

MTA Doktori Értekezés

**A humán fetuin-A vizsgálatának hasznosíthatósága a
klinikai gyakorlatban**



Dr. Kalabay László

Semmelweis Egyetem Családorvosi Tanszék

III. Sz. Belgyógyászati Klinika

Budapest

2020

Tartalom

1. Bevezetés és célkitűzések	9
1.1. A fetuin-A felfedezése és elnevezése.....	11
1.2. A fetuin-A szerkezete.....	11
1.3. A fetuin-A gén promoter szerkezete	14
1.4. A fetuin-A cisztatin szupercsalád tagja.....	15
1.5. A szérum fetuin-A koncentráció életkori változásai	15
1.6. A fetuin-A molekula biológiai funkciói	17
1.6.1. A kalcifikáció szabályozása	17
1.6.2. A fetuin-A negatív akut fázis fehérje	20
1.6.3. Az anyagcserében betöltött szerep: elhízás, metabolikus szindróma és 2-es típusú diabétesz...	21
1.6.4. A fetuin-A szerepe a szöveti regenerációban	23
1.6.5. A fetuin-A daganatos betegségekben.....	23
2. Gyakrabban vizsgált betegcsoportok és alkalmazott laboratóriumi, statisztikai módszerek	25
2.1. Az adipokinek és citokinek, a fetuin-A rs4917 és rs4918, valamint a PPAR α intron 7 G/C, PPAR γ 2 Pro12Ala, PPAR γ C161T polimorfizmus vizsgálata egészséges kontrollokban és posztinfarktusos betegekben.....	25
2.2. A szérum fetuin-A koncentráció meghatározása elektroimmundifúzióval.....	25
2.3. A szérum fetuin-A koncentráció meghatározása radiális immundifúzióval.....	26
2.4. Egyéb laboratóriumi meghatározások.....	26
2.5. Statisztikai analízis.....	27
3. A rekombináns humán fetuin-A-val végzett vizsgálatok	28
3.1. A rekombináns humán fetuin-A előállítása és poszttranszlációs modifikációjának vizsgálata.....	29
3.1.1. Módszerek.....	29
3.1.2. Eredmények	31
3.1.3. Megbeszélés.....	33
3.2. A teljes hosszúságú humán rekombináns fetuin-A gátolja az inzulin receptor tirozin kinázt	35
3.2.1. Módszerek.....	35
3.2.2. Eredmények	37
3.2.3. Megbeszélés.....	39
4. A szérum fetuin-A koncentráció vizsgálata májbetegségekben.....	40
4.1. A szérum fetuin-A koncentráció követése alkoholos májcirrrosisban és hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegekben.....	40
4.1.1. A szérum fetuin-A koncentráció egy hónapos követése alkoholos májcirrrosisban és hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegekben	41
4.1.1.1. Betegek és módszerek.....	41
4.1.1.2. Eredmények	42

4.1.2. A szérumbetuín-A koncentráció egyéves követése alkoholos májcirrhosisban szenvedő betegekben. Összehasonlítás a Child-Pugh és a MELD score-ral	46
4.1.2.1. Betegek és módszerek	46
4.1.2.2. Eredmények	47
4.1.2.3. Megbeszélés	57
4.2. A fetuín-A koncentráció követése krónikus C-vírus hepatitisben	60
4.2.1. Betegek és módszerek	60
4.2.2. Eredmények	61
4.2.3. Megbeszélés	65
4.3. A fetuín-A koncentráció primer biliaris cholangitisben	68
4.4. A fetuín-A koncentráció Wilson-kórban	70
4.4.1. Betegek és módszerek	71
4.4.2. Eredmények	71
4.4.3. Megbeszélés	75
5. A szérumbetuín-A koncentráció vizsgálata egészséges és patológiás terhességben	77
5.1. Az anyai szérumbetuín-A koncentrációnak az anyai inzulinrezisztenciával és az újszülöttek antropológiai paramétereivel való kapcsolata egészséges terhességben és gesztációs diabéteszben	77
5.1.1. Vizsgált személyek és módszerek	78
5.1.2. Eredmények	79
5.1.3. Megbeszélés	84
5.2. A szérumbetuín-A koncentráció praeeclamsiában és HELLP szindrómában	87
5.2.1. Vizsgált személyek és módszerek	89
5.2.2. Eredmények	90
5.2.3. Megbeszélés	95
6. A szérumbetuín-A koncentráció vizsgálata szívinfarktust túlélő betegekben	100
6.1. A szérumbetuín-A koncentráció anyagcsere és gyulladásos paraméterekkel való kapcsolatának vizsgálata szívinfarktust túlélő betegekben	100
6.1.1. Betegek és módszerek	102
6.1.2. Eredmények	102
6.1.3. Megbeszélés	106
6.2. A posztinfarktusos betegeket és a referencia személyeket elkülönítő paraméterek vizsgálata	109
6.2.1. Eredmények	110
6.2.2. Megbeszélés	115
7. A szérumbetuín-A koncentráció aorta aneurysmák és perifériás érszűkületes betegekben	118
7.1. Betegek és módszerek	118
7.2. Eredmények	120
7.3. Megbeszélés	125
7.4. A fetuín-A koncentráció ellentétes irányú változásának magyarázata atherosclerosisban	129

8. A fetuin-A rs4917 és rs4918 polimorfizmus kapcsolata az elhízással	132
8.1. Vizsgált személyek és módszerek	134
8.2. Eredmények	135
8.3. Megbeszélés	147
9. A szérumban fetuin-A koncentráció és a PPARα intron 7 G/C, a PPARγ2 Pro12Ala és a PPARγ C161T polimorfizmus közötti kapcsolat.....	154
9.1. Betegek és módszerek	154
9.2. Eredmények	156
9.3. Megbeszélés	163
10. Autoimmun betegségek, Helicobacter pylori fertőzés és a fetuin-A koncentráció kapcsolata	167
10.1. A Helicobacter pylori átvészelttség és a fetuin-A kapcsolata	168
10.1.1. Betegek és módszerek	168
10.1.2. Eredmények	168
10.2. Helicobacter pylori fertőzés poliszisztémás autoimmun betegekben	172
10.2.1. Betegek és módszerek	172
10.2.2. Eredmények	173
10.2.3. Megbeszélés	174
11. A fetuin-A koncentráció vizsgálata egyéb betegségekben	176
11.1. Szérumban fetuin-A koncentráció HIV negatív és HIV pozitív betegekben.....	176
11.2. A szérumban fetuin-A koncentráció követése hereditár angioneurotikus ödémában (HANO).....	177
11.2.1. Betegek és módszerek	178
11.2.2. Eredmények	179
11.2.3. Megbeszélés	181
12. A szérumban fetuin-A koncentráció meghatározásának nyitott kérdései.....	184
13. Összefoglalás: A szérumban fetuin-A koncentráció meghatározásának gyakorlati jelentősége.....	186
14. Az új tudományos eredmények összefoglalása.....	188
15. Saját közlemények jegyzéke.....	190
15.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben	190
Rövid közlemények	193
Könyvfejezet	193
Hozzászólás	193
15.2. Az értekezésben nem tárgyalt, de a témához kapcsolódó további nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben	194
16. Tudománymetriai adatok.....	196
17. Köszönetnyilvánítás	198
18. Irodalomjegyzék.....	202

Az értekezésben szereplő rövidítések jegyzéke

AARDA	American Autoimmune Related Diseases Association
ACE	antiogenzin konvertáló enzim
ACMNPV	Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus
ahs	humán fetuin-A/ α 2HS-glikoprotein gén
AHSG	humán fetuin-A/ α 2HS-glikoprotein
Ala	alanin
AMA	antimitokondriális antitest
ANA	antinukleáris antitest
AP-1	aktivátor protein-1
ARA	American Rheumatism Association
AUC	görbe alatti terület (Area Under the Curve)
BMI	testtömeg (body mass) index
BMP	csont morfogenetikus fehérje (bone morphogenetic protein)
bp	bázispár
C/EBP	CCAT enhancer kötő fehérje (CCAT/enhancer binding protein)
C.I.	konfidencia intervallum
C1-INH	C1 komplement komponens inhibitor
ConA	konkanavalin-A
CP	Child-Pugh score
CPP	kalciprotein részecske (partikulum)
CRP	C-reaktív protein
CT	computer tomográfia
C3	C3 komplement komponens
EBV	Epstein-Barr vírus
eGFR	becsült glomeruláris filtrációs ráta
EID	elektroimmundiffúzió
ELCIA	elektrokemilumineszcencia immunassay
ELISA	enzimhez kötött immunassay (enzyme-linked immunoassay)
FCS	fötális borjúsavó (fetal calf serum)
FGF23	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor 23)
sFLT1	szolubilis Fms- (vascularis endothelialis growth factor-1) szerű tirozin kináz 1
GDM	gesztációs diabétesz mellitusz

GFR	glomeruláris filtrációs ráta
H. pylori	Helicobacter pylori
HAART	igen aktív antiretrovirális kezelés (highly active antiretroviral treatment)
HANO	herediter angioneurotikus ödéma
HAV	hepatitis A vírus
HBV	hepatitis B vírus
HCC	primer hepatocelluláris karcinóma
HCV	hepatitis C vírus
HDL	magas denzitású koleszterin (high density cholesterolin)
HELLP	haemolysis, emelkedett májenzimek, alacsony thrombocytaszám
HIF-1	hypoxia által indukálható faktor-1 (hypoxia-inducible factor-1)
HIV	humán immundeficiencia vírus
HMGB1	High Mobility Group Box-1 fehérje
HMWK	nagy molekulatömegű kininogén
HNF	hepatikus nukleáris faktor
HOMA-B	Homeostasis Model Assessment – béta sejt funkció
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance
HPLC	magas nyomású folyadék kromatográfia
hsp	hő sokk-fehérje (heat-shock protein)
IACV	intraassay variációs koefficiens
ICAM-1	intercelluláris adhézións molekula-1
IECV	interassay variációs koefficiens
IFN	interferon
IL	interleukin
ILGF	inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
INR	International Normalisation Rate
IQR	interkvartilis tartomány
IR	inzulin receptor
IRS-1	inzulin receptor szubsztrát-1
IRTK	inzulin receptor tirozin kináz
ITP	idiopathiás (autoimmun) thrombocytopeniás purpura
JAK	Janus kináz
KASP	kompetitív allélspecifikus PCR
LDH	laktát dehidrogenáz

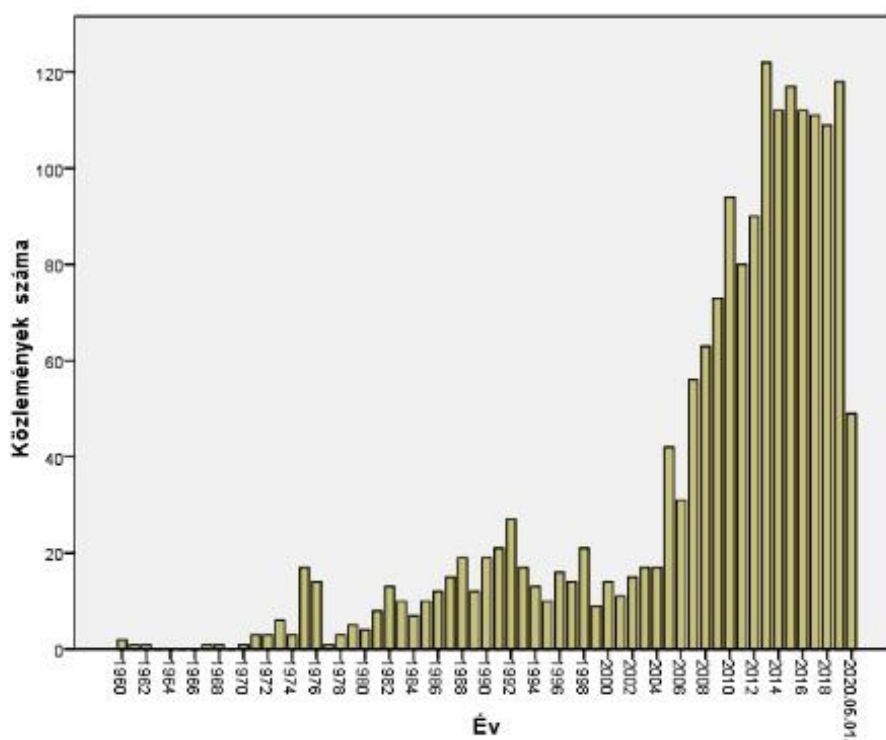
LDL	alacsony denzitású koleszterin, low density cholesterolin
LPS	lipopoliszacharid
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MCP1	monocita kemoattraktáns protein-1
MELD	Model for End-Stage Liver Disease score
MELDNa	Model for End-Stage Liver Disease Natrium score
MGP	matrix Gla protein
MIF	migrációt gátló faktor (Migration Inhibitor Factor)
MMP	mátrix metalloproteináz
NAFLD	nem alkoholos eredetű zsírmáj, non-alcoholic fatty liver disease
NDC	nem differenciált kötőszöveti betegség
NFκB	nukleáris faktor kappa B
NHS	normál humán szérum
OD	optikai denzitás
OGTT	orális glukóz tolerancia teszt
OR	esélyhányados, odds ratio
ORM	α1-acid glikoprotein, orozomukoid
PAD	perifériás érszűkület
PAMP	kórokozóhoz kapcsolt molekuláris mintázat (Pathogen-Associated Molecular Pattern)
PBC	primer biliaris cholangitis
PBS	protein-bound saline oldat
PCOS	policisztás ovarium szindróma
PCR	polimeráz láncreakció
PDGF	thrombocyta eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PHA	phytohaemagglutinin
PIGF	placenta növekedési faktor
PM/DM	polymyositis/dermatomyositis
PMSF	fenil-metil-szulfonilfluorid
PPAR	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
PPRE	PPAR-responsive element
Pro	prolin
Q1, Q2, Q3, Q4	1., 2., 3., 4. kvartilis
RA	rheumatoid arthritis

RFLP	restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus
RIA	radioimmunassay
RID	radiális immundiffúzió
RNS	ribonukleinsav
ROC	Receiver-Operating Characteristic
RR	relatív kockázat, relative risk
SDS-PAGE	nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézis
Sf9	Spodoptera Frugiperda 9 rovarsejtvonal
sFLT1	szolubilis smf-szerű tirozin kináz
SGOT	szérum glutamát-oxálacetát transzamináz
SGPT	szérum glutamát-piruvát transzamináz
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SLEDAI	SLE betegségaktivitási index
SMA	simaizom-ellenes antitest
SNP	single nucleotide polymorphism, egyes nukleotid polimorfizmus
SRE	serum response element
SRF	szérum válasz faktor (serum response factor)
SSc	szisztémás sclerosis
STAT	signal transducers and activators of transcription
STEMI	ST elevációval járó miokardiális infarktus
T2DM	2-es típusú diabétesz
TGF-β	transzformáló növekedési faktor- β , transforming growth factor- β
TMB	tetrametil-benzidin
TNFα	tumor nekrosis faktor- α (TNF superfamily 2, TNFSF2)
sTNFR-1	szolubilis tumor nekrosis faktor receptor-1 (TNF receptor superfamily-1 A, TNFRSF1A)
sTNFR-2	szolubilis tumor nekrosis faktor receptor-2 (TNF receptor superfamily-1 B, TNFRSF1B)
VCAM-1	vaszkuláris sejt adhézións molekula-1
VGEF	ér-endothel eredetű növekedési faktor
VSMC	érfal simaizomsejt
We	Westergren-érték
WGA	wheat germ agglutinin
γGT	gamma-glutamil transzferáz

1. Bevezetés és célkitűzések

A fetuin-A-val a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Immunológiai Munkacsoportjának tagjaként 1985-ben találkoztam először. Abban az időben vált ismertté a fehérje szerkezete, működéséről elszótan jelentek meg közlemények, klinikai szerepe felfedezését követően évtizedekkel körvonalazódik. Már igen régóta ismert volt, hogy szérumkoncentrációja nagy (egészséges emberben 450–600 mg/l közötti), és a molekula cisztatin doménjeinek nagyfokú konzervativizmusa van. Ez a két tulajdonság alapvető funkcióra engedett következtetni, és ez keltette fel érdeklődésemet a molekula iránt.

Felfedezését követően a ma fetuin-A-nak nevezett molekuláról kevés közlemény jelent meg. A fehérje az utóbbi 15 évben került a klinikai vizsgálatok látóterébe, azután, hogy a fetuin-A-ra knock-out egerek két fő tulajdonsága ismertté vált: extracelluláris kalcifikációt mutatnak [1] és a vad törzshöz képest inzulinérzékenységük fokozódik [2]. Ez utóbbi tulajdonság, azaz az inzulinrezisztencia kialakulásában feltételezett szerep klinikai jelentőséget is sejtetett. A fehérjével foglalkozó publikációk száma ettől kezdve ugrásszerűen megemelkedett és kis túlzással állítható, hogy napjainkra „slágertéma” lett (1.1. ábra).



1.1. ábra. Az AHSG/humán fetuin A-val foglalkozó közlemények száma 1960. január 1. és 2020. május 1. között. Az adatsor forrása a PubMed-en történt keresés, saját adatbázissal kiegészítve.

A fetuin-A inzulinrezisztenciára gyakorolt hatásnak vizsgálata kandidátusi értekezésem [3] beadását követően vált ismertté. Inzulin-receptor tirozin kináz gátló tulajdonsága mellett klinikusként elsősorban a fetuin-A szérumszint jelentősége, annak betegség melletti hasznosíthatósága érdekelt. A molekula addig megismert tulajdonságai alapján elsősorban a májbetegségek, az egészséges és kóros terhesség, az érlemeszesedés, az immunfolyamatokban betöltött lehetséges szerepe miatt az autoimmun betegségek, a *H. pylori* fertőzés, a kininogénnel való szerkezeti kapcsolat alapján a HANO látszott elsősorban érdekesnek.

Célkitűzéseim az alábbiak voltak:

1. Rekombináns humán fetuin-A előállítása és az inzulin receptor tirozin kináz aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata.
2. A szérum fetuin-A koncentráció meghatározása különböző krónikus májbetegségekben, a fetuin-A szint diagnosztikus értékének vizsgálata.
3. A fetuin-A koncentráció meghatározása egészséges és patológiás terhességben, összefüggés feltárása az anyai inzulinrezisztencia és az újszülött antropológiai paraméterei között.
4. A fetuin-A szint mérése az érlemeszesedés különböző formáiban (szívinfarktus utáni állapot, aorta aneurysma, perifériás érbetegség), egyes gyulladásos citokinekkal és adipokinekkal való kapcsolatának meghatározása.
5. A fetuin-A rs4917 és rs4918 polimorfizmus magyarországi frekvenciájának meghatározása és egyes gyulladásos citokinekkal és adipokinekkal való kapcsolatának vizsgálata egészséges egyéneken és szívinfarktust túlélte betegekben.
6. A szérum fetuin-A koncentráció és egyes PPAR polimorfizmusok közötti kapcsolat vizsgálata.
7. A szérum fetuin-A szint vizsgálata autoimmun betegségekben, valamint a *Helicobacter pylori* fertőzéssel való kapcsolatának vizsgálata.
8. A fetuin-A koncentráció meghatározása eddig erre nem vizsgált olyan betegségekben, amelyekben várható szintjének változása, mint amilyen a HIV fertőzés és a hereditár angioneurotikus ödéma.

Tudomásom szerint Magyarországról tölem, munkatársaimtól és társzerzőimtől függetlenül csak három közlemény jelent meg a fetuin-A-val kapcsolatban. Az egyik Reusz György professzor munkacsoportjától, akik krónikus veseelégtelenségben szenvedő gyermekekben a csont ásványianyag-tartalomnak és anyagcserének az artériák rugalmasságára gyakorolt hatásának vizsgálata során mérték a fetuin-A szérumszintjét [4]. A másik Bódis József professzor és mtsai tollából, akik in vitro fertilizáció során vizsgálták a szérumszintjét és a follikuláris folyadék fetuin-A szintjét [5]. A harmadik Barbaitól és mtsaitól, akik HIV pozitív betegekben vizsgálták a fetuin-A szint változását IL-2 kezelés után [6]. Ezen kívül Nemcsik és munkatársai említették ezt a fehérjét egy összefoglaló munkájukban [7].

1.1. A fetuin-A felfedezése és elnevezése

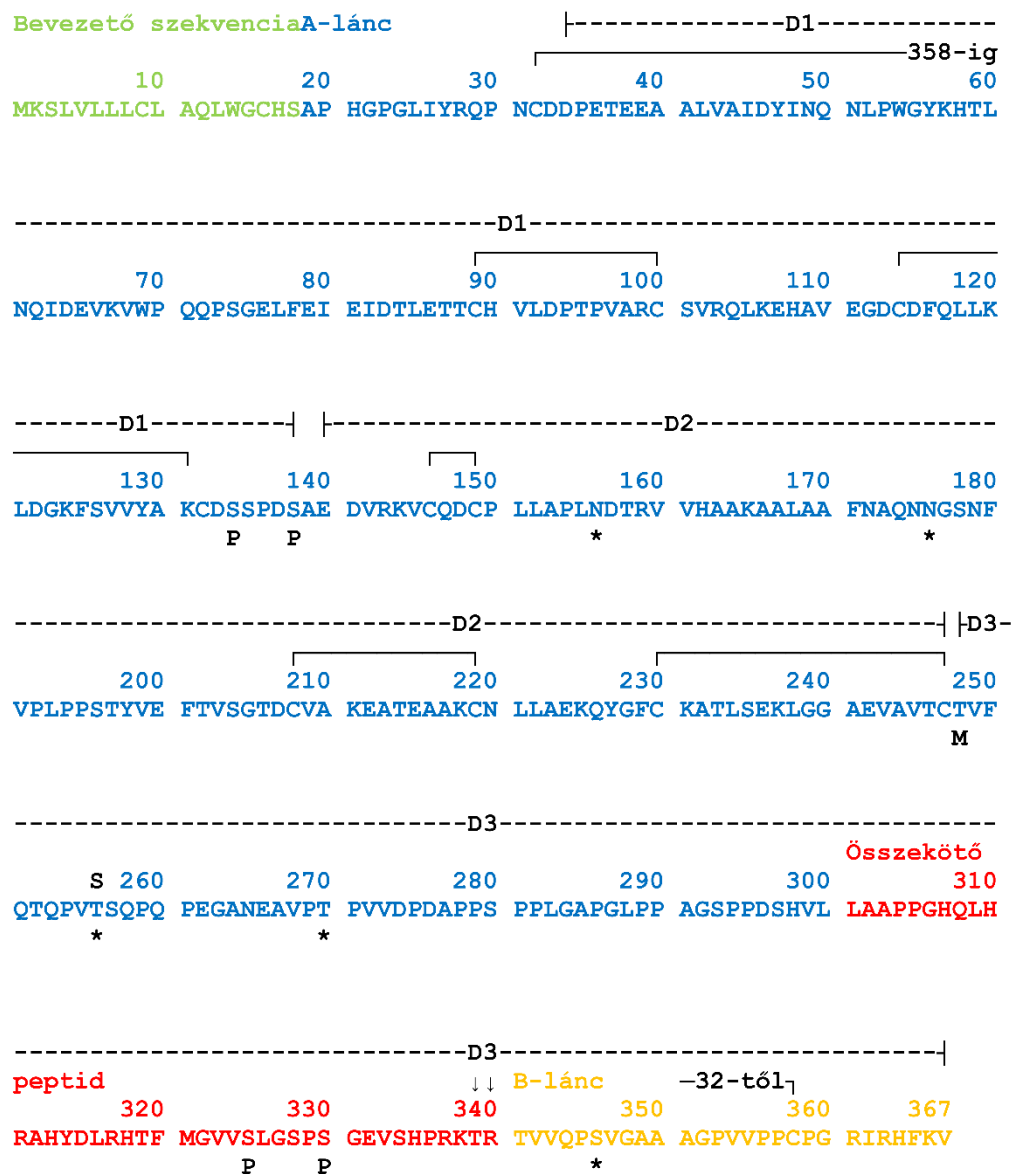
A fetuint először Pedersen írta le 1944-ben mint a főtális borjúszerumban nagy koncentrációban előforduló fehérjét [8]. Humán megfelelőjét elsőnek a belga Heremans találta meg 1960-ban [9], majd tőle függetlenül Schmid és Bürgi [10]. Egy évvel később Schultze bizonyította be, hogy a fenti két munkacsoport által egymástól függetlenül szeparált fehérje immunreaktivitása alapján azonos [11]. Az elektroforetikus mobilitás és az első leírók nevének kezdőbetűje (Heremans és Schmid) alapján adta a glikoprotein sokáig kizárólagosan használt nevét: α 2HS-glikoprotein (AHSG) [11]. Később kiderült, hogy az AHSG azonos más szerzők által az 1970-es évek közepén humán és szarvasmarha eredetű csontszövetből izolált fehérjéjével [12-14]. 1990-ben Dziegielewska és mtsai ismerték fel, hogy a humán AHSG a szarvasmarhában leírt fetuinok humán analógja, és javasolták a humán fetuin elnevezést [15]. Az AHSG-vel homológ fetuin-B felfedezésekor [16] kapta a glikoprotein a mai nevét: fetuin-A.

1.2. A fetuin-A szerkezete

A fetuin-A egyláncú prekursoraként szintetizálódik. Ez a prekursor a Golgi apparátusban egy 321 aminosav hosszúságú nehézláncra és egy 27 aminosav hosszúságú B-láncra hasad. A nehézlánc C-terminális részén egy 39 aminosav hosszúságú összekötő szakasz, mely felnőttkorban 93%-ban lehasad. A maradék 282 aminosav hosszúságú az A-lánc [17-19]. A patkányból, illetve a szarvasmarhából származó fehérje egyláncú marad [19].

A fetuin-A molekulában 12 cisztein van, ezekből 11 az A-láncon és egy a B-láncon. Ezek 6 diszulfid hidat alkotnak. A nehéz lánc 32. és a könnyű lánc 358. helyén lévő cisztein között elhelyezkedő diszulfid híd kapcsolja a két láncot egymáshoz. Az A láncon lévő többi

5 diszulfid kötés áthidaló hurkokat képez a 89.-100., a 114.-132., a 146.-149., a 208.-219. és a 230.-247. aminosav között [20] (1.2.1. ábra).



1.2.1. ábra. A fetuin-A aminosav sorrendje. A 18 aminosavból álló bevezető szekvenciát zölddel, az A-láncot (282 aminosav) kékkel, az összekötő szakaszt pirossal, a B-láncot narancssárgával jelöltem. **D1, D2:** első (34.-138. aminosav) és második (140.-246. aminosav) cisztatin domén; **D3:** harmadik, nem cisztatin domén (247.-367. aminosav); — : diszulfid híd; **P:** foszforilációs hely; *: glikozilációs hely; **M:** az rs4917 SNP minor variánsa (248Met); **S:** az rs4918 SNP minor variánsa (256Ser), egyben glikozilációs hely is. A ↓ a fetuin-A hosszú és rövid láncát eredményező hasítási helyét jelöli. (Forrás¹: [21-24]).

¹ www.uniprot.org/uniprot/P02765 (megtekintve: 2020.01.04-én)

Az A-láncon négy glikozilációs hely található. Ezek közül kettő a molekula centrumában van, a (szignál peptidet is számítva) 156-os és a 176-os aszparaginhoz N-glikozid kötéssel kapcsolódik oligoszacharid oldallánc. A másik két glikozilációs hely a karboxi-terminális régióban elhelyezkedő 256. és 270. helyen lévő threonin, melyhez O-glikozid kötéssel heteropoliszacharidok kötődnek. Az N-glikánok aszparaginhoz kapcsolódnak. Mind az N-, mind az O-glikán a molekula felszínén helyezkedik el és a szénhidrát komponens kinyúlik a polipeptid láncból [18].

A B-lánc 27 aminosavból áll, egy triszacharidot tartalmaz, mely O-glikozid kötéssel kapcsolódik az N-terminustól számított 6. helyen lévő szerinhez. [25]. Bár két N-glikozilációs (156. és 176. aminosav), egy O-glikozilációs (270. aminosav) és egy foszforilációs hely (138. aminosav) konzervált, a glikoziláció nagyfokban eltér az emberből és a szarvasmarhából származó molekulában [19].

Az érett fetuin-A-nak funkcionálisan is elkülönülő három doménje van (1.2.1. ábra) [21, 26].

A D1 domén a kalcium-kötő helyet tartalmazza. Ezen a doménen van a TGF β -kötő hely is, melynek szerepe van a sejtdifferenciálódásban és proliferációban [22, 27]. A fetuin-A a TGF β és a csont morfogenetikus protein (BMP) természetes antagonistája [22, 27, 28]. A kalcium-kötő hely adja a molekula ásványianyag szállító („mineral chaperone”) és a csontosodást gátló funkcióját [29, 30]. A fetuin-A mind in vitro, mind in vivo gátolja a hidroxipatit kristályok precipitációját [31]. A D1 domén a TGF- β és a BMP kötésével fontos szabályozója a csontfejlődésnek, valamint szerepet játszik az érleszesedés kialakulásában [22, 27, 32].

A D2 domén három N-glikozilációs és egy foszforilációs (a bevezető szakaszt nem számítva) (Ser120) helyet tartalmaz. Az D1 és a D2 domén intramolekuláris homológiát mutat, ezen belül is az 1. és a 3., valamint a 2. és a 4. diszulfid híd elhelyezkedése tandemzerű [20]. A fetuin-A molekulák kb. 10%-a az N-kötött, szíalsavat tartalmazó oligoszacharidokon szulfatálódik is [33].

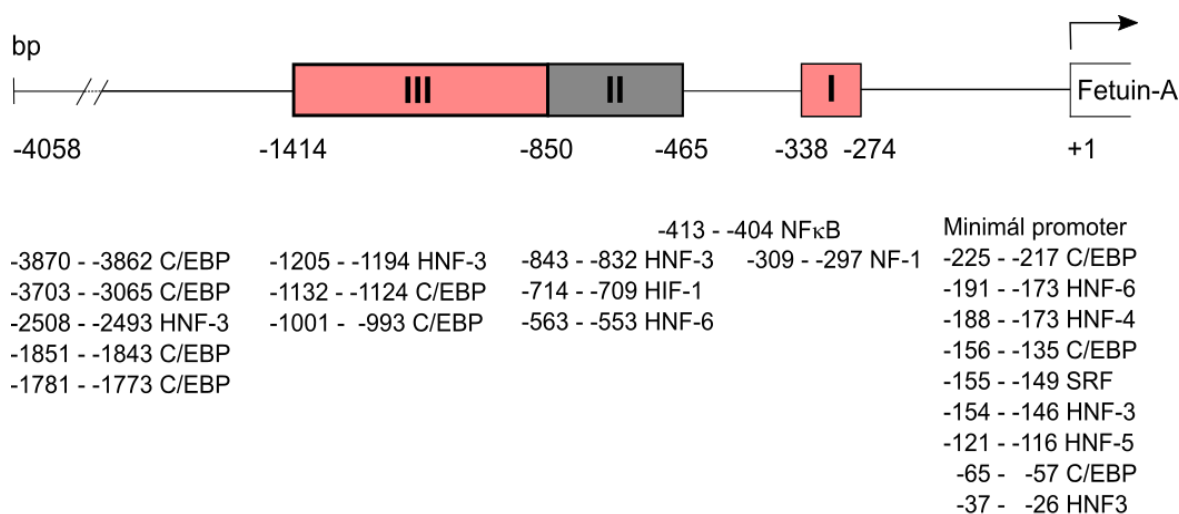
A D3 domén területén két O-glikozilációs és egy foszforilációs (Ser312) hely van [21, 23, 24, 34]. A fetuin-A mintegy 20%-a legalább egy helyen foszforilált. A foszforiláció alapvető a molekula működése szempontjából [17, 23, 24, 35].

A D1 domén az első és a második, a D2 domén a harmadik, negyedik és az ötödik diszulfid hurkot foglalja magába. Ezek a lineárisan elrendezett, tandemszerűen ismétlődő diszulfid hurkok a cisztein proteáz inhibitorokra (cisztatin, kininogén) jellemzők [21, 26, 36].

Szeptikus folyamatokban a humán fetuin-A tovább hasad az összekötő szakasz határain, illetve azon belül [37]. A deszializáció a keringésből történő azonnali eltávolítását vonja maga után a máj aszialoglikoprotein receptorain keresztül [38].

1.3. A fetuin-A gén promoter szerkezete

A fetuin-A-t negatív akut fázis fehérjeként tartják számon, azonban, ahogy később kiderült, koncentrációja terhességben, palmitinsav hatására, HCV fertőzésben, kísérletes körülmények között cerebrális ischaemiában fokozódik, ami fokozott expresszióval magyarázható [39, 40]. Bár a fetuin-A gén expresszióját közvetlenül nem vizsgáltam, a fokozott expresszió molekuláris mechanizmusának tanulmányozására mégis érdemesnek láttam a fetuin-A promoter régió szerkezetének bemutatását (1.3.1. ábra).



1.3.1. ábra. A humán fetuin-A promotere. A fetuin-A gén (AHS) átírása a +1gyel jelölt helyen indul. Az ettől az 5' vég felé eső mintegy 4 kb szakaszon két gátló (III, I, vörössel jelölve), valamint egy serkentő régiót (II, szürkével jelölve) azonosítottak. A -273-tól a transzkripció starthelyig terjedő minimál promoter önmagában is képes az átírás szabályozására. Az I. és III. gátló régió csak a minimál promoteren, a II. is részben csak azon keresztül képes szabályozni a fetuin-A gén átírását. Az ábrázolt promoter szakasz számos, az átírást befolyásoló faktor potenciális kötődési helyét tartalmazza (HNF-1, HNF-4, HNF-6, NFκB, STAT3, C/EBP). Ezek közül csak azokat tüntettük fel, melyek szekvenciája teljesen vagy majdnem teljesen megegyezik a konszenzus szekvenciákkal, azaz valóban reguláló szerepük lehet. Az I. reguláló régió tartalmazza az egyetlen NF-1 kötőhelyet, mely fel- és lefelé reguláló egyaránt lehet, attól függően, hogy melyik másik két régióhoz kötődik. A II. régióban elhelyezkedő 709 – 714. bázispár (TACGTG) megfelel a HIF-1 célszekvenciájának. Rövidítések: HIF:-1: hipoxia által indukálható faktor-1; HNF: hepatikus nukleáris faktor; C/EBP:

CCAT/enhancer binding protein; a transzkripció fokozó faktorok; SRF: szérumszervező faktor (serum response factor); STAT: signal transducers and activators of transcription (Forrás: [41-43]).

1.4. A fetuin-A cisztatin szupercsalád tagja

Az emlős cisztatinok cisztein proteáz inhibitorok. A cisztatin szupercsalád alcsaládjai legvalószínűbben akkor ágaztak el, amikor egy kezdetben egyedül álló cisztatin domén elsődlegesen megkettőződött, mert a fetuin-A két cisztatin doménjében lévő diszulfid hurok sokkal inkább hasonlít a kininogén megfelelő doménjeire, mint egymásra [21, 26, 36]. A másik három alcsaláddal ellentétben a fetuinok elvesztették cisztein proteáz gátló tulajdonságukat [36]. A cisztatin szupercsaládba a cisztatin domének száma alapján négy alcsalád tartozik (1.4.1. táblázat).

1.4.1. táblázat. A cisztatin szupercsalád alcsaládjai

Domének száma	Alcsalád
0	Stefinek*
1	Cisztatinok
2	Fetuin-A, fetuin-B, hisztidinben gazdag glikoprotein, humán cisztatin C
3	Kis és nagy molekulatömegű kininogén

*: Cisztatin domén nélküli intracelluláris molekulák; IRTK: inzulin receptor tirozin kináz

1.5. A szérumszervező A koncentráció életkori változásai

A fetuin-A szérumszervező A koncentrációja a magzati, az újszülött-, a csecsemő- és a kora gyermekkorban lényegesen magasabb, mint felnőttkorban. A főtális szérumban található nagy koncentráció alapján alapvető funkció tételezhető fel. Magzatokban, újszülöttekben és csecsemőkben magas fetuin-A szintet mértek, de ez az alkalmazott mérési módszertől és a terhesség idejétől is függ [44, 45].

A koraszülötteknek magasabb fetuin-A szintjük van, mint az időse szülötteknek [44, 45]. Dziegielewska és mtsai 19 terápiás abortuszból származó magzatot vizsgálva megfigyelték, hogy a fetuin-A szint a 20. gesztációs héttől a 38.-ig növekedett, bár ezt a trendet nem találták szignifikánsnak [46]. A fetuin-A koncentráció a 23.–30. gesztációs hét között érte el maximumát (1000 ± 330 mg/l), majd a 32.–36. hét között 630 ± 260 mg/l-re csökkent, mely a 37.–40. hét között sem változott érdemben: 630 ± 210 mg/l. Ezt követően serdülőkorig lényegében változatlan, 580 ± 120 mg/l értékű volt, mely már megfelel a

felőtttkorban mért tartománynak [44]. Hausler és mtsai 1000 mg/l vagy ennél nagyobb szintet csak koraszülöttekben mértek. A koraszülötteket követve a fetuin-A szint alakulása az időre születettek lefolyását követte, és nem mutatott az extrauterin élethez való adaptációra utaló szintváltozást. A fetuin-A a 37. igazított gesztációs hét után már az ő esetükben is a felnőttkori szintre csökkent [44]. Ez a molekulának a szöveti fejlődésben betöltött általános szerepére utal. Régóta ismert, hogy a 6.–33. gesztációs hét között a fetuin-A számos humán embrionális szövetben, így a csontszövetben, a vesében, a gonádokban, a gyomor-bél traktusban, a tüdőben, a szívben és az agyszövetben is kimutatható, kevéssé a thymusban is, de legfőképpen (életkortól függetlenül) a májban [46]. A fetuin-A kimutatható a főtális liquorban is. Itt 43 mg/l körüli szintet mértek, mely a felnőttkori érték mintegy 25-szöröse. A liquor/plazma fetuin-A koncentráció arány 13,7% a főtuszban, míg felnőttben 0,36% [46]. Mindez a molekulának a központi idegrendszer fejlődésében betöltött valószínűleg igen fontos szerepére utal. A szérumkoncentráció emelkedésének elmaradása, sőt a felnőttkori érték irányába való csökkenése újszülött- és csecsemőkorban nem jelenti feltétlenül a szintézis csökkenését, hiszen ebben az időben a legnagyobb a csontképződés és a mineralizáció, melyben a fetuin-A-nak szintén többes szerepe van. Egyrészt a fiziológiás mineralizációt segíti és beépül a csontszövetbe (a csontszövet nem-kollagén fehérjéi közül a fetuin-A van jelen a legnagyobb mennyiségben), másrészt – valószínűleg az életkortól függetlenül – gátolja az extraosseális kalcifikációt.

Briana és mtsai vizsgálataiban a normál súlyú és az intrauterin növekedésben elmaradt újszülöttek fetuin-A koncentrációja nem tért el egymástól lényegesen [47], de a fetuin-A O-glikoziláltsága hiányzott az utóbbi csoportban [48]. Ez a megfigyelés is a molekula poszttranszlációs modifikációjának funkcionális jelentőségére utal.

Wigger és mtsai 246 (csecsemőkortól 16 év feletti) egészséges gyermeket ELISA-val vizsgálva 220–700 mg/l közötti értéket mértek (átlag: 460 ± 240 mg/l), melyet a nemtől, az életkortól és a BMI standard deviációjától függetlennek találtak [49].

Felötttkorban a fetuin-A-t elsősorban a máj termeli, de több más szövetben is expresszálódik még felnőttben is (zsírszövet, placenta, nyelv) [46, 50]. Egészséges felnöttekben a szérum fetuin-A koncentráció az életkorral csökken [51]. Mások pozitív korrelációt találtak az életkorral (aggkorú, 81–100 év közötti) személyekben [52]. Szívelégtelenségben szenvedő [53] és krónikus veseelégtelenség miatt dializált betegekben az életkor negatívan korrelált a fetuin-A szinttel.

A fetuin-A és a természetes öregedés kapcsolata nem ismert, de több megfigyelés utal arra, hogy a molekula szerepet játszik benne. Jelen ismereteink az inzulinrezisztencia és az agyi működések időskori változásaival kapcsolatosak.

Az öregedés köztudottan az inzulinrezisztencia fokozódásával jár. A fetuin-A génre kiütött egerek védettek az inzulinrezisztencia életkorral járó fokozódásával szemben (80 hetes, azaz 53 év emberi életkornak megfelelő korban vizsgálva) [54].

A fetuin-A szerepe a központi idegrendszer működésében nem ismert, de a már fentebb említett, kiugróan magas agyszövetbeli kifejeződés és liquor-koncentráció meghatározó szerepre utal [46]. Az öregedés vizsgálatának során felvetették, hogy a fetuin-A-nak szerepe lehet az agyi működések megőrzésében, mert szintjének csökkenése a kognitív funkciók romlásával társul [55]. Laughlin és mtsai 1382 idősebb személyt vizsgálva azt találták, hogy a magasabb fetuin-A koncentrációval rendelkező egyének Mini-Mentál teszten nyújtott teljesítménye jelentősen jobb, illetve a Trails B teszten is jobb volt, mint az alacsonyabb fetuin-A szint esetén. A 4 éves követés során a magasabb fetuin-A szint esetén a szellemi hanyatlás mértéke is kisebb volt, de csak azokban a személyekben, akiknek nem volt ismert szív- és érrendszeri betegségük [55]. Egy másik, a szellemi hanyatlást vizsgáló korábbi tanulmányban azt találták, hogy az enyhe és mérsékelt súlyos Alzheimer-betegségben szenvedők fetuin-A koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a korban illesztett, nem Alzheimer-kóros kontrollokban [56]. Geroldi és mtsai szerint az AHS1-1 (rs4917 CC és rs4918 CC) homozigótákban 3,9-szer nagyobb eséllyel alakul ki a betegség, függetlenül az életkortól, a nemtől és az apoE ϵ 4 státusztól [57].

1.6. A fetuin-A molekula biológiai funkciói

1.6.1. A kalcifikáció szabályozása

A fetuin-A-ról szóló első közlésekben is kimutatták, hogy a molekula felhalmozódik a mineralizált szövetekben, így a csontban [12, 14] és a dentinben [58]. A kalciumtartalmú kristályokhoz való affinitás erősségét jellemzi, hogy (több lépés mellett) hidroxipatit kromatográfiás oszlopon lehetett izolálni humán szérumból [59].

A fetuin alkotja az emlős csontok nem-kollagén állományának egynegyedét [14]. A kollagén után a legnagyobb mennyiségben van jelen a plazmában és kalcium-kötő képessége a csont- és porcképződéshez alapvető [30, 60].

A csontszövet AHSZG tartalma az életkorral változik: magzati korban a legnagyobb [274], gyermekkorban lényegesen nagyobb, mint felnőttkorban [78]; az arány 7:3:1 [214].

Már a korai klinikai megfigyelések is arra utaltak, hogy a szérumban a fetuin-A koncentrációja és a csont turnover között mind fiziológiás, mind patológiás viszonyok mellett szoros kapcsolat van. Osteogenesis imperfectában a csontszövet [61] és a szérumban [51, 62] a fetuin-A szintje szignifikánsan magasabb az azonos életkorú egészséges egyénkéhez képest. Tumoros csontátültetéseket szenvedő betegekben [63] és Paget-kórban alacsony szérumszintet figyeltek meg [14, 64, 65], mely negatívan korrelált a szérumban a foszfatáz aktivitással és difoszfonát vagy calcitonin kezelésre normalizálódott [14, 64]. Ez utóbbi betegségben a csontmátrixban a fetuin-A tartalmát is emelkedettnek találták [65]. Osteopetrosisban viszont lényegesen alacsonyabb a csontszövetben a fetuin-A tartalma [65].

A molekulának a mineralizációban betöltött szerepére Jahnen-Dechent és mtsainak knock-out egereken végzett munkája derített fényt. A fetuin-A (AHS) génre knock-out egerek túléltek, sőt, fertilisek voltak. Ugyanakkor a vad egértörzsszel ellentétben vérsavójuk nem gátolta *in vivo* az apatitképződést már a heterozigótákban sem. Homozigótákban extraosseális kalcifikáció jelent meg a lágy szövetekben, a vesében, a tüdőben és a szívdobozban [1]. Az AHS génre knock-out egereknek a növekedési lemezek korai mineralizációja miatt megrövidült hosszú csöves csontjaik vannak [1, 66]. Később kiderült, hogy nem a fetuin-A az egyetlen kalcifikációt gátló molekula, az oszteopontin és a matrix Gla protein (MGP) is hasonló tulajdonságú [22]. A fetuin-A a szérumban a kalcifikációt gátló hatásának feléért felelős [67]. A fetuin-A több módon gátolja a nemkívánatos kalcifikációt.

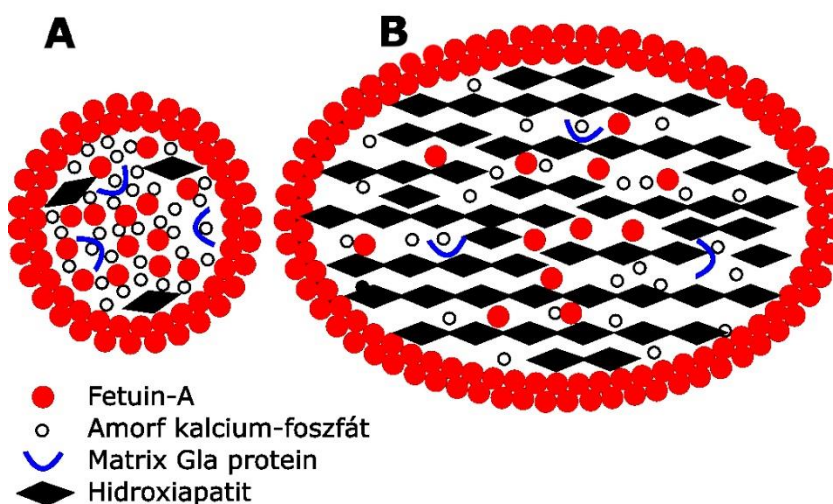
A fetuin-A kalciprotein monomer formájában képes megkötni a kalciumot. A primer kalciprotein partikulumok (CPP-k) 30–150 nm átmérőjű, gömb alakú részecskék, melyek 18%-ban amorf kalciumfoszfátot, 80%-ban fetuin-A-t és 2%-ban MGP-t tartalmaznak [68]. Ásványianyag-tartalmuk kevésbé strukturált. A kalciumfoszfát kristálmaghoz kötődik és ezáltal a további kristálynövekedést gátolja [69]. Stabilizálja a kalciprotein részecskéket: a 100–150 nm átmérőjűek legalább 24 óráig nem növekednek tovább [70]. Ugyanakkor nincs hatással a mineralizációs magok képződésére, viszont megelőzi azok gyors növekedését és aggregációját, ezáltal precipitációjukat [22]. Ezen túlmenően elősegíti a

reticuloendotheliális rendszer (RES) általi opszonizációjukat, mielőtt elérik a precipitációt eredményező nagyságot (1.6.1. ábra) [71].

Az elsődleges CPP-k sorsa kétféle lehet: vagy a reticuloendotheliális rendszer (RES) scavenger mechanizmusai eltávolítják őket, ezáltal nem rakódnak le és nem lesz kalcifikáció, vagy ha ez nem következik be, másodlagos CPP-vé növekednek.

A másodlagos CPP-k túlságosan alakú, az elsődleges CPP-khez képest tömöttebb képződmények, melyekben a kalcium hidroxipatit kristály formájában van jelen. A fetuin-A mellett albumint és savi fehérjéket is tartalmaznak [32, 72]. A molekula védi a mineralizációs fázist, lehetővé teszi a stabil CPP részecskék kialakulását, transzportját és eliminációját [21].

Ez a tulajdonsága nemcsak a szérumban, hanem a vizeletben lévő fetuin-A-nak is megvan [73]. Bár a veseköves betegek szérum fetuin-A koncentrációja nem különbözik az egészségesektől [74], alacsonyabb vizelet fetuin-A koncentrációt írtak le a nem vesekövesekhez képest [74, 75], sőt a veseparenchymában, a nephronokban végig csökkent fetuin-A expressziót mutattak ki immunhisztokémiai vizsgálattal [74].



1.6.1. ábra. Az elsődleges és másodlagos kalciprotein (CPP) részecskék. Az elsődleges CPP részecskék **(A)** gömb alakúak, kevésbé strukturáltak. Az ásványi kötegeket fetuin-A veszi körül. A másodlagos kalciprotein részecskék **(B)** elnyújtottak, a rendezett kristályos ásványi magot veszi körül a fetuin-A. A szekunder CPP atherogén hatásához annak a primerhez képest magasabb apolipoprotein A4, E és C3 tartalma is hozzájárul. Forrás: [22, 76].

Reynolds vizsgálatai világítottak rá, hogy a fetuin-A kulcsszerepet játszik a humán éreredetű simaizomsejtek (VSMC) vezikulum-mediálta kalcifikációjának gátlásában, ezáltal enyhíti a kalcium túlterhelés káros hatásait a kalcifikálódó vezikulák mozgásakor, ily módon indirekt módon gátolva az apoptosist [77]. A szérumból származó molekula együtt fordul elő a kalcifikált simaizomsejtekkel in vitro és az elmeszesedett artériákkal in vivo. A molekula dózisfüggő módon gátolja az érfal simaizomsejtek emelkedett extracelluláris ásványi ion koncentráció által kiváltott meszesedését. Ez részben az apoptózis és a kaszpáz út gátlásával valósul meg. A fetuin-A-t felveszik az érfal simaizomsejtei és intracelluláris vezikulumokban tárolják. A fetuin-A az apoptotikus és élő ér-simaizomsejtek vezikulumaiból történő felszabadulással szekretálódik. A vezikulumokról ismert, hogy a kristálymagképződés fészkei. A fetuin-A jelenléte a vezikulumokban meggátolta a kalciumfoszfát kristályok képződését. Ezen túlmenően a fetuin-A fokozta a vezikulumoknak az érfal simaizomsejtek által történő fagocitózist. Az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése számos enzim (foszfolipáz, proteáz, endonukleáz) aktivációjával jár, és ez a folyamat apoptózishoz vagy nekrozishoz vezet, melyet a fetuin-A csökkenteni képes [78]. A fetuin-A a fibrózis és a csontképződés folyamatában kulcsszerepet játszó TGF- β és a BMP megkötésével is szabályozza a csontképződést [79, 80].

A kalcifikáció gátlása az 1. cisztatin doménhez (D1) kötött. Ezen a doménen található a Ca-kötőhely és attól C-terminális irányban a TGF- β kötőhely is.

Mindezek alapján a fetuin-A egyik legfontosabb funkciója a mineralizációs fázis védelme, a fölösleges kalcium és foszfor megkötése a fiziológián nem mineralizálódó szövetekben, valamint a kalcium és a foszfor csontokba történő szállítása („mineral chaperone” szerep) [72, 81]. Emberben teljes fetuin-A hiányos állapotot eddig nem találtak [82].

1.6.2. A fetuin-A negatív akut fázis fehérje

A fetuin-A szérumkoncentrációjának gyulladásos folyamatokban történő változását rég leírták. Tudjuk, hogy számos heveny gyulladásos folyamatban, így traumában [83], bakteriális fertőzésekben [84], szívinfarktusból [85-87] és malignus betegségekben [88, 89] koncentrációja csökken. Ezek alapján a fetuin-A-t a negatív akut fázis fehérjék között tartják számon mind a mai napig [84]. Ezt erősítették azok az állatkísérletes eredmények, melyekben a proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-6, TNF α), terpentin [90, 91] vagy parciális hepatectomia [91] a fetuin-A expresszió gyors és jelentős csökkenését

eredményezték. Ahogy szaporodtak az ismeretek a szubklinikus gyulladásnak az elhízás és az atherosclerosis kialakulásában játszott szerepéről, a csökkent fetuin-A szintet a szubklinikus gyulladással magyarázták.

Ugyanakkor számos megfigyelés szól amellett, hogy a fetuin-A fékezni is képes a gyulladásos folyamatot. Lipopoliszacharid (LPS) hatására a fetuin-A szint átmenetileg csökken a gyulladás korai fázisában [78, 92]. Fetuin-A adása ugyanakkor javítja az endotoxin sokkos egerek túlélését [92]. A fetuin-A protektív hatásának egyik magyarázata a proinflammatorikus citokinek (IL-1, TNF α) korai termelődésének gátlása sepszisben, ezáltal a high mobility group box-1 (HMGB1) által mediált késői gyulladásos reakció enyhítése [93]. A fetuin-A ezenkívül nélkülözhetetlen a spermin gyulladáscsökkentő hatásának létrejöttéhez [78, 94].

Mai ismereteink szerint a fetuin-A koncentrációja csökken akut gyulladásban, de fokozódik a fertőzések okozta késői gyulladásra adott válaszként. A fetuin-A pozitív akut fázis reaktánsként viselkedik az agyi ischaemiára adott válaszként, mind emberben, mind szarvasmarhában [93, 95, 96]. Ezekben a kórállapotokban a kezdeti sérülés segíti a HMGB1 termelődését, mely ellenhatás nélkül további károsodást és gyulladást idéz elő. A fetuin-A-t ezért a gyulladásos válasz csökkentőjeként és a további károsodás megelőzőjeként tartják számon [93]. A fetuin-A normálisan nem jut át a vér-agy gáton, de az ischaemiás trauma hatására átmenetileg fokozódó permeabilitás következtében bejuthat a károsodás területére [97]. Ezért a gyulladás típusa és forrása fontos lehet a fetuin-A és az immunválasz kapcsolata szempontjából.

1.6.3. Az anyagcserében betöltött szerep: elhízás, metabolikus szindróma és 2-es típusú diabetes

A fetuin-A-nak az elhízás kialakulásában betöltött szerepére kísérletes és klinikai megfigyelések utalnak. A fetuin-A génre kiütött egerek zsírszövetmennyisége jelentősen kisebb volt a vad típushoz képest, és az utóbbival ellentétben nem híztak el magas zsírtartalmú étrend mellett [2]. Hasonlóan védettnek bizonyultak az öregkori elhízás ellen is [54].

A testsúly gyarapodása a fetuin-A szint emelkedésével, míg a fizikai aktivitás vagy bariatrikus sebészeti beavatkozás következtében bekövetkező fogyás a fetuin-A szint csökkenésével jár együtt [98, 99].

Az étrendnek is hatása van a fetuin-A szint alakulására. A többszörösen telítetlen zsírsavak cukorbetegekben javítják az inzulinérzékenységet [100]. A fokozott kalóriabevitel, a szénhidrátban és zsírban gazdag étrend fokozza a fetuin-A expresszióját a máj- és a zsírsejtekben, mely emelkedett szérumkoncentrációhoz vezet [101, 102]. A fetuin-A kötődik a telített zsírsavakhoz és a TLR gyulladásos kaszkádot stimulálja [101, 103]. A kalóriamegvonás viszont csökkenti a fetuin-A szintet [104]. Ugyanakkor ez nem volt megfigyelhető a normális testtömegű személyekben, fokozott fizikai aktivitásra sem [105]. Valószínű, hogy a kalóriamegvonás hatása függ a kiindulási fetuin-A koncentrációtól és a zsírszövet eloszlásától is. Ez utóbbit bizonyítják Perez-Sotelo és mtsai humán vizsgálatai, akik azt találták, hogy a visceralis zsírszövet fetuin-A szekréciója nagyobb, független a BMI-től és könnyebben lehet gátolni fizikai aktivitással és éhezéssel, mint a subcutan zsírszövet esetében [106]. Elhízottakban a subcutan zsírszövet által termelt aktív, foszforilált fetuin-A növekszik és hozzájárul az inzulinrezisztenciához [106].

A fetuin-A génje a 3q27 régióban található, melyet a T2DM, elhízás és metabolikus szindróma régióinak is leírtak [107-109]. A fetuin-A és a T2DM közötti kapcsolatnak számos molekuláris bizonyítéka ismert. A legkézenfekvőbb az IR-TK csökkent foszforilációja és a következményes inzulinrezisztencia az izom- és a zsírszövetben [2, 35, 54, 110]. Elhízott diabéteszes egerekben a fetuin-A csökkenti a gyulladásos zsírsejtek adiponektin szintézisét [111]. Az adiponektin antidiabetikus és antiatherogén adipokin, ez az inzulinrezisztencia fokozódását okozza.

A fetuin-A és a T2DM közötti kapcsolatát vizsgáló klinikai tanulmányok a mi rekombináns fetuin-A-val történő in vitro vizsgálataink után születtek. Több tanulmányban is kimutatták, hogy az emelkedett fetuin-A koncentráció kapcsolatban van a T2DM-mel, sőt hozzájárul annak kialakulásához. Cukorbetegekben magasabb fetuin-A szint mérhető, mint normális glukóztoleranciájú személyekben [112, 113]. Mindez azzal magyarázható, hogy a fetuin-A csökkenti az inzulinra adott választ a receptor autofoszforilációjának gátlása útján [24, 34, 114]. A fetuin-A 2. doménjének szerkezete hasonló a tirozin kinázéhoz, így valóban gátló hatású lehet [24].

Az emelkedett fetuin-A szint a T2DM fokozott kockázatával társult nőkben, de férfiakban nem [115]. Ezzel szemben a 2500 személyt (életkor: 35–65 év) vizsgáló EPIC-Potsdam Study-ban a fetuin-A szint fokozott kockázatot mutatott T2DM-re [116, 117]. A Nurses' Health Study-ban részt vevő nők körében a legfelső fetuin-A kvintilisbe (570 mg/l)

tartozóknak 1,8-szer nagyobb kockázatuk volt, mint a legalacsonyabb kvintilisbe (400 mg/l) tartozóknak [118]. A Health ABC Study-ban is azt találták több mint 3000, 70–79 év közötti személyben, hogy a felső tercilisbe (>970 mg/l) tartozó érték kétszer nagyobb kockázatot jelentett T2DM-re, mint az alsó harmadba tartozó fetuin-A koncentráció [119]. Ezzel összhangban az EPIC-Potsdam tanulmányban a T2DM kockázata 1,75-szorosára növekedett az életkorra történő igazítás után a fetuin-A szélső kvintiliseiben [117]. Az 1 SD fetuin-A növekedésre eső T2DM-kockázat 1,23-1,24-nak adódott [120-122].

1.6.4. A fetuin-A szerepe a szöveti regenerációban

Számos megfigyelés utal arra, hogy a fetuin-A-proteináz interakcióknak szerepük van a szöveti regeneráció szabályozásában. A mátrix metalloproteinázok az extracelluláris mátrix specifikus alkotórészeit bontják le. A fetuin-A számos mátrix metalloproteinázzal lép kapcsolatba, így aktiválja a MMP-3-at [123], valamint serkenti az emberi monociták proMMP-9 termelését [124]. Ugyanakkor gátolja a meprin metalloproteázokat [125], hatással van a cisztein-proteáz m-calpainra [126], mely a fibroblasztok sejtmembrán-sérülését javítja és gátolja a humán rekombináns cathepsint [22].

A fetuin-A a növekedési faktorok, így az inzulin [110], a TGF- β [27], a hepatocytá growth factor/scatter factor (HGF/SF) természetes antagonistája [127] és gátolja a lymphocytá blasztos transzformációt [128].

1.6.5. A fetuin-A daganatos betegségeken

A fetuin-A-nak a rosszindulatú daganatos betegségek kialakulásában betöltött szerepéről több, egymásnak ellentmondó közlemény látott napvilágot. A legkorábbi klinikai vizsgálatok fej-nyaki és egyéb tumorokban csökkent szintet találtak [88, 129]. A fetuin-A szintet a tumorelles cellulás immunitás fokmérőjének tekintették, de később ez nem igazolódott.

A fetuin-A szerepet játszik a TGF- β és az inzulin jelátviteli út szabályozásában, mely csökkent tumornövekedéshez és érképződéshez vezet. Kimutatták, hogy gátolja a TGF- β 1 kötődését a receptorához, amely mérsékli a tumor epitheliális-mesenchymális áttörését. Egy vizsgálatban emberből származó kolorektális tumorminták fetuin-A tartalma az egészséges szövetekének harmada volt [130]. Ezzel egyhangzóan a fetuin-A-ra knock-out egerek belében talált polipok száma és mérete jelentősen nagyobb volt a vad törzsből származó egerekéhez képest [130]. A fetuin-A-nak a MMP-3-hoz történő kapcsolódása,

majd aktivációja révén segíti az egér bőrtumorsejtek megtapadását és a daganat progresszióját [123].

Ugyanakkor a Lewis-tüdőrák növekedése és terjedése óriási mértékben lelassul a fetuin-A hiányos egerekben [131]. Ennek mechanizmusa, hogy a tumorsejtek Ca-dependens módon megkötik a fetuin-A-t, ami fokozott növekedésüket eredményezi [131]. A fetuin-A IRTK gátló tulajdonsága [35, 110] szintén befolyásolhatja a tumorok növekedését, akárcsak az a saját [128] és más laboratóriumból származó [132] megfigyelés, hogy a molekula gátolja a lymphocyták PHA-ra és ConA-ra létrejövő blasztos transzformációját.

A fetuin-A fő adhezív protein, melyhez a BT-549 humán emlőtumorsejtek specifikusan és Ca-függő módon kikötődtek sejtenyészetben [133]. Ezen túlmenően a tumorsejtek képesek voltak felvenni fetuin-A-t a médiumból, majd oda juttatták vissza. A sejtek fetuin-A-hoz való kötődését a foszfatidilinozitol 3-kináz/Akt aktivációja követte, melynek kifejeződése gátlódott azokban a sejtekben, melyekről hiányzott az annexin-A6, a fetuin-A egyik sejtfelszíni receptora [133]. Kis malignitású gliomában szenvedő betegek liquorjában magasabb fetuin-A szintet mértek, mely a műtéti eltávolítást követően a kontrollokéra (egy kivétellel nem malignus neurológiai betegségben szenvedők) csökkent [134].

Ezek a megfigyelések sokszor ellentétesek, a fetuin-A-nak valószínűleg szerepe van a tumorsejtek megtapadásában, a daganat növekedésében és szóródásában, akkor is, ha ezek a sejtek nem termelik. Bár számos rosszindulatú daganat előrehaladott állapotában csökken a szérumban fetuin-A koncentrációja, ennek specifikus klinikai diagnosztikus vagy prognosztikus jelentősége egyik daganatféléseknél sem volt megállapítható.

Az eddig megismert adatok alapján úgy tűnik, hogy a szöveti regenerációban és a daganatok kialakulásában betöltött szerepet, kölcsönhatásokat a sejt körüli, és nem a szérumban fetuin-A koncentráció határozza meg.

2. Gyakrabban vizsgált betegcsoportok és alkalmazott laboratóriumi, statisztikai módszerek

2.1. Az adipokinek és citokinek, a fetuin-A rs4917 és rs4918, valamint a PPAR α intron 7 G/C, PPAR γ 2 Pro12Ala, PPAR γ C161T polimorfizmus vizsgálata egészséges kontrollokban és posztinfarktusos betegekben

Ezekben a vizsgálatokban a Fővárosi Károlyi Sándor Kórházban kezelt 171, szívinfarktust túlélő beteg vett részt, akik értékeit 81 egészséges személyéhez hasonlítottuk.

Az egészséges kontrollok csoportja (1. kohorsz) 81, egészséges kontroll személyből állt (16 férfi, 65 nő, életkor: $60,4 \pm 7,1$ év, átlag $\pm$ SD). Beválasztási kritériumok voltak: fizikális vizsgálattal egészséges státusz, normál tartományban ($18\text{--}25\text{ kg/m}^2$ közötti) BMI és normális laboratóriumi értékek.

A posztinfarktusos betegeknek (2. kohorsz) a vizsgálatot 6–24 hónappal megelőzően volt szívinfarktusuk. Csak STEMI eseteket vizsgáltunk. A szívinfarktus diagnózisát a típusos EKG elváltozások és a troponin emelkedés alapján állítottuk fel. Kizárási kritériumok a következők voltak: akut fertőzés, rosszindulatú daganat, májbetegség, veseelégtelenség, immunszuppresszív kezelés, friss szívinfarktus, stroke (ez utóbbi bármikor), trauma, akut sebészeti állapot. A T2DM diagnózisát a WHO kritériumok alapján állapítottuk meg (éhomi plazma glukóz $\geq 7,0$ mmol/l vagy a 2 órás OGTT során mért 120 perces érték $\geq 11,1$ mmol/l). A cukorbetegeket diétával, metforminnal és bedtime inzulinnal kezeltük. A posztinfarktusos betegek 65%-a sztatin, 70%-uk aspirin kezelést is kapott. Ezeket a vizsgálatokat a Budapesti Károlyi Sándor Kórház Etikai Tanácsa hagyta jóvá.

2.2. A szérum fetuin-A koncentráció meghatározása elektroimmundifúzióval

Az elektroimmundiffúziós (EID) meghatározásokat 1%-os Litex agaróz gélben, 5*5 cm-es üveglemezen végeztük. Antigénként 2 μ l szérumot, antitestként 60 μ l, a gélbe kevert monospecifikus nyúlban termelt anti-humán fetuin-A antiszérumot (0,7 g/l, Behringwerke, Németország) használtunk.

Standardként a korábban általunk tisztított fetuin-A-t alkalmaztuk 200, 400, 600, 800 mg/l koncentrációban. Az elektroforézist Veronal-Na-Veronal pufferben (pH 8,6) 1 V/cm-en 16 órán át végeztük. A készítményeket Amidoschwarz-cal festettük.

2.3. A szérum fetuin-A koncentráció meghatározása radiális immundiffúzióval

A szérum fetuin-A koncentrációt radiális immundiffúzióval 10*10 cm-es lemezen, Litex agaróz gélben határoztuk meg, kecskében termelt monospecifikus anti-humán antitestet használva (IgG frakció, DiaSorin /Insstar Inc., Stillwater, MI, USA, Cat No. 81931, 13,7 mg/ml, végső koncentráció: 84 µl/11,5 ml gél, IACV: 3,6%, IECV: 6,2%). Standardként egészséges véradók poolozott plazmáját alkalmaztuk.

2.4. Egyéb laboratóriumi meghatározások

A CRP koncentrációt particle-enhanced immunoturbidimetriás assay-vel határoztuk meg Roche Cobas Integra 4000 analizátoron. A kimutatási küszöb 0,07 mg/l, az IECV 108 mg/l átlagértéknél 3,9%, az IACV 6,2 mg/l-nél, ill. 142 mg/l-nél 1,8%, ill. 1,5%, az IECV ugyanezeknél a koncentrációknál 2,9%, ill. 2,7% volt.

A szérum α 2-makroglobulin koncentrációt radiális immundiffúzióval határoztuk meg, nyúlban termelt anti-humán α 2-makroglobulint antitestet használva (Dako, Glostrup, Dánia, Cat. No. A0033). A standardok meghatározásához Human Serum Protein Calibratort (Dako, Glostrup, Dánia, Cat. No. X0908) és egészséges véradók poolozott plazmáját használtuk. A mérés IACV-je 3,8%, IECV-je 6,5% volt.

A szérum ORM és transferrin koncentrációt szintén RID-val határoztuk meg, kecskében termelt antitestet használva (DiaSorin, Stillwater, Mi, USA, IgG frakció, Cat No. 81901, ill. 91913, IECV: 4,2%, ill. 5,0%).

Az inzulin koncentrációt direkt humán ELISA kittel (Invitrogen, Camarillo, CA, USA, legalacsonyabb kimutatható koncentráció: 0,17 µIU/ml, IACV: 4,8%, IECV: 8,1%), a C-peptid szintet RIA-val (Biodata, Róma, Olaszország, legalacsonyabb kimutatható koncentráció: 0,2 ng/ml, IACV: 5,6%, IECV: 7,3%, normál éhomi tartomány: 0,66–2,50 ng/ml) mértük.

A szérumban adiponektin és ghrelin szintet RIA-val (Linco Research, St Charles, MO, USA, adiponektin: IACV: 3,86%, IECV: 8,47%, ghrelin: IACV: 7,43%, IECV: 13,45%) határoztuk meg.

A szérumban $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2, Sigma, St.Louis, MI, USA, IACV: 4,8%, IECV: 6,7%), a szérumban sTNFR-1 (sTNFRSF1A, Bender MedSystem, Bécs, Ausztria, IACV: 1,9%, IECV: 8,6%), a sTNFR-2 (sTNFRSF1B, Bender MedSystem, Bécs, Ausztria, IACV: 1,4%, IECV: 2,0%) meghatározást ELISA módszerrel végeztük. A rezisztint és a leptint szintén ELISA-val mértük (rezisztin: Linco Research Inc., IACV: 4,0%, IECV: 7,0%, leptin: DRG International, Mountinside, NJ, USA, IACV: 4,6%, IECV: 6,6%).

A HbA1c értékét HPLC-vel (BioRad, USA, normál tartomány nem-diabéteszesekben: 4,3–5,8%, (23,59–39,93 mmol/mol), a fruktózaminét a Boehringer (Mannheim, Németország) automata analizátorral mértük (normál tartomány nem várandós nem-diabéteszesekben: 185–280 $\mu\text{mol/l}$).

2.5. Statisztikai analízis

A legtöbb vizsgálatban a statisztikai analízist az SPSS v.10, később magasabb, a 23-ig terjedő verziószámú szoftverével (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, ill. a 2010-ben megjelent 19-es verziótól felfelé IBM-SPSS Inc., Armonk, NY, USA), továbbá a GraphPad Prism v3.0 szoftverrel végeztük. A praeeclampsziás betegek vizsgálatánál a STATISTICA (V. 6.1 és v.8.0; StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) és a MedCalc for Windows (v.10.0.1.0; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), az érszűkületes betegek adatainak elemzésekor a GraphPad v5.1 program került alkalmazásra. Ez utóbbi tanulmányban a képző eljárásokat értékelők közötti megbízhatóságot a kappa statisztikai teszttel vizsgáltuk. Mivel az elemzések döntő többségében nem mindegyik paraméter követett normál eloszlást, a nem-paraméteres próbákat használtuk.

3. A rekombináns humán fetuin-A-val végzett vizsgálatok

A fetuin-A-nak 5 szénhidrát lánc van, melyből kettő N, három O típusú és az eltérő szializációból eredő különbség felelős a keringő fehérje kiterjedt mikroheterogenitásáért. A fetuin-A-nak kiterjedt genetikai polimorfizmusa van [135].

Vizsgálatainkat az a megfigyelés indította el, hogy a pp63 fehérje, mely a fetuin-A homológja patkányban, foszforilált, és az inzulin receptor természetes antagonistájának bizonyult [35]. A fetuin-A és a pp63 aminosav sorrendje 61%-ban egyezik, viszont számos strukturális rész konzervált mindkét fehérjében, így különösképpen a két cisztein reziduum száma és helyzete teljes mértékben megőrzött [21]. Nem volt ismert az sem, hogy az összekötő peptid leválása a májsejtben, vagy a fehérje exportálása során, vagy a keringésben, esetleg a tisztítás során következik be.

A molekula törékenysége és viszonylag nehéz izolálhatósága miatt elhatároztuk, hogy rekombináns fehérjét állítunk elő rovarsejtekben, a bakulovírus expressziós rendszerben.

A rekombináns fehérje vizsgálatával kettős célunk volt:

1. Célul tűztük ki a natív rekombináns fehérje poszttranszlációs modifikációjának vizsgálatát. Különösképpen kíváncsiak voltunk a foszforilációs állapotra, valamint az összekötő peptid jelenlétére. A vizsgálathoz izoelektromos fókuszálást és SDS-PAGE elektroforézist követően, különböző antitestekkel végzett immunblottot használtunk. A rekombináns fehérje poszttranszlációs modifikálását a plazmából, humán májsejtekből származó fehérjékével hasonlítottuk össze.
2. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy vajon a humán fetuin-A is gátolja-e az IRTK-t. Munkánk befejezésekor jelent meg Srinivas és mtsainak közleménye, melyben szintén rovarsejtekben fejezték ki a humán fetuin-A-t, és a mi eredményeinkkel megegyezően azt találták, hogy a fetuin-A gátolja az IRTK-t [12].

3.1. A rekombináns humán fetuin-A előállítása és poszttranszlációs modifikációjának vizsgálata

3.1.1. Módszerek

3.1.1.1. A fetuin-A cDNS klón izolálása

Normál humán májból λ 11 fág segítségével konstruált cDNS könyvtárat anti-fetuin-A-val (Behringwerke Marburg, Németország) pásztáztunk (screeneltünk).

A könyvtár pásztázása során korábban 50 000 cDNS bakteriális plakkot átvizsgálva 5 olyan klónt találtunk, melyek konzekvensen reagáltak az antiszérummal. Ezekből egy 1,2 kb hosszú cDNS-t sikerült izolálnunk, mely nem tartalmazta a bevezető szekvenciát és az első 99 aminosavat. Ezért egy másik cDNS könyvtárat vizsgáltunk végig ezzel a részleges inzerttel. Sikerült a teljes kódoló szekvenciát tartalmazó, kb. 1,5 kb hosszúságú cDNS-t izolálnunk. Ezt a cDNS-t a p-Bluescript KS (-) plazmidba (Stratagene, La Jolla, CA, USA) klónoztuk és teljes hosszában szekvenáltuk [136]. A cDNS két szálának dideoxi szekvenálása azt mutatta, hogy a fehérje teljes hosszúságában megvolt, a bevezető peptiddel együtt. Az általunk talált szekvencia az ATG kodontól 4 bázissal följebb kezdődött és teljesen megegyezett a korábban leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a 419. helyen A helyett C nukleotidot találtunk, mely a 106. aminosav helyen lizin helyett treonint kódolt. Ez valószínűleg egy fetuin-A allél variánsnak felelt meg.

3.1.1.2 A rekombináns bakulovírus transzfer vektor (pVL1392-fetuin-A) előállítása

A fetuin-A inzertet EcoRV és BalI restrikciós enzimmal kivágtuk p-Bluescriptből és a pVL1392 transzfer plazmid (In Vitrogen, San Diego, CA, USA) SmaI helyére klónoztuk, blunt-end kötéssel. A kapcsolódások szekvenciája a vártak megfelelő volt. Az inzert orientációjáról a megfelelő restrikciós emésztéssel nyert szakaszok hosszúságának analízisével győződünk meg.

3.1.1.3. A rekombináns vírus előállítása

Az Sf9 Spodoptera Frugiperda rovarsejtvonalat (In Vitrogen) 10% főtális borjúsérumot (FCS) tartalmazó 27°C hőmérsékletű Grace mediumban szuszpendáltuk palackonként 3×10^6 sűrűségben. Két μ g PVL1392-fetuin-A DNS-t transzfektáltunk 1 μ g Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Vírussal (ACMNPV, In Vitrogen). A sejteket 5 napig 10% FCS-ban inkubáltuk, majd a rekombinánsokat dot-blottal (BioRad, Richmond, USA) azonosítottuk. Az azonosításhoz random priming módszerrel jelölt fetuin-A cDNS-t

használtunk (Stratagene, La Jolla, CA, USA) [137]. A pozitív sejteket limitált hígítással egy darab rekombináns vírus szintjéig tisztítottuk. A végső izolátum 10^{-7} -ig terjedő hígításban pozitív volt.

3.1.1.4. A rekombináns humán fetuin-A termeltetése rovarsejtekben és a fehérje izolálása

A bakulovírust 2,5 ml térfogatban (plakk assay-vel meghatározott titere: $9 \cdot 10^8$ pfu/ml) adtuk 10^6 Sf9 sejthez T75 sejt kultúra edényben (teljes térfogat: 32,5 ml). A vad és a rekombináns vírussal fertőzött sejteket 27 C-on FCS-t nem tartalmazó Grace médiumban tároltuk. Előzetes kísérleteink alapján a fehérje termelésének optimuma a 7. napra esett, ezért ekkor gyűjtöttük le a felülúszót, majd 200 pM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) adtunk a sejtekhez.

3.1.1.5. Egyéb sejt kultúrák

A Hep3B sejt vonal az American Type Culture Collectiontól származott és 10% FCS-t tartalmazó Dulbecco módosított Eagle médiumban tartottuk. A sejteket FCS-mentes médiumban inkubáltuk és szintén FCS-t nem tartalmazó médiumban voltak 5 napig, majd legyűjtöttük a felülúszót.

3.1.1.6. Antitestek

Fetuin-A ellenes antitestek. A fetuin-A ellenes antitesteket először dr. Baudnertől (Behringwerke, Marburg, Németország) kaptuk. A további kísérletekhez a tisztított fetuin-A 200 mg mennyiségével nyulakat immunizáltunk. Az első oltást 100 mg-os booster adag követte a 3., a 4. és az 5. héten. Az antitestet normál humán szérum és tisztított fetuin-A ellenében vizsgáltuk.

A nyulakat az első oltást követő 12. héten véreztettük el. Kettős immundiffúzióval, immunoelektroforézissel és Western blot tál vizsgálva az antiszérum nem mutatott keresztreakciót semmilyen humán vagy rovarfehérjével. Az antiszérumot immobilizált Protein-A-t tartalmazó oszlopon affinitás-kromatográfiával tisztítottuk, és 1:1000 hígításban a Western blot-hoz használtuk.

Az összekötő peptid elleni antitestek. A B lánc utolsó 10 (azaz az egyláncú fehérje 340.–349. aminosava) ellen termelt antitest Dr. W. Jahnen-Dechent ajándéka volt. Ezzel az antitesttel a redukáló körülmények között futtatott immunblotokon különbséget tudtunk

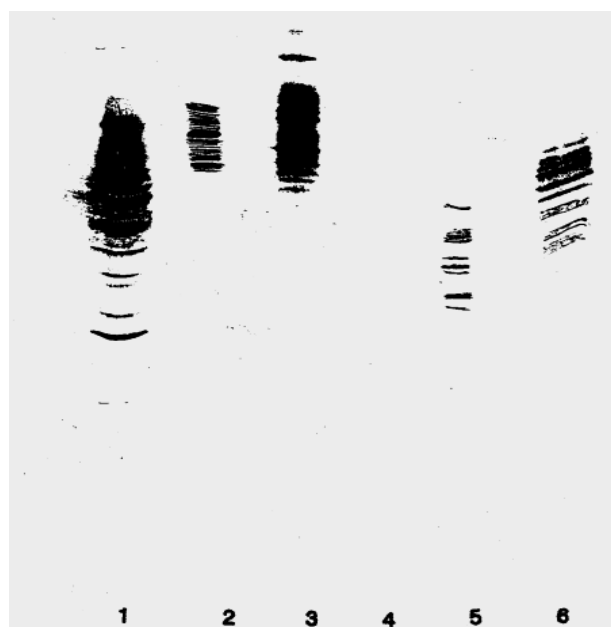
tenni az egy- és a kétláncú fetuin-A között. Az összekötő peptid ellenes antitestet 1:1000 hígításban a Western blothoz használtuk.

3.1.1.7. Metabolikus jelzés és immunprecipitáció

A ^{32}P izotóppal történő jelölést a Jahnen-Dechent és mtsai által leírt módon végeztük [138]. A sejteket foszformentes médiumban mostuk, és kb. 300 μCi ^{32}P -ortofoszforsavat adtunk a 10 cm átmérőjű Petri csészében lévő 10^6 sejthez. Négy órán át tartó 37 C-os inkubációt követően a felülúszót 2500/perc fordulatszámra lecentrifugáltuk és 20 μl fetuin-A-ellenes szérumot adtunk hozzá. A csöveket 4°C-on 1 órán át folyamatosan rázva 50 μl protein A-agarózt (Pierce, Rockford, IL, USA) adtunk hozzájuk, majd 4 C-on 1 órán át inkubáltuk. Az agarózt a fenti paraméterekkel történt centrifugálással távolítottuk el, majd 3-szor Tnet pufferben mostuk [138]. Utána 100 μl SDS mintapuffert (mely 2-merkaptoetanolt tartalmazott) adtunk mindegyik galacsinhoz, és 10 perces forralás után 25 μl -nyi mennyiségeket SDS gélen futtattunk (10% folyamatos gél). A géleket Whatman 3MM szűrőpapíron szárítottuk és XOMAT-AR filmre exponáltuk (Kodak, Scientific Imaging Films) -70°C-on éjszakára.

3.1.2. Eredmények

A fetuin-A izoelektromos képét az 3.1.1. ábra mutatja.

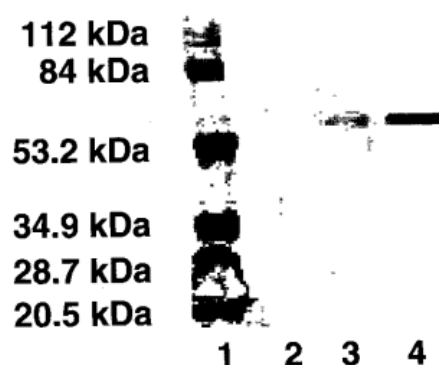


3.1.1. ábra. A különböző eredetű fetuin-A molekulák izoelektromos fókuszálós képe. A gél pH grádiense 3,5–8 között volt. A futtatás és az immunblot körülményeit Boutin és mtsai leírása alapján állítottuk be [139]. Első antitest: nyúlban termelt anti-humán fetuin-A 1:1000 hígításban. Második antitest: peroxidázzal jelzett, kecskében termelt anti-nyúl antiszérum (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). A katód felül van. 1. oszlop: Hep3B sejt felülúszó, 2. oszlop: HepG2 sejt

felülúszó, 3. oszlop: normál humán szérumból tisztított fetuin-A, 4. oszlop: rovarsejtek felülúszója, 5. oszlop: rekombináns fetuin-A, 6. oszlop: normál humán szérum.

A tisztítást követően a fetuin-A csíkok sorozatként mutatkoztak, melyek a normál humán szérumból származókhöz képest az anódhoz közelebb helyezkedtek el. Ezzel ellentétben a Hep3B sejtek felülúszójából származó fetuin-A a normál humán szérumhoz származóhoz képest is katodálisan helyezkedett el, és leginkább a rekombináns vírussal transzfektált Sf9 sejtek felülúszójából származó fetuin-A-hoz hasonlított.

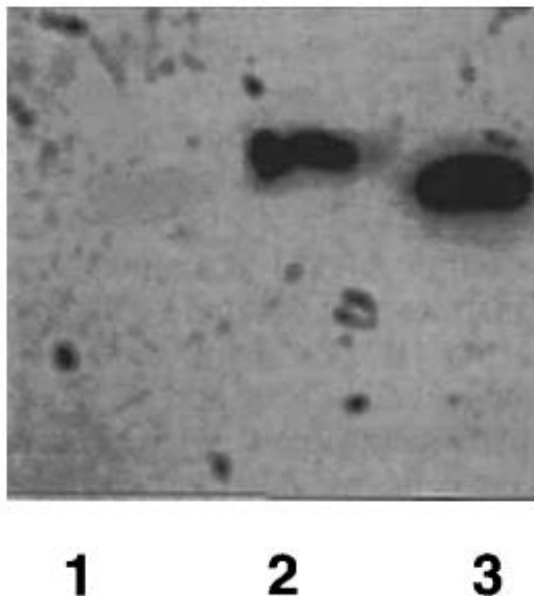
A 3.1.2. ábra a rovarsejtek és a Hep3B sejtek felülúszójában lévő fetuin-A-t hasonlítja a normál humán szérumból származó molekulához az összekötő peptid jelenlétének szempontjából.



3.1.2. ábra. Az összekötő peptid jelenlétének vizsgálata a különböző eredetű fetuin-A molekulákban immunblottal. A mintákat 10%-os SDS-PAGE-n futtattuk, redukáló körülmények között. A futtatás befejeztével a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk éjszakára. A membránokat Kellermann módszere szerint kezeltük [21], azzal a változtatással, hogy az első antitest a fetuin-A összekötő peptidje ellen irányuló antitest volt [138]). A színreakció labilitása miatt a blotot az előhívás után azonnal digitalizáltuk AppleColor Scannerben OfotoTM 1.1. szoftver alkalmazásával (Light Source Computer Images, Greenbrae, CA, USA). 1. sor: molekulatömeg markerek (Bio-Rad), 2. sor: normál humán szérum 1:100 hígítás, 5 μ l, 3. sor: hígítatlan Hep3B felülúszó, 20 μ l, 4. sor: a rekombináns bakulovírussal transzfektált sejtek hígítatlan felülúszója, 20 μ l.

A membránokat az összekötő peptid-ellenes antiszérummal hibridizálva látszik, hogy a Hep3B és a rekombináns bakulovírussal transzfektált sejtek felülúszója reagál az antiszérummal, viszont a normál humán szérumból származó fetuin-A nem.

Amikor a sejteket ^{32}P izotóppal jelöltük és a felülűszót specifikusan immunprecipitáltuk, mindkét májsejtvonal és a rovarsejtvonal is metabolikusan jelződött, mutatva, hogy a fetuin-A foszforilálódott ezekben a sejtekben (3.1.3. ábra).



3.1.3. ábra. A sejt felülűszókban lévő ^{32}P izotóppal jelzett fetuin-A autoradiográfiás képe. A Hep3B sejteket és a rovarsejteket ^{32}P -vel jelölt ortofoszfátot adtunk 4 órán át. Az összes felülűszót immunprecipitáltuk fetuin-A- és Protein-A agaróz-ellenes specifikus antiszérummal. A precipitátumok izolálása után 100 μl , 2-merkaptoetanolt is tartalmazó SDS puffert adtunk hozzájuk, és 25 μl mintát 10%-os SDS gélen futtattuk. A futtatás után a gélt megszáritottuk és autoradiográfiás filmen exponáltuk. 1. oszlop: a vad típusú AcMNPV bakulovirussal transzfektált rovarsejtek felülűszója, 2. oszlop: Hep3B sejt felülűszó, 3. oszlop: a rekombináns bakulovirussal transzfektált rovarsejtek felülűszója.

A foszforilációt foszfoszerin-ellenes monoklonális antitesttel (Sigma, 1:200-as hígítás) is vizsgáltuk az immunprecipitátumokban. Csak a sejt kultúrákból származó precipitátumokkal kaptunk pozitívítást, a normál humán szérumból származó fetuin-A-val nem.

3.1.3. Megbeszélés

Elsőnek mutattunk rá a humán fetuin-A foszforiláltságának jelentőségére [140]. Az a felfedezés, miszerint a humán fetuin-A a patkányban lévő IRTK gátló tulajdonságú pp63 foszforilált fehérje homológja, fontos előrelépés volt a fetuin-A biológiai szerepének megértéséhez [35, 141].

Bár a humán és a patkány fehérje aminosav sorrendje csak 60%-ban azonos, a cisztein reziduumok száma és helyzete, a két cisztatin domén teljesen konzervált. Emellett a glikozilációs szekvenciák, a proteolitikus vágási, valamint a foszforilációs helyek is azonosak mindkét fehérjében [141].

Korábban azt találtuk, hogy a humán szérumból származó fetuin-A nem gátolta számottevően az IRTK aktivitást izolált inzulin receptorokon. A májsejtvonalak felülúszóiból származó fetuin-A szintén nem mutatott meggyőző gátló hatást. Ezt a fehérje törekenységével és tisztításának nehézségeivel magyaráztuk. Másoknak is volt hasonló megfigyelésük [141]. Ugyanakkor Srinivas és mtsai olyan fetuin-A frakciót izoláltak affinitáskromatográfiával, melynek volt IRTK gátló hatása [110]. Ezért mi olyan rekombináns bakulovírust állítottunk elő, mely rovarsejtekben termelte a fetuin-A-t. A rekombináns fehérje dózisfüggő módon gátolta a receptor autofoszforilációját, de nem gátolta meg az inzulin receptorához történő kötődését. Két hónapos -70°C-on való tárolás után a rekombináns fehérje aktivitása felére csökkent. Ez arra utalt, hogy a rekombináns fehérje megváltozott, szükségessé téve a rekombináns fehérje poszttranszlációs modifikációjának vizsgálatát.

A különböző eredetű fehérjék izoelektromos fókuszálással és immunfixációval történő vizsgálata azt mutatta, hogy a normál humán szérumból származó fetuin-A a katódhoz közelebb helyezkedett el a Hep3B és a rovarsejt eredetű fehérjéhez képest, bár mindegyikük jelentős kifejezett mikroheterogenitást mutatott. Ismert, hogy a fetuin-A mikroheterogenitását főleg a szíalsav-tartalom eltérése adja [135, 139], ezért valószínűleg nem a glikozilációs különbség felelős a pI-ben látható eltérésekért. Az összekötő peptid ellen termelt monospecifikus antitesttel kimutattuk, hogy mind a májsejtvonalakból, mind a rovarsejtekből származó natív fetuin-A-n van összekötő szakasz. Mivel a mintákat redukáló körülmények között futtattuk, a natív fetuin-A egy láncként volt jelen. A natív egyláncú fetuin-A kétláncúvá alakulását humán májsejtvonalon tanulmányozták [138]. A HepG2 és a Hep3B sejtvonal által termelt fetuin-A is egy láncból áll, de a felülúszóban mind az egyláncú, mind a kétláncú forma jelen van [138]. A rovarsejtek által termelt fetuin-A is egyláncú.

A következő lépésben a fetuin-A foszforilációját vizsgáltuk. A fetuin-A csak egy szerin helyen foszforilált [138]. A HepG2 sejtek teljes foszforilált fetuin-A-t termelnek [138]. Az immunprecipitációt és autoradiográfiát követő metabolikus jelzéssel kimutattuk, hogy a

bakulovírus expressziós rendszerben termelt rekombináns humán fetuin-A is foszforilált. A foszforiláció mértéke a májsejtvonalakban találtakkal azonos mértékű volt. A foszfoszerin-ellenes monoklonális antitesttel vizsgálva a normál humán szérumból származó fetuin-A nem tartalmazott foszfoszerint (a mi mérési tartományunkon belül).

Vizsgálataink gyakorlati jelentősége a következő: Mivel a rekombináns fetuin-A hatékonyan gátolja az IRTK-t, miközben a szérumból származó molekula vagy hatástalan [141], vagy legalábbis 100-szor kevésbé hatásos [142], arra utal, hogy a molekula szekrécióját követően kialakuló szerkezeti változásoknak nagy jelentőségük az IRTK aktivitás gyors gátlásának a szérumban. Eredményeink arra utalnak, hogy ez a gátlási folyamat az összekötő peptid defoszforilációján és/vagy hasításán keresztül valósulhat meg. Megfigyelésünket nemrégén állatkísérletben és humán vizsgálatban igazolták: a fetuin-A foszforilált formája az, amelyik aktívan gátolja az inzulin hatását és mutat összefüggést az elhízással és az inzulin rezisztenciával [143].

3.2. A teljes hosszúságú humán rekombináns fetuin-A gátolja az inzulin receptor tirozin kinázt

3.2.1. Módszerek

3.2.1.1. A rekombináns fetuin-A tisztítása

Az SF9 sejtfelülűszóban lévő fetuin-A-t affinitás-kromatográfiával izoláltuk immobilizált Procion Red (Red Sepharose CL 6 B) oszlopon (Pharmacia, Piscataway, N.J., USA) [144]. A szeparálás hatásfoka 30% feletti volt. A mintákat -80°C-on tároltuk további felhasználásig. Az assay-k előtt az extraktumokat Ultrafree-MC centrifuga filtrációs egységet használva (molekulatömeg határ: 10 000 D), dialízissel koncentráltuk, majd az assay puffernek megfelelő koncentrációra hígítottuk. Hasonlóképpen a vad típusú ACPNV vírussal transzfektált rovarsejtek felülűszóját is átfuttattuk a Procion Red oszlopon. Azokat a sorszámú oszlopokat, melyek a rekombináns fehérje izolálásakor a fetuin-A-t tartalmazták, a vad típus eluálásakor összeöntöttük és negatív kontrollként használtuk.

3.2.1.2. Inzulin receptor készítmények

A fetuin-A-nak az IRTK aktivitásra gyakorolt hatását két receptor preparátumon vizsgáltuk.

A humán inzulin receptorok a teljes szekvenciát (-exon11) tartalmazó, SV40 korai promoteren stabilan transzfektált patkány embrió fibroblasztokból (Rat-I sejtek) származtak [145]. A humán inzulin receptort fokozottan expresszáló Rat-I sejteket a korábbiakban leírtak szerint kezeltük [146]. A receptorokat WGA-agaróz oszlopon lektin affinitáskromatográfiával izoláltuk [147].

A patkány inzulin receptorokat patkány izomsejtekből nyertük a fent említett módon [147], feloldottuk, majd szintén WGA affinitáskromatográfiával tisztítottuk.

A receptorokat -80°C-on tároltuk felhasználásig. A WGA oszlopok eluátum inzulinkötő kapacitását ekvilibrium inzulin kötéssel mértük, A14(¹²⁵I) inzulint alkalmazva (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA, specifikus aktivitás: 100–140 mCi/mg), nem jelzett inzulin hiányában vagy jelenlétében [146, 147]. Nem specifikusnak az 1 mmol inzulin jelenlétében létrejövő kötődést tekintettük, és ezt háttérként levontuk.

3.2.1.3. Az IRTK aktivitás mérése

Az IRTK aktivitását a polyGlu-Tyr (4:1) (Sigma, Saint-Louis, Mo, USA) szintetikus szubsztrát assay-vel mértük, a korábbiakban leírt metodika [146-148] módosításával. A WGA eluátomokat (~25 fmol inzulinkötő kapacitás) 60 percig 24 C-on inkubáltuk, 2 vagy 100 nmol inzulin jelenlétében (vagy a háttérben anélkül), 1 mmol MnCl₂, 10 mmol MgCl₂, 0,1 mmol nátriumvanadát és 0,025% bovin szérum albumin oldatban (össztérfogat: 65 µl), melyhez vagy 10 µl assay puffert vagy 10 µl tisztított rovarsejt-felülűszót adtunk. A rovarsejteket előzetesen vagy a fetuin-A génnel, vagy a vad típusú bakulovírussal transzfektáltuk (negatív kontroll). Az egy órás inkubációt követően polyGlu-Tyr-t adtunk a rendszerhez (végső koncentráció: 0,2 mg/ml). A reakciót 5 perccel később, 25 pmol γ³²P-ATP hozzáadásával indítottuk, és 5 perces, 24°C-on történő jelölést követően 50 mmol jelöletlen ATP adásával állítottuk le. Az aliquotokat Whatman 3 MM szűrőpapírra vittük át, és jéghideg 10%-os triklórecetsav és 10 mmol Na₄P₂O₇ oldatban háromszor mostuk, majd megszáritottuk. A ³²P mennyiségét szcintillációs spektrofotométeren határoztuk meg. A polyGlu-Tyr nélküli minták értékét mint háttéraktivitást kivontuk azon mintákból, melyekhez szubsztrátot adtunk.

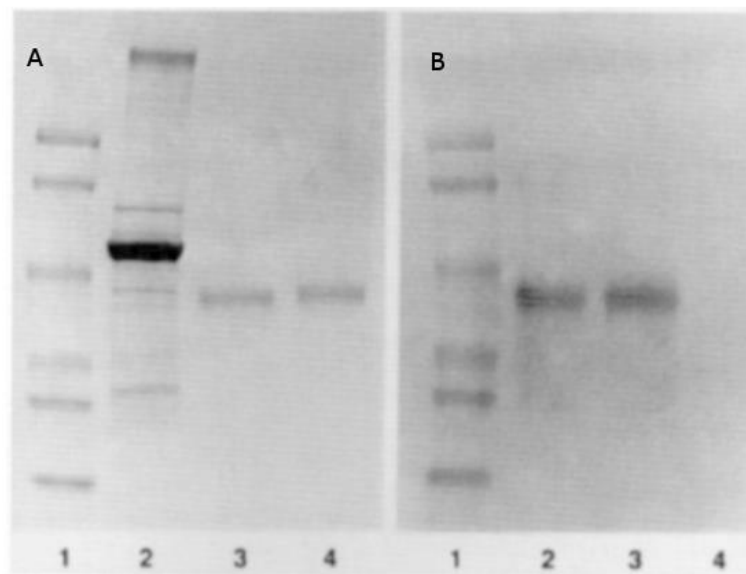
Mivel a vad típusú bakulovírussal transzfektált sejtek felülűszójában nem volt fehérje kimutatható mennyiségben, néhány mérésben α1-acid glikoproteint (ORM) adtunk hozzájuk. Az ORM-nak hasonló molekulatömege van, és a korábban leírtaknak megfelelően tisztítottuk [149].

3.2.1.4. Egyéb módszerek

A fehérjét Bradford módszerével [150] mértük (BioRad Richmond, CA, USA). A fetuin-A koncentrációt EID-val mértük, fetuin-A ellenes antitestet (Behringwerke GmbH, Marburg, Németország) használva.

3.2.2. Eredmények

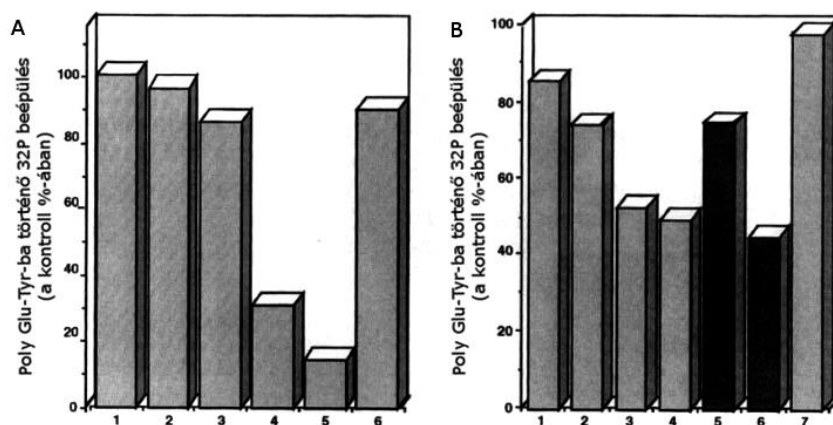
Az SDS PAGE-sel vizsgálva a preparátum homogénnek bizonyult (3.2.1. ábra).



3.2.1. ábra. A rekombináns fetuin-A tisztítása. A rovarsejt felülűszót immobilizált Procion Red oszlopon frakcionáltuk. A fetuin-A-t tartalmazó frakciókat összeöntöttük és koncentráltuk. Öt μ nyi mennyiségeket SDS-PAGE-n futtattuk, redukáló körülmények között. **A.** Coomassie Brilliant Blue festékekkel festett SDS-PAGE. 1. oszlop: előzetesen festett molekulatömeg markerek (felülről lefelé: β -galaktozidáz (116250 D), foszforiláz B (97400 D), bovin szérum albumin (66200 D), ovalbumin (45000 D) szénsav-anhidráz (31000 D), szójabab tripszin inhibitor (21500 D) és lizozim (14400 D)); 2. oszlop: normál humán szérum (NHS) 1:50 hígításban; 3. oszlop: tisztított rekombináns fetuin-A (kb. 250 ng); 4. oszlop: kontroll fehérje: tisztított α 1-acid glikoprotein (ORM), kb. 300 ng. **B.** Nitrocellulóz membránra blottolt SDS-PAGE gél. A membránt nyúlban termelt anti-humán fetuin-A antiszérummal mint első antitesttel, majd kecskében termelt, peroxidázzal jelzett anti-nyúl antiszérummal reagáltattuk. A membránt 4-kloro-1-naftollal festettük. Az oszlopok megegyeznek az A részben leírtakkal. A NHS-t 1:50 hígításban, a fetuin-A-t kb. 50 ng, az ORM-t kb. 60 ng mennyiségben alkalmaztuk.

3.2.2.1. Az IRTK aktivitás meghatározása

A rovarsejt felülűszók tisztítását követően egy héten belül elvégzett IRTK aktivitásvizsgálat eredményét a 3.2.2. ábra A része mutatja.



3.2.2. ábra. Az IRTK aktivitás mérése. **A.** Oldatba vitt, rekombináns humán inzulin receptorokat vizsgáltunk a polyGlu-Tyr-ba történő ³²P beépüléssel a fent leírt módon. A maximálisan stimulált értéket vettük 100%-nak (~9200 cpm/5 min 100 nmol inzulin jelenlétében). 1. oszlop: a vad típusú bakulovírussal kezelt Sf9 sejtek felülszója; 2.–5. oszlop: a rekombináns fetuin-A-t tartalmazó felülszó 0,06, 0,33, 1,65 és 3,3 μ mol koncentrációban; 6. oszlop: a vad típusú felülszó + 3 μ mol koncentrációjú α 1-acid glikoprotein (ORM). **B.** A -80°C-on mintegy 2 hónapig tárolt fetuin-A hatása a humán rekombináns inzulin receptorokra 0,83, 1,65, 3,3 μ mol koncentrációban (2.–4. oszlop), és a patkány harántcsíkolt izomból preparált inzulinreceptorra 3,3 μ mol koncentráció. Az 1. oszlop a humán, az 5. oszlop a patkány eredetű receptor aktivitását mutatja, a vad típusú bakulovírussal fertőzött sejtek felülszójával történő kezelést követően. A 7. oszlop a vad típusú bakulovírus és a 3 pmol ORM hatását mutatja. Minden érték legalább két mérés átlaga.

A szolubilizált, rekombináns humán inzulin receptor dóziszfüggő módon gátolta az IRTK aktivitást. A bazális IRTK aktivitás a maximális érték 15–30%-a volt, míg a 2 hónapig tárolt minta esetében kevesebb, mint 5%. Az IRTK aktivitására a negatív kontroll (vad típusú bakulovírus és ORM) nem volt hatással.

Alacsony, 0,06 μ mol (3 mg/l) és 0,33 μ mol (17 mg/l) koncentrációban a rekombináns fetuin-A-nak alig volt gátló hatása (7%, ill. 11%). Magasabb koncentrációban 1,65 μ mol (83 mg/l) a gátló hatás már 69%, és 3,3 μ mol (166 mg/l) esetében 87% volt. A fetuin-A a bazális IRTK aktivitást csak alig gátolta, ami megegyezik mások korábbi megfigyeléseivel [35].

Két hónapig tartó, -80°C-on történt tárolást követően az assay-eket megismételtük (2B ábra). A fetuin-A IRTK aktivitást gátló hatása jelentősen csökkent: a legnagyobb (166 mg/l) koncentráció is csak 50%-os gátlást eredményezett. A patkány és a humán receptorok gátlása hasonló volt. A fetuin-A preparátumot 7 hónapig -80°C-on történő tárolás után újra tesztelve a gátló aktivitás tovább csökkent: 166 mg/l-nél 22%-nak és 332 mg/l-nél 34%-nak adódott.

3.2.3. Megbeszélés

Vizsgálataink megjelenésekor az elsők között mutattunk rá a humán fetuin-A foszforiláltságának jelentőségére [140, 151].

Amikor Auburger és mtsai kimutatták, hogy az IRTK-t gátló patkány pp63 fehérje a humán fetuin-A homológja, feltételezték, hogy az emberi fehérjének ez a gátlás a fő biológiai funkciója [35]. A normál humán szérumból származó fetuin-A-nak ilyen hatását nem sikerült kimutatnunk. A Hep3B sejtek felülúszójából tisztított fetuin-A hatásosságát is megkérdőjelezték [141, 152]. Nem sokkal később mások is igazolták, hogy a patkány pp63 a humán fetuin-A homológja és gátolja az IRTK-t, de a humán plazmából szeparált molekula nem [141, 142]. Bár csak 61%-ban egyezik a két fehérje, mind a 14 cisztein reziduum konzervált mindkét speciesben [153]. Az irodalomban talált eltérések részben abból származhatnak, hogy a fetuin-A igen törékeny molekula. Később bizonyították, hogy a keringésben lévő formából hiányzik az összekötő szakasz [19, 138], mely felelős az IRTK gátlás hiányáért [35, 141] vagy legalábbis gyenge aktivitásáért [110]. A mi rekombináns preparátumunk gátló hatásának idővel történő csökkenése is valószínűleg a molekula fokozott fragilitásával függ össze.

Az IRTK aktivitás gátlásával szubsztrátjának IRS-1 foszforilációját is gátolja, a foszfatidil-inozitol-3-kináz p85 alegységén keresztül [110]. Mind a pp63, mind a fetuin-A gátolja az inzulin hatását ép sejtekhez adva is [110, 149]. Ezek a fehérjék az inzulin receptor sejtfelszíni doménjével lépnek kapcsolatba, de magával az inzulin molekulával nem. Később kiderült, hogy a fetuin-A molekula az inzulin receptor β lánc 95 kd alegységével lép kapcsolatba és így gátolja az inzulin receptort [34].

4. A szérum fetuin-A koncentráció vizsgálata májbetegségekben

Vizsgálatainkat megelőzően alig jelent meg közlés a fetuin-A szintről májbetegségekben. Az egyéb klinikai paraméterekkel történő kapcsolatot nem elemezték. Két, akut hepatitiszes betegeket [154, 155] és egy, a májcirrhotikus betegek fetuin-A glikozilációját vizsgáló közleményt [156] kivéve munkacsoportunk határozott meg először fetuin-A szintet májbetegségben. Kandidátusi értekezésemben szerepel, hogy a fetuin-A koncentráció alkoholos májcirrhotisban jelentősen csökken és szintje korrelál a prothrombin aktivitással [3]. Mivel a fetuin-A-t felnőttkorban döntően a máj termeli és sokáig negatív akut fázis fehérjeként tartották számon, kézenfekvőnek látszott szérumkoncentrációjának részletes vizsgálata más krónikus májbetegségekben is.

4.1. A szérum fetuin-A koncentráció követése alkoholos májcirrhotisban és hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegekben

A negatív akut fázis fehérje tulajdonságú transferrin és albumin szintjét már régen csökkentnek találták májcirrhotisban és egyéb alkohol okozta májbetegségben [157]. A fetuin-A szintnek a hagyományos laboratóriumi paraméterekkel való összehasonlításával célunk volt annak vizsgálata, hogy a csökkenés hátterében az akut fázis reakció vagy a máj redukált fehérjeszintetizáló kapacitása áll-e. Mindkét folyamat csökkent szérumszinthez vezet. Célul tűztük ki a fetuin-A koncentráció mérésének hasznosságát alkoholos májzsugoros és HCC-s betegek rövid (1 hónapos) és hosszú távú (1 éves) követése során. A májcirrhotis és a HCC diagnózisát a klinikai kép, az ultrahang, a CT és a máj szövettani vizsgálata alapján állapítottuk meg. Vírusos (HAV, HBV, HCV) és autoimmun eredetű (ANA, AMA és SMA pozitív) májkárosodás kizáró tényező volt. Az alkalmazott módszerek leírása egyezik az akut vírus hepatitiszes vizsgálatokéval. A két követéses vizsgálat eredményeit külön mutatom be.

4.1.1. A szérumbetuín-A koncentráció egy hónapos követése alkoholos májcirrhosisban és hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegekben

4.1.1.1. Betegek és módszerek

A vizsgált személyek adatait a 4.1.1. táblázatban foglaltuk össze.

4.1.1. táblázat. Az alkoholos májsugoros és primer hepatocelluláris karcinómás betegek adatai

	N	Nem (férfi / nő)	Életkor (év) átlag $\pm$ SD (min-max)
Alkoholos májcirrhosis	92	54 / 38	53 $\pm$ 12 (28-88)
HCC	7	6 / 1	58 $\pm$ 8 (50-71)
Egészséges kontroll	51	27 / 24	47 $\pm$ 6 (33-59)

HCC: primer hepatocelluláris karcinóma

A szérumbetuín-A koncentrációt az általános részben leírt RID módszerrel határoztuk meg, viszont itt és a májcirrhosisos betegek vizsgálatánál kétféle antitestet használtunk. Az egyik a kereskedelmi forgalomban lévő termék (anti-AHSG, IgG frakció, Incstar, Cat No. 81931, végső koncentráció: 84 μ l/11,5 ml gél) a fetuin-A kétláncú formáját ismeri fel.

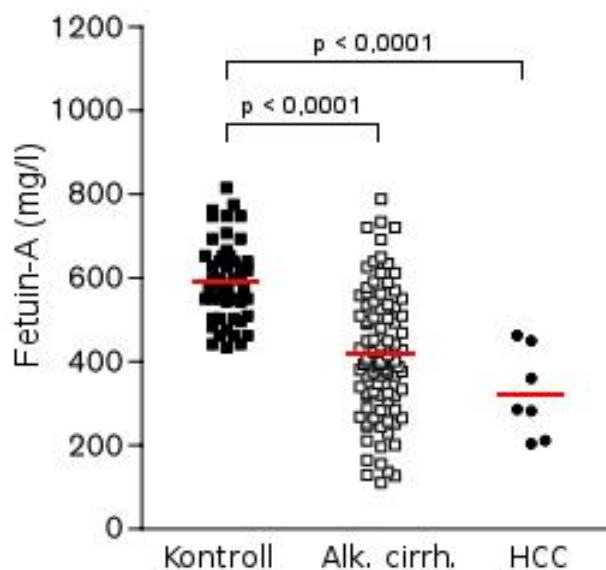
A másik antitestet mi állítottuk elő. Az egyláncú humán rekombináns fetuin-A-t a bakulovírus expressziós vektor rendszerben állítottuk elő az Sf9 sejtek felülszójából. Egyszáz μ g tisztított fetuin-A és komplett Freund adjuváns elegyét subcutan injektáltunk nyúlba. Az oltást két alkalommal kéthetes időközökkel megismételtük, majd a nyulat elvéreztettük. A szérumbet -20°C-on tároltuk további felhasználásig. A nyúlserumbetuín-A kötő kapacitását kompetitív ELISA-val igazoltuk. Ezt az antitestet 568 μ l/11,5 ml gél koncentrációban alkalmaztuk a RID során. A májsugoros betegek vizsgálata két antitesttel történt mérés szoros egyezést mutatott, mind a kontroll személyekben, mind a betegekben.

Az egyéb laboratóriumi vizsgálatokat a hagyományos klinikai kémiai meghatározásokkal végeztük. Az α 2-makroglobulin, a transferrin, a haptoglobin és az ORM meghatározása RID módszerrel történt.

4.1.1.2. Eredmények

A szérumbetuín-A koncentráció alkoholos májzsugoros és HCC-s betegekben

Az alkoholos májzsugoros és a HCC-s betegek szérumbetuín-A koncentrációja már kiinduláskor jelentősen csökkent volt az egészséges kontrollokéhoz képest (4.1.1. ábra). A betegek életkora és fetuin-A szintje ebben a csoportban sem korrelált egymással. Mivel az elemszám nem tette lehetővé az utóbbi betegcsoport külön vizsgálatát, összevontuk őket.



4.1.1. ábra. Szérumbetuín-A koncentráció alkoholos májzsugoros (n = 92) és primer hepatocelluláris karcinómás (n = 7) betegekben. Kontroll: egészséges kontroll (n = 51), alk. cirrh.: alkoholos cirrhosis, HCC: primer hepatocelluláris karcinóma. A két betegcsoport között statisztikailag nem volt szignifikáns különbség (Kruskal-Wallis teszt, p = 0,103). A vörös vonal az átlagot jelöli.

Korrelációs vizsgálatok

A szérumbetuín-A koncentráció és a vizsgált egyéb laboratóriumi paraméterek közötti korrelációt a 4.1.2. táblázat mutatja. A fetuin-A szint szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a prothrombin, az albumin és a transferrin koncentrációval, és negatív korrelációt detektáltunk az INR szinttel.

4.1.2. táblázat. A szérumbetuín-A koncentráció és a laboratóriumi paraméterek közötti korreláció

Paraméter	n	r	p [#]
We	90	-0,175	0,098
Hematokrit	56	0,006	0,963
Hemoglobin	56	-0,048	0,723
Fehérvérsejt szám	92	-0,085	0,422
Granulocita szám	53	-0,087	0,534
Thrombocita szám	88	0,142	0,187
Szérumbilirubin	96	-0,092	0,375
SGOT	97	-0,015	0,885
SGPT	95	0,013	0,897
Szérumbilirubin	95	-0,028	0,787
γGT	95	0,068	0,513
Prothrombin	86	0,382	0,0003
INR	86	-0,372	0,0004
Összfehérje	83	0,201	0,068
Albumin	83	0,369	0,0003
α2-makroglobulin	62	0,179	0,165
Transzferrin	62	0,379	0,002
Haptoglobin	59	0,101	0,445
ORM	61	0,046	0,723

#: Spearman-féle rang korreláció; We: Westergren érték; SGOT: szérumbilirubin-glutámát-oxálacetát transzamináz; SGPT: szérumbilirubin-glutámát-piruvát transzamináz; γGT: gamma-glutámil transzferáz; INR: International Normalisation Rate; ORM: α1-savi glikoprotein

A szérumbetuín-A koncentráció nem korrelál a lázas és infekciós állapottal alkoholos májcirrhosisos és HCC-s betegekben

A láz és a heveny gyulladás okozta akut fázis reakció hatását két módon becsültük. Először a lázas és láztalan betegek betuín-A szintjét hasonlítottuk össze a bevonás idejében. A májzsugoros betegekben a betuín-A szint nem különbözött szignifikánsan a lázas (382 ± 135 mg/l, átlag $\pm$ SD, $n = 33$) és a láztalan betegek (413 ± 168 g/l, $n = 66$) között ($p = 0,511$). Másodszor, az egy hónapos követési idő alatt 5 májzsugoros és 1 HCC-s esetben lépett fel hemokultúrával, köpet- és vizelettenyésztéssel igazolt interkurrens infekció. A betuín-A szint nem változott lényegesen a fertőzéses epizód alatt (371 ± 195 g/l) és utána (448 ± 145 mg/l, $n = 6$, Wilcoxon teszt, $p = 0,438$).

A szérumbetuín-A koncentráció és a rövid távú mortalitás

Az egy hónapos követési idő alatt a 99-ből 23 (19 májcirrhosisos és 4 HCC-s) beteg halt meg. Három haláleset a májelégtelenséggel közvetlen kapcsolatban nem álló, interkurrens betegség miatt következett be (egy-egy esetben hasnyálmirigy-gyulladás, meningitisz és

heveny balkamra-elégtelenség). A maradék 20 exitus oka májelégtelenség volt. Ezeket az eseteket vizsgáltuk tovább és hasonlítottuk össze az egy hónapot túlélte betegekkel. Ahogy a 4.1.3. táblázat A része mutatja, a 300 mg/l alatti fetuin-A szint jelentősen nagyobb halálozással társult, mint az ennél magasabb érték. A 300 mg/l-es érték a legalacsonyabb kvartilis határértéke. Mivel a szérum transferrin szint erős korrelációt mutatott a fetuin-A-val, ugyanezt a számítást elvégeztük az előbbire is. Csak az 1,24 g/l alatti érték mutatott magasabb, de statisztikailag nem szignifikáns kapcsolatot a halálozás fokozott kockázatával (4.1.3. B táblázat).

4.1.3. táblázat. A halálozási arány és a halálozás kockázata csökkent fetuin-A (A) és transferrin (B) koncentráció esetén alkoholos májcirrhosisos és HCC-s betegekben

Koncentráció	Meghalt	Túlélt	Összesen	Halálozási arány (%)
A. Fetuin-A				
≤ 300 mg/l	13	12	25	52,0
> 300 mg/l	7	67	74	9,5
Összesen	20	99	99	20,2
p < 0,0001, RR: 5,497, 95% C.I.: 2,472-12,23				
B. Transzferrin				
≤ 1,24 g/l	6	10	16	37,5
> 1,24 g/l	8	38	46	17,4
Összesen	14	48	62	22,6
p = 0,162, RR: 2,156, 95% C.I.: 0,883-5,266				

Az egyhónapos követési idő alatt meghalt és túlélte betegek laboratóriumi adatait a 4.1.4. táblázatban hasonlítjuk össze. Szignifikáns különbséget találtunk a hematokrit, a fehérvérsejt, az abszolút granulocyták szám, valamint az α 2-makroglobulin értékében. A két csoport paramétereinek között messze a fetuin-A mutatta a legmarkánsabb különbséget. A meghalt és a túlélte betegcsoport nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a prothrombin aktivitás, az INR és az albumin koncentráció tekintetében, bár a fetuin-A szint ezekkel szoros korrelációt mutatott.

4.1.4. táblázat. Az egyhónapos követés során túlélte és meghalt betegek laboratóriumi adatainak összehasonlítása

Paraméter	Meghalt betegek		Túlélte betegek		p [#]
	n	átlag ± SD	n	átlag ± SD	
Életkor	20	52,4 ± 9,5	79	53,5 ± 12,1	0,941
We	11	52,8 ± 33,0	79	47,7 ± 30,1	0,567
Hematokrit	9	0,29 ± 0,05	47	0,37 ± 0,07	0,004

4.1.4. táblázat. Az egyhónapos követés során túlélő és meghalt betegek laboratóriumi adatainak összehasonlítása

Paraméter	Meghalt betegek		Túlélő betegek		p [#]
	n	átlag ± SD	n	átlag ± SD	
Hemoglobin (g/l)	9	101,2 ± 19,6	47	121,4 ± 20,2	0,044
Fehérvérsejt szám (/μl)	13	11280 ± 5062	79	8266 ± 4480	0,051
Granulocyták szám (/μl)	8	8788 ± 4676	45	6295 ± 4654	0,210
Thrombocyták szám (*10 ³ /μl)	13	163,7 ± 137,9	76	191,7 ± 97,4	0,272
Szérumbilirubin (μmol/l)	18	189,3 ± 170,1	78	142,2 ± 159,5	0,228
SGOT (U/l)	18	93,1 ± 62,1	79	98,9 ± 80,3	0,774
SGPT (U/l)	18	40,4 ± 24,6	78	67,1 ± 121,3	0,789
Szérumbázilikus foszfátáz (U/l)	18	481,1 ± 363,8	77	325,1 ± 26,1	0,062
γGT (U/l)	18	380,2 ± 124,8	77	361,4 ± 267,9	0,717
Prothrombin	13	53,9 ± 22,6	73	65,5 ± 23,0	0,265
INR	13	1,66 ± 0,83	72	1,46 ± 0,58	0,299
Összfibrin (g/l)	13	67,3 ± 11,2	70	68,6 ± 10,1	0,491
Albumin (g/l)	13	29,6 ± 5,4	70	33,2 ± 5,9	0,247
α2-makroglobulin (g/l)	14	2,68 ± 0,58	48	3,42 ± 1,86	0,018
Transzferrin (g/l)	14	1,50 ± 0,51	48	1,95 ± 0,81	0,098
Haptoglobulin (g/l)	13	1,59 ± 1,78	46	1,61 ± 1,16	0,546
ORM (g/l)	14	0,98 ± 0,54	47	0,91 ± 0,28	0,925
Fetuin-A (mg/l)	20	298 ± 132	79	459 ± 141	< 0,0001

#: Mann-Whitney teszt; We: Westergren érték; SGOT: szérumbázilikus glutamát-oxálacetát transzamináz; SGPT: szérumbázilikus glutamát-piruvát transzamináz; γGT: gamma-glutamil transzferáz; INR: International Normalisation Rate; ORM: α1-savi glikoprotein

A fentiek alapján az alacsony szérumbázilikus fetuin-A szint és a halálozás között szoros kapcsolat volt kimutatható alkoholos májzsugor és HCC-s betegekben. A következőkben többszörös logisztikus regressziós vizsgálatot végeztünk, hogy a fetuin-A hatását meg tudjuk ítélni az olyan más paraméterekhez viszonyítva, melyek különbséget mutattak a meghalt és a túlélő betegek között (hematokrit és transzferrin) (4.1.5. táblázat).

Adatainknak az életkorra, nemre és a fent említett paraméterekre történő korrekciója után erősen szignifikáns regressziós együttható mutatkozott az fetuin-A koncentráció és a halálozás között. Ez az összefüggés független volt az alacsony hematokrit és a halálozás kapcsolatától. Az egyéb vizsgált paraméterek esetében nem találtunk ilyen összefüggést.

4.1.5. táblázat. Az alacsony fetuin-A koncentráció és a rövid távú (a vérvételt követő 3 hónapon belül bekövetkező) halálozás kapcsolatának igazított többszörös logisztikus regressziós vizsgálata alkoholos májcirrhosisos és HCC-s betegekben

Paraméter	A regressziós koefficiens p értéke [#]
Életkor (év)	0,488
Nem (férfi / nő)	0,597
Hematokrit	0,009
Abszolút granulocita szám	0,850
Transzferrin, $\leq 1,24$ g/l / $> 1,24$ g/l	0,105
Fetuin-A ≤ 300 mg/l / > 300 mg/l	0,007

[#] Az életkorra, a nemre és a 4.2.4. táblázatban a rövid távú halálozással szignifikáns kapcsolatot mutató paraméterekre igazítva

Ha az alacsony fetuin-A értéket a legalacsonyabb kvartilis határát jelentő 300 mg/l-nek határoztuk meg a 4.2.5. táblázatban felsorolt paraméterekre történő korrekció után, az alacsony fetuin-A szint esetén a betegeknek 88,7 (95% C.I.: 3,4-2310, $p = 0,007$) esélyhányadosuk volt a vérvételt követő 3 hónapon belül bekövetkező halálozásra.

4.1.2. A szérumban fetuin-A koncentráció egyéves követése alkoholos májcirrhosisban szenvedő betegekben. Összehasonlítás a Child-Pugh és a MELD score-ral

A fetuin-A koncentrációnak az alkoholos májcirrhosisos és HCC-s betegek rövid távú halálozásának előrejelzésében mutatott jó prediktív értéke alapján folytattuk a betegek hosszabb távú, egyéves követését. Emellett célul tűztük ki a fetuin-A koncentráció prediktív értékének összehasonlítását a Child-Pugh (CP) és a Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score-okkal. Mindkét score rendszert széles körben alkalmazzák a végstádiumú májbetegek kilátásainak előrejelzésére [158-160].

4.1.2.1. Betegek és módszerek

Kilencvenhárom alkoholos májsugoros beteg (52 férfi, 41 nő, életkor: 54 ± 13 év, átlag $\pm$ SD) került be ebbe a vizsgálatba. A diagnózist a fentiekben leírtak alapján állapítottuk meg. A kizárási kritériumok is azonosak voltak, azzal a különbséggel, hogy vírus- és autoimmun eredetű májkárosodás mellett a hepatotoxikus gyógyszerek alkalmazását is kizártuk. Etikai okból májbiopsziát nem végeztünk. A betegek csak

szupportív kezelést (diuretikumot, β -blokkolót) kaptak. A vérmintákat a beválogatás idején, majd, 1, 3, 6 és 12 hónap múlva vettük le.

A MELD score-t a Kamath és mtsai által felállított képlet alapján számoltuk² [159]. A CP score-t a következő paraméterek 1 és 3 közötti súlyossági osztályozása alapján határoztuk meg: ascites, encephalopathia, prothrombin idő (< 15, 15-17, > 17 s), szérumbilirubin (< 2, 2-3, > 3 mg/dl), albumin (> 35, 28-35, < 28 g/l) [158, 160]. A betegek közül 53-nak a 1. fokú, 20-nak 2. fokú és 16-nak 3. fokú encephalopathiája, 27 betegnek 1. fokú, 26-nak 2. fokú és 26-nak 3. fokú ascitese volt. Tizenhat beteget az 5.-6., 46-ot a 7.-9., 43-at a ≥ 10 score csoportba lehetett besorolni.

A szérumbetuin-A koncentrációt az általános részben leírt RID módszerrel határoztuk meg. A CRP szintet az általános részben leírtak szerint mértük.

4.1.2.2. Eredmények

A szérumbetuin-A koncentráció és az 1 éves túlélés kapcsolata

A 93 beteg közül 41 halt meg az 1 éves követés során. Közülük 4 esetben a halál oka májbetegségtől független volt (2 heveny balszívfél-elégtelenség, 1 szívinfarktus és 1 tüdőgyulladás). A 37 másik haláleset oka májelégtelenség volt. A továbbiakban csak ezeket az eseteket vettük figyelembe. A 4.1.6. táblázat A oszlopa az egyéves követés végén mért laboratóriumi adatokat mutatja. A meghalt betegeknek a túléltekhez képest jelentősen alacsonyabb kiindulási hematokrit, albumin, transzferrin és fetuin-A koncentrációjuk, szignifikánsan emelkedett kreatinin, INR, CP és MELD score értékeik voltak. Az egyik legnagyobb különbség itt is a fetuin-A esetében volt megfigyelhető.

4.1.6. táblázat. A meghalt és túlélő alkoholos májcirrhotosisos betegek laboratóriumi adatainak összehasonlítása az 1 éves követés alatt (A) és az 1.–12. hónap között (B)

Paraméter	(A) 1 éves követés			(B) 1-12. hónap közötti követés		
	Meghalt betegek átlag $\pm$ SD n = 37	Túlélő betegek átlag $\pm$ SD n = 52	p [#]	Meghalt betegek átlag $\pm$ SD n = 23	Túlélő betegek átlag $\pm$ SD n = 52	p [#]
Életkor (év)	57 $\pm$ 14	52 $\pm$ 12	0,056	58 $\pm$ 15	52 $\pm$ 12	0,056
We (mm/h)	57 $\pm$ 32	40 $\pm$ 30	0,019	59 $\pm$ 34	40 $\pm$ 30	0,030
Hematokrit	0,32 $\pm$ 0,1	0,37 $\pm$ 0,1	0,004	0,33 $\pm$ 0,1	0,36 $\pm$ 0,1	0,029

² A MELD score számítása: MELD score = $3,8 * \ln$ szérumbilirubin [mg/dl] + $11,2 * \ln$ INR + $9,6 * \ln$ szérumbkreatinin [mg/dl] + 6,4

4.1.6. táblázat. A meghalt és túlélő alkoholos májcirrhosisos betegek laboratóriumi adatainak összehasonlítása az 1 éves követés alatt (A) és az 1.–12. hónap között (B)

	(A) 1 éves követés			(B) 1-12. hónap közötti követés		
Paraméter	Meghalt betegek átlag ± SD n = 37	Túlélő betegek átlag ± SD n = 52	p [#]	Meghalt betegek átlag ± SD n = 23	Túlélő betegek átlag ± SD n = 52	p [#]
Hemoglobin (g/l)	112 ± 18	121 ± 24	0,053	113 ± 18	121 ± 24	0,137
Fehérvérsejt szám (/μl)	9582 ± 5076	7706 ± 4640	0,016	8960 ± 5102	7706 ± 4639	0,082
Granulocyták szám (/μl)	6308 ± 4080	4788 ± 3241	0,080	5409 ± 3253	4787 ± 3240	0,311
Thrombocyták szám (*10 ³ /μl)	160,6 ± 117,3	177,3 ± 91,7	0,228	153,5 ± 114,8	177,4 ± 91,7	0,185
Kreatinin (mg/dl)	1,31 ± 0,65	0,96 ± 0,29	0,002	1,32 ± 0,62	0,97 ± 0,28	0,001
Bilirubin (mg/dl)	10,7 ± 1,0	6,90 ± 10,1	0,008	7,8 ± 1,3	7,13 ± 171	0,041
SGOT (U/l)	113 ± 80	122 ± 171	0,201	107 ± 81	122 ± 10	0,485
SGPT (U/l)	79 ± 137	143 ± 351	0,852	97 ± 173	142 ± 350	0,763
Alkalikus foszfatáz (U/l)	425 ± 422	371 ± 284	0,987	404 ± 479	371 ± 283	0,571
INR	1,73 ± 0,7	1,25 ± 0,4	< 0,001	1,64 ± 0,7	1,26 ± 0,4	< 0,001
Összfehérje (g/l)	63 ± 7	68 ± 10	0,453	68 ± 7	68 ± 9	0,815
Albumin (g/l)	31 ± 7	37 ± 6	0,001	31 ± 7	36 ± 7	0,008
CRP (mg/l)	62 ± 78	42 ± 78	0,061	65 ± 103	43 ± 79	0,505
α2-makroglobulin (g/l)	3,15 ± 0,87	3,39 ± 1,23	0,588	3,35 ± 0,97	3,40 ± 1,23	0,851
Haptoglobin (g/l)	1,86 ± 2,60	2,01 ± 1,50	0,035	2,03 ± 2,80	2,00 ± 1,51	0,108
Transzferrin (g/l)	1,48 ± 0,52	2,16 ± 0,86	< 0,001	1,48 ± 0,60	2,17 ± 0,87	0,003
ORM (g/l)	0,94 ± 0,51	1,12 ± 0,53	0,049	0,93 ± 0,54	1,12 ± 0,54	0,076
CP score	11 ± 2	7 ± 2	< 0,001	11 ± 2	8 ± 2	< 0,001
MELD score	20 ± 9	13 ± 5	< 0,001	20 ± 8	13 ± 6	< 0,001
Fetuin-A (mg/l)	293 ± 77	490 ± 106	< 0,001	303 ± 91	490 ± 91	< 0,001

#: Mann-Whitney teszt; We: Westergren érték; SGOT: szérumbilirubin-glutámát-oxalacetát transzamináz; SGPT: szérumbilirubin-glutámát-piruvát transzamináz; γGT: gamma-glutámil transzferáz; INR: International Normalisation Rate; CRP: C-reaktív protein; ORM: α1-savi glikoprotein; CP: Child-Pugh score; MELD: Model for End-Stage Liver Disease score

Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a hematokrit, az albumin, a transzferrin és negatív korrelációt a szérumbilirubin kreatinin, az INR, a CRP, a MELD és a CP score értékével, míg más paraméterekkel nem (4.1.7. táblázat).

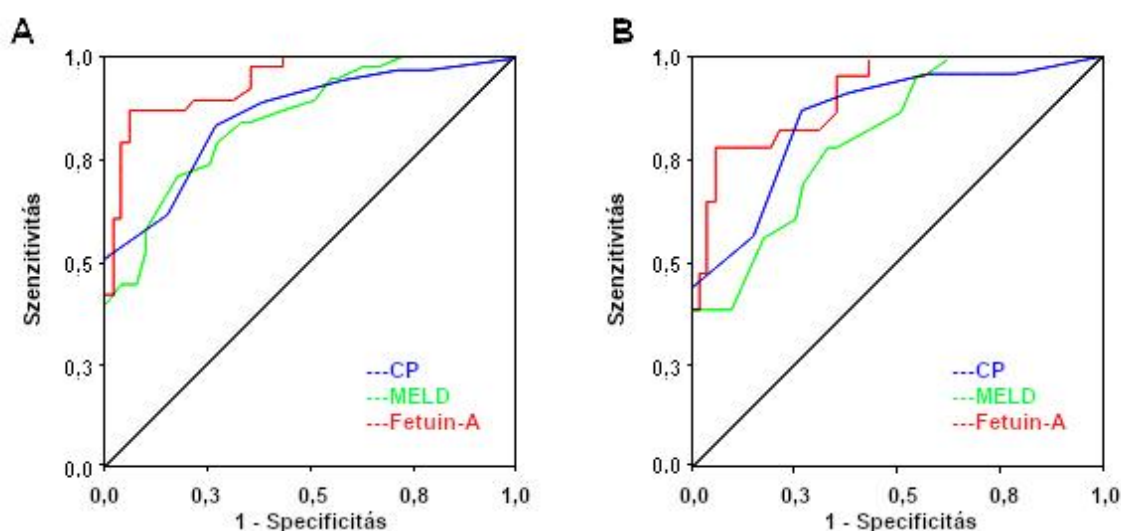
4.1.7. táblázat. A szérumbetuin-A koncentráció és a vizsgált laboratóriumi paraméterek közötti korreláció alkoholos májcirrhosisos betegekben

	(A) 1 éves követés (n = 89)		(B) 1-12. hónapos követés (n = 75)	
Paraméter	r [#]	p	r [#]	p
Hematokrit	0,406	0,001	0,368	0,004
Kreatinin	-0,312	0,006	-0,314	0,010
INR	-0,467	< 0,001	-0,404	< 0,001
Albumin	0,366	0,002	0,331	0,007
CRP	-0,405	0,001	-0,264	0,070
Transzferrin	0,529	< 0,001	0,499	< 0,001
CP score	-0,522	< 0,001	-0,431	< 0,001
MELD score	-0,342	0,001	-0,271	0,018

#: Spearman-féle rank korreláció; INR: International Normalisation Rate; CRP: C-reaktív protein; CP: Child-Pugh score; MELD: Model for End-Stage Liver Disease score

A fetuin-A koncentráció prediktív pontosságának meghatározása

A fetuin-A koncentráció optimális vágópontját és diszkriminációs képességét ROC görbe analízissel határoztuk meg (4.1.2. ábra). A görbe alapján a 365 mg/l-es érték bizonyult optimálisnak a betegek stratifikációjához. Ennél az értéknél a relatív kockázat, a szenzitivitás és a specificitás magasabb volt, mint a rövid távú követésnél megállapított 300 mg/l-es koncentrációnál (4.1.8. táblázat).



4.1.2. ábra. Az alkoholos májsugoros betegek túlélése és a Child-Pugh score (kék vonal), a MELD score (zöld vonal), valamint a szérumbetuin-A szint (piros vonal) közötti kapcsolat vizsgálata ROC görbével. A kimeneti érték a halálozás. A. ábra: az egyéves követés adatai (n = 89). Az egyes paraméterek adatai: Child-Pugh score: AUC: 0,865 ± 0,040 (± SD), 95% C.I.: 0,787-0,943, p < 0,001; MELD score: AUC: 0,739 ± 0,052, 95% C.I.: 0,637-0,871, p < 0,001;

szérumbilirubin-A koncentráció: $0,937 \pm 0,025$, 95% C.I. 0,889-0,986, $p < 0,001$. **B. ábra:** az 1.–12. hónap közötti követés adatai. Child-Pugh score AUC: $0,855 \pm 0,050$, 95% C.I.: 0,757-0,953, $p < 0,001$; MELD score: AUC: $0,740 \pm 0,058$, 95% C.I.: 0,626-0,854, $p = 0,001$; szérumbilirubin-A koncentráció: AUC: $0,908 \pm 0,035$, 95% C.I.: 0,839-0,978, $p < 0,001$. Mivel a CP és a MELD score magasabb, a bilirubin-A koncentráció alacsonyabb értéke jár együtt a nagyobb túléléssel, a bilirubin-A vonala a négyzet jobb alsó sarkához közelítene. A három AUC összehasonlításához a bilirubin-A görbét átlósan tükröztem. CP: Child-Pugh score, MELD: Model for End-Stage Liver Disease score. AUC: görbe alatti terület

4.1.8. táblázat. A Child-Pugh, a MELD score és a szérumbilirubin-A szenzitivitásának, specificitásának és prediktív értékének összehasonlítása alkoholos májzsugoros betegekben

	(A) 1 éves követés (n = 89)	(B) 1-12. hónap közötti követés (n = 75)
CP score < 10, ≥ 10		
RR (95% C.I.)	3,878 (1,998-7,527)	4,838 (2,009-11,649)
p	< 0,001	< 0,001
Vágóérték szenzitivitása	0,753	0,675
Vágóérték specificitása	0,827	0,755
MELD score < 20, ≥ 20		
RR (95% C.I.)	2,205 (1,318-3,689)	2,417 (1,229-4,952)
p	0,002	0,011
Vágóérték szenzitivitása	0,595	0,587
Vágóérték specificitása	0,729	0,720
Bilirubin-A < 365 µg/ml, ≥ 365 µg/ml		
RR (95% C.I.)	9,874 (4,258-22,898)	9,257 (3,945-21,724)
p	< 0,001	< 0,001
Vágóérték szenzitivitása	0,865	0,783
Vágóérték specificitása	0,942	0,936
Bilirubin-A < 300 µg/ml, ≥ 300 µg/ml		
RR (95% C.I.)	4,209 (2,675-6,622)	4,813 (2,813-8,233)
p	< 0,001	< 0,001
Vágóérték szenzitivitása	0,594	0,478
Vágóérték specificitása	0,981	0,972

AUC: görbe alatti terület; CP: Child-Pugh score; MELD: Model for End-Stage Liver Disease score

Eredményeink megjelenését követően bebizonyosodott, hogy a MELD score a betegek 15-20%-ának túlélését nem képes prognosztizálni [161]. 2008-ban bevezetésre került a MELDNa score, mely a szérumbilirubin-t is figyelembe veszi, és prognosztikus értéke 12%-kal jobb a MELD score-nál [162, 163]. Adatbázisunkat újraszámolva mi is azt találtuk, hogy a

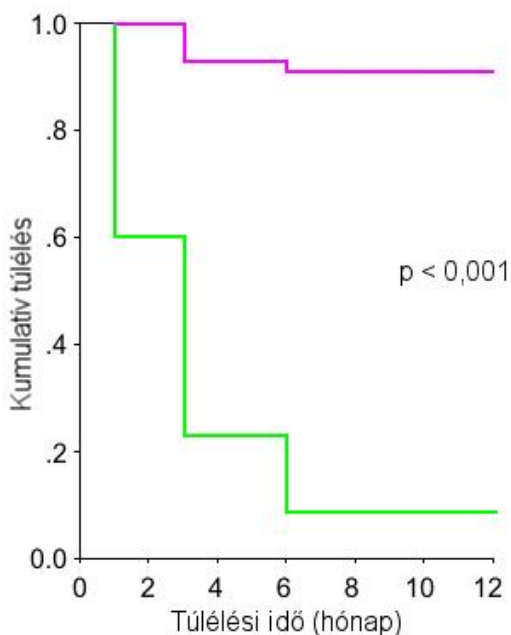
MELDNa score³ ROC görbe értékei kedvezőbbek voltak a MELD score-énál (AUC: $0,870 \pm 0,088$, 95% C.I.: 0,698-1,000), de nem voltak jobbak, mint a szérumban lévő fetuin-A értékei ($0,908 \pm 0,035$, 95% C.I.: 0,839-0,978, 4.1.8. táblázat). A MELDNa score 15, 18, ill. 20-as vágóértékéhez tartozó specificitás/szenzitivitás rendre 0,800/0,696, 0,600/0,783, ill. 0,600/0,826-nek adódott, mely megint csak nem volt jobb, mint a 365 mg/l fetuin-A vágóértékhez tartozó szenzitivitás és specificitás (0,783/0,936, 4.2.9. táblázat).

A 365 mg/l alatti fetuin-A koncentráció szignifikánsan nagyobb halálozási kockázattal társult, mint az ennél magasabb érték (4.1.9. táblázat). Ezt erősítette meg a betegek túlélésének Kaplan-Meier szerinti vizsgálata (4.1.3. ábra). A 365 mg/l alatti fetuin-A szint 3 ± 1 hónapos (átlag $\pm$ S.E., 95% C.I.: 2-4), az ennél magasabb 11 ± 1 hónapos (95% C.I.: 11-12) túléléssel társult (log-rank analízis, $p < 0,0001$). Élettábla analízissel a medián túlélés 3,27 hónap volt az előző, és 12 hónapnál is hosszabb az utóbbi csoportban ($p < 0,0001$). A halálos kimenetel kockázata fokozódott az idővel 365 mg/l alatti fetuin-A szint esetén, de ezen érték felett nem (4.2.10. táblázat).

4.1.9. táblázat. A kiindulási fetuin-A koncentráció és az alkoholos májcirrhosisos betegek túlélésének kapcsolata az 1 éves (A) és a 1.–12. hónap közötti (B) megfigyelés során

(A) 1 éves követés				
Szérumban lévő Fetuin-A	Meghalt	Túlélt	Összesen	Halálozási arány %
< 365 µg/ml	32	3	35	94,1
≥ 365 µg/ml	5	49	54	9,3
Összesen	37	52	89	41,6
p < 0,001, RR: 9,874 (95% C.I.: 4,258-22,898)				
(B) 1.–12. hónap közötti követés				
Szérumban lévő Fetuin-A	Meghalt	Túlélt	Összesen	Halálozási arány %
< 365 µg/ml	18	3	21	85,7
≥ 365 µg/ml	5	49	54	9,3
Összesen	23	52	75	30,7
p < 0,001, RR: 9,257 (95% C.I.: 3,945-21,724)				

³ A MELDNa score számítása: MELDNa score = MELD score – szérumban lévő Na – (0,025 * MELD score*(140 - szérumban lévő Na)) + 140, ahol a szérumban lévő Na értéke 125–140 mmol/l között van.



4.1.3. ábra. Az alkoholos májzsugoros betegek túlélésének Kaplan-Meier szerinti vizsgálata. A < 365 mg/l fetuin-A koncentráció (zöld vonal, n = 35) esetén a túlélés rosszabb, mint a magasabb érték esetén, májcirrhotikus betegek 1 éves követése során (lila vonal, n = 54, log-rank teszt, $p < 0,001$)

4.1.10. táblázat. A 365 mg/l alatti és feletti fetuin-A koncentráció esetén alkoholos májzsugoros betegek 1 éves követése során (n = 89)

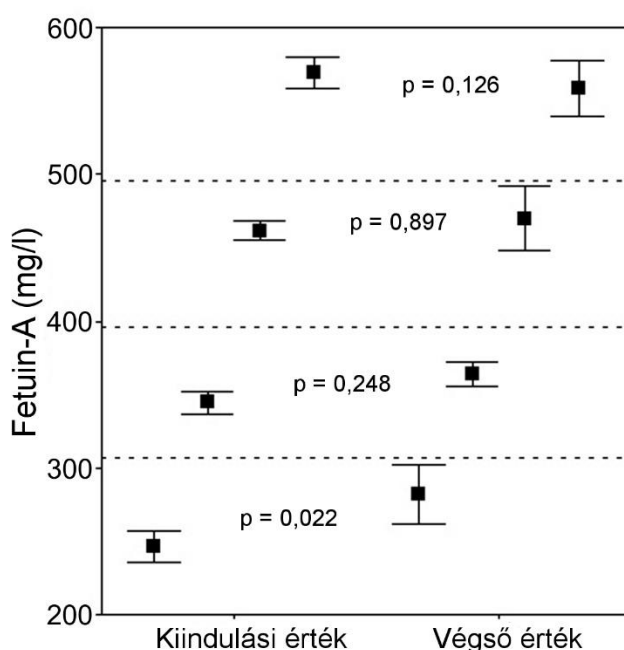
Halálozási kockázat ideje	Fetuin-A < 365 µg/ml	Fetuin-A ≥ 365 µg/ml
1 hónap	0,500 ± 0,129	0,000 ± 0,000
3 hónap	0,897 ± 0,222	0,077 ± 0,384
6 hónap	0,909 ± 0,362	0,020 ± 0,000
12 hónap és utána [#]	0,943 ± 0,420	0,000 ± 0,000

[#]: Mivel a követési idő 1 évre korlátozódott, az ennél az időperiódusnál számított halálozási kockázat interpoláció. Halálozási kockázat: átlag ± SE

Hat cirrhotikus betegnek ráakódó alkoholos hepatitis is volt. Fetuin-A koncentrációjuk (405 ± 85 mg/l, átlag ± S.D.) nem különbözött érdemben azokétól, akiknek nem volt hepatitisük ($434 \pm$ mg/l, n = 83, $p = 0,447$). Az alkoholos hepatitises betegek kiindulási fetuin-A szintje nem csökkent tovább, sőt valamelyest növekedett, 454 ± 101 mg/l-re ($p = 0,500$). A 89 alkoholos cirrhotikus beteg közül 7 folytatta az italozást. Az ő fetuin-A szintjük (259 ± 97 mg/l) szignifikánsan alacsonyabb volt az absztinensekéhez képest (418 ± 129 mg/l, n = 82, $p = 0,003$). Közülük hatan haltak meg az 1 éves követési időszak alatt. Az egyetlen túlélőnek 365 mg/l feletti kiindulási fetuin-A koncentrációja volt.

A bevásztás idején 4 betegnek volt fertőzőes szövődménye: egy spontán bakteriális peritonitis, egy cholangitis, egy orbánc és egy uroinfekció. Az ő kiindulási fetuin-A szintjük nem szignifikáns mértékben, de emelkedett a következő mintavétel idejére (445 ± 126 mg/l-ről 475 ± 171 mg/l-re, Wilcoxon teszt, $p = 0,465$).

Ahogy a 4.1.4. ábra mutatja, a fetuin-A szint nem változott érdemben a megfigyelési időszakban. A 75 beteget a kiindulási fetuin-A szint alapján négy kvartilisra osztottuk és a követés végén mért fetuin-A szintjüket összehasonlítottuk a kiindulási kvartilis értékeikkel. A végső fetuin-A értékek a kiindulási kvartilisek tartományába estek. A követési idő során a 300 mg/l alatti kiindulási érték szinte sohasem emelkedett 350 mg/l fölé, és fordítva sem változott.



4.1.4. ábra. Az alkoholos májsugoros betegek kiindulási és végső szérum fetuin-A koncentrációjának összehasonlítása az 1 éves követési időszakban. A fetuin-A szint nem változott lényegesen a követés során. Az értékek átlag $\pm$ SEM-nek felelnek meg. A megfigyelés első hónapjában meghalt betegek ($n = 14$) értékeit nem vettük figyelembe. A p érték a négy kvartilisban a kezdeti és a végső érték közötti különbség szignifikanciáját jelöli (Wilcoxon-teszt).

Az alacsony szérum fetuin-A koncentráció nagy halálozással társult. A meghalt és a túlélő betegek adatait összehasonlítva szignifikáns különbséget találtunk a (kreatinint és INR-t magában foglaló) MELD score, hematokrit, albumin, transzferrin és fetuin-A értékek között (4.1.6. táblázat). A fetuin-A szint önálló determináns voltának megítélésére többszörös logisztikus regressziós vizsgálatot végeztünk. A fetuin-A szint és az 1 éves

halálozás között szignifikáns regressziós koefficiens értéket találtunk, a fent felsorolt zavaró tényezőkre történő igazítás után is, mind a kreatinin és INR értéket önállóan, mind a helyettük a MELD score-t tartalmazó modellben (4.1.11. táblázat).

4.1.11. táblázat. Alkoholos májcirrhosisos betegek fetuin-A koncentrációjának és 1 éves halálozásuk kapcsolata igazított logisztikus regressziós modellben

	(A) 1 éves követés (n = 89)		(B) 1.–12. hónap közötti követés (n = 75)	
Paraméter	1. modell, p [#]	2. modell, p [#]	1. modell, p [#]	2. modell, p [#]
Hematokrit	0,597	0,482	0,453	0,463
Szérum albumin	0,832	0,271	0,994	0,249
Transzferrin	0,838	0,706	0,843	0,608
Szérum kreatinin	0,633	-	0,806	-
INR	0,290	-	0,262	-
MELD < 20, ≥ 20	-	0,172	-	0,165
Fetuin-A < 365 mg/l, ≥ 365 mg/l	0,010	0,004	0,012	0,021
OR fetuin-A < 365 mg/l, ≥ 365 mg/l	49,35 95% C.I.: 2,497-975,6	58,82 95% C.I.: 3,703-950,8	32,59 95% C.I.: 1,502-707,0	28,91 95% C.I.: 1,661-503,4
Modell illeszkedése	p = 0,068	p = 0,015	p = 0,012	p = 0,002

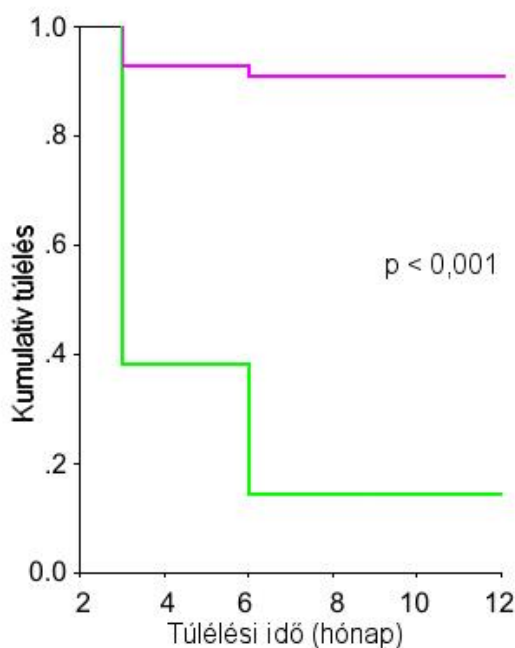
Az 1. modellben a kreatinin és INR érték önállóan, a 2. modellben helyettük a MELD score szerepel. #: Az egyváltozós analízis során szignifikáns különbséget mutató paraméterekre történt igazítás utáni p érték. OR: esélyhányados; INR: International Normalisation Rate; MELD: Model for End-Stage Liver Disease score

Az 1.–12. hónap túlélésének vizsgálata

Az alacsony fetuin-A szint az 1 hónapos követés során magas halálozási aránnyal társult. Ahogy a 4.1.4. ábra mutatja, a 37 halálesetből 14 az első hónapban történt. A fetuin-A szint 1 éves hasznosságának megítélésére megismételtük számításainkat, kihagyva az első hónapban meghalt betegek adatait.

Ebben az időszakban csak a kreatinin, az INR, az albumin, a transzferrin, a fetuin-A szint, a CP és a MELD score különbözött szignifikánsan a meghalt és a túlélő betegek között (4.1.6. táblázat, B oszlop). Ebben a megfigyelési periódusban csak a hematokrit, a kreatinin, az INR, az albumin, a transzferrin, a MELD és a CP score korrelált szignifikánsan a fetuin-A értékekkel (4.1.7. táblázat, B oszlop). Az alacsony fetuin-A az 1.–12. hónap között is emelkedett halálozási aránnyal és fokozott kockázattal társult (4.1.10. táblázat, B oszlop).

A Kaplan-Meyer teszt ebben az időperiódusban is jelentős különbséget mutatott az alacsony és magasabb kiindulási fetuin-A szint között (4.1.5. ábra). A számított átlagos túlélési idő 365 mg/l alatti és feletti érték esetén 5 ± 1 hónap (átlag $\pm$ S.E., 95% C.I.: 4-6) és 11 ± 1 hónap (95% C.I.: 11-12, $p < 0,001$), (log-rank analízis). Life table analízissel a medián túlélés 4,81 hónap volt az előző, és a 12 hónapot is meghaladta az utóbbi csoportban ($p = 0,001$).



4.1.5. ábra. A 365 mg/l feletti és alatti fetuin-A koncentrációjú alkoholos májzsugoros betegek túlélésének összehasonlítása. A 365 mg alatti szint (zöld vonal, $n = 21$) rosszabb túléléssel társul, mint az e feletti érték (lila vonal, $n = 54$, log-rank teszt, $p < 0,001$).

Az 1.–12. hónap közötti időszak halálozásának vizsgálatát logisztikus regressziós analízissel folytattuk. A hematokritra, kreatininre, INR-re, albuminra és transzferrinre történő igazítás után továbbra is szignifikáns regressziót találtunk a fetuin-A szint és az 1.–12. hónap halálozása között, mind a szérum kreatinint és INR-t, mind a MELD score-t tartalmazó modellben (4.1.6. táblázat, B oszlop).

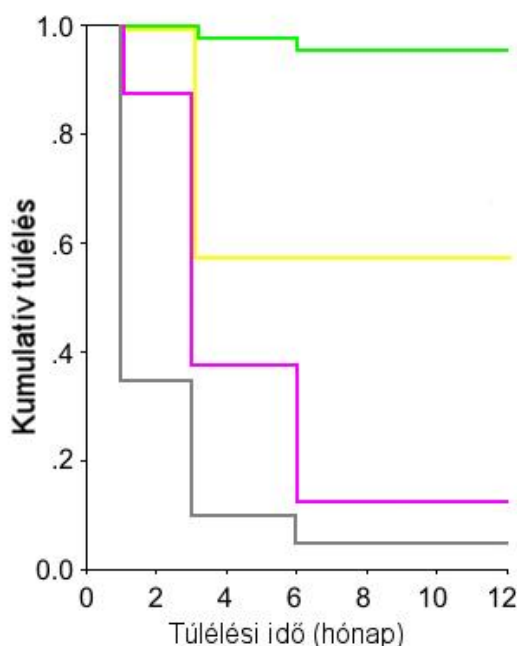
A CP és a MELD score, valamint a fetuin-A koncentráció prediktív pontosságának összehasonlítása

A ROC görbe analízise során szérum fetuin-A alatti görbe területe nagyobbak bizonyult, mint a CP és a MELD score alattié. A 365 mg/l-es vágóértéknél a fetuin-A koncentráció

szenzitivitása és specificitása a másik két paraméter feletti volt, az 1.–12. hónap között is (4.1.8. táblázat, B oszlop).

A két score-ral szerzett általános tapasztalat alapján betegeinket a CP score 10-es vágóértéke alapján két csoportra osztottuk [158, 160]. A MELD score ≥ 20 értékét általánosságban a transzplantáció indikációjának tekintik [159]. Ezért a MELD score vágóértékének a 20-at tekintettük. A 20 vagy e feletti MELD score-ral rendelkező betegeknek egy éven belül magasabb halálozási kockázatuk volt, mint a 20 alattiaknak, de ez a kockázat alatta maradt a 365 mg/l alatti értékeknél találthoz (4.1.8. táblázat). A 10 alatti CP esetén észlelt halálozási kockázat lényegében azonos volt az alacsony kiindulási fetuin-A értéknel számítottal.

A MELD score < 20 és ≥ 20 , valamint a szérum fetuin-A < 365 és ≥ 365 mg/l vágóértékéhez tartozó túlélés között szignifikáns különbséget találtunk (4.1.6. ábra). A MELD score és a fetuin-A együttes hatásának elemzéséhez a betegeket a fenti értékek szerint négy csoportra osztottuk.



4.1.6. ábra. A szérum fetuin-A koncentráció és a MELD score együttes hatása az alkoholos májcirrhosisos betegek túlélésére. 1. csoport (zöld vonal): MELD < 20 , szérum fetuin-A ≥ 365 mg/l (n = 46), 2. csoport (lila vonal): MELD < 20 , szérum fetuin-A < 365 mg/l (n = 16), 3. csoport (sárga vonal): MELD ≥ 20 , szérum fetuin-A ≥ 365 mg/l (n = 7) és 4. csoport (szürke vonal): MELD ≥ 20 , szérum AHSG < 365 mg/l (n = 20). Az 1. csoporthoz viszonyítva a többi csoport túlélése szignifikánsan megrövidült. A halálozás esélyhányadosa (OR) a 2., 3., és a 4. csoportban rendre: 157,5 (95% C.I.: 20,28-1223, $p < 0,001$), 16,875 (95% C.I.: 2,149-132,5, $p = 0,012$) és 405,0, 95% C.I.: 34,53-4749 $p < 0,0001$).

Az 1. csoporthoz (MELD < 20 és szérumbilirubin-A ≥ 365 $\mu\text{g/ml}$) képest a 2. csoport (MELD < 20 és szérumbilirubin-A < 365 mg/l) átlagos túlélése szignifikánsan megrövidült: 5 ± 1 hónap (átlag $\pm$ SD, 95% C.I.: 3-6) vs. 12 hónap (95% C.I. 11-12) (log-rank analízis: $p < 0,001$). A 3. csoporté (MELD ≥ 20 és szérumbilirubin-A ≥ 365 mg/l) szintén csökkent: 8 ± 2 hónap (95% C.I.: 5-11) (log-rank analízis: $p = 0,008$). A legrosszabb prognózisa a 4. csoport (MELD ≥ 20 és szérumbilirubin-A < 365 mg/l) betegeknek volt: 2 ± 1 hónap (95% C.I.: 1-3) (log-rank analízis: $p = 0,00001$). A 3. és a 4. csoport túlélése szintén szignifikánsan különbözött egymástól ($p = 0,001$).

Végül a szérumbilirubin-A koncentráció prediktív erejét a CP és a MELD score-éval logisztikus regressziós elemzéssel hasonlítottuk össze (4.1.12. táblázat). A bilirubin-A értéknek volt a legszorosabb kapcsolata a halálozással.

4.1.12. táblázat. A szérumbilirubin-A koncentrációjának, a CP és a MELD score és a halálozás kapcsolatának vizsgálata, alkoholos májzsugoros betegek körében, igazított logisztikus regressziós modellben

	(A) 1 éves követés (n = 89)		(B) 1-12. hónap közötti követés (n = 75)	
Paraméter	OR 95% C.I.	p [#]	OR 95% C.I.	p [#]
CP score < 10, ≥ 10	17,54 2,556-119,9	0,004	15,58 2,333-104,1	0,005
MELD score < 20, ≥ 20	-	0,110	-	0,120
Bilirubin-A < 365 mg/l, ≥ 365 mg/l	170,6 22,73-1280	< 0,001	89,43 11,89-672,6	< 0,001
Modell illeszkedése	p = 0,114		p = 0,001	

#: a regressziós koefficiens p értéke; CP: Child-Pugh score; MELD: Model for End-Stage Liver Disease score

4.1.1.3. Megbeszélés

Korábban Jezequel és mtsai mértek bilirubin-A szintet alkoholos májbetegekben (20 zsírmáj és 62 cirrhosis), de ez a keresztmetszeti vizsgálat a fehérje kóros glikoziláltságát tanulmányozta és nem elemezte a szérumszinteket [156]. Ettől és a korábban említett egy akut hepatitiszes vizsgálatától eltekintve a bilirubin-A szintet előttünk nem vizsgálták májbetegségeken.

Bár mind az akut vírus hepatitisekre, mind a cirrhosisra és HCC-re jelentős fokú májsejtkárosodás jellemző, alacsony szérumbetuin-A koncentráció csak májcirrhosisban és HCC-ben volt megfigyelhető. Ezt mind az akut fázis reakció, mind a csökkent májfunkció okozhatta. Az akut fázis reakció szerepe mellett szól a szérumbtranszferrin szinttel talált szoros pozitív korreláció. Régóta ismert, hogy az IL-1, IL-6 és a TNF α (TNFSF2) csökkenti a betuin-A termelődését patkánymájban és emberi HepG2 sejtvonalon [90, 91].

A fent említett proinflammatorikus citokinek betuin-A szintet kizárólagosan meghatározó szerepe azonban megkérdőjelezhető, mivel emelkedett szintjüket már régen kimutatták az általunk vizsgált májbetegségekből, így akut hepatitis A-ban [164], hepatitis B-ben [165], hepatitis C-ben [164, 166], valamint fulmináns májelégtelenségben [167-169]. A pozitív akut fázis fehérjék emelkedésének azonban gátat szab a máj csökkent fehérjeszintetizáló képessége [170]. A negatív akut fázis fehérjék e két ok bármelyikének következtében létrejövő csökkenése a májbetegségek jó prognosztikus markereként szolgálhat.

Másfelől több megfigyelés szól az akut fázis reakciónak a szérumbbetuin-A-t meghatározó szerepe ellen májbetegségekből. Először is, nem találtunk negatív korrelációt a pozitív akut fázis fehérjékkel és a gyulladás számos laboratóriumi paraméterével sem (We, fehérvérsejt, granulocytaszám). Másodszor, a betuin-A szint nem csökkent tovább lázas állapot vagy interkurrens fertőzés fellépésekor, ami bakteriális szepszisben, tüdőgyulladásban vagy rosszindulatú hematológiai betegségekből tapasztalható [84, 171]. Harmadszor, a betuin-A koncentráció következetesen és szorosan korrelált a prothrombin aktivitással, mely kizárólag a májfunkciótól függ. A szérumbalbumin szinttel talált pozitív korreláció mindkét módon magyarázható, mivel negatív akut fázis fehérjeként is viselkedik. A klinikai gyakorlatban azonban e két fehérje a máj fehérjetermelő kapacitásának legjobb indikátora.

Eredményeink arra utalnak, hogy a csökkent betuin-A koncentráció inkább a hepatocita diszfunkció, és kevésbé az akut fázis reakció következménye. Emellett szólnak azok a megfigyelések is, miszerint a hepatitis C vírussal asszociált betegségekből az emelkedett IL-1, IL-6 és TNF α (TNFSF2) szint jobban korrelál a prothrombin idővel, mint a májgyulladást jelző transzaminázok aktivitásával [166]. Az általunk észleltekkkel megegyezően a betuin-A szint és az alkoholos cirrhosis súlyossága között fordított arányosság volt megfigyelhető [156].

A regressziós vizsgálatok szerint a hematokrit majdnem olyan jó előrejelzője a rövid távú halálzásnak alkoholos májcirrhosisban, mint a betuin-A. Az általunk vizsgált betegek

egyike sem masszív gasztrointesztinális vérzésben halt meg, de mikroszkópos vérzés természetesen nem volt kizárható. Mivel a vérszegénységnek számos oka lehet májcirrhosisban, az alacsony hematokrit nem tekinthető a májelégtelenség eredetű halálozás markerének.

A halálozást tekintve a fetuin-A bizonyult a legjobb előrejelző paraméternek. A transferrin változása kisebb halálozási aránnyal és halálozási kockázattal társult. Eredményeink megjelenését megelőzően egy glikoproteinnel sem végeztek hasonló rövid távú mortalitási vizsgálatot májbetegségekben.

A rövid távú vizsgálatainkban a szérum fetuin-A koncentráció igen jól jelezte a halálozást alkoholos májsugoros betegek 1 hónapos követése során. Ezek az eredmények inspirálták a hosszabb távú követéses vizsgálatokat. Jelen vizsgálataink alapján az alacsony fetuin-A szintnek az 1 éves túlélésre is hatása van. Ezt bizonyítják az első hónapon túl végzett túlélési számítások.

A proinflammatorikus citokinek (IL-1, IL-6, TNF α) fokozzák a pozitív (CRP, ORM) és lefelé regulálják a negatív akut fázis fehérjék szintézisét állatkísérletekben és HepG2 sejtvonalon [90, 91]. Az 1 hónapos követéses vizsgálat eredményei is arra engedtek következtetni, hogy a fetuin-A szint csökkenése inkább a májsejtkárosodás, semmint az akut fázis reakció következménye. Az 1 éves követés alatt a szoros pozitív korrelációt találtunk a negatív akut fázis fehérje transferrinnel és negatív korrelációt a CRP-vel. Ez utóbbi azonban már nem volt szignifikáns az 1. hónapot követő periódusban. A pozitív akut fázis fehérje ORM-dal sem találtunk szoros kapcsolatot. Mindez arra utal, hogy az akut fázis reakció nem határozza meg ezeknek a fehérjéknek a szintjét és a hosszú távú kimenetelt sem befolyásolja alkoholos májcirrhosisban. Így az 1 éves követés eredményei is megerősítik korábbi feltételezéseinket, hogy a csökkent fetuin-A szint inkább a májsejtkárosodást és nem az akut fázis reakciót jelzi.

2001-ben történt bevezetése óta a MELD score-t széles körben használják a végstádiumú májbetegségek prognosztizálására [159]. A mi vizsgálatainkban a CP enyhén jobbnak bizonyult a MELD-nél. Ez nem meglepő, hiszen a MELD score elsősorban a transzplantáció indikációjának felállításában nyújt segítséget [158-160].

Összefoglalva, a szérumban fetuin-A koncentráció szenzitivitása, specificitása és prediktív értéke jobbnak bizonyult a CP és a MELD score-éhoz képest, sőt a fetuin-A meghatározás fokozta a MELD prediktív erejét. és nem volt rosszabb a MELDNa score-hoz képest.

4.2. A fetuin-A koncentráció követése krónikus C-vírus hepatitisben

Kandidátusi értekezésemben beszámoltam 14 NANB hepatitiszes és 4 bizonyítottan HCV fertőzött beteg fetuin-A szintjéről [3]. Munkatársaimmal a NANB csoportban fetuin-A szint emelkedést észleltünk. Követéses vizsgálatot ekkor nem végeztünk. A HCV meghatározás ezekben az években vált rutinná Magyarországon. A HCV szűrést is 1992 óta végezzük. Bár a korábban NANB hepatitiszesek túlnyomó többsége később C-vírus fertőzésnek bizonyult, további vizsgálatainkban szerológiailag homogén betegcsoporton követéses vizsgálatot kívántunk végezni. A vizsgálatot azért tartottuk különösen érdekesnek, mert az addig vizsgált krónikus májbetegségekben észlelt csökkenéssel szemben a fetuin-A koncentráció emelkedése nem várt eredmény volt. Hepatitis C-ben a fetuin-A szintet előttünk nem vizsgálták, sőt a 2004-es közleményünket megelőzően a klasszikus akut fázis proteinek viselkedéséről is csak elszórtan jelentek meg eredmények [172].

A hepatitis C-ben szenvedő betegek szérumban fetuin-A koncentráció meghatározását részben ezek a megfontolások inspirálták, részben az, hogy Bíró és mtsai 4 évvel korábban a C9 és a C1-INH komplement komponens szignifikáns emelkedését találták olyan krónikus C-vírus hepatitiszes betegekben, akik legalább 50%-os HCV RNS koncentráció csökkenést mutattak interferon (IFN) α 2B monoterápiára vagy IFN α 2B és ribavirin kombinált kezelésre [173]. Ezt mások is megfigyelték [174]. Célul tűztük ki két pozitív ORM és CRP és két negatív transzferrin és fetuin-A akut fázis fehérje szintjének meghatározását és követését krónikus C-vírus hepatitiszes betegek IFN α kezelése előtt és azt követően.

4.2.1. Betegek és módszerek

Negyven krónikus HCV hepatitiszes beteget (20 férfi, 20 nő, medián életkor: 44 év, kvartilis értékek: 41–51) vizsgáltunk. A krónikus C-hepatitis diagnózisát a 6 hónapon túl fennálló, a normálérték felső határát legalább kétszeresen meghaladó transzamináz értékek és az anti-HCV antitestek jelenléte alapján állítottuk fel. Minden esetben májbiopszia történt az IFN kezelés elkezdése előtt egy éven belül. A betegség átlagosan 1 (0,5–5,0) évig állt fenn. A

kezdeti Knodell-index 11,0 (8,0–13,5) volt. A kontrollcsoport 52 egészséges személyből állt (28 férfi, 24 nő, életkor: 47 év, 44–49 év).

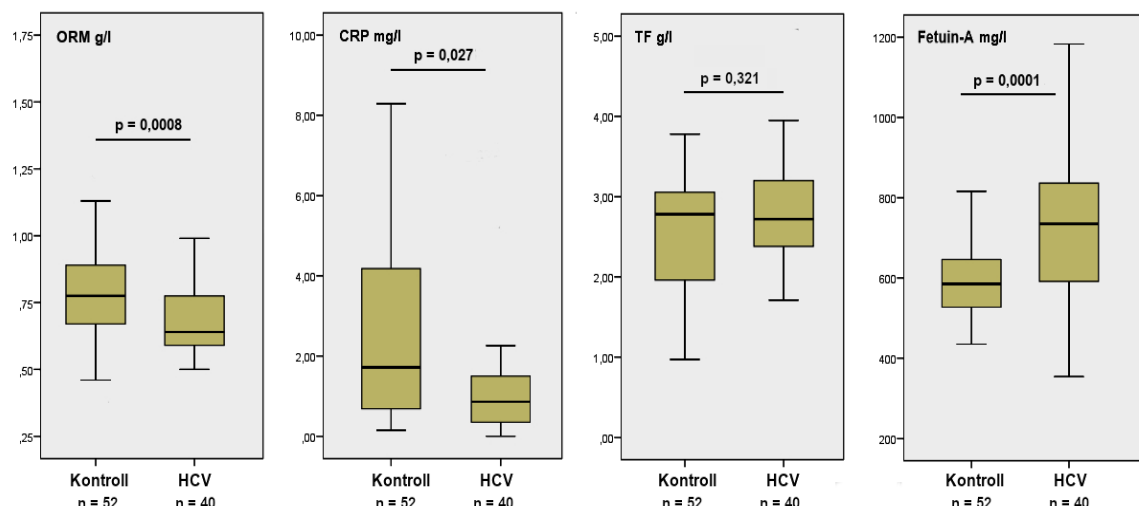
A betegek nagy dózisú rekombináns IFN α -2b-t kaptak (Schering-Plough AG) naponta 5 MIU szubkután, 6 héten keresztül, majd hetente háromszor 5 MIU-t szubkután további 6 hétig. A vérmintákat a kezelés kezdetén és a 3 hónapos terápia végén vettük le. A betegeket akkor nyilvánítottuk reszpondernek ($n = 18$), ha a HCV RNS legalább 90%-kal csökkent 3 hónapos kezelést követően. Akinél ez nem teljesült, non-reszponder minősítést kapott ($n = 22$). A betegeket a Budai Irgalmasrendi Kórház II. sz. Belgyógyászati Osztályán, a Belügyminisztérium Központi Kórházában, a Szent László Kórház III. sz. Belgyógyászati Osztályán, a Pécsi Tudományegyetem ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinikán, a székesfehérvári Szent György Kórházban, az Országos Molekuláris Diagnosztikai Központban, a Zalaegerszegi Megyei Kórház és a győri Petz Aladár Kórház Belgyógyászati Osztályain kezelték.

Az ORM, a transferrin és a fetuin-A koncentrációját RID módszerrel határoztuk meg, az utóbbit az általános részben leírtak szerint. A HCV RNS koncentráció mérése a branched-chain DNA módszerrel Quantiplex HCV bDNA 2.0 kittel történt (Bayer-Chiron, Emeryville, CA, USA).

4.3.2. Eredmények

A pozitív és a negatív akut fázis fehérjék koncentrációja egészséges egyéneken és krónikus C-vírus hepatitises betegekben az interferon- α kezelés megindítása előtt

Az egészséges kontroll személyek és a krónikus HCV hepatitises betegek kiindulási akut fázis fehérje koncentráció értékeit a 4.2.1. ábra mutatja. A kiindulási ORM szint szignifikánsan alacsonyabb volt a HCV-s betegekben a kontrollokhoz képest. A betegek CRP értéke a normál tartományban (0–6 mg/l) volt, de annak feltűnően az alsó értékeinél, olyannyira, hogy az egészséges kontrollokhoz viszonyítva a különbség statisztikailag szignifikánsnak adódott. A pozitív akut fázis fehérjékkel ellentétben a fetuin-A kiindulási értéke jelentősen magasabb volt a krónikus HCV-s betegekben, a transferrin nem különbözött jelentősen a két csoport között. A Knodell-index értéke szignifikáns negatív korrelációt mutatott az ORM koncentrációval, ($r = -0,398$, $p = 0,019$), de a többi akut fázis fehérjével nem.



4.2.1. ábra. Az egészséges kontrollok és a krónikus HCV hepatitiszes betegek akut fázis fehérje koncentrációja. ORM: α 1-savi glikoprotein; CRP: C-reaktív protein; TF: transzferrin. Medián, Q1-Q3 értékek, Mann-Whitney teszt

A szérum akut fázis fehérjék és a HCV RNS szintje krónikus C-vírus hepatitiszes betegek interferon- α kezelése előtt és után

A HCV RNS koncentráció jelentősen csökkent az IFN α kezelés hatására: 0,61 (0,00–1,91) vs. 3,57 (0,77–9,14) MEQ/ml, $p < 0,0001$. Az összes beteg esetében a kezelés végére a pozitív akut fázis fehérjék közül az ORM szint szignifikánsan emelkedett a kezelés előttihez képest, míg a CRP nem változott jelentősen (4.2.1. táblázat). Mindkét negatív akut fázis fehérje koncentrációja csökkent, a TF szignifikáns mértékben.

4.2.1. táblázat. A krónikus HCV hepatitiszes betegek akut fázis fehérje koncentrációjának változása IFN α kezelés hatására

Paraméter	HCV betegek kezelés előtt (n = 40)	HCV betegek kezelés után (n = 40)	p ^{&}
ORM (g/l)	0,64 (0,59-0,78)	0,75 (0,65-0,82)	0,006
CRP (mg/l)	0,86 (0,35-1,51)	0,98 (0,55-1,58)	0,467
Transzferrin (g/l)	2,72 (2,37-3,20)	2,53 (2,31-3,04)	0,006
Fetuin-A (mg/l)	735 (581-840)	713 (617-806)	0,082

&: Wilcoxon teszt; Medián, Q1-Q3 értékek; ORM: α 1-savi glikoprotein; CRP: C-reaktív protein

A pozitív és negatív akut fázis fehérjék koncentrációváltozásai reszponderekben és non-reszponderekben interferon- α kezelés előtt és után krónikus C-vírus hepatitises betegekben

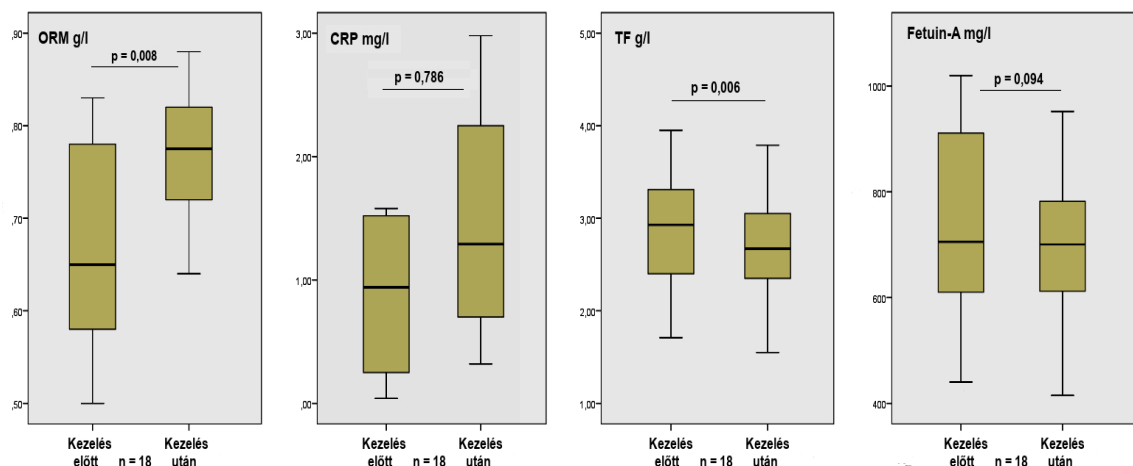
A továbbiakban a betegeket reszponder és non-reszponder csoportba osztottuk. Csak a reszponderekben lehetett megfigyelni a transzamináz értékek jelentős csökkenését (4.2.2. táblázat).

4.2.2. táblázat. A HCV RNS és a szérum transzamináz aktivitás változása krónikus C-vírus hepatitises betegek IFN α kezelése előtt és után reszponder betegekben

	Kezelés előtt (n = 18)	Kezelés után (n = 18)	p[#]
HCV RNS (MEQ/ml)	4,77 (0,59-9,68)	0,00 (0,00-0,00)	0,0002
SGOT (U/l)	71 (58-117)	25 (20-29)	0,018
SGPT (U/l)	112 (90-193)	33 (27-49)	0,001

#: Wilcoxon teszt; Medián, Q1-Q3 értékek. HCV RNS: hepatitis C vírus ribonukleinsav; SGOT: szérum glutamát-oxálacetát transzamináz, SGPT: szérum glutamát-piruvát transzamináz

Több akut fázis fehérje koncentráció esetében jelentős különbséget találtunk a kezelésre válaszolók és a nem reszponderek között. A reszponderekben a pozitív akut fázis fehérje ORM szint jelentősen emelkedett (4.2.2. ábra) és a normál értékre tért vissza 3 hónap után az egészséges kontrollokhoz viszonyítva $p = 0,502$, Mann-Whitney teszt), míg a non-reszponderekben nem változott (4.3.3. táblázat) és a kezelés végére is alacsony maradt (a kontrollokhoz viszonyítva $p = 0,039$). A CRP nem változott a reszponder és a non-reszponder csoportban a kezelés alatt. A transzferrin jelentősen csökkent az IFN α kezelés során a reszponderekben, míg a non-reszponderekben nem változott jelentősen.



4.2.2. ábra. A HCV RNS és az akut fázis fehérjék szérumszintjének változása krónikus C-vírus hepatitiszes betegek IFN α kezelése előtt és után reszponder betegeknél. Wilcoxon teszt; medián, Q1-Q3 értékek. ORM: α 1-savi glikoprotein; CRP: C-reaktív protein, TF: transzferrin

A non-reszponderek esetében egyik akut fázis reaktáns szintje sem változott számottevően a 3 hónapos IFN α kezelés alatt (4.2.3. táblázat). A fetuin-A koncentráció egyik csoportban sem csökkent szignifikánsan a kiindulási értékhez képest.

4.2.3. táblázat. A HCV RNS és az akut fázis fehérjék szérumkoncentrációjának és a transzaminázok aktivitásának változása krónikus C-vírus hepatitiszes, non-reszponder betegek IFN α kezelése előtt és után

	Non-reszponder (n = 22)		
	Kezelés előtt	Kezelés után	p [#]
HCV RNS (MEQ/ml)	3,08 (0,86-9,59)	1,70 (0,85-4,10)	0,191
ORM (g/l)	0,64 (0,59-0,76)	0,68 (0,64-0,82)	0,257
CRP (mg/l)	0,81 (0,36-1,68)	0,84 (0,48-1,43)	0,859
Transzferrin (g/l)	2,67 (2,33-3,13)	2,54 (2,28-3,03)	0,313
Fetuin-A (mg/l)	762 (613-820)	721 (629-806)	0,335
SGOT (U/l)	71 (42-95)	59 (45-59)	0,866
SGPT (U/l)	77 (66-137)	78 (45-94)	0,017

Medián, Q1-Q3 értékek. #: Wilcoxon teszt; HCV RNS: hepatitis C vírus ribonukleinsav; ORM: α 1-savi glikoprotein; CRP: C-reaktív protein; SGOT: szérumsz glutamát-oxálacetát transzamináz, SGPT: szérumsz glutamát-piruvát transzamináz

A szérumsz fetuin-A koncentráció és a vizsgált laboratóriumi paraméterek kapcsolata krónikus C-vírus hepatitiszes betegekben interferon- α kezelés előtt és után

A HCV-s betegek kezelés előtti mintáiban a fetuin-A koncentráció a transzferrin szinttel és a HCV mennyiséggel mutatott szignifikáns korrelációt, más paraméterrel nem (4.2.4.

táblázat). A 3 hónapos IFN α kezelést követően a reszponderekben a transferrinnel ($r = 0,522$, $p = 0,038$), a non-reszponderekben is csak a transferrin szinttel találtunk szignifikáns korrelációt ($r = 0,578$, $p = 0,005$). A reszponderekben a CRP szint szignifikancia közeli értékben korrelált a fetuin-A-val ($r = -0,620$, $p = 0,056$).

4.2.4. táblázat. A szérumban fetuin-A koncentráció és a vizsgált laboratóriumi paraméterek közötti korreláció

Paraméter	$r^{\#}$	p
HCV RNS	0,352	0,026
ORM	0,035	0,831
CRP	-0,278	0,236
Transzferrin	0,362	0,022
SGOT	0,182	0,281
SGPT	0,141	0,405
IL-6	0,230	0,206

#: Spearman-féle rang korreláció; HCV RNS: hepatitis C vírus ribonukleinsav; ORM: α 1-savi glikoprotein; CRP: C-reaktív protein; SGOT: szérumban glutamát-oxálacetát transzamináz, SGPT: szérumban glutamát-piruvát transzamináz; IL-6: interleukin-6

4.2.3. Megbeszélés

A fetuin-A-t előttünk nem vizsgálták HCV fertőzésben. Később in vitro kimutatták, hogy a Huh-7 humán hepatoma sejtenyészeten HCV hatására a fetuin-A mennyisége tízszeresére fokozódik [175]. A HCV fertőzésben észlelhető cryoglobulin fetuin-A-t tartalmaz [176]. Feltételezték, hogy a fetuin-A kalciumfoszfáttal, nagy molekulatömegű szérumbanfehérjékkel (pl. IgM és komplement komponensek) képez komplexet. A cirrhosisba történő átmenettel járó csökkenő szint oka a fokozott felhasználódás, a cirrhosisba progrediáló krónikus gyulladás okozta Ca-túlterhelés elleni védekezés [177].

Az egészséges kontrollok és a betegek kezelés előtti állapotának összehasonlítása egyértelműen mutatja a pozitív akut fázis fehérje ORM szintjének csökkenését és a negatív akut fázis reaktáns fetuin-A szintjének emelkedését krónikus HCV hepatitisben. Mivel a CRP normálértékének alsó határa 0, nem várható, hogy csökkenése a krónikus C-vírus hepatitiszes betegekben biológiailag releváns és egyben statisztikailag szignifikáns lenne, de az utóbbi mégis igaz. Az a megfigyelés, hogy csak 7 betegnek volt 1 mg/l-nél és 2-nek 6 mg/l-nél magasabb CRP szintje is arra utal, hogy az valóban csökkent az egészséges kontrollokhoz képest. Az akut fázis fehérjék paradox irányú eltérése visszafordulni látszott az IFN α kezelésre kielégítően reagáló betegekben, míg megmaradt a non-reszponderekben.

Eredményeink megjelenése előtt az akut fázis reakciót is alig vizsgálták krónikus HCV hepatitises betegekben. Egy korai vizsgálatban a CRP, a fibrinogén és az albumin szintjében nem találtak eltérést krónikus C-vírus hepatitises betegekben az egészségesekhez képest, de az IFN α -ra reszponderek alacsony C3 és C4 koncentrációja a normális szintre tért vissza [172]. Hasonló megfigyelést tettek hazai szerzők a C9 és C1-INH [173] és mások [174] a C4 komplement komponens változásával kapcsolatban. Ezek a megfigyelések az akut fázis reakció szuppressziójára utalnak krónikus HCV hepatitises betegekben. Egy esetkontroll vizsgálatban utánunk hasonlóan emelkedett fetuin-A koncentrációt találtak ebben a betegségben, sőt a T2DM-es hepatitisesekben magasabbat is, mint a nem cukorbetegben [178]. Ennek alapján még a fetuin-A inzulinrezisztenciát fokozó hatását is felvetették, ami gyakran megfigyelhető HCV fertőzésben. A fetuin-A szintet metabolikus tényezők (BMI, inzulinrezisztencia) is befolyásolják, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy koncentrációja nem csökkent jelentősen még a reszponderekben sem.

Az akut vírus hepatitisben és alkoholos májcirrhosisban tett megfigyeléseink tükrében különösen érdekes volt a krónikus HCV hepatitisben észlelt kifejezett fetuin-A emelkedés, mert a HCV-ben talált eredményeink megjelenését megelőzően a fetuin-A-t kizárólag negatív akut fázis fehérjeként tartották számon.

A mi megfigyeléseinkkel egyezően később mások is magasabb transferrin szintet mértek HCV fertőzésben, mint a kontrollokban, és a CRP szintje sem tért el egymástól a két csoportban [179]. A 12 hetes IFN α + ribavirin kezelés után a reszponderekben a CRP magasabb, a transferrin és az ORM alacsonyabb volt, mint a non-reszponderekben.

A krónikus HCV hepatitisben megfigyelt akut fázis fehérje eltéréseket mind a gazdaszervezet megváltozott immunregulációja, mind pedig a vírus direkt immunszuppresszív hatása okozhatja. Az IFN α direkt immunmoduláló hatása ellen szól, hogy a non-reszponderek is ugyanolyan IFN α dózist kaptak.

A vizsgált akut fázis fehérjék paradox változásának molekuláris mechanizmusát közvetlenül nem vizsgálták. Mai ismereteink birtokában a jelenség magyarázata a hepatocita jelátviteli utak megváltozása a HCV fertőzés során. A HCV igen sok jelátviteli utat befolyásol a gazdaszervezetben, melyek közül a fetuin-A szintézis és az akut fázis reakció szempontjából a hepatocitákban kettő, a Janus kináz (JAK kináz) és a TNF α (TNFSF2) jelátviteli út releváns [180, 181].

1. JAK kináz útvonal. A Janus kinázok aktiválják a signal transducers and activators of transcription (STAT)1-6 kinázokat. Ezek közül a STAT3 regulálja az akut fázis reakciót. A hepatitis C-vírus C és E2 strukturális proteinje, valamint az NS5A nem strukturális fehérjéje csökkenti az IFN α receptorok (IFNAR1 és IFNAR2c) számát, ezáltal blokkolja az IFN α által történő STAT1-3 aktivációt [182]. A STAT3 aktiváció elmaradása az akut fázis reakció gátlásához, valamint az IFN α hatás és az antivirális válasz gyengüléséhez vezet.

2. TNF α (TNFSF2) jelátviteli út. A HCV core fehérjéje és kisebb mértékben az NS4B fehérje három különböző úton is befolyásolja a sejtproliferációban és a gyulladásos folyamatban meghatározó szerepet játszó citokinek: IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α (TNFSF2) és az IFN β termelődését, úgymint az NF κ B, az activator protein-1 (AP-1) és a serum response element (SRE) út stimulálásával [181].

2.a. A HCV-nak az NF κ B aktivitására gyakorolt hatásáról ellentmondásos közlemények jelentek meg. Serkentő [181] és gátló [182-184] hatást egyaránt leírtak, a sejtek környezetétől [185] és a vírus genotípusától függően (az 1a gátol, az 1b-vel ezt nem észlelték) [184]. A vírus NS5A fehérjéje aktiválja az NF κ B-t [186]. Tovább színezi a képet, hogy az NF κ B jelátviteli ún. kanonikus (klasszikus) jelátviteli útja gátlódik, mely kedvez a vírusreplikációnak. A nem kanonikus út valószínűleg aktiválódik [183]. Az NF κ B aktivitását szorosan reguláló IKK α a HCV fertőzés szempontjából kulcsfontosságú, és az NF κ B-től függetlenül is, a gazdasejt saját jelátvitelét használva indukálja a lipogenezist és szerepet játszik a vírus összeállításában [187].

2.b. Az AP-1 (c-jun/c-fos heterodimer) a fetuin-A promotor -1488/-1482. helyéhez képes kötődni és így fokozza a fetuin-A szintézisét (így stimulálják az ösztrogének is [188]).

2.c. A serum response element (SRE) mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli út aktivációja az ELK-1-et foszforilálja, mely az SRE-hez és a szérum reszponzív faktorhoz (SRF) kötődik [180]. A fetuin-A promoterén is számos SRF kötőhely található [41].

A mi eredményeinket két szempontból tartom fontosnak és újnak: 1) az egészséges kontrollok és a krónikus HCV hepatitises betegek közötti akut fázis fehérje koncentráció közötti különbség kimutatása, 2) az IFN α kezelésre reagálók és nem reagálók közötti különbség kimutatása szempontjából.

A HCV-nak direkt immunszuppresszív hatása is van. A HCV NS5A fehérjéje IL-8 termelést indukál, mely csökkenti az IFN antivirális aktivitását. A magas IL-8 koncentráció

az IFN α kezelésre adott rossz terápiás válasszal társul [189]. A perifériás vérből származó mononukleáris sejtek IFN α termelése is csökken HCV jelenlétében [190]. A vírus NS3 antigénje a T-helper sejtek proliferációját indukálja, de az IL-2 termelése nélkül [191].

Munkánk megjelenése után jóval később felmerült, hogy az akut fázis fehérjéknek esetleg prediktív jelentőségük lehet a terápia sikerességének megítélése szempontjából. Patel és mtsai a krónikus HCV hepatitises betegek peginterferon kezelése során a tartós virológiai választ jósó markereket kerestek. A vizsgált 105 szérumfehérjéből három, a D-vitamin kötő fehérje, a fetuin-A és a C5 komplement komponens bizonyult erre alkalmasnak [192]. Az általunk vizsgált akut fázis fehérjék prediktív ereje nem összemérhető a HCV kópiaszámával és az SGPT értékkel. Különösen igaz ez az utóbbi években használt, az IFN-hoz képest sokkal hatékonyabb antivirális gyógyszerek birtokában.

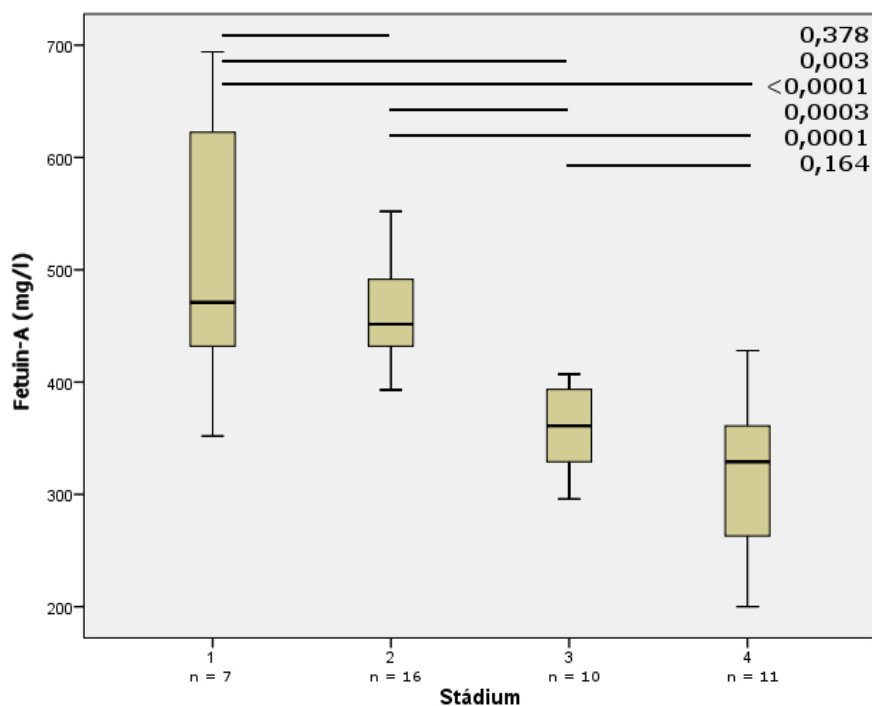
Az akut fázis fehérjék változásának klinikai jelentősége van HCV hepatitisben. Régóta ismert, hogy az emelkedett szérum vas, transferrin szaturáció, ferritin, a máj vasterhelésének növekedése fokozza a betegség súlyosságát és rontja az IFN α kezelésre adott választ [193, 194]. Egy másik vizsgálatban krónikus HCV-ben a fibrózisért felelős csillagsejtek kollagén szintézisét a fetuin-A jelentősen gátolni tudta. Eredményeikből arra következtettek, hogy a fetuin-A véd a fibrózis kialakulásával szemben [195].

4.3. A fetuin-A koncentráció primer biliaris cholangitisben

Korábbi vizsgálatainkban csökkent szérum fetuin-A koncentrációt találtunk alkoholos májcirrhosisban, de nem minden májbetegségben. Szalay és mtsai emelkedett IL-6 szintet találtak a PBC előrehaladott stádiumaiban [196]. Az IL-6 gátolja a fetuin-A szintézisét [90]. Mindezek alapján érdekesnek látszott a fetuin-A koncentráció meghatározása PBC-ben. A fetuin-A szintet előttünk nem még vizsgálták ebben a betegségben.

A Semmelweis Egyetem I. Sz. és III. Sz. Belgyógyászati Klinikáján, az Országos Reumatológiai Intézet II. Belgyógyászati Osztályán és a Szent László Kórház III. sz. Belgyógyászati Osztályán gondozott 52 PBC-s beteg szérummintáját vizsgáltuk és hasonlítottuk 58 egészséges kontroll személyéhez. A PBC diagnózisa a klinikai kép, a cholestasisra utaló laboratóriumi eltérések, az AMA pozitivitás és a cholestasis extrahepaticus okának kizárása után született. A betegség átlagos fennállási ideje 6 (4–12) év volt. A fetuin-A meghatározást elektroimmundiffúzióval végeztük a korábban leírt

módszer szerint. A betegek mindegyike urzodezoxikólsav kezelést kapott. Az egészséges kontrollokhoz képest szignifikánsan csökkent fetuin-A értéket találtunk: 400 (329–471) vs. 571 (532–662) mg/l, (medián és interkvartilis tartomány, $p < 0,001$). Negyvennégy beteg esetében történt szövettani vizsgálat, melynek alapján stádiumbeosztást lehetett végezni. A fetuin-A koncentráció a betegség előrehaladott stádiumaiban szignifikánsan csökkent (4.3.1. ábra).



4.3.1. ábra. A szérum fetuin-A koncentráció a primer biliaris cholangitis egyes stádiumaiban. Medián és kvartilis értékek. Az ábra jobb felső sarkában az egyes stádiumok páronkénti összehasonlításának (Mann-Whitney teszt) szignifikancia értékeit tüntettem fel. Kruskal-Wallis teszt a négy stádiumra: $p < 0,0001$

Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a betegség stádiumával, a szérum bilirubin, alkalikus foszfatáz, az IgM értékével és pozitív korrelációt a szérum albumin koncentrációval (4.3.1. táblázat).

4.3.1. táblázat. A szérum fetuin-A koncentráció és a vizsgált laboratóriumi paraméterek közötti korreláció primer biliaris cholangitisben

Paraméter	n	r	p [#]
Életkor	40	-0,263	0,071
Betegség fennállásának ideje	40	0,243	0,130
Stádium	44	-0,731	< 0,0001
Bilirubin	41	-0,461	0,002

4.3.1. táblázat. A szérumban fetuin-A koncentráció és a vizsgált laboratóriumi paraméterek közötti korreláció primer biliaris cholangitisben

Paraméter	n	r	p [#]
SGOT	42	-0,255	0,103
SGPT	42	-0,141	0,372
Alkalikus foszfatáz	42	-0,454	0,003
γ GT	41	-0,252	0,112
Albumin	39	0,388	0,008
α 2-makroglobulin	47	0,123	0,410
C3	47	0,059	0,692
Haptoglobin	46	0,124	0,411
ORM	47	-0,056	0,711
IgG	48	-0,066	0,656
IgA	48	-0,242	0,097
IgM	48	-0,338	0,019

#: Sperman-féle rank korreláció; SGOT: szérumban glutamát-oxálacetát transzamináz, SGPT: szérumban glutamát-piruvát transzamináz; γ GT: gamma-glutamil transferáz; C3: C3 komplement komponens; ORM: α 1-savi glikoprotein

Mivel a fetuin-A gátolja a lymphoblastos transzformációt [128], szintjének csökkenése fokozhatja az autoimmun folyamatot PBC-ben. A fetuin-A csökkenéséhez az emelkedett IL-6 szint is hozzájárul. Mivel a fetuin-A a csontot is szabályozza, csökkent szintje hozzájárulhat a biliaris cholangitisben és a különböző eredetű májcirrrosisban észlelt csonttérképekhez. Ezt még nem vizsgálták.

4.4. A fetuin-A koncentráció Wilson-kórban

A Wilson-kór a réz-anyagcserében szerepet játszó ATP7B gén ritka autoszomális recesszív betegsége, jellemzően központi idegrendszeri, szem- és májérintettséggel. Ez utóbbi idővel progresszív májelégtelenséghez, cirrhosishoz vezethet. A májbetegségeken végzett korábbi megfigyeléseink alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy hogyan változik az akut fázis fehérjék, így a fetuin-A szérumban koncentrációja Wilson-kórban. A kérdés azért is volt különösen érdekes, mert Wilson-kórban a cöruoplazmin rézszállító fehérje koncentrációja csökken. A cöruoplazmin, a fetuin-A, a transferrin és a pszeudokolineszteráz gén egymás közelségében a 3. kromoszóma 3q21-3qter régiójában helyezkedik el [197]. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy van-e összefüggés a betegek 37–63%-ában előforduló H1069Q

mutáció és az akut fázis fehérjék szintje között. A fetuin-A szérumszintjét Wilson-kórban előtűnk még nem vizsgálták.

4.4.1. Betegek és módszerek

Ötven, a Semmelweis Egyetem I. Sz. Belgyógyászati Klinikáján gondozott Wilson-kóros beteget (29 férfit, 21 nőt, életkor: $33,6 \pm 12,4$ év, átlag $\pm$ SD) vizsgáltunk. A betegség átlagosan $11,4 \pm 7,1$ évig állt fent. A diagnózist a klinikai kép, a laboratóriumi eltérések, a Kaiser-Fleischer gyűrűk megléte, a napi 100 μ g-ot meghaladó vizelet rézürités és a genetikai eltérések alapján állítottuk fel. Májérintettség gyanúja esetén biopsziára került sor. Kizárási tényezők voltak az alábbiak: vírusos és autoimmun eredetű hepatitis (HBsAg, anti-HCV, ANA, AMA, SMA pozitivitás), májkarcinóma, hepatotoxikus gyógyszerekkel történő kezelés.

A fetuin-A és az ORM koncentrációt RID módszerrel határoztuk meg az általános részben leírtak szerint. Az ATP7B gén H1069Q mutáció vizsgálata „semi-nested” PCR-en alapuló RFLP módszerrel történt az I. Sz. Belgyógyászati Klinikán [198]. A többi laboratóriumi meghatározást konvencionális standardizált módszerekkel végeztük.

4.4.2. Eredmények

Szérumszintű fetuin-A koncentráció Wilson-kóros betegekben

Az egészséges kontrollokéhoz képest a Wilson-kóros betegcsoport fetuin-A szintje nem különbözött egymástól (4.4.1. táblázat).

4.4.1. táblázat. Szérumszintű fetuin koncentráció Wilson-kóros betegekben (átlag $\pm$ SD)

	Wilson-kór	Egészséges kontroll	p [#]
N (férfi / nő)	50 (29 / 21)	51 (26 / 25)	
Életkor (év)	37 ± 12	35 ± 8	0,333
Fetuin-A (mg/l)	598 ± 148	605 ± 88	0,419

#: Mann-Whitney teszt

Szérum fetuin-A koncentráció Wilson-kóros betegekben májérintettség esetén

Mivel krónikus májbetegségekben korábban csökkent fetuin-A szintet találtunk, a betegeket három csoportra osztottuk: májérintettség⁴ nélkül (n = 16), májérintettség cirrhosis nélkül (n = 24) és májcirrhosis (n = 10). A májérintettséggel nem járó és a nem cirrhotikus májérintettségű Wilson-kóros betegek csak a transzaminázok tekintetében tértek el jelentősen egymástól (SGOT: 20 ± 5 U/l vs. 37 ± 19 U/l, $p < 0,001$, SGPT: 22 ± 9 U/l vs. 49 ± 24 U/l, $p < 0,001$). A továbbiakban csak a májérintettséget mutató betegekkal foglalkoztunk. A májcirrhosisos Wilson-kóros betegeknek jelentősen alacsonyabb fetuin-A koncentrációjuk volt, mint májcirrhosis nélkül. A vizsgált paraméterek tekintetében a fetuin-A különbözött legjobban a két csoport egymástól (4.4.2. táblázat).

4.4.2. táblázat. A cirrhosisal nem járó, de májérintettséget mutató és a májcirrhosisos Wilson-kóros betegek adatai (átlag $\pm$ SD)

Paraméter	Májérintettség cirrhosis nélkül (n = 24)	Májcirrhosis (n = 10)	p [#]
Életkor a diagnózis idején (év)	22 $\pm$ 11	23 $\pm$ 6	0,354
Betegség időtartama (év)	9 $\pm$ 5	13 $\pm$ 7	0,164
Fetuin-A (mg/l)	676 $\pm$ 149	490 $\pm$ 58	0,001
ORM (g/l)	52 $\pm$ 20	48 $\pm$ 12	0,879
We (mm/ó)	6 $\pm$ 10	3 $\pm$ 2	0,932
Vörösvértest szám ($10^6/\mu$ l)	5,0 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,4	0,420
Hematokrit	0,43 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,03	0,779
Hemoglobin (g/l)	149 $\pm$ 20	148 $\pm$ 11	0,677
Fehérvérsejt szám (/μl)	6318 $\pm$ 1674	5350 $\pm$ 1186	0,129
Prothrombin aktivitás (%)	87 $\pm$ 11	78 $\pm$ 21	0,442
INR	1,11 $\pm$ 0,11	1,30 $\pm$ 0,51	0,461
Szérum bilirubin (μmol/l)	17,0 $\pm$ 15,6	19,2 $\pm$ 8,8	0,213
SGOT (U/l)	37 $\pm$ 19	27 $\pm$ 5	0,092
SGPT (U/l)	49 $\pm$ 24	43 $\pm$ 46	0,130
Alkalikus foszfatáz (U/l)	335 $\pm$ 414	230 $\pm$ 58	0,643
γGT (U/l)	74 $\pm$ 129	55 $\pm$ 50	0,770
LDH (U/l)	330 $\pm$ 116	297 $\pm$ 66	0,563
Szérum összfehérje (g/l)	78 $\pm$ 5	73 $\pm$ 2	0,023
Szérum albumin (g/l)	49 $\pm$ 3	46 $\pm$ 2	0,122
Szérum réz (μmol/l)	6,7 $\pm$ 4,7	6,1 $\pm$ 5,1	0,880
Szérum cörol plazmin (g/l)	0,09 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 2,08	0,279

⁴ A májérintettség kritériumai a következők voltak: SGPT ≥ 50 U/l, vagy prothrombin idő ≥ 19 s, vagy szérum bilirubin ≥ 34 μmol/l, vagy ezek hiányában is a szövettani képen észlelt elváltozás (gyulladás, fibrosis).

#: Májérintettség cirrhosis nélkül vs. cirrhosisal, Mann-Whitney teszt; ORM: α 1-acid glikoprotein; INR: International Normalisation Rate; SGOT: szérumb glutamát-oxálacetát transzamináz; SGPT: szérumb glutamát-piruvát transzamináz; γ GT: gamma-glutamil transzferáz; LDH: laktát dehidrogenáz

A szérumb fetuin-A és a hagyományos laboratóriumi paraméterek közötti korreláció

A májérintettség nélküli betegekben érdemi korrelációt nem találtunk a fetuin-A szint és a 4.4.3. táblázatban felsorolt laboratóriumi paraméterek között. Májérintettség esetén azonban szignifikáns negatív korrelációt találtunk a betegség fennállásának idejével és a szérumb bilirubin szinttel, valamint pozitív korrelációt a szérumb összfehérje koncentrációval (4.4.3. táblázat).

4.4.3. táblázat. A szérumb fetuin-A koncentráció kapcsolata a májérintettséget mutató Wilson-kóros betegekben (n = 34)

Paraméter	r	p [#]
Életkor a diagnózis idején	0,262	0,135
Betegség időtartama	-0,471	0,005
We	0,033	0,890
Vörösvértest szám	0,266	0,189
Hematokrit	-0,026	0,900
Hemoglobin	-0,003	0,989
Fehérvérsejt szám	-0,038	0,857
Prothrombin aktivitás	0,348	0,096
INR	-0,335	0,110
Prothrombin idő	-0,327	0,119
Szérumb bilirubin	-0,489	0,007
SGOT	0,066	0,733
SGPT	0,066	0,733
Alkalikus foszfatáz	-0,127	0,510
γ GT	-0,239	0,213
Szérumb összfehérje	0,685	< 0,001
Szérumb albumin	0,318	0,130
Szérumb réz	0,095	0,652
Szérumb cörol plazmin	-0,130	0,519
ORM	0,197	0,264

#: Spearman-féle rank korreláció; We: Westergren érték; INR: International Normalisation Rate; SGOT: szérumb glutamát-oxálacetát transzamináz; SGPT: szérumb glutamát-piruvát transzamináz; γ GT: gamma-glutamil transzferáz; ORM: α 1-acid glikoprotein

A szérumban fetuin-A cirrhosist jelző vágóértéke Wilson-kóros betegekben

A 34 májérintettséget mutató beteg szérumban az ROC görbe alapján meghatároztuk a májcirrhosist előrejelző fetuin-A koncentrációt. Az 510 mg/l szinthez tartozó görbe alatti terület (AUC) nagysága $0,869 \pm 0,061$ (95% C.I.: 0,749–0,988) volt ($p = 0,001$). Ez a vágóérték 70,0%-os szenzitivitással és 83,3%-os specificitással jelezte a májcirrhosis fennállását. Az ≤ 510 mg/l koncentráció szignifikánsan nagyobb cirrhosis-kockázattal társult (RR: 3,807, 95% C.I.: 1,117–12,98, Fisher teszt, $p = 0,030$).

A szérumban fetuin-A és ORM koncentráció összehasonlítása a Nazer score-ral

A Wilson-kór súlyosságának mérésére a Nazer score-t használtuk [199]. A 0 feletti score-ral rendelkező betegeknek alacsonyabb fetuin-A értékük volt, mint a 0 érték esetén (4.4.4. táblázat, A). A különbség még kifejezettebbé vált, amikor csak azokat a betegeket vettük figyelembe, akiknek májérintettségük volt (4.4.4. táblázat, B). A kis esetszám nem tette lehetővé az 1 fölötti score értékű betegek összehasonlítását. Az ORM koncentráció nem mutatott különbséget a 0 és az 1 fölötti score-ral rendelkező betegek között.

4.4.4. táblázat. A szérumban fetuin-A, valamint az ORM koncentráció (átlag $\pm$ SD) és a Nazer score közötti kapcsolat az összes ($n = 50$) (A) Wilson-kóros betegben és májérintettség esetén ($n = 34$) (B)

(A) Összes Wilson-kóros beteg ($n = 50$)			
	Nazer score		
	0 ($n = 36$)	≥ 1 ($n = 14$)	$p^{\#}$
Fetuin-A (mg/l)	619 ± 157	485 ± 28	0,050
ORM (g/l)	$0,54 \pm 20$	$0,49 \pm 0,18$	0,541
(B) Wilson kór, májérintettséggel ($n = 34$)			
	Nazer score		
	0 ($n = 24$)	≥ 1 ($n = 10$)	$p^{\#}$
Fetuin-A (mg/l)	661 ± 148	485 ± 28	0,006
ORM (g/l)	$0,52 \pm 0,19$	$0,48 \pm 0,20$	0,978

#: Mann-Whitney teszt; ORM: α 1-acid glikoprotein

A szérumban fetuin-A koncentráció és a H1069Q mutáció kapcsolata Wilson-kóros betegekben

H1069Q homozigóta mutációt 9, heterozigóta mutációt 27 betegben találtunk. Tizennégy betegben nem volt eltérés. A szérumban fetuin-A és az ORM szint nem különbözött a három genotípus között (4.4.5. táblázat).

4.4.5. táblázat. A szérumban fetuin-A, valamint az ORM és a H1069Q mutáció közötti kapcsolat Wilson-kóros betegekben (átlag $\pm$ SD)

H1069Q mutáció				
	Homozigóta (n = 9)	Heterozigóta (n = 27)	Nincs mutáció (n = 14)	p [#]
Fetuin-A (mg/l)	556 $\pm$ 115	621 $\pm$ 161	597 $\pm$ 152	0,499
ORM (g/l)	0,54 $\pm$ 0,24	0,51 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,30	0,395

#: Kruskal-Wallis teszt; ORM: α 1-acid glikoprotein

4.4.3. Megbeszélés

Az alkoholos májcirrhosisban és primer biliaris cholangitisben találtakhoz hasonlóan a Wilson-kórhoz társuló májcirrhosisban is csökkent fetuin-A koncentráció mérhető.

Az interleukin-1 β (IL-1 β) konvertáló enzim (mely az IL-1 β -t érett formává alakítja) és az IL-6 gén expressziója fokozott a Long-Evans cinnamon patkányokban. Ez a törzs különösen hajlamos Wilson-kór kialakulására [200]. Az IL-1 β proinflammatorikus citokin segíti a májcirrhosis kialakulását és az IL-6-tal együtt csökkenti a fetuin-A gén expresszióját.

A pozitív akut fázis fehérje ORM-val való korreláció hiánya ebben a betegségben is amellet szól, hogy fetuin-A szint csökkenése inkább a májsejt diszfunkció, semmint az akut fázis reakció következménye. A cirrhosisos betegek kis száma miatt nem tudtunk korrelációt számolni a fetuin-A szint és az alkoholos cirrhosisos betegeknél vizsgált paraméterek között.

Az alkoholos májcirrhosisban lényegesen alacsonyabb vágóértéket találtunk, mint Wilson-kórban (365 vs. 510 mg/l). Ennek oka a vágóértékhez tartozó esemény különbözősége (alkoholos cirrhosisos halálozás, illetve cirrhosis megjelenése Wilson-kórban). A mortalitást előrejelző érték valószínűleg Wilson-kórban is sokkal alacsonyabb.

Ugyanakkor az is igaz, hogy a Wilson-kóros betegeket általában szorosabban követik és kezelik, ami késlelteti a cirrhosis kialakulását és súlyosbodását. Ebben a betegcsoportban a cirrhosis nem is volt olyan súlyos, mint az alkoholos csoportban, ahogy ezt a laboratóriumi eredmények mutatják: májelégtelenség sem fordult elő és mindegyikük túlélte 1 évet.

A cöruroplazmin koncentrációja Wilson-kórban csökkent. Bár a 3. kromoszóma 3q21-3qter régiójában a cöruroplazmin génje a fetuin-A génjéhez közel helyezkedik el [197], mi nem találtunk korrelációt a két molekula szérumszintje között. Ez azzal magyarázható, hogy a betegek a szérum rézszintjét csökkentő kezelésben részesültek.

5. A szérum fetuin-A koncentráció vizsgálata egészséges és patológiás terhességben

A fetuin-A a főtális plazma egyik legnagyobb mennyiségben kimutatható fehérjeje [8]. Számos embrionális szövetben expresszálódik. Negatív akut fázis fehérje tulajdonsága, a kalcifikáció szabályozásában, valamint az inzulin receptor tirozin kináz gátlásában betöltött szerepe alapján érdemesnek látszott megvizsgálni, hogyan alakul egészséges és patológiás terhességben. Célul tűztük ki egyfelől az egészséges terhes, valamint a gesztációs diabéteszes várandósok tanulmányozását, valamint a fetuin-A szintjének vizsgálatát a patológiás terhesség egyéb formáiban, így praeclampsziában és annak súlyosabb formájában, HELLP szindrómában.

5.1. Az anyai szérum fetuin-A koncentrációnak az anyai inzulinrezisztenciával és az újszülöttek antropológiai paramétereivel való kapcsolata egészséges terhességben és gesztációs diabéteszben

A fetuin-A a csontmátrix nem-kollagén állományának egyik legfontosabb összetevője, különösen főtális korban. Főként a májban termelődik, és foszforilált variánsa gátolja az inzulin receptor jelátvitelét, hozzájárulva az inzulinrezisztencia kifejlődéséhez. A TNF α (TNFSF2) [201] és a leptin szintén szerepet játszik az inzulinrezisztencia létrejöttében elhízaskor és T2DM fennállásakor [202], valamint hatással van a β -sejtek inzulinszekréciónak kapacitására is. Mindkét citokin szerepet játszik a csontfejlődésben is [203-205].

Az egészséges terhesség során kialakuló és fokozódó inzulinrezisztencia régóta ismert. A perifériás szövetek és a máj inzulinérzékenysége még inkább csökkent gesztációs diabéteszes (GDM) betegekben. A fetuin-A-nak az inzulin receptor jelátvitelében betöltött szerepének ismeretében kíváncsiak voltunk arra, hogy szerepe lehet-e a szérum fetuin-A koncentrációnak az inzulinrezisztencia kialakulásában egészséges terhességben és gesztációs diabéteszben.

Említésre méltó, hogy a policisztás ovárium szindrómát (PCOS) ugyancsak hiperinzulinémia és fokozott inzulinrezisztencia jellemzi [206, 207]. Ebben a kórállapotban szintén emelkedett fetuin-A-t figyeltek meg, mely a HOMA-IR-rel korrelált [208, 209].

Feltételezhető, hogy az anyai cukorbetegségben észlelt magzati károsodások egy része (pl. a testösszetétel és az antropológiai paraméterek megváltozása) a $\text{TNF}\alpha$ rendszer és a leptin hatásával magyarázható. Ezért ebben az eset-kontrollos keresztmetszeti vizsgálatban meghatároztuk az anyai szérumban fetuin-A, $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2), szolubilis TNF-receptor-1 és -2 (sTNFR-1, sTNFRSF1A és sTNFR-2, sTNFRSF1B), valamint leptin koncentrációt egészséges terhesekben és GDM betegekben. A TNFR-1 (TNFRSF1A)-en történő jelátvitel sejt apoptózishoz, nekroptózishoz vezet, míg a TNFR-2 (TNFRSF1B) út a sejt túlélését eredményezi [210]. A szolubilis sTNFR-2 (sTNFRSF1B) szerepet játszik az inzulinrezisztencia létrejöttében [211]. Összefüggést kerestünk továbbá az anyai inzulinrezisztencia indirekt paramétereivel (éhomiai C-peptid szint, C-peptid/éhomiai vércukor hányados). Az anyai citokin szinteket összehasonlítottuk az újszülöttek antropológiai paramétereivel (testhossz, testsúly és fejkörfogat).

5.1.1. Vizsgált személyek és módszerek

Száznégy egészséges várandós (közülük 35 az első, 31 a második és 38 a harmadik trimeszterben), valamint 30 gesztációs diabéteszes beteg (emelkedett éhomiai C-peptid szinttel, a 20.–40. terhességi hét között), valamint 30 egészséges, korban illesztett, nem várandós nő adatait hasonlítottuk össze (5.1.1. táblázat).

5.1.1. táblázat. Az egészséges várandósok, a GDM-es betegek és a nem terhes kontrollok klinikai és laboratóriumi adatai (átlag $\pm$ SD)

	GDM betegek (n = 30)	Egészséges várandósok (n = 104)	Nem várandós nők (n = 30)
Életkor (év)	28,0 $\pm$ 2,8	27,8 $\pm$ 2,8	28,3 $\pm$ 3,5
Gesztációs idő (hét)	27,67 $\pm$ 6,1	24,3 $\pm$ 13,6	-
BMI (kg/m²)	33,4 $\pm$ 6,4*	25,8 $\pm$ 2,7	22,9 $\pm$ 2,5
Éhomiai glukóz (mmol/l)	4,70 $\pm$ 1,50	4,48 $\pm$ 0,37	4,48 $\pm$ 0,27
Éhomiai C-peptid (ng/ml)	6,00 $\pm$ 3,01	1,85 $\pm$ 0,97	1,11 $\pm$ 0,82
C-peptid/vércukor arány	0,40 $\pm$ 0,15	1,27 $\pm$ 0,51	0,27 $\pm$ 0,13
HbA1c (mmol/mol)	32,41 $\pm$ 4,50	34,48 $\pm$ 5,07	30,78 $\pm$ 2,85
HbA1c (%)	5,11 $\pm$ 0,71	5,30 $\pm$ 0,80	4,96 $\pm$ 0,45
Szérumban fruktózamin ($\mu\text{mol/l}$)	203,3 $\pm$ 15,4	191,0 $\pm$ 18,5	
Inzulin adag (NE/nap)	33,30 $\pm$ 20,83	-	-
Napi inzulin adag/testsúlykg	0,41 $\pm$ 0,21	-	-

*: $p < 0,01$ az egészséges várandósokhoz viszonyítva (Mann-Whitney teszt); BMI: testtömeg-index

A GDM diagnózisát a 75 g glukózzal végzett orális glukóz-terhelési teszt (OGTT) alapján állítottuk fel, a vizsgálat idején érvényes WHO klasszifikáció szerint [212]. Mindegyik beteg intenzifikált inzulinkezelést kapott (3 vagy több rövid hatású és egy bedtime intermedier hatású inzulin adagot).

A GDM-es anyák 30 (13 fiú, 17 lány), az egészséges anyák 23 (11 fiú, 12 lány) 3. trimeszterben született újszülöttjeinek antropológiai paramétereit (születési súly, testhossz, fejkörfogat) vetettük össze az anyai klinikai és laboratóriumi paraméterekkel. Mindegyik gyermek a 38.–40. gesztációs héten született. Az 5.1.2. táblázat az újszülöttek antropológiai paramétereit mutatja.

5.1.2. táblázat. Az újszülöttek antropológiai paramétereit (átlag $\pm$ SD)

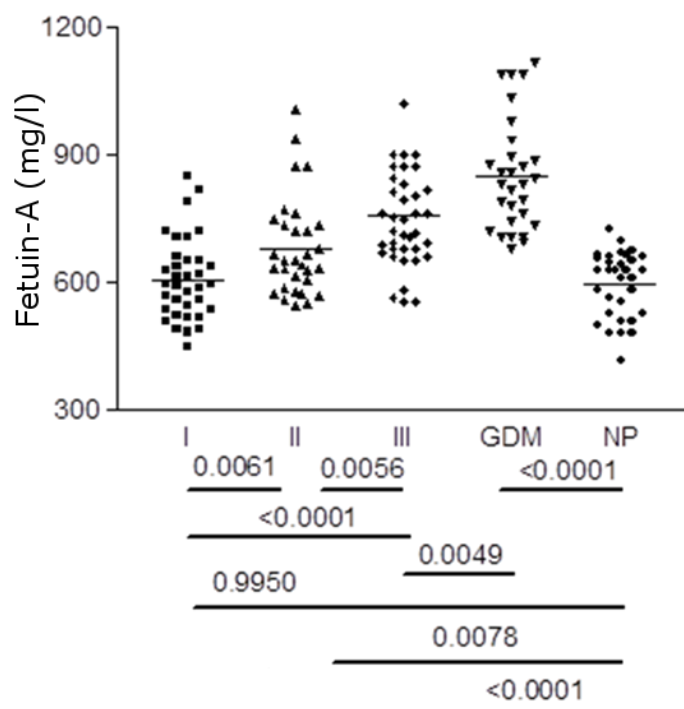
	GDM	Egészséges terhesség
N (fiú/lány)	30 (13/17)	23 (11/12)
Testsúly (g)	3151 $\pm$ 672*	3575 $\pm$ 365
Percentilis (%)	55,87 $\pm$ 30,29	64,75 $\pm$ 16,10
Testhossz (cm)	51,90 $\pm$ 3,40*	55,80 $\pm$ 2,80
Percentilis (%)	86,4 $\pm$ 31,88	110,90 $\pm$ 16,24
Fejkörfogat (cm)	33,80 $\pm$ 1,70*	34,75 $\pm$ 1,15
Percentilis (%)	65,50 $\pm$ 22,84	71,30 $\pm$ 32,14

N: újszülöttek száma, *: $p < 0,01$ az egészséges várandósok újszülöttjeihez viszonyítva (Mann-Whitney teszt).

5.1.2. Eredmények

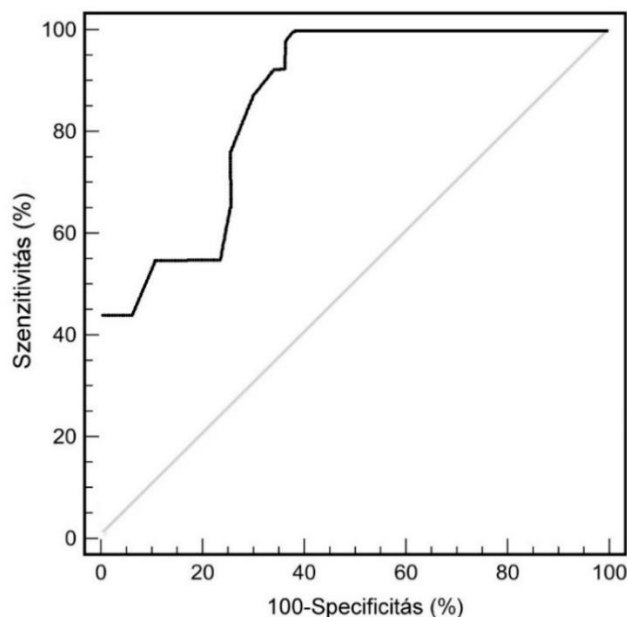
Szérum fetuin-A koncentráció nem várandós és várandós nőkben és gesztációs diabéteszes betegekben

A nem várandós állapothoz képest várandósokban a szérum fetuin-A koncentráció fokozatos emelkedését lehetett megfigyelni a második és a harmadik trimeszterben (5.1.1. ábra). A GDM-es betegek fetuin-A szintje szignifikánsan magasabb volt az egészséges várandósokéhoz és a nem várandósokéhoz képest.



5.1.1. ábra. Szérum fetuin-A koncentráció az egészséges terhesség három (I., II., III.) trimeszterében, a gesztációs diabétesz (GDM) harmadik trimeszterében és nem várandós (NP) nőkben. A szórásdiagrammokon belüli vízszintes vonalak az átlagokat jelölik (a csoportok összehasonlítása Mann-Whitney teszttel történt). Az egészséges várandósok I., II. és III. trimeszterében mért fetuin-A koncentráció különbségének Kruskal-Wallis p értéke: < 0,0001.

ROC görbe analízissel meghatároztuk azt a fetuin-A koncentráció értéket, mely a lehető legjobban tud differenciálni az egészséges és a GDM-es várandósok között (5.1.2. ábra). A 768 mg/l fetuin-A érték 94,7%-os szenzitivitással és 64,6%-os specificitással tudott differenciálni a két csoport között a 3. trimeszterben. A 768 mg/l és az e feletti koncentráció gyakrabban társult GDM-mel (OR: 1,99, 95% C.I.: 1,41–2,82, $p < 0,001$).



5.1.2. ábra. A gesztációs diabéteszes és az egészséges várandósok között differenciáló szérumban fetuin-A értékek ROC görbéje. AUC: $0,856 \pm 0,45$, 95% C.I.: $0,767-0,945$, $p < 0,001$). 1100 mg/l vagy magasabb értéket csak GDM-ben mértünk.

A GDM-es betegekben a nem várandós és az egészséges várandós nőkhöz képest (bármely trimeszterben) szignifikánsan magasabb ($p < 0,01$) szérumban TNF α (TNFSF2), sTNFR-1 (sTNFRSF1A), sTNFR-2 (sTNFRSF1B), leptin és C-peptid szintet mértünk (5.1.3. táblázat). Az egészséges várandós asszonyok harmadik trimeszterében ezek az értékek szignifikánsan magasabbak voltak, mint az első két trimeszterben vagy a nem várandós kontrollokban.

5.1.3. táblázat. A szérumban tumor nekrozis faktor- α (TNFSF2), a szolubilis TNF-receptor-1 (sTNFRSF1A), és TNF-receptor-2 (sTNFRSF1B), a leptin, az éhgyomri C-peptid koncentráció és a C-peptid/vércukor hányados gesztációs diabéteszben, az egészséges terhesség különböző trimesztereiben és egészséges, nem várandós nőkben (átlag $\pm$ SD)

	GDM (n = 30)	Egészséges várandós			Nem várandós s kontroll (n = 30)
		1. trimeszter (n = 35)	2. trimeszter (n = 31)	3. trimeszter (n = 38)	
Szérumban TNF α (pg/ml)	$6,3 \pm 0,6^{**}$	$4,1 \pm 0,4^{#, +}$	$4,4 \pm 0,4^{#, +}$	$5,5 \pm 0,7^*$	$4,1 \pm 0,4$

5.1.3. táblázat. A szérumban tumor nekrozis faktor- α (TNFSF2), a szolubilis TNF-receptor-1 (sTNFRSF1A), és TNF-receptor-2 (sTNFRSF1B), a leptin, az éhgyomri C-peptid koncentráció és a C-peptid/vércukor hányados gesztációs diabéteszben, az egészséges terhesség különböző trimesztereiben és egészséges, nem várandós nőkben (átlag $\pm$ SD)

	GDM (n = 30)	Egészséges várandós			Nem várandó s kontroll (n = 30)
		1. trimeszter (n = 35)	2. trimeszter (n = 31)	3. trimeszter (n = 38)	
Szérumban sTNFR-1 (ng/ml)	3,2 $\pm$ 0,5*	2,1 $\pm$ 0,5 ^{#,+}	2,3 $\pm$ 0,5 ^{#,+}	2,8 $\pm$ 0,9**	2,01 $\pm$ 0,1
Szérumban sTNFR-2 (ng/ml)	10,0 $\pm$ 6,9**	4,7 $\pm$ 2,1 ^{#,+}	5,3 $\pm$ 3,7 ^{#,+} +	5,7 $\pm$ 2,6**	3,3 $\pm$ 0,2
Szérumban leptin (ng/ml)	40,4 $\pm$ 24,5* *	11,4 $\pm$ 7,2 [#] +	11,1 $\pm$ 5,2 [#] +	33,5 $\pm$ 22,0* *	12,0 $\pm$ 9,1
Szérumban éhgyomri C-peptid	6,0 $\pm$ 3,0**	1,2 $\pm$ 0,8 ^{#,+}	1,3 $\pm$ 0,4 ^{#,+}	3,1 $\pm$ 1,7*	1,1 $\pm$ 0,8
Éhgyomri C-peptid/vércukor hányados	1,4 $\pm$ 0,5**	0,3 $\pm$ 0,1 ^{#,+}	0,3 $\pm$ 0,1 ^{#,+}	0,7 $\pm$ 0,2*	0,2 $\pm$ 0,1

*: p < 0,05, **: p < 0,01 a nem terhes nőkhez képest (Mann-Whitney teszt); #: p < 0,01 a GDM-es várandósokhoz képest; +: p < 0,05, ++: p < 0,01 az egészséges várandós nők 3. trimeszteréhez képest; GDM: gesztációs diabétesz; TNF α : tumor nekrozis faktor- α (TNFSF2); sTNFR-1: szolubilis tumor nekrozis faktor- α receptor-1 (sTNFRSF1A); sTNFR-2: szolubilis tumor nekrozis faktor- α receptor-2 (sTNFRSF1B)

Az anyai szérumban fetuin-A koncentráció és az inzulinrezisztencia indirekt paramétereinek közötti korreláció

A szérumban fetuin-A koncentráció erősen pozitívan korrelált a BMI-vel GDM-es betegekben. Ezen kívül szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az anyai inzulinrezisztencia indirekt paramétereivel is (éhgyomri C-peptid és C-peptid/vércukor arány), mind a GDM-es betegekben, mind az egészséges várandósokban (5.1.4. táblázat). Az anyai szérumban fetuin-A szint pozitívan korrelált az anyai TNF α (TNFSF2) és a leptin értékekkel mindkét várandós csoportban. Ezek a korrelációk nem voltak megfigyelhetők a nem várandós csoportban.

5.1.4. táblázat. A szérumban a fetuin-A koncentráció és a gesztációs diabéteszes, az egészséges várandós és a nem várandós nők laboratóriumi paramétereinek közötti korreláció

	GDM (n = 30)		Egészséges várandós (n = 38)		Nem várandós (n = 30)	
	r [#] (95% C.I.)	p	r [#] (95% C.I.)	p	r [#] (95% C.I.)	p
BMI (kg/m²)	0,570 (0,254-0,776)	0,001	0,218 (-0,101-0,503)	0,177	-0,002 (-0,388-0,351)	0,910
TNFα	0,661 (0,386-0,829)	< 0,0001	0,585 (0,326-0,763)	< 0,0001	-0,054 (-0,322-0,416)	0,777
sTNFR-1	0,031 (-0,343-0,396)	0,871	0,396 (0,084-0,635)	0,012	-0,009 (-0,378-0,362)	0,962
sTNFR-2	0,100 (-0,280-0,454)	0,598	0,212 (-0,116-0,499)	0,188	0,032 (-0,342-0,397)	0,867
Leptin	0,578 (0,264-0,781)	0,0008	0,353 (0,037-0,605)	0,026	-0,121 (-0,470-0,261)	0,523
C-peptid	0,670 (0,399-0,833)	< 0,0001	0,402 (0,094-0,640)	0,0101	0,052 (-0,324-0,414)	0,786
C-peptid / vércukor hányados	0,512 (0,0940-0,640)	0,0039	0,324 (0,004-0,587)	0,041	0,215 (-0,168-0,542)	0,254

#: Spearman-féle rangsor korreláció; GDM: gesztációs diabétesz; BMI: testtömeg index; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2); sTNFR-1: szolubilis tumor nekrozis faktor-α receptor-1 (sTNFRSF1A); sTNFR-2: szolubilis tumor nekrozis faktor-α receptor-2 (sTNFRSF1B)

A többváltozós analízis során a TNFα (TNFSF2) szignifikáns hatással volt a fetuin-A koncentrációra mind a GDM-es betegekben ($r = 0,781$, $p < 0,0001$), mind az egészséges várandósokban ($r = 0,737$, $p = 0,004$). Ebben a vizsgálatban a fetuin-A önmagában nem gyakorolt szignifikáns hatást az inzulinrezisztencia indirekt paramétereire (C-peptid és C-peptid/vércukor arány), de a TNFα-val és a leptinnel együtt már igen, a GDM csoportban (igazított $r^2 = 0,575$, $p = 0,001$) és az egészséges várandósok között ($r^2 = 0,823$, $p < 0,001$) egyaránt.

Az anyai szérumban fetuin-A koncentráció és az újszülöttek antropológiai paramétereinek közötti korreláció

Az újszülöttek testhossza és fejkörfogata szignifikáns negatív korrelációban volt az anyai szérumban fetuin-A szinttel a GDM csoportban (5.1.5. táblázat). Az egészséges terhesekben mindhárom újszülöttkori antropológiai paraméterrel szignifikáns negatív korrelációt találtunk.

5.1.5. táblázat. Az anyai szérumban fetuin-A koncentráció és az újszülöttek testmérete közötti korreláció gesztációs diabéteszben és egészséges terhesekben

	GDM (n = 30)		Egészséges terhesség (n = 23)	
	r [#] (95% C.I.)	p	r [#] (95% C.I.)	p
Fejkörfogat	-0,626 (-0,809- -0,333)	0,0002	-0,642 (-0,837- -0,300)	0,001
Testhossz	-0,407 (-0,675- -0,043)	0,026	-0,502 (-0,763- -0,100)	0,015
Testsúly	-0,310 (-0,610- 0,068)	0,096	-0,500 (-0,777- -0,059)	0,025

#: Spearman-féle rank korreláció; GDM: gesztációs diabétesz

A többváltozós analízis során az anyai szérumban fetuin-A koncentráció önmagában nem befolyásolta szignifikánsan sem az újszülöttek fejkörfogatát, sem a testhosszukat, azonban a TNF α -val, a leptinnel és a C-peptiddel együtt szignifikáns hatással volt azokra GDM-ben (igazított $r^2 = 0,563$, $p = 0,002$), de az egészséges terhesekben nem (igazított $r^2 = -0,069$, $p = 0,583$).

5.1.3. Megbeszélés

A szérumban fetuin-A koncentráció vizsgálata várandósságban azért volt különösen érdekes, mert vizsgálataink előtt összesen három közlés jelent meg a humán terhességben mérhető fetuin-A szintről, jóllehet állatokban a fetuinnek az embrionális fejlődésben betöltött fontos szerepét már évekkel korábban felvetették [1, 46]. Két vizsgálatban az egészséges (és nem várandós) kontrollokhoz viszonyítottak több betegséget és egészséges várandós nők 37, illetve 4 fős csoportját [213, 214]. A várandósokat nem elemezték, referencia csoporttal statisztikai összehasonlítás sem történt, bár az egyikben megállapítják, hogy magasabb a nem várandós állapothoz képest [213]. A másik tanulmányban a nem várandós állapothoz képest eltérő elektroforetikus mobilitást figyeltek meg, melyet megváltozott glikozilációval magyaráztak [214]. A harmadik közlemény fetuin-A jelenlétéről számol be várandós nők vizeletében és arról, hogy a fetuin-A a szülés után is kimutatható a vizeletben [215].

A fetuin-A szint emelkedését GDM-ben az egészséges terhesekhez képest utánunk többen is megfigyelték [216-218]. A fetuin-A korrelált a HbA1c-vel értékével [216]. Mások is megerősítették, hogy magasabb fetuin-A szint társul a 7%-os vagy nagyobb HbA1c-vel, mint a 6,5% alattival [219]. Egy idén közölt vizsgálatban az 1. és a 2. trimeszter közötti fetuin-A emelkedés a GDM kialakulásának fokozott kockázatával járt együtt, felvetve a fetuin-A prediktor szerepét [218]. Egy 2019-ben megjelent vizsgálat mind az anyai, mind a köldökszinór vérben emelkedett fetuin-A szintet írt le GDM-ben az egészséges várandósokhoz képest, sőt a magasabb anyai fetuin-A koncentráció gyakrabban társult terhességi szövődeményekkel (postpartum vérzés, intrauterin distress, újszülöttkori hipoglikémia) [220].

Simják és mtsai nemrég szintén emelkedett fetuin-A szintet mértek terhességben, bár nem találtak jelentős különbséget a vizsgált 12 egészséges és 12 GDM-es várandós fetuin-A szintje között [221]. Az ő vizsgálatukban az egészséges várandósok és a GDM-es betegek BMI-je lényegében azonos, HbA1c értékük mintegy 0,3%-kal magasabb volt, mint az általunk vizsgált személyeké. Az ő betegek viszont metformint is kaptak, melyről szintén megfigyelték, hogy csökkenti a fetuin-A szintet [222, 223]. Ugyanakkor ők is megerősítették, hogy GDM-ben magasabb a TNF α (TNFSF2) koncentráció, mint egészséges terhességben, és a fetuin-A szint pozitívan korrelál a TNF α (TNFSF2) szinttel [221]. Egy másik, kis statisztikai erővel bíró munkában sem különbözött a fetuin-A szint a 10-10 GDM-es és egészséges terhes között a harmadik trimeszterben [224]. A HbA1c 4,9% volt a GDM és a kontroll csoportban egyaránt. Az OGTT nem változtatta meg a fetuin-A koncentrációt. A fetuin-A csak a BMI-vel korrelált és nem állt kapcsolatban sem az inzulinérzékenységgel, sem az inzulin vagy a C-peptid szinttel [224].

A szérum TNF α (TNFSF2), valamint a sejtfelszínről leváló, az erekbe kerülő sTNFR-1 (sTNFRSF1A) és a sTNFR-2 (sTNFRSF1B) szint emelkedése a TNF rendszer aktiválódására utal mind egészséges, mind GDM-es várandósokban. A TNFR-1 (TNFRSF1A) által közvetített jelátviteli úton érvényesül a TNF α proinflammatorikus és apoptosist indukáló hatása [210], míg a TNFR-2 (TNFRSF1B) által közvetített útnak szerepet tulajdonítanak az inzulinrezisztencia kialakításában [211]. Ugyanakkor régi megfigyelés, hogy a szolubilis receptorok, így a TNF α receptorok gátolhatják is a ligand hatását, ezáltal szabályozva a gyulladást [225].

Fiziológiás körülmények között szülés után a fetuin-A szint csökken [216, 217]. A postpartum emelkedett fetuin-A szint szoros kapcsolatban van a GDM utáni állapottal szülés után [221, 224]. Rottenkolber és mtsainak vizsgálataiban 3–16 hónappal a GDM után lévő nőknek még mindig magasabb fetuin-A koncentrációjuk és alacsonyabb inzulinérzékenységi indexük volt, mint a nem GDM-es kontrolloknak [217]. Az alacsony inzulinérzékenység legfőbb prediktora a magas plazma leptin, a BMI, a TG és a derékkörfogat volt. Másokéval együtt [226] a mi eredményeink is arra engednek következtetni, hogy a béta-sejt funkció már károsodott a nemrég lezajlott GDM-ben is, mely fokozott kockázatot jelent ezekben a fiatal betegekben T2DM kialakulására (18,9% vs. 2,0% 9 éven belül). A fetuin-A és a leptin közvetítette hormonális diszreguláció már a korai szakaszban hozzájárul a T2DM kialakulásához [217].

A T2DM-hez hasonlóan a terhességet is inzulinrezisztencia jellemzi, mely GDM-ben még kifejezettebb. Ahogy mások és mi is kimutattuk, csak a foszforilált fetuin-A képes gátolni az inzulin jelátvitelét, a defoszforilált forma inaktív [110, 143]. Az egészséges emberek szérumában lévő fetuin-A molekula kb. 20%-a foszforilált [23]. Később bizonyították, hogy GDM-ben is az IR és az IRS1 csökkent tirozin-foszforilációja mutatható ki [227].

A fetuin-A-nak szerepe van a lipid-indukált inzulinrezisztencia kialakulásában is [103, 228, 229], mely nem hagyható figyelmen kívül sem a GDM, sem a T2DM patogenezisében [103]. A molekula részt vesz a TLR4-en keresztüli gyulladásos jelátviteli folyamatban: a palmitinsav–fetuin-A komplex aktiválja a TLR4-et, mely proinflammatorikus citokinek felszabadulása útján inzulinrezisztenciához vezet [103].

Az emelkedett fetuin-A koncentráció forrását illetően várandósságban ellentmondásosak az irodalmi adatok. Elvileg a placenta, a zsírszövet és a máj fokozott termelése jön szóba [50, 230]. A fetuin-A mRNS expressziója a placentában régóta ismert [50]. Az egészséges várandósok és a GDM-es betegek közötti fetuin-A placentáris mRNS expressziót illetően Simjak és mtsai nem észleltek különbséget, [221], míg Wang és mtsai fokozott mRNS és fehérjemennyiséget találtak GDM-es betegek placentamintáiban az egészséges várandósokéhoz képest [231]. Utóbbi szerzők megfigyelései továbbá arra is következtetni engednek, hogy a fetuin-A gátolja a méhlepény növekedését és a ciliogenezist, ami a molekula eddig nem ismert biológiai tulajdonságát, a placenta növekedését szabályozó szerepét vetik fel [231]. Egy vizsgálatban magasabb fetuin-A-t találtak a köldökzsinórvérben GDM-ben [220].

A zsírszövet fetuin-A mRNS expressziója is ismert [230], bariatrikus sebészeti műtét után a fetuin-A szint a zsírszövet mennyiségével arányosan csökken [232], praeeclampsiában a zsigeri zsírszövet fokozott TNF α (TNFSF2) termelődést mutat [233], ugyanakkor GDM-es betegekben mások nem tudták kimutatni a fetuin-A mRNS expresszióját sem a bőr alatti, sem a viscerális zsírszövetben [221]. A fetuin-A-t döntően (95%-ban) a máj termeli [46, 234] és innen jut a keringésbe, ezért a szérumkoncentrációt is legnagyobb részt a hepatikus szekréció határozza meg. Nincs bizonyíték arra, hogy ez várandósságban másképp lenne. A máj, a zsírszövet és a placenta eredetű molekula szerkezeti különbségét nem vizsgálták.

A magzatban szintén magas fetuin-A szint mérhető [16]. Az anyai és a magzati fetuin-A szint korrelációja alapján egyesek transzplacentáris transzfert tételeznek fel [47].

A legmagasabb fetuin-A szinttel rendelkező anyák újszülöttjeinek mégis kisebb átlagos születési súlya, testhossza és kisebb fejkörfogata volt. Saját eredményeink és az irodalmi adatok alapján nem egyértelmű, hogy ezekre a magzati paraméterekre az anyai fetuin-A-nak – akár a magzati csontfejlődés (mineral chaperone szerep [22]), akár a magzati zsírszövet befolyásolása révén – közvetlen hatása lenne. A leptin és a krónikusan magas TNF α (TNFSF2) szint csontépülést gátló hatásáról vannak megfigyelések [203-205].

Mind egészséges várandósokban, mind GDM-es betegekben szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a TNF α rendszer, a leptin, a fetuin-A és az inzulinrezisztencia indirekt paraméterei között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a fetuin-A fokozódó termelése hozzájárul az inzulinérzékenység csökkenéséhez egészséges terhességben és GDM-ben.

5.2. A szérum fetuin-A koncentráció praeeclampsiában és HELLP szindrómában

Abból a megfigyelésből kiindulva, hogy a szérum fetuin-A koncentráció terhességben változik és különbség van az egészséges és az addig leírt patológiás terhesség (gesztációs diabétesz) során mért értékek között, megvizsgáltuk, hogy más terhességi kórállapotokban, így praeeclampsiában és HELLP szindrómában hogyan alakul a szérum fetuin-A koncentrációja. Mindkét kórállapot alapja a szervezet terhesség kiváltotta szisztémás gyulladásos reakciója.

A praeeclampsia az anyai és a magzati halálozás vezető oka. A közvetlen anyai halálozás 10–15%-ra tehető [235]. Kialakulását ma kétlépcsős folyamatnak tartjuk [236].

Az első lépcső lényege a kóros placentáció. Az angiogenetikus faktorok (VGEF) hiánya, anti-angiogenetikus hatású szolubilis fms-szerű tirozin kináz (sFLT-1) és a szintén anti-angiogenetikus hatású szolubilis TGF β receptor endoglin fokozott termelése, az angiogenetikus placentális növekedési faktor (PIGF) csökkent termelődése következtében zavart szenved a placentális erek kifejlődése, csökkent az anyai spirál artéria konverzió. A nem megfelelő vérellátás oxidatív stresszfolyamatokat indít el a méhlepényben. A leptin szint emelkedik, proinflammatorikus citokinek termelődnek, és szintén gyulladáskeltő tulajdonságú trophoblast-törmelék jut az anyai keringésbe. Az anyában generalizált endothel diszfunkció, szisztémás gyulladásos válaszreakció jön létre, mely beindítja a második lépcsőt, melyet vérnyomásemelkedés, ödémaképződés, proteinuria, véralvadási zavar, azaz a praeeclampsia klinikai tünetei jellemeznek. A gyulladásos folyamat elsősorban granulocitákat, monocitákat, NK sejteket foglal magában. Proinflammatorikus citokinek (TNF α , IL-1, IL-8) termelődnek, melynek eredményeképpen a gyulladásos válasz a Th1 irányba tolódik, fokozott Th17 és csökkent Treg aktivitás észlelhető [237], aktiválódik az endothel, a véralvadási és a komplement rendszer, aggregálódnak a thrombocyták [236]. Ezek mellett az angiotenzin-II 1. típusú receptora ellen irányuló, agonista hatású autoantitestek jelenlétét is kimutatták, mely hozzájárul a praeeclampsias hypertonia kialakulásához [238].

A korai kezdetű praeeclampsia a 34. hét előtt lép fel. A késői kezdetű, azaz a 34. héttől fellépő, a praeeclampsias esetek közel 80%-át teszi ki. Erre a kórformára már nem jellemző a csökkent artériás átalakulás, a méhlepény perfúziója megtartott, sőt fokozott is lehet [239]. A placentáris stressz is minimális, az sFLT-1 és a PIGF sem változik számottevően. Az anyai praeeclampsia eredete a szív-érrendszeri betegségek irányában örökölt anyai kockázattal (hypertonia, elhízás, diabétesz, dyslipidaemia, inzulinrezisztencia, autoimmun betegségek) magyarázható.

A HELLP szindróma a praeeclampsia súlyos változata, melyet microangiopathias haemolysis, emelkedett májenzim értékek és alacsony vérlemezkeszám jellemez. Patogenezisében fontos az elsősorban a májat érintő microvascularis károsodás. Az endothel sérülését thrombocyta aktiválódás és microthrombusok kialakulása, fibrin lerakódás követi, ischaemiát és hepatocelluláris nekrozist okozva. Ehhez

microangiopathiás vörösvérsejt károsodás, thrombocyta felhasználódás és károsodás társul [240]. A HELLP szindróma gyakorisága a súlyos praeclampsziások között 10–20%. Az esetek 70%-a a szülés előtt, 30%-a postpartum lép fel. Normotenzív és proteinuriától mentes személyekben is előfordul.

A fetuin-A negatív akut fázis fehérjeként viselkedik [84], részt vesz az embrionális szövetek differenciálódásában. Szöveti expressziója és szérumszintje különösen magas a magzatban, feltételezik, hogy részt vesz az embrionális szövetek fejlődésében is [46]. Vizsgálataink végzésének idején már megjelentek olyan közlemények, melyek arról számoltak be, hogy a molekula serkenti a monociták phagocyta működését [241, 242]. Ezek alapján különösen érdekesnek találtuk a szérumkoncentráció diagnosztikus pontosságának, esetleges marker jelentőségének vizsgálatát praeclampsziás betegekben és HELLP szindrómában. A fetuin-A értékeket a pozitív akut fázis fehérje CRP koncentrációjával összevetve értékeltük.

5.2.1. Vizsgált személyek és módszerek

A praeclampsziás és az egészséges várandósokat összehasonlító eset-kontrollos tanulmányban 93 praeclampsziás beteget és 127 normotenzív (szisztolés vérnyomás < 140 Hgmm, diasztolés vérnyomás < 90 Hgmm) egészséges várandós nőt vizsgálatunk. A vizsgált személyek a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján és a Kútvölgyi Klinikai Tömb Nőgyógyászati Osztályán kaptak ellátást.

A praeclampszia diagnózisát a korábban normotenziós nőkben a 20. gesztációs hét után fellépő magasvérnyomás (szisztolés érték: ≥ 140 Hgmm vagy diasztolés érték ≥ 90 Hgmm, legalább 6 órás különbséggel mérve) és proteinurina ($\geq 0,3$ g/24 h) alapján állítottuk fel. A praeclampsziás betegek vérnyomása 12 héttel a szülés után minden esetben normalizálódott.

A HELLP szindrómás betegeket összehasonlító vizsgálatban részt vevő személyek a Semmelweis Egyetem Kútvölgyi Klinikai Tömb Szülészeti-Nőgyógyászati Osztályáról és az I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról származtak. Tíz súlyos praeclampsziás és egyben HELLP szindrómás, 20 súlyos praeclampsziás, de nem HELLP szindrómás és 20 normotenziós (140/90 Hgmm alatti vérnyomású), szövődmenymentes várandós nőt vizsgáltunk. A HELLP szindrómás betegeket jelentkezésük szerint rögtön beválogattuk, és hozzájuk anyai életkorra, gesztációs időre, a terhesség előtt BMI-re illesztett személyeket választottunk ki a korábban leírt 93 praeclampsziás és 127 normotenziós csoportból.

Minden vizsgált személy kaukázusi volt. Az egészséges kontrollok a terhesség során végig normotenziósak voltak.

A HELLP szindróma diagnózisát a következő kritériumok alapján állítottuk fel: szérum glutamát-oxálacetát transzamináz (SGOT) > 70 U/l, laktát dehidrogenáz (LDH) > 600 U/l és thrombocytaszám $< 150\,000/\mu\text{l}$.

A súlyos praeclampsia diagnózisát a terhesség 20. hete után mért, legalább 6 óras időközzel legalább két alkalommal mért 160 Hgmm vagy magasabb szisztolés, vagy 110 Hgmm vagy magasabb diasztolés vérnyomás érték esetén állítottuk fel abban az esetben, ha a páciensnek korábban nem volt magas vérnyomása, vagy akkor, ha a proteinuria mértéke ≥ 5 g/24 volt [243]. Ezek a kritériumok mind a HELLP szindrómás, mind a súlyos praeclampsias csoportban teljesültek. A vérnyomás a szülést követő 3 hónap alatt normalizálódott.

A magzat növekedésbeli visszamaradását mindkét tanulmányban a gesztációs időnek és nemnek megfelelő súly alsó 10 percentilisébe eső vagy annál kisebb érték esetén állapítottuk meg [244].

Kizárási kritériumok voltak a következők: ikerterhesség, krónikus magasvérnyomás, cukorbetegség, autoimmun betegség, ér- vagy vesebetegség, anyai vagy magzati fertőzés, valamint veleszületett fejlődési rendellenességek. A vizsgált nőknél a szülés még nem indult meg, burokrepedés még nem történt.

A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével, a vizsgált személyek írásos beleegyezésével végeztük a Helsinki Deklarációnak megfelelően.

A laboratóriumi vizsgálatokat anyai vénás vérből végeztük 3000 g-n 10 percig tartó centrifugálás után. A mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk. A szérum fetuin-A-t és a CRP-t az általános részben leírtak szerint határoztuk meg.

5.2.2. Eredmények

A vizsgált személyek klinikai jellemzőit az 5.2.1. táblázat mutatja. A vizsgált két csoport nem különbözött egymástól az anyai életkor, a dohányosok és a primiparák aránya tekintetében. A praeclampsias csoportban azonban szignifikánsan magasabb BMI-t és gesztációs kort mértünk. Ebben a csoportban a szisztolés és a diasztolés vérnyomás

jelentősen magasabb, míg az újszülöttek születéskori gesztációs kora és súlya szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges várandósokban. A magzati növekedés visszamaradása csak a praeclampsziás csoportban volt megfigyelhető.

5.2.1. táblázat. Az egészséges várandósok és a praeclampsziás betegek klinikai tulajdonságai⁵

	Egészséges kontroll (n = 127)	Praeclampsia (n = 93)	p
Életkor (év)	28 (25-31)	28 (25-32)	NS
BMI (kg/m²)	26,0 (23,7-28,0)	29,4 (26,3-32,0)	< 0,001
Dohányosok	2 (1,6%)	5 (5,4%)	NS [#]
Primiparák	77 (60,6%)	59 (63,4%)	NS [§]
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	110 (105-120)	170 (160-180)	< 0,001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (60-80)	104 (100-115)	< 0,001
Gesztációs kor a vérvételkor (hét)	35 (31-37)	37 (35-39)	< 0,05
Gesztációs kor szüléskor (hét)	40 (39-40)	38 (35-39)	< 0,001
Születési súly (g)	3300 (3100-3800)	2900 (1980-3450)	< 0,001
Növekedési visszamaradás (%)	0 (0%)	21 (22,6%)	< 0,001[#]
CRP (mg/l)	3,38 (1,69-7,27)	6,71 (2,76-12,69)	< 0,001
Fetuin-A (mg/l)	744 (660-816)	660 (612-768)	< 0,001

#: Fisher-teszt, §: χ^2 teszt, ahol nem jelölve, ott Mann-Whitney teszt. Folyamatos változók medián (25%-75% percentilis) érték; BMI: testtömeg index; CRP: C-reaktív protein

Az egészséges kontrollokhoz képest a szérumban CRP koncentráció szignifikánsan magasabb, a fetuin-A szignifikánsan alacsonyabb volt a praeclampsziás betegekben. Az ANCOVA során a fetuin-A szintek között mért különbség az anyai életkorra, a BMI-re és a vérvétel idején számított gesztációs időre történt illesztés után is szignifikáns maradt: 754 ± 1 vs. 662 ± 1 mg/l (átlag $\pm$ SEM, $p < 0,001$).

A praeclampsziás betegekben belül a CRP és a fetuin-A koncentráció nem mutatott különbséget a normális és a visszamaradt magzati fejlődést mutató alcsoportok között (5.2.2. táblázat).

⁵ A szérumban fetuin-A koncentráció kivételével a táblázatban szereplő paramétereket dr. Molvarec Attila mérte. A vizsgált személyek közül 70 egészséges és 67 praeclampsziás várandós nő adatai az ő MTA doktori értekezésében szerepelnek (dr. Molvarec Attila: Angiogén és immunológiai tényezők vizsgálata praeclampsziában, MTA doktori értekezés, 2016, 13. táblázat, 66. oldal).

5.2.2. táblázat. Az anyai szérumban CRP és fetuin-A koncentráció praeclampsias betegekben normális és visszamaradt magzati fejlődés esetén

Paraméter	Visszamaradt magzati növekedés (n = 21)	Normális magzati növekedés (n = 72)	p*
CRP (mg/l)	7,30 (2,80-14,24)	6,53 (2,74-12,69)	NS
Fetuin-A (mg/l)	636 (574-720)	660 (624-780)	NS

Medián (25%-75% percentilis) érték; *Mann-Whitney teszt; CRP: C-reaktív protein

A praeclampsias betegek klinikai jellemzőinek és szérumban CRP szintjének kapcsolata a szérumban fetuin-A koncentrációval

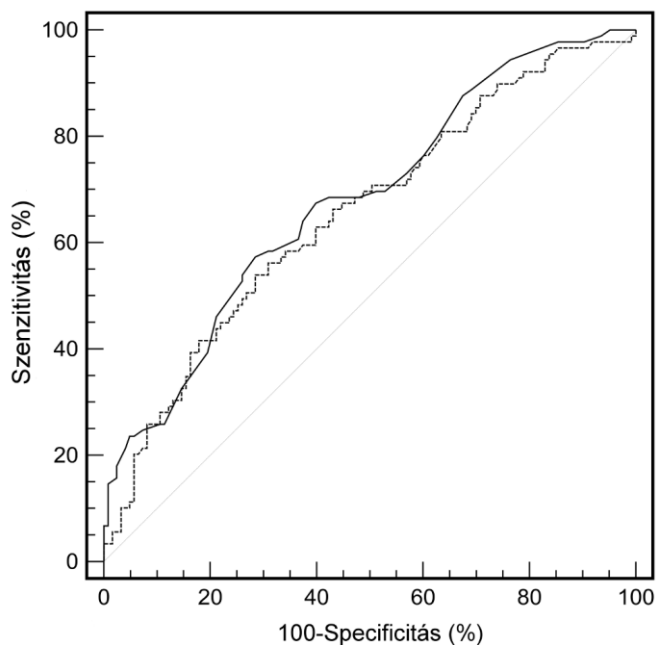
A terhességi diabetesben tett megfigyelések alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e kapcsolat a szérumban fetuin-A koncentrációk és a praeclampsias betegek klinikai jellemzői és CRP szintje között.

A praeclampsias betegekben a szérumban fetuin-A koncentráció szignifikáns negatív korrelációt mutatott a szisztolés vérnyomás értékével ($r = -0,229$, $p < 0,05$) és a szérumban CRP szinttel ($r = -0,214$, $p < 0,05$). Ugyanakkor nem találtunk összefüggést a szérumban fetuin-A koncentráció és a praeclampsias betegek klinikai jellemzői (anyai életkor, dohányzás, korábbi terhességek száma, BMI, a vérétele idején meghatározott gesztációs idő, a diasztolés vérnyomás, a szülés idején mért gesztációs idő, az újszülött születési súlya) között.

A szérumban fetuin-A koncentráció diagnosztikus pontosságának meghatározása praeclampsiasban

ROC görbe analízissel meghatároztuk azt a fetuin-A koncentráció értéket, mely a lehető legjobban tud differenciálni a normotenzív egészséges várandósok és a praeclampsias betegek között. A 720 mg/l-es fetuin-A érték 68,1%-os szenzitivitással és 60,8%-os specificitással tudott differenciálni a két csoport között. A 720 mg/l és az ez alatti koncentráció szignifikánsan gyakrabban társult praeclampsiasal (esélyhányados, OR: 3,32, 95% C.I.: 1,88–5,86, $p < 0,001$), többszörös logisztikus regressziós analízissel az anyai életkorra, a BMI-re és a vérétele idején meghatározott gesztációs időre korrigálva is (OR: 3,69, 95% C.I.: 1,82–7,51, $p < 0,001$).

A fetuin-A (AUC: 0,68, 95% C.I.: 0,61-0,74) és a CRP (AUC: 0,65, 95% C.I.: 0,58-0,72) ROC görbéinek paraméterei nem különböztek szignifikánsan egymástól ($p = 0,611$) (5.2.1. ábra).



5.2.1. ábra. A praeeclampsiás betegek és egészséges várandósok között differenciáló szérumban fetuin-A (folyamatos vonal) és a szérumban CRP (szaggatott vonal) értékek ROC görbéje

Összehasonlítottuk a szérumban CRP és fetuin-A koncentráció együttes prediktív erejét is. Önmagában emelkedett ($> 5 \text{ mg/l}$) CRP esetén az OR: 2,56 (95% C.I.: 1,46–4,51, $p = 0,001$) volt. Többszörös logisztikus regressziós analízissel az anyai életkorra, a BMI-re és a vérvétel idején meghatározott gesztációs időre korrigálva az OR: 1,15-nek (95% C.I.: 0,56–2,34) adódott ($p = 0,710$). Ha az emelkedett CRP mellé alacsony ($< 720 \text{ mg/l}$) fetuin-A társult, az OR: 3,55 (95% C.I.: 1,91–6,60) volt ($p < 0,001$). Többszörös logisztikus regressziós analízissel az anyai életkorra, a BMI-re és a vérvétel idején meghatározott gesztációs időre korrigálva a kapcsolat még mindig szignifikáns maradt: OR: 2,11 (95% C.I.: 1,01–4,42) ($p < 0,05$).

A HELLP szindrómás, a súlyos praeclampsziás és az egészséges várandós kontrollok összehasonlítása

A HELLP szindrómás, a súlyos praeclampsziás és az egészséges várandós kontrollok klinikai és laboratóriumi jellemzőit az 5.2.3. táblázat mutatja. A HELLP és a súlyos praeclampsia csoportba tartozó betegeknek a kontrollokhoz képest szignifikánsan magasabb vérnyomásértékeik voltak. A szüléskor meghatározott gesztációs idő és – részben ezért – az újszülött születési súlya szignifikánsan kisebb volt a HELLP szindrómás és a súlyos praeclampsziás csoportban. A magzat növekedési visszamaradása is gyakoribb volt ezekben a csoportokban a kontrollokhoz képