

A FETUIN-A SZEREPE ÉS INTERAKCIÓI MÁJ- ÉS KARDIOVASZKULÁRIS BETEGSÉGEKBEN

Doktori tézisek

Dr. Vörös Krisztián Szabolcs

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kalabay László, egyetemi tanár, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Lengyel Gabriella, egyetemi docens, PhD

Dr. Nagy György, egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Somogyi Anikó, egyetemi tanár, DsC

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pánczél Pál, egyetemi tanár, PhD

Dr. Réthy Lajos Attila, tudományos
szaktanácsadó, PhD

Budapest

2014

Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek a legtöbb országban a mortalitás és morbiditás vezető okai. Az új biomarkerek vizsgálata segíti az atherosclerosis folyamatának megértését, a mortalitás előrejelzését és új terápiás lehetőségek megtalálását. Az egyes molekulák prediktív értéke azonban sok vizsgálatban szerénynek bizonyult. Az egyes biomarkerekből képzett hányadosok vizsgálata ellenben hasznosnak bizonyulhat.

A fetuin-A az érlemezés több rizikótényezőjével, így az elhízással és diabétesszel és a metabolikus szindrómával is pozitívan korrelál. Az összefüggés hátterében a molekula speciális tulajdonságai állnak. A fetuin-A az inzulinreceptor aktivációját gátolja. Emelkedett szérumszintje elhízáshoz és a máj steatosisához vezet, szabad zsírsavakkal kapcsolódva a zsírszövet inzulinrezisztenciáját és inflammációját okozza. Gátolja az adiponektin termelődését. Azonban a fetuin-A negatív akut fázis fehérje is, emellett a szöveti kalcifikáció természetes gátló molekulája. Alacsony szintje így kialakulhat az érlemezés kíséretében szubklinikus gyulladás következtében, illetve alacsony szintje esetén az erek kalcifikációja felgyorsulhat. Az ellentmondásos biológiai hatások nehezítik a fetuin-A szerepének megítélését kardiovaszkuláris betegségekben. Az eddigi vizsgálatok a különböző atheroscleroticus betegségekben ellentmondásos eredményeket hoztak, különösen előrehaladott érlemezés esetén. Az anamnézisben szereplő miokardiális infarktus az atherosclerosis kemény végpontjának tekinthető, az érlemezés klinikai jelentőségét egyértelművé teszi. A posztinfarktusos betegek vizsgálata segítheti a fetuin-A szerepének pontosítását atherosclerosisban.

A ghrelinnek számos kardioprotektív tulajdonsága ismert, de atherosclerosisban szenvedő betegek vizsgálat során az eredmények ellentmondásosnak bizonyultak. A szénhidrát-anyagcserében szerepe még nem pontosan tisztázott. Cukorbetegség és kardiovaszkuláris betegségek együttes fennállása esetén koncentrációját, kapcsolatát más adipokinekkal még nem vizsgálták.

Az egyes adipokinekből képzett hányadosokkal kapcsolatban kevés adat áll rendelkezésre. A kombinációban vizsgált molekulák kiválasztása legtöbbször az adott kutatócsoport profiljának megfelelően történt, nem pedig alapos statisztikai elemzést és mérlegelést követően.

A fetuin-A a májban termelődő glikoprotein, így májbetegségekben diagnosztikai alkalmazása is felmerül. Korábban kutatócsoportunk alacsonyabb glikoprotein koncentrációt talált több májbetegségben is. Alkoholos májcirrhosisban a rövidtávú túlélés független

prediktorának találtuk. A hosszabb távú túlélés megítélésében játszott szerepe, kapcsolata a mortalitás megítélésére szolgáló pontrendszerekkel nem tisztázott.

Wilson-kórban a májérintettség gyakori, azonban a cirrhosis ritkább, mint alkoholos májbetegségben. A májzsugor azonban sokszor alattomosan alakul ki. A fetuin-A eltérését Wilson-kórban még nem vizsgálták, változása májérintettséggel, cirrhosisal szövődött Wilson-kórban nem ismert.

Célkitűzések

1. Előrehaladott atherosclerosisban a szérum fetuin-A csökkent és emelkedett szintjét is kövölték. A fetuin-A szintje az életkorral párhuzamosan csökken. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a 60 évnél idősebb, nem ideális anyagcsere helyzetű, szívinfarktust túlélte páciensekben a szérum fetuin-A szintje emelkedett-e.
2. A fetuin-A negatív akutfázis fehérje és számos kóros anyagcsere folyamatban játszik szerepet. Célunk volt annak tisztázása, hogy a fetuin-A interakciói a metabolizmust befolyásoló adipokinekkal szorosabbak, vagy a szubklinikus gyulladás markereivel. Elemezni kívántuk ezért a molekula kapcsolatát az adiponektinnel és a leptinnel, illetve a CRP-vel, a TNF- α -val és a rezisztinnel.
3. A szérum ghrelin szint eltérése kardiovaszkuláris betegségekben még nem pontosan ismert. Tisztázni kívántuk, hogy az infarktust kiállott betegekben a szérum ghrelin szintje csökkent, vagy emelkedett.
4. Posztinfarktusos betegekben a szérum ghrelin és a peptid szintjét befolyásoló molekulák kapcsolatát még nem vizsgálták. Elemezni kívántuk a ghrelin szint összefüggését más anyagcsere markerekkel: az inzulinnal (szénhidrát anyagcsere), a leptinnel (energiaháztartás), az adiponektinnel és a fetuin-A-val (zsírmáj, cukor és zsíryanycsere), valamint a TNF- α -val és rezisztinnel (szubklinikus gyulladás). A vizsgálatba számos 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegek vontunk be, hogy megítélhessük a ghrelin kapcsolatát a szérum inzulin és glükóz szinttel koszorúér-betegségben.
5. Az egyes molekulák elemzése ritkán javítja jelentősen a kardiovaszkuláris kockázat előrejelzését, ezért hasznos lehet bizonyos molekula-hányadosok vizsgálata. Célul tűztük ki olyan molekula-hányados azonosítását, mely hatékonyan különíti el a kontroll személyeket a betegektől.

