

Válasz Dr. Nagy György egyetemi tanár, az MTA doktora opponensi bírálatára

Köszönöm dr. Nagy György egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, hogy értekezésemet megbírált.

A bírálat tartalmi részét érintő észrevételekre és kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

1.

Az inzulin hatásának gátlása mellett milyen további funkcionális következményei lehetnek a fetuin-A poszttranszlációs modifikálásának?

A fetuin-A poszttranszlációs modifikálásával kapcsolatban számos vizsgálatot végeztek, de ezek funkcionális következményei csak részben ismertek.

Az inzulin receptor és az ehhez kapcsolódó jelátvitel gátlása tirozin kináz gátlásán történik, melyre csak a foszforilált fetuin-A képes. Hasonló tirozin-kináz gátlást, IRS-1 aktivitás csökkenést figyeltek meg a placenta extravillous trophoblast sejteiben is, mely feltételezhetően szintén foszforilált formához kötött [1].

A fetuin-A különböző glikoziláltságú formában fordul elő egészséges ember plazmájában is [2]. Korai tanulmányokban kimutatták, hogy májcirrhosisban - más glikoproteinekhez hasonlóan - a fetuin-A glikozilációja is zavart szenved [3]. Jellemzően nem épül be a terminális szialsav. Ennek hiányában a molekula – aszialogfetuin - könnyebben kötődik a hepatocyták aszialoglikoprotein receptoraihoz, aminek gyorsabb elimináció lesz a következménye. A fetuin-A kórosan fokozott szializációja mutatható ki hepatoma sejtekben [4], melynek minden bizonnyal szerepe van a daganat progressziójában.

Különös szerepe lehet a fukozilált fetuin-A-nak. Ezt a formát a cholangiocarcinoma diagnosztikus markerének írták le, ennek óriási klinikai jelentősége lehet [5]. Szeptikus betegekben is kimutathatóan fokozott az N-fukoziláltság az 176-os aminosavhoz kapcsolódóan [6].

A fetuin-A glikozilációjának defektusát az intrauterin növekedésben elmaradt újszülöttekben is kimutatták [7].

Nemrég a molekulához kötött telített zsírsavakat is leírtak, melynek a lipid-indukálta gyulladás kialakulásában lehet szerepe [2].

2.

A fetuin-A milyen molekulákhoz sejtekhez kötődhet? Létezik fetuin-A receptor?

A molekula nagy affinitással kötődik a következő molekulákhoz: annexinek (II és IV) [8], toll-like receptor 4 (TLR4) [9], hidroxipapatit kristály [10], inzulin receptor 95 kD β alegység [11].

A fetuin-A számos sejttípushoz kötődhet. A legfontosabbak: máj parenchyma sejtek, adipociták, ér-endothel és -simaizomsejtek, pancreas β -sejtek, immunsejtek (monocita-makrofágok), placenta syncitialis sejtek, tumorsejtek.

Korábban az Epstein-Barr vírus EBNA antigénjét vélték a fetuin-A receptorának [12], de később kiderült, hogy a fetuin-A-nak nincs specifikus, kitüntetett receptora. Az előbb említett aszialoglikoprotein, toll-like receptor, inzulin receptor sem specifikus a fetuin-A-ra. A sejtekben egyébként nem csak receptor-mediált úton, hanem az extracelluláris vezikulákban bejutva is ki tudja fejteni a hatását.

3.

A fetuin-A genetikai változékonyságának lehet szerepe az elhízásra való hajlamban? Milyen hatása lehet a pajzsmirigy hormonoknak a fetuin-A termelésre?

A molekula genetikai polimorfizmusának hatása van az elhízásra való hajlamra.

Az rs2593813 SNP G/G genotípus gyakoribb volt a sovány, mint az elhízott személyek között (esélyhányados = 2,01, $p = 0,009$) [13]. Az rs2593813:G-rs4917:Met-rs4918:Ser haplotípus is a soványság fokozott esélyével járt (esélyhányados = 1,90, $p = 0,027$). Az rs4917Met és az rs4918Ser minor variáns. Kimutatták, hogy a minor variánssal rendelkező személyek szubkután zsírszövetében mért β -receptor működés, azaz a lipolitikus aktivitás mintegy 35-ször nagyobb a major variánshoz képest, ami az elhízás elleni védelem molekularis magyarázatául szolgál [14].

