	-0.020	0.748
MAP (mm Hg)	0.086	<0.05	0.151	<0.05	0.200	<0.001	0.027	0.671
Pulse pressure (mm Hg)	0.116	<0.01	-0.028	0.653	0.139	<0.001	-0.024	0.707
Pulse (beats/min)	0.220	<0.001	0.087	0.172	0.146	<0.01	0.095	0.143
VO <sub>2</sub> (ml/kg/min)	-0.253	<0.001	-0.099	0.115	-0.206	<0.001	-0.092	0.148
Handgrip (kg)	-0.017	0.687	-0.043	0.497	-0.038	0.377	-0.075	0.237
IMT (mm)	-0.032	0.453	-0.053	0.397	0.042	0.329	-0.017	0.792
PWV (m/s)	0.082	0.054	0.112	0.076	0.182	<0.001	0.058	0.360
Alx_HR75 (%)	0.039	0.357	0.050	<0.05	0.109	<0.05	0.023	0.716
Average sedentary/day	0.019	0.661	0.064	0.324	-0.032	0.469	-0.015	0.818
Average light/day	-0.082	0.057	0.018	0.783	-0.018	0.679	-0.021	0.746
Average moderate/day	-0.061	0.156	-0.026	0.685	-0.065	0.135	0.052	0.430
Average vigorous/day	-0.097	<0.05	0.011	0.872	-0.102	<0.05	-0.092	0.163
Average MVPA/day	-0.090	<0.05	-0.018	0.777	-0.096	<0.05	0.005	0.939
All PA/day	-0.109	<0.05	0.005	0.945	-0.063	0.150	-0.014	0.830
Steps/day	-0.117	<0.01	-0.012	0.852	-0.102	<0.05	0.008	0.907

### Genomförda insatser för att resultaten ska komma till praktisk användning

Två separata vetenskapliga manuskript är under slutlig bearbetning. Då dessa publicerats kommer vi att ge en press-release till media. Vi bedömer båda fynden som ytterst signifikanta

och att i fortsatt forskning påvisa om manifest ateroskleros respektive livsstilsinterventioner har ett kausalsamband med lipidprofiler på AGP. Detta kan reellt bidra till utveckling av framtidens diagnostik och terapi vid vår vanligaste folksjukdom

### **Publikationer, presentationer och annan spridning av projektet**

Slutlig bearbetning av två separata vetenskapliga manuskript pågår. Särskilt de basvetenskapliga fynden bedöms vara så starka (och unika) att vi prövar att publicera i en mycket välrenommerad internationell tidskrift. Resultaten så här långt har enbart presenterats i akademiska sammanhang. Vi anser att forskningsdata först skall publiceras i vetenskapliga tidskrifter (efter granskning av internationell expertis) innan resultaten förmedlas till media och presenteras i allmänna sammanhang. Det kan dock framhållas att ledande forskare inom fältet som tagit del av fynden bedömer resultaten som anmärkningsvärda. Vi vill även framhålla indikationen från den kliniska delen i projektet: livsstilsinterventioner skulle kunna påverka de inflammatoriska mekanismer vi kartlagt.