6. A szérumban a fetuin-A koncentrációjának májbetegségekben történő vizsgálata során elsődleges célunk annak megállapítása volt, hogy a fetuin-A alkalmas-e az alkoholos cirrhosisban szenvedő betegek hosszútávú prognózisának előrejelzésére.
7. Elemezni kívántuk a prediktív értékét az elterjedten használt pontszámok (Child-Pugh és MELD) hatékonyságához viszonyítva. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a fetuin-A koncentráció kombinálása a fenti pontszámokkal a prognózis pontosabb megítélését lehetővé teszi-e.
8. A fetuin-A a májszintetizáló képességének jellemzője és egyben negatív akutfázis fehérje. Tisztázni kívántuk, hogy mely tulajdonsága játszik fontosabb szerepet az alkoholos májzsugorban.
9. Célunk volt annak vizsgálata, hogy a szérumban a fetuin-A szint alacsonyabb-e Wilson-kóros betegekben, különösen, ha májérintettség is megfigyelhető. Vizsgálni kívántuk, hogy a Wilson-kórban megfigyelhető-e összefüggés a szérumban a fetuin-A szint és a betegség súlyosságát jellemző Nazarscore között, illetve, hogy az alacsony fetuin-A szint alkalmas-e a cirrhotikus esetek azonosítására. Célul tűztük ki továbbá a H1069Q mutáció esetleges kapcsolatának elemzését a fetuin-A koncentrációval.

Betegek és vizsgálati módszerek

Betegek

Infarktust túlélő betegek

A beválasztást megelőző 6-24 hónapban infarktust túlélő betegeket vontunk be (120 férfi, 51 nő, átlagéletkor: 62 ± 6 év, átlag \pm SD). A diagnózis felállítása a panaszokon, az EKG eltéréseken és a troponin emelkedésen alapult, csak STEMI eseteket vontunk be. A kizárási kritériumok az alábbiak voltak: akut fertőzés klinikai vagy laboratóriumi jelei, aktív malignus daganat (a megelőző öt évben propagáció vagy onkológiai kezelés), a nem alkoholos zsírmáj kivételével a májbetegségek, veseelégtelenség (60 ml/min alatti eGFR), immunszuppresszió, illetve egyéb súlyos lefolyású kórkép (stroke, trauma, sebészeti beavatkozás). A diabetes diagnózisát az aktuális ajánlások alapján állítottuk fel (éhomi vércukorszint $\geq 7,0 \text{ mmol/l}$ vagy az orális glukóz tolerancia teszt $\geq 11,1 \text{ mmol/l}$). A diabeteses betegek mindegyike 2-es típusú volt, kezelésük diétával, metforminnal és bedtime inzulinnal történt. Elhízottnak 30 kg/m^2 feletti BMI esetén tekintettük a betegeket. A posztinfarktuszos betegek 65%-a szedett sztatint, 70%-uk aszpirint. A kontroll csoportot 81 életkor szerint illesztett, kardiovaszkuláris betegségtől mentes személy alkotta.

Májbetegek

Kilencvenhárom alkoholos májcirrhosisban szenvedő beteg adatait elemeztük (52 férfi, 41 nő, átlagéletkor: 54 ± 13 év, átlag \pm SD). Az anamnézisen és a megfelelő klinikai tüneteken túl a diagnózist hasi ultrahang és hasi CT vizsgálattal igazoltuk. Etikai okokból májbiopsziát nem végeztünk. A kizárási kritériumok a következők voltak: vírusos májgyulladás (HBsAg és anti-HCV pozitivitás), autoimmun hepatitis (antinukleáris és simaizomellenes antitest pozitivitás), májrák (az anamnézis vagy a rutin gondozás során végzett vizsgálatok alapján) és hepatotoxikus gyógyszerek szedése (melyek leiratában a májkárosodás a „nagyon gyakori”, „gyakori” vagy „nem gyakori” kategóriákban szerepelt). Vértétel a bevásárlásakor és az első, harmadik, hatodik és tizenkettedik hónapban történt. A betegek tüneti terápiában (diuretikumok, β -blokkoló) részesültek. A MELD pontszámot Kamath és mtasai képlete alapján számoltuk, ezen kívül a Child-Pugh pontszámot állapítottuk meg a betegeknél. A Wilson-kóros betegek adatait feldolgozó vizsgálatunkba 50 gondozott pácienszt vontunk be. A betegek között 29 férfi, 21 nő volt, életkoruk $33,6 \pm 12,4$ év volt (átlag \pm SD), betegségük $11,4 \pm 7,1$ éve állt fenn. Májérintettség gyanúja esetén a betegeknél korábban májbiopszia is történt. A páciensek az I. Sz. Belgyógyászati Klinika Hepatológiai Szakrendelésén álltak gondozás alatt és d-penicillinamin kezelésben részesültek. A kizárási kritériumok a következők voltak: vírusos hepatitis (HBsAg vagy anti-HCV pozitivitás), autoimmun hepatitis (antinukleáris vagy simaizom ellenes antitest pozitivitás), primer májrák vagy májtoxikus gyógyszer szedése. A kontroll csoportot 51 (26 férfi és 25 nő) egészséges, életkor szerint illesztett személy adta (életkor: 35 ± 8 év).