Az rs2248690 minor (T) variáns alacsonyabb fetuin-A szinttel jár és véd az elhízás ellen [15]. Bidirekcionális Mendeli randomizációs vizsgálattal oksági kapcsolat volt feltételezhető a fetuin-A rs2248690-tól a BMI felé, de fordítva már nem.

A fentiekkel összhangban munkacsoportunk az rs4917 és az rs4918 polimorfizmus minor (T, ill. G) allél esetén kedvezőbb antropológiai paramétereket (BMI, has- és csípőkörfogot) talált, sőt az utóbbiban a leptin szint is magasabb volt, mint a major (C) allél meglétekor [16, 17].

Hypothyreosisban az elhízás miatt emelkedett fetuin-A szintet várnánk, de az eredmények ellentmondásosak. Egy vizsgálatban 41 nőbeteg esetében alacsonyabb fetuin-A szintet találtak, mely 3 hónapos L-thyroxin szubsztitúcióra normalizálódott és negatívan korrelált a TSH szinttel, valamint szignifikancia-közel pozitív korrelációban volt a BMI-vel [18]. Mások szintén csökkent szintet találtak Hashimoto thyreoiditis okozta szubklinikus thyreoiditisben, de ez nem volt kapcsolatban sem a TSH-val, sem a BMI-vel [19]. Megint mások emelkedett szintet mértek szubklinikus hypothyreosisban, mely szintén normalizálódott L-thyroxin kezelésre, de a BMI-t nem nézték [20].

4.

Hogyan alakul a fetuin-A szint hemochromatosisban, vagy a májtranszplantációt követően?

Haemochromatosisban nincs irodalmi közlés a fetuin-A koncentrációról. Várhatóan csökkenni fog a májérintettség súlyosbodásával. Saját anyagunkban 2 férfi szérummintájában 498, ill. 400 mg/l-es értéket mértem. Ezek alacsony értékek¹.

Az egyetlen tanulmány, melyben a fetuin-A-t májtranszplantációt követően vizsgálták, 8 olyan betegről szól, akik nem egyező fenotípusú fetuin-A-t termelő májat kaptak [21]. A donor fetuin-A fenotípus általában 1-10 nap múlva jelent meg, a recipiens fenotípus még később is kimutatható volt. Nincs közlés a fetuin-A szint nagyságáról az átültetést követően. Várhatóan normalizálódik, de nem zárható ki az immunszuppresszív kezelés hatása.

5.

A fetuin-A milyen rutin klinikai alkalmazását javasolja májbetegségben? Elképzelhető olyan módosított Child-Pugh score vagy MELD score változat, ami a fetuin-A szintet is tartalmazza?

A fetuin-A szintjének csökkenése májcirrhosisban hasznos paraméter, a máj fehérjeszintetizáló kapacitásának megítélésére és a májelégtelenség előrejelzésére. A 4.1.2. és a 4.1.6. ábra, valamint a 4.1.8. táblázat adatai alapján a fetuin-A 365 mg/l-es vágóértékét Child-Pugh és a MELD score-ral kombinálva a túlélés megítélése tovább javítható.

6.

Lehet-e szerepe a szérum fetuin-A koncentráció mérésének a praeeclampsia és a HELLP szindróma korai diagnosztikájában?

Igen, utánunk mások is a fetuin-A csökkenését a korai preeclampsia potenciális biomarkerének találták [22]. A fetuin-A meghatározásnak különös jelentősége lehet akkor, ha az anamnézisben már szerepel preeclampsia. A középső trimeszterben fetuin-A szint emelkedik egészséges terhességben, és - ahogy egy későbbi, követéses vizsgálatban kimutatták, - ez elmarad, sőt, csökkenő trendet mutat azokban a várandósokban, akikben később preeclampsia alakul ki [23].

7.

A máj és a zsírszövet mellett milyen más szövetekben termelődhet fetuin-A és mi ennek a klinikai jelentősége?

A máj és a zsírszövet mellett a fetuin-A szintézise számos sejtben és szövetben termelődhet Ezek²: immunsejtek (CD8-pozitív T sejtek, NK sejtek, mononukleáris sejtek), thrombocyták, nyirokcsomók, tonsillák, csontvelő mesenchymális sejtjei, őssejtek, agykéreg, gerincvelő,

¹ Referencia tartomány: 501-685 mg/l.

² <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AHSG#expression>; megtekintve: 2021.05.28-án.

retina, szív, orrgarat, orr-nyálkahártya, nyelőcső, gyomor, vastagbél, rectum, vese, lép, tüdő, amnionsejtek, pajzsmirigy, mellékvesekéreg, emlőszövet, Langerhans szigetek, epehólyag, prostata, húgyhólyag, bőr, placenta, uterus, cervix, ovarium, here, vesicula seminalis. A termelés természetesen nem jelent egyben szekréciót is.

A felsoroltak közül konkrét klinikai jelentőségét ismerjük még az amnionsejtek esetében, ahol a fetuin-A a sperminnel együtt gátolja a makrofágok TNF α termelését [24]. A szérumszintet elsősorban a hepatikus szintézis mértéke határozza meg. Jelenleg nem tudni, mi a klinikai jelentősége annak, hogy a fetuin-A ennyiféle szövetben kimutatható. Feltételezem, hogy ennek általános biológiai jelentősége van - szöveti szinten a szövetek integritásának megőrzése: a gyulladáscsökkentés, a hypoxia elleni védelem, sebgyógyulás szabályozása.

8.

A fetuin-A termelésének a szabályozásában milyen gyulladásos és gyulladástól független tényezők vesznek részt?

Gyulladásos tényezők:

- csökkentik: proinflammatorikus citokinek: TNF α , IL-1, IL-6, interferon- γ
- növelik: HMGB1 (veszély szignál), TNF α (zsírszövetben)

Nem gyulladásos tényezők:

- csökkentik: fizikai aktivitás, adiponektin
- növelik: zsírszövet mennyisége, elhízás, FGF23, Klotho fehérje, HIF.

9.

Milyen napi ingadozást mutat a fetuin-A szérum szintje, milyen módon függ a táplálkozástól, mozgástól?

A fetuin-A napi ingadozásáról nem tudunk, inkább 2-3 napos intervallummal változik. Számos vizsgálat kimutatta, hogy a zsírdús táplálkozás egyértelműen fokozza, míg a kalória restriktio [25-27] és a rendszeres testmozgás [28-30] csökkenti a szérum koncentrációt. A csökkenés a kövér emberek fogyásakor a legkifejezettebb.

10.

Milyen direkt bizonyíték (a korrelációs eredmények mellett) támasztja alá a fetuin-A részvételét az érlelmeszesedés folyamatában?

A fetuin-A kimutatható a meszes plakkokban [31], a keringő és az intracelluláris mikrovezikulákban (ér simaizomsejtekben), a másodlagos kalciprotein részecskékkel asszociálisan [32-34]. A foszfáttérhelés, a másodlagos kalciprotein részecskék fokozzák a csont morfogenetikus protein (BMP2) és az oszteopontin expresszióját, oszteogén irányba differenciálva az ér simaizomsejteket [34, 35]. A fetuin-A-nak protektív szerepe van: gátolja a

másodlagos kalciprotein részecskék kialakulását, antagonizálja a BMP2-t, valamint védi a sejteket a kalcium lerakódástól [36-38].

11.

H. pylori pozitivitást hogyan befolyásolhatja az immunszuppresszív kezelés gyulladásos autoimmun kórképekben?

A H. pylori fertőzés és az autoimmun betegségek kapcsolata kétirányú. A H. pylori fertőzés, elsősorban a cagA pozitív kórokozó fokozza egyes autoimmun betegségeket, így az ITP, a Sjögren szindróma, pajzsmirigy betegségek és a cukorbetegség kialakulására való hajlamot. Az eradikáció javíthatja az autoimmun betegséget, olyannyira, hogy pl. az ITP-ben kötelező az H. pylori szűrése [39]. Ezzel ellentétben a fertőzés védő hatását is leírták, gyulladásos bélbetegségekben, sclerosis multiplexben. Az SLE-ben, RA-ban, sclerodermában, vasculitisekben tett megfigyelések sem egyértelműek (összefoglalva: [40, 41]). Az összefüggés fordítottjáról, azaz a gyulladásos autoimmun betegségek immunszuppresszív kezelésének a H. pylori statusra gyakorolt hatásáról nincs adat. Várhatóan nem szünteti meg a H. pylori pozitivitást, sőt elvben ronthatja is a betegséget.

Végül még egyszer köszönöm dr. Nagy György professzor úrnak, hogy értekezésemet megbírált és támogatólag véleményezte.

Budapest, 2021. június 6.



dr. Kalabay László

Hivatkozások jegyzéke

1. Gomez L. M., Anton L., et al. Effects of increased fetuin-A in human trophoblast cells and associated pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(6):484.e481-488.
2. Kovářová M., Kalbacher H., et al. Detection and Characterization of Phosphorylation, Glycosylation, and Fatty Acid Bound to Fetuin A in Human Blood. *J Clin Med.* 2021;10(3).
3. Jezequel M., Seta N. S., et al. Modifications of concanavalin A patterns of alpha 1-acid glycoprotein and alpha 2-HS glycoprotein in alcoholic liver disease. *Clinica Chimica Acta.* 1988;176(1):49-57.
4. Azuma K., Serada S., et al. Identification of sialylated glycoproteins in Doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *J Proteome Res.* 2014;13(11):4869-4877.
5. Betesh L., Comunale M. A., et al. Identification of fucosylated Fetuin-A as a potential biomarker for cholangiocarcinoma. *Proteomics Clin Appl.* 2017;11(9-10).
6. Lin Y. H., Zhu J., et al. Glycoproteogenomics: A Frequent Gene Polymorphism Affects the Glycosylation Pattern of the Human Serum Fetuin/ α -2-HS-Glycoprotein. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18(8):1479-1490.
7. Karamessinis P. M., Malamitsi-Puchner A., et al. Marked defects in the expression and glycosylation of alpha2-HS glycoprotein/fetuin-A in plasma from neonates with intrauterine growth restriction: proteomics screening and potential clinical implications. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(3):591-599.
8. Kundranda M. N., Ray S., et al. Annexins expressed on the cell surface serve as receptors for adhesion to immobilized fetuin-A. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004;1693(2):111-123.
9. Pal D., Dasgupta S., et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2012;18(8):1279-1285.
10. Price P. A., Lim J. E. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex. *J Biol Chem.* 2003;278(24):22144-22152.
11. Goustin A. S., Derar N., et al. Ahsg-fetuin blocks the metabolic arm of insulin action through its interaction with the 95-kD beta-subunit of the insulin receptor. *Cell Signal.* 2013;25(4):981-988.
12. Lewis J. G., Andre C. M. Evidence that the alpha 2HS glycoprotein receptor and the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA) are identical. *FEBS Letters.* 1983;161(2):306-310.
13. Lavebratt C., Wahlqvist S., et al. AHSG gene variant is associated with leanness among Swedish men. *Hum Genet.* 2005;117(1):54-60.
14. Lavebratt C., Dungner E., et al. Polymorphism of the AHSG gene is associated with increased adipocyte beta2-adrenoceptor function. *Journal of Lipid Research* 2005;46(10):2278-2281.
15. Thakkinstian A., Chailurkit L., et al. Causal relationship between body mass index and fetuin-A level in the asian population: a bidirectional Mendelian randomization study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;81(2):197-203.
16. Temesszentandrási G., Voros K., et al. Association of human fetuin-A rs4917 polymorphism with obesity in 2 cohorts. *Journal of Investigative Medicine.* 2015;63(3):548-553.
17. Temesszentandrási G., Voros K., et al. Human Fetuin-A rs4918 Polymorphism and its Association with Obesity in Healthy Persons and in Patients with Myocardial Infarction in Two Hungarian Cohorts. *Med Sci Monit.* 2016;22:2742-2750.
18. Bakiner O., Bozkirli E., et al. Plasma fetuin-A levels are reduced in patients with hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(3):411-418.
19. Muratli S., Uzunlulu M., et al. Fetuin A as a new marker of inflammation in Hashimoto thyroiditis. *Minerva Endocrinol.* 2015;40(1):9-14.
20. Bilgir O., Bilgir F., et al. Comparison of pre- and post-levothyroxine high-sensitivity c-reactive protein and fetuin-a levels in subclinical hypothyroidism. *Clinics (Sao Paulo).* 2015;70(2):97-101.
21. Schmeling A., Correns A., et al. Changes in the phenotype of polymorphic plasma proteins after liver transplantation - new data and medico-legal consequences. *Int J Legal Med.* 1999;112(6):364-367.
22. Kolialexi A., Tsangaris G. T., et al. Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia. *Expert Rev Proteomics.* 2017;14(3):269-276.
23. Chaemsaitong P., Romero R., et al. Maternal plasma fetuin-A concentration is lower in patients who subsequently developed preterm preeclampsia than in uncomplicated pregnancy: a longitudinal study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;1-10.
24. Wang H., Zhang M., et al. Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet.* 1997;350(9081):861-862.
25. Choi K. M., Han K. A., et al. The effects of caloric restriction on fetuin-A and cardiovascular risk factors in rats and humans: a randomized controlled trial. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;79(3):356-363.
26. König D., Zdziblik D., et al. Internal Fat and Cardiometabolic Risk Factors Following a Meal-Replacement Regimen vs. Comprehensive Lifestyle Changes in Obese Subjects. *Nutrients.* 2015;7(12):9825-9833.
27. Park C. Y., Park S., et al. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;490(3):636-642.
28. Malin S. K., Mulya A., et al. Fetuin-A is linked to improved glucose tolerance after short-term exercise training in nonalcoholic fatty liver disease. *J Appl Physiol (1985).* 2013;115(7):988-994.

29. Malin S. K., del Rincon J. P., et al. Exercise-induced lowering of fetuin-A may increase hepatic insulin sensitivity. *Med Sci Sports Exerc.* 2014;46(11):2085-2090.
30. Mathews S., Ren G., et al. Plasma fetuin-A and phosphofetuin-A (Ser312) responses to a single or short-term repeated bout of exercise in obese and normal-weight individuals (1028.2). *The FASEB Journal.* 2014;28(1 Supplement).
31. Keeley F. W., Sitarz E. E. Identification and quantitation of alpha 2-HS-glycoprotein in the mineralized matrix of calcified plaques of atherosclerotic human aorta. *Atherosclerosis.* 1985;55(1):63-69.
32. Jahnen-Dechent W., Heiss A., et al. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res.* 2011;108(12):1494-1509.
33. Reynolds J. L., Skepper J. N., et al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-A in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2005;16(10):2920-2930.
34. Aghagolzadeh P., Bachtler M., et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor-alpha. *Atherosclerosis.* 2016;251:404-414.
35. Kapustin A. N., Chatrou M. L., et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 2015;116(8):1312-1323.
36. Sage A. P., Lu J., et al. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int.* 2011;79(4):414-422.
37. Sage A. P., Tintut Y., et al. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(9):528-536.
38. Demetriou M., Binkert C., et al. Fetuin/alpha 2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(22):12755-12761.
39. Malfertheiner P., Megraud F., et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut.* 2017;66(1):6-30.
40. Hasni S. A. Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(4):429-434.
41. Youssefi M., Tafaghodi M., et al. *Helicobacter pylori* infection and autoimmune diseases; Is there an association with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, autoimmune atrophy gastritis and autoimmune pancreatitis? A systematic review and meta-analysis study. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020.