Laboratóriumi módszerek

A szérumban fetuin-A koncentráció meghatározása

A fetuin-A szint meghatározására radiális immunodiffúziót használtunk. Röviden összefoglalva, a betegek 1:4 arányban hígított 5 μ l szérumbat vittük fel 11,5 ml Litexagaróz géltre (Sigma). Ismert koncentrációjú, 1:4 arányban hígított szérumbat minták szolgáltattak standardként. A minták felvitelét 48 órás inkubáció követte szobahőmérsékleten. Az immunodiffúzióhoz IncstarIgG frakciójú anti-fetuin-A antitestet használtunk 84 μ l/11,5 ml gél koncentrációban (Cat No. 81931). Az intra- (IACV) és interassay koefficiens eltérés (IECV) 4,11% és 4,85% volt.

További laboratóriumi mérések

A szérumban a ghrelin szint meghatározása a 3-as szerinenaciláltpeptidre specifikus radioimmunassay-jel történt (Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA, Cat. No. GHRA-88HK, szenzitivitás: 10 pg/ml, specificitás: 100% a human ghrelinre, intra-assay variancia [IACV%]: 7,425%, interassayvariancia [IECV%]: 13,45%).

Az adiponektin szint meghatározása radioimmunassay-jel történt (Linco Research, St. Charles, MO, IACV: 3,6%, IECV: 8,47%). A szérumban a rezisztin (Linco Research Inc., Resistin ELISA kit, Cat. No. EZHR-95K, szenzitivitás: 0,16 ng/ml, specificitás: humán rezisztin 100%, IACV: 4,0%, IECV: 7,0%), TNF- α (Sigma, St. Louis, MI, USA, IACV: 4,8%, IECV: 6,7%) és leptin (DRG International, Mountinside, NJ, USA, IACV: 4,6%, IECV: 6,6%) szintet ELISA-val mértük. A C-reaktív protein koncentráció meghatározása particle-enhanced immunoturbidimetriás assay (Roche Cobas Integra 4000) használatával történt. Az assay érzékelési határa 0,07 mg/l, a variációs koefficiens a 108 mg/l átlagértéknél 3,9% volt. Az egyéb változók mérése rutin laboratóriumi módszerekkel történt.

A szérumban a α 2-makroglobulin, transferrin, haptoglobin és az orozomukoid szint mérésekor szintén radiális immundiffúziót alkalmaztunk.

A szérumban a cöruoplazmin meghatározása immunturbidimetriás vizsgálattal történt (Tinaquant Ceruloplasmin; Roche, Indianapolis, IN, USA), míg a szérumban a réz mérésére abszorpciós fotometriás módszert használtunk (Merckotest, Diagnostica Merck, Darmstadt, Germany).

A vörösvérsejt-süllyedés, hematocrit, hemoglobin, fehérvérsejtszám, granulocita és trombocitaszám, szérumban a bilirubin, aszpartát-aminotranszferáz, alanin-aminotranszferáz, alkalikus foszfatáz, INR, C-reaktív protein, összfehérje és albumin koncentráció meghatározása rutin laboratóriumi módszerekkel történt.

Statisztikai elemzés

A kétmintás adatokat Mann-Whitney U teszttel, a páros adatokat pedig a Wilcoxon teszttel elemeztük. A többmintás adatokat összehasonlítására Kruskal-Wallis-tesztet alkalmaztunk. A korrelációkat Spearman féle rang korrelációval, illetve parciális korrelációval vizsgáltuk. A kontingenciatablák elemzésére a Fisher és khi-négyzet tesztet használtuk. A többváltozós analízis során lineáris illetve logisztikus regressziót alkalmaztunk. A betegek túlélését Kaplan-Meier teszttel és halandósági tábla készítésével értékeltük. Az optimális vágópont megtalálására ROC analízist végeztünk.

Az adipokinek kombinált alkalmazásának vizsgálatára a molekulák közötti kapcsolat erősségét részben a korrelációk vizsgálatával, részben faktor analízissel elemeztük. A beteg és kontroll csoport közötti adipokin eltérések és azok erősségének vizsgálatára diszkriminancia analízist végeztünk. Az adipokinek kombinált alkalmazásához olyan molekulapárt érdemes választani mely tagjai egymással gyengén korrelálnak, így a faktor analízis során külön csoportba kerülnek. A molekulák kiválasztásánál fontos szempont, hogy az atherosclerosisban szenvedő betegek és a kontroll csoport értékei markánsan eltérjenek – tehát a molekulák a diszkriminancia analízis során erős elkülönítő értékkel bírjanak.

A statisztika analízis során az SPSS szoftvert használtuk (SPSS Software, IBM, Armonk, New York, USA). A 0,05 alatti p értéket, májbetegség esetén a 0,01 alatti tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A fetuin-A koncentráció vizsgálata infarktust túlélő betegekben

A betegek fetuin-A szintje szignifikánsan magasabb volt a kontroll személyekénél ($619 \pm 96 \mu\text{g/ml}$ vs. $673 \pm 103 \mu\text{g/ml}$, átlag \pm SD, $p < 0,001$). A férfiak és nők fetuin-A szintje között nem volt szignifikáns különbség sem a kontroll személyek ($p = 0,617$), sem a betegek esetében ($p = 0,328$).

A betegek között 49 elhízott és 53 diabeteses személy fordult elő. A fetuin-A szint korrelált a BMI-vel ($r = 0,342$, $p = 0,035$). Az elhízott betegek fetuin-A szintje – nem szignifikáns mértékben – emelkedett volt a nem obese betegekhez viszonyítva ($686 \pm 102 \mu\text{g/ml}$, $n = 49$, vs. $668 \pm 104 \mu\text{g/ml}$, $n = 122$, $p = 0,109$). A diabeteses betegek esetében hasonló összefüggést figyeltünk meg: nem szignifikáns mértékben, de a cukorbeteg posztinfarktusos személyek fetuin-A szintje is magasabb volt a nem cukorbeteg posztinfarktusos betegekénél ($680 \pm 108 \mu\text{g/ml}$, $n = 53$ vs. $670 \pm 101 \mu\text{g/ml}$, $n = 118$, $p = 0,371$). A fetuin-A mind az obezításban, mind a diabetes kialakulásában szerepet játszik, ezért megvizsgáltuk, hogy a nem elhízott, nem diabeteses betegek szérumban fetuin-A szintje hogyan viszonyul a kontroll személyekéhez. Túlsúlyos betegek így továbbra is szerepeltek mind a betegek, mind a kontroll személyek között. A nem elhízott, cukorbetegségben nem szenvedő páciensek fetuin-A szintje is szignifikánsan magasabb volt a kontroll személyekénél (619 ± 96 vs. 667 ± 101 , $p = 0,002$). A betegek adiponektin szintje alacsonyabb volt a kontroll személyekénél ($12,77 \pm 3,15 \mu\text{g/ml}$ vs. $9,04 \pm 4,31 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$). Az adiponektin és a fetuin-A között negatív korrelációt figyeltünk meg ($r = -0,236$, $p = 0,006$). Mivel az adiponektin is korrelált a BMI-vel ($r = 0,181$,

$p = 0,018$), a két változó közötti kapcsolatot BMI-re korrigált parciális korrelációval is megvizsgáltuk. A fetuin-A és az adiponektin közötti összefüggés így is szignifikánsnak bizonyult ($r = 0,177$, $p = 0,043$). A többváltozós elemzésben vizsgáltuk, hogy mely molekulák kapcsolata független az adiponektinnel. A modell az életkort, a BMI-t, a fetuin-A-t, a leptint, a rezisztint és a TNF- α -t tartalmazta. A többváltozós analízis igazolta, hogy a fetuin-A szint, a BMI mellett, az adiponektin szint független meghatározója ($R^2: 0,203$, $p < 0,001$, BMI (β): $-0,131$, $p = 0,001$, fetuin-A: $-0,094$, $p = 0,014$).

A szérumban leptin szint is emelkedett volt posztinfarktusos betegekben ($12,17 \pm 9,16$ ng/ml vs. $31,89 \pm 18,36$ ng/ml, $p < 0,001$) és korrelált a BMI-vel ($r = 0,265$, $p = 0,022$). A fetuin-A szint korrelált a leptin szinttel, de az összefüggés a BMI-re történő korrigálás után már nem volt szignifikáns ($r = 0,209$, $p = 0,072$).

A TNF- α és CRP szint emelkedett volt a posztinfarktusos betegek körében (rendre: $4,07 \pm 0,24$ vs. $6,13 \pm 1,77$ pg/ml, $p < 0,001$, illetve $1,95 \pm 1,43$ vs. $4,04 \pm 3,98$ mg/l, $p = <0,001$). A fetuin-A szint azonban nem korrelált egyik citokinnel sem. Megvizsgáltuk, hogy a gyulladásban központi szerepet betöltő TNF- α szérumban szintjét mely változók határozzák meg. A fetuin-A a többváltozós elemzésben sem mutatott kapcsolatot a TNF- α -val, hasonlóan az életkorhoz, illetve a leptin és az adiponektin szinthez. A TNF- α szinttel a BMI és a rezisztin szint állt szignifikáns kapcsolatban az analízisben ($R^2: 0,227$, $p < 0,001$, BMI (β): $0,087$, $p = 0,005$, rezisztin: $0,110$, $p < 0,001$).

A ghrelin szint vizsgálata infarktust túlélte betegekben

Az infarktuson átesett betegek szérumban ghrelin szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll személyekéhez viszonyítva ($240,55 \pm 59,33$ vs. $337,96 \pm 30,75$ pg/ml, átlag \pm SD, $p < 0,001$). A férfiak és nők ghrelin szintje között nem volt szignifikáns különbség sem a kontroll személyek ($p = 0,911$), sem a betegek esetében ($p = 0,371$).

Az obezitás és a diabetes ismertén alacsonyabb szérumban ghrelin szinttel jár, így ezen betegségek zavaró hatásának kizárása céljából összehasonlítottuk a kontroll személyek ghrelin szintjét a nem obez, nem diabeteses betegek adataival. A betegek szérumban ghrelin szintje az elhízott és diabeteses betegek kizárása után is alacsonyabb volt a kontroll személyek szérumban ghrelin koncentrációjánál ($240,63 \pm 54,08$; $n = 88$ vs. $337,96 \pm 30,75$; $n = 81$, $p < 0,001$). A diabeteses betegek szérumban inzulin szintje emelkedett volt a diabetesben nem szenvedő betegekéhez viszonyítva ($28,30 \pm 16,30$ μ U/ml; $n = 53$ vs. $21,68 \pm 14,80$; $n = 118$, $p = 0,008$), de ezt az eltérést nem kísérte a ghrelin szint szignifikáns különbsége a két csoport között ($231,06 \pm 52,9$ vs. $244,81 \pm 61,7$; $p = 0,154$).

A szérumban ghrelin és az éhomi vércukor szint között nem volt szignifikáns korreláció, az egyváltozós regresszió során a ghrelin nem bizonyult a vércukorszint meghatározójának ($R^2 = 0,003$, $\beta = -0,057$; $p = 0,459$).

A szérumban ghrelin és inzulin szint között találtak a legszorosabb korrelációt, a BMI-re és nemre történő korrekciót követően is ($r = -0,369$, $p < 0,001$; Part. korr. = $-0,270$, $p = 0,001$). A diabetesesek csoportjában azonban nem volt szignifikáns korreláció a két változó között.

A ghrelin és adiponektin közötti korreláció gyengült ($r = 0,307$, $p < 0,001$; Part. korr. = $0,280$, $p = 0,001$), a ghrelin és rezisztin közötti kapcsolat pedig már nem volt szignifikáns a testsúlyra és nemre történő igazítást követően ($r = 0,178$, $p = 0,02$; Part. korr. = $-0,085$, $p = 0,317$). A szérumban ghrelin szint nem korrelált a fetuin-A, leptin, TNF- α és szérumban lipid szintekkel.

Többváltozós analízissel elemeztük, hogy mely laborparaméterek határozzák meg a szérumban ghrelin szintet. Az inzulin és adiponektin szint a ghrelin koncentráció független meghatározóinak bizonyult ($R^2 = 0,199$; $p < 0,001$, inzulin (β): $-0,327$, $p < 0,001$, adiponektin: $0,301$, $p < 0,001$). A modell a következő paramétereket foglalta magában: életkor, a nem, a BMI, az éhomi vércukor, inzulin, triglicerid, HDL-koleszterin, adiponektin, rezisztin, leptin, TNF- α és fetuin-A koncentráció.

Az adipokinek kombinált alkalmazásának vizsgálata, a TNF- α / ghrelin hányados jelentősége

A vizsgált molekulák között a leggyengébb korrelációt a ghrelin és a TNF- α között találtak ($r = 0,017$, NS).

A faktor analízis során főkomponens analízis módszert, direkt oblimin rotációval alkalmaztunk. A KMO érték nem érte el a 0,5-öt (0,486) valószínűleg a viszonylag alacsony esetszám és a kardiovaszkuláris betegségek kialakulását befolyásoló számos egyéb tényező miatt. A Bartlett-féle sfericitási teszt azonban szignifikáns volt.

Az analízis 5 csoportot írt le, melyeken belül a biomarkerek egymással szorosabb összefüggést mutattak. Az 1-es csoportot „Gyulladásos faktor”-nak neveztük el, mivel az alábbi molekulák faktorterhelése volt magas: TNF- α , CRP és rezisztin (0,861; 0,765; 0,649). A 2-es és 3-as csoportokban a különböző vérzsír összetevők domináltak, ezt a két csoportot „Lipid 1” és „Lipid 2 faktor”-nak kereszteltük el. A 2-es csoport esetében a triglicerid, az összkoleszterin és a BMI, a 3-as csoport esetében az összkoleszterin, a HDL-koleszterin és a BMI súly volt magas (0,790; 0,660; 0,483; illetve 0,591; 0,817; 0,536). A 4. csoportot „Metabolikus faktor”-nak neveztük, a magas fetuin-A, adiponektin és leptin terhelés alapján

(0,680; 0,609; 0,526). Az 5. csoportot „Ghrelin faktor”-nak neveztük, mivel az inzulin és az adiponektin mellett a ghrelin faktorterhelése volt legmagasabb (0,881; 0,600; 0,437).

A diszkriminancia analízis során megvizsgáltuk, hogy a ghrelin, adiponektin, leptin, fetuin-A, rezisztin és a TNF- α milyen prediktív értékkel különíti el a betegeket a kontroll személyektől. Ezen molekulák a csoportok közötti eltérés 57,5%-át magyarázták (kanonikus korreláció: 0,758; Wilks féle lambda 0,426, $p < 0,001$). A keresztvalidáció során a klasszifikáció azt mutatta, hogy az egyedek 90,1%-a megfelelő csoportba lett besorolva (a kontroll személyek 100%-a, és a betegek 85,4%-a). A struktúra mátrix elemzése alapján a csoportba sorolás legerősebb tényezője a ghrelin volt (0,760), majd a TNF- α következett (-0,569). Csak ezen két molekula használatával a betegek és kontroll személyek 89,7%-a helyesen csoportosítható volt.

A korrelációk, a faktor analízis és a diszkriminancia analízis eredményei alapján a továbbiakban a TNF- α /ghrelin hányadost vizsgáltuk. A betegek TNF- α /ghrelin hányadosa szignifikánsan magasabbnak bizonyult (Mann-Whitney teszt, $p < 0,001$). A TNF- α / ghrelin hányados értékben úgy húztuk meg a határt, hogy az összes kontroll személy egy csoportba kerüljön, hányadosuk a határértéknél alacsonyabb legyen (0,014286). A 171 infarktuson átesett beteg közül 165-nek (96,5%) ennél magasabb volt a TNF- α / ghrelin hányadosa, és a posztinfarktusos betegek közül csak hatan kerültek a kontroll személyek csoportjába. A χ^2 teszt szignifikáns kapcsolatot mutatott a TNF- α / ghrelin hányados és a között, hogy a vizsgálat alanyai a betegek csoportjába tartoztak-e ($\chi^2(1) = 215,6$, $p < 0,001$). A hatás-nagyság 0,932 volt. A magas TNF- α / ghrelin hányadosú alanyoknak 11,25-ször magasabb esélye volt arra, hogy a betegek (és ne a kontroll személyek) közé tartozzanak (95% CI.: 5,80-21,80). A TNF- α / ghrelin hányados tehát nagyon hatékonyan különítette el a betegeket a kontroll személyektől.

A fetuin-A koncentráció prediktív szerepe alkoholos májzsugorban

Az egyéves követés során a 93 alkoholos májcirrhosisban szenvedő beteg közül negyvenegyen haltak meg. A továbbiakban a májelégtelenség következtében elhunyt 37 beteg adatait elemeztük. A túlélő betegekhez viszonyítva a májelégtelenség következtében meghalt betegeknek szignifikánsan alacsonyabb volt a hematokritja, az albumin, TF és fetuin-A szintje. A kreatinin, bilirubin, INR, valamint a CP és MELD pontszám szignifikánsan emelkedett volt. A fetuin-A koncentráció pozitívan korrelált a hematokrittal ($r = 0,406$, $p = 0,001$), az albuminnal ($r = 0,366$, $p = 0,002$) és a transferrinnel ($r = 0,529$, $p < 0,001$). Negatív korrelációt figyeltünk meg a fetuin-A és a szérum kreatinin ($r = -0,312$, $p = 0,006$), az

INR ($r = -0,467$, $p < 0,001$), a CRP ($r = -0,405$, $p = 0,001$) szint, valamint a MELD ($r = -0,342$, $p = 0,001$) és a CP pontszám között ($r = -0,522$, $p < 0,001$).

A fetuin-A szint hatékonyságának vizsgálata és az ideális vágópont megtalálása céljából ROC analízist végeztünk. Az analízis alapján a 365 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentráció bizonyult optimálisnak. Ennél az értéknél a görbe alatti terület a vizsgált paraméterek közül a legmagasabb volt ($0,937 \pm 0,025$; $p < 0,001$; 95% CI.: 0,889 – 0,986). A 365 $\mu\text{g/ml}$ -nél alacsonyabb fetuin-A szintű betegek többsége (35/32) elhunyt az egyéves követés során, míg az ennél magasabb fetuin-A koncentrációjú 54 páciens közül csak öten haltak meg. A 365 $\mu\text{g/ml}$ -nél alacsonyabb fetuin-A szintű betegek halálzásának relatív kockázata így 9,874-szernagyobb volt a magasabb fetuin-A koncentrációjú betegekéhez képest (95% C.I.: 4,258 – 22,898, $p < 0,001$).

A Kaplan-Meier analízis alapján a 365 $\mu\text{g/ml}$ -nél alacsonyabb szérumszintű betegek átlagos túlélése 3 ± 1 hónap volt (átlag \pm SE., 95% CI.: 2 – 4), míg az ennél magasabb szérumszintű betegek esetében 11 ± 1 hónap volt (95% CI.: 11 – 12; $p < 0,001$).

A fetuin-A szint a májelégtelenségben meghalt és a túlélő betegek között több más paraméterrel együtt szignifikánsan eltért, illetve több vizsgált laboratóriumi értékkel szignifikánsan korrelált. Logisztikus regressziót alkalmaztunk annak megítélésére, hogy a két csoport között szignifikánsan eltérő paraméterek közül melyek tekinthetők a mortalitás független előrejelzőinek. A modellbe a meghaltak és túléltek között az egyváltozós analízis során szignifikánsan eltérő változók kerültek be (hematokrit, albumin, transzferrin, kreatinin, INR, MELD pontszám, fetuin-A). Tekintettel arra, hogy a MELD pontszám tartalmazza a kreatinin és INR változókat, így a pontszámot tartalmazó modellt vizsgáltuk. Ezen egyenlet illeszkedése szignifikáns volt (0,015). Az alacsony fetuin-A szint – egyetlen változóként – az egyéves mortalitás független prediktorának bizonyult (OR: 58,82, 95% C.I.: 3,703 - 950,8, $p = 0,004$).

Összevetettük a fetuin-A szint valamint a MELD és CP pontszámok hatékonyságát az egyéves mortalitás előrejelzésében. Az irodalmi adatok alapján vágópontnak a MELD score esetében a transzplantáció indikáció során használt 20 pontot, a CP score esetében a 10 pontot tekintettük, a fetuin-A esetében a 365 $\mu\text{g/ml}$ -t.

A ROC analízis során a görbe alatti terület a fetuin-A szint esetében meghaladta a MELD és CP score-ok értékét (AUC \pm SD (95% C.I.): $0,937 \pm 0,025$ (0,889 - 0,986) vs. $0,739 \pm 0,052$ (0,637 - 0,871) vs. $0,865 \pm 0,040$ (0,787 - 0,943), $p < 0,001$ mindhárom változónál). A szérumszintű fetuin-A koncentráció szenzitivitása és specificitása is meghaladta a két pontrendszer hasonló értékeit ($0,865$ vs. $0,595$ vs. $0,753$ illetve $0,942$ vs. $0,729$ vs. $0,827$). A halálozás relatív rizikója emelkedett volt magas MELD és CP pontszám esetén is (RR (95% C.I.) 2,205 (1,318

- 3,689), $p = 0,002$, illetve 3,878 (1,998 - 7,527), $p < 0,001$), de az alacsony fetuin-A koncentrációjú betegek kockázata volt messze a legmagasabb (9,874 (4,258 - 22,898), $p < 0,001$).

A MELD pontszám és a fetuin-A koncentráció kombinált alkalmazása javította a mortalitás előrejelzését. A 20 felett MELD pontszámú és a 365 $\mu\text{g/ml}$ -nél alacsonyabb fetuin-A koncentrációjú betegek esetében a prognózis rosszabb volt, mint külön-külön vizsgálva a fenti tényezőket. Ezen betegekben az átlagos túlélés 2 ± 1 hónap volt (95% CI.: 1 – 3 hónap, log rank analízis: $p < 0,001$).

A fetuin-A-ról korábban munkacsoportunk igazolta, hogy a rövidtávú túlélés független előrejelzője. Elemeztük ezért, hogy az egyéves túlélés vizsgálatának eredményeit mennyire befolyásolják az első hónap során bekövetkező halálesetek. Az első hónapban elhalálozott betegek adatai nélkül megismételt elemzés során az egyéves mortalitás előrejelzésében a fetuin-A prediktív értéke nem változott.

A vizsgálat során 6 betegben alakult ki alkoholos hepatitis. Az ő szérum fetuin-A szintjük azonban nem különbözött szignifikánsan a többi beteg fetuin-A koncentrációjától (405 ± 85 $\mu\text{g/ml}$, $n = 6$ vs. $434 \pm \mu\text{g/ml}$, $n = 83$, $p = 0,447$).

További négy betegben zajlott interkurrens fertőzés. Az infekciót megelőző és követő vérvétel eredményei között nem volt szignifikáns különbség (445 ± 126 $\mu\text{g/ml}$ vs. 475 ± 171 $\mu\text{g/ml}$, Wilcoxon teszt, $p = 0,465$).

A betegek közül heten továbbra is fogyasztottak az alkoholt. Az ő fetuin-A szintjük szignifikánsan alacsonyabb volt az absztinens betegek szérum koncentrációjához képest (259 ± 97 $\mu\text{g/ml}$, $n = 7$ vs. 418 ± 129 $\mu\text{g/ml}$, $n = 82$, $p = 0,003$). A mortalitás azonban ebben a csoportban sem tért el az absztinens betegektől a szérum fetuin-A koncentráció vonatkozásában. A 7 beteg közül hat meghalt, az egyetlen túlélő szérum fetuin-A szintje magasabb volt, mint 365 $\mu\text{g/ml}$.

A szérum fetuin-A szint nem változott jelentősen az egyes betegekben a követés során. A vizsgálat végén életben lévő betegeket ($n = 75$) kezdeti fetuin-A szintjük alapján négy kvartilisbe soroltuk. A követés során az átlag fetuin-A koncentráció enyhén emelkedett, mivel az alacsony fetuin-A szintű betegek mortalitása volt magasabb. A sok haláleset miatt a legalacsonyabb kvartilisú betegek esetében az emelkedés szignifikáns volt (Wilcoxon teszt, $p = 0,022$), de még ebben a csoportban is a kezdeti érték tartományába esett az 1 éves követés végén a fetuin-A szint.

A szérum fetuin-A koncentráció meghatározásának jelentősége Wilson-kórban

Az egészséges kontroll személyekhez viszonyítva a Wilson-kórban szenvedő betegek fetuin-A szintje nem tért el szignifikánsan ($605 \pm 88 \mu\text{g/ml}$ vs. 598 ± 148 , $p = 0,419$). A májérintettségben szenvedő és attól mentes Wilson-kóros betegek fetuin-A koncentrációjában sem találtunk szignifikáns eltérést (622 ± 154 , $n = 16$ vs. 562 ± 138 , $n = 34$, $p = 0,126$).

A cirrhosisban szenvedő Wilson-kóros betegek körében azonban a fetuin-A szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a cirrhosistól mentes páciensekhez képest (491 ± 58 , $n = 10$ vs. 631 ± 154 , $n = 40$, $p = 0,013$).

Megvizsgáltuk, hogy a májbetegségben szenvedő Wilson-kóros betegek csoportján belül mely paraméterek segíthetik a cirrhosisos betegek azonosítását. Szignifikáns eltérést az összfehérje (78 ± 5 vs. $73 \pm 2 \text{ g/l}$; $p = 0,023$) és kifejezettebb formában a fetuin-A esetében találtunk (676 ± 149 vs. $491 \pm 58 \mu\text{g/ml}$; $p = 0,001$).

A betegek körében a fetuin-A szint pozitívan korrelált a máj fehérje-szintetizáló működését jellemző összfehérje szinttel ($r = 0,437$; $p = 0,01$). Negatív korrelációt találtunk az életkorral ($r = -0,334$; $p = 0,018$) és a betegség fennállási idejével ($r = -0,390$; $p = 0,006$). Amennyiben csak a májérintettségben is szenvedő Wilson-kóros betegek körében vizsgáltuk a korrelációt, szorosabb összefüggéseket kaptunk (összfehérje: $r = 0,685$; $p < 0,001$; életkor: $r = -0,394$; $p = 0,02$; betegség fennállási ideje: $r = -0,471$; $p = 0,005$).

A májkárosodás mértéke alapján a Nazar pontrendszer segít a prognózis megítélését.

Elemeztük a fetuin-A és a Nazarscore kapcsolatát, hogy közvetve lássuk összefügghet-e a fetuin-A szérum szintje a prognózissal. Kifejezett májkárosodás – magas Nazar pontszám – kevés betegben fordult elő a statisztikai analízishez. Ezért a közepes és súlyos májkárosodásban szenvedő betegeket (Nazarscore: 1-4) összevontuk egy csoportba, és összehasonlítottuk a májérintettséggel bíró, de súlyosabb májkárosodásban nem szenvedő betegekkel (Nazarscore: 0). Az emelkedett Nazarscore szignifikánsan alacsonyabb fetuin-A szinttel társult (661 ± 148 vs. $485 \pm 28 \mu\text{g/ml}$; $p = 0,006$).

A fetuin-A koncentráció a súlyos májkárosodás és a májcirrhosis szempontjából hasznos paraméternek bizonyult. A továbbiakban ROC analízissel elemeztük a glikoprotein szint cirrhosis iránti szenzitivitásának és specificitásának értékét a 33 májérintettséggel bíró beteg körében. A görbe alatti terület $0,869 \pm 0,061$ volt (95% C.I.: $0,749 - 0,988$, $p = 0,001$). Az $510 \mu\text{g/ml}$ -es koncentráció mellett a szenzitivitás 70,0%-osnak, a specificitás 83,3%-osnak bizonyult. Az $510 \mu\text{g/ml}$ alatti koncentráció a cirrhosis fokozott kockázatával társult (relatív kockázat 3,807 (95% C.I.: $1,117 - 12,973$), $p = 0,030$).

A fetuin-A és a cöroloplazmin génje a hármas kromoszóma azonos régiójában található. A két protein között azonban nem találtunk összefüggést sem az összes Wilson-kóros beteg között ($r = -0,80$; $p = 0,618$), sem a májérintettséggel bíró Wilson-kóros betegek körében ($r = -0,13$; $p = 0,519$).

A Közép-Európában leggyakoribb ATP7B mutáció (H1069Q) és a fetuin-A koncentráció összefüggését is megvizsgáltuk. A génre homozigóta, heterozigóta, illetve a gént nem hordozó csoportok szérum fetuin-A szintjében nem találtunk különbséget (556 ± 115 vs. 621 ± 161 vs. 597 ± 152 $\mu\text{g/ml}$, Kruskal-Wallis teszt, $p = 0,142$)

Következtetések

1. A fetuin-A szintje emelkedett infarktust kiállott betegekben. A glikoprotein szintje – nem szignifikánsan – emelkedett diabeteses és obez betegekben, korrelál az adiponektin és leptin szintekkel. A fetuin-A a legszorosabb összefüggést az adiponektinkoncentrációval mutatja, utóbbi protein szintjének független meghatározója.
2. A kardiovaszkuláris betegekben is megfigyelhető a fetuin-A szintjének csökkenése az életkor előrehaladtával és az erek kalcifikációjával párhuzamosan. Metabolikus zavarok, diabetes, elhízás fennállása esetén a fetuin-A szint még 60 év felett is emelkedett maradhat a korábbi adatok alapján feltételezett 55-56 év helyett.
3. Bár a fetuin-A ismert negatív akutfázis fehérje, posztinfarktusos betegekben szintje a gyulladásos citokinekkal nem mutat összefüggést. Az atherosclerost kísérő szubklinikus gyulladással szintje nem mutat kapcsolatot.
4. A szérum dezacil-ghrelin szintje csökkent infarktust kiállott betegekben és szoros negatív korrelációt mutat az inzulin szinttel.
5. A szubklinikus gyulladással a ghrelin szint nem mutat kapcsolatot.
6. A TNF- α és ghrelin szintje markánsan eltér a kontroll személyek és az infarktust kiállott betegek között. A két molekula között nincs kapcsolat ezen betegcsoportban. A TNF- α / ghrelin hányados hatékonyan különíti el a kontroll személyeket a posztinfarktusos betegektől.
7. Alkoholos májbetegségben az alacsony fetuin-A szint az egyéves túlélés pontos, megbízható és független prediktora.
8. A fetuin-A alacsony szintje a károsodott májműködés és nem a gyulladásos folyamatok következménye.

9. Az alkoholos májbetegség eredetű mortalitás szempontjából a fetuin-A szint szenzitivitása, specificitása és prediktív értéke magasabb, mint a Child-Pugh vagy MELD score. A MELD score kiegészítése a fetuin-A szint mérésével segíti a magas mortalitás rizikójú alkoholos májbetegség azonosítását.
10. Wilson-kórban a fetuin-A koncentráció nem csökkent, még fennálló májérintettség esetén sem. A H1069Q mutáció a szérumban a fetuin-A szintet nem befolyásolja. Wilson-kóros betegekben az alacsony fetuin-A szint a cirrhotikus betegek azonosítását segíti.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Kalabay L, Gráf L, Vörös K, Jakab L, Benkő Z, Telegdy L, Fekete B, Prohászka Z, Füst G. (2007) Human serum fetuin A/ α 2HS-glycoprotein level is associated with long-term survival in patients with alcoholic liver cirrhosis, comparison with the Child-Pugh and MELD scores. BMC Gastroenterol, 7:15-24. **IF: 1,975**

Vörös K, Gráf L Jr, Prohászka Z, Gráf L, Szenthe P, Kaszás E, Böröcz Z, Cseh K, Kalabay L. (2011) Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. Eur J Clin Invest, 41(7): 703-709. **IF: 3,018**

Vörös K, Prohászka Z, Kaszás E, Alliquander A, Terebesy A, Horváth F, Janik L, Sima A, Forrai J, Cseh K, Kalabay L. (2012) Serum ghrelin level and TNF- α /ghrelin ratio in patients with previous myocardial infarction. Arch Med Res, 43(7): 548-554. **IF: 2,079**

Vörös K, Cseh K, Kalabay L. (2014) A fetuin-A szerepe cardiovascularis betegségekben. Orv Hetil, 155(1): 16-23.

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Vörös K, Torzsa P, Kalabay L. (2008) Burnout a napi praxisban. Magyar Családorvosok Lapja, 10: 22-27.

Vajer P, Szélvári Á, Vörös K, Torzsa P, Eőry A, Dunai K, Tamás F, Kalabay L. (2010) Comparative analysis of diagnostic probability estimates of some common diagnoses among family doctors, medical residents, and medical students reveals negative correlation between age and estimate of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). MedSciMon, 16(3): CR109-115. **IF: 1,699**

Ádám Sz, Torzsa P, Győrffy Zs, Vörös K, Kalabay L. (2009) Gyakori a magas fokú kiégés a házi orvosok és házi orvosi rezidensek körében. Orv Hetil, 150(7):317-23.

Vörös K, Magyar Zs, Kalabay L. (2012) Pszichoszociális problémákkal társult magasvérnyomás-betegség beállítása. Magyar Családorvosok Lapja, 6:11-14.

Rurik I, Ilyés I, Rinfel J, Hajnal F, Vajer P, Szélvári Á, Torzsa P, Nagy L, Balogh S, Vörös K, Tamás F, Kalabay L. Past and present challenges in education and certification of family physicians in Hungary. In: María Ortiz, Claudia Rubio (szerk.) Educational Evaluation: 21st century issues and challenges. New York: Nova Science Publishers Inc., 2008: 407-416. (ISBN:978-1-60456-577-5)

Összes impakt faktor: 8,771

A disszertációhoz kapcsolódó impakt faktor: 7,072

A disszertációhoz kapcsolódó első szerzős impakt faktor: 5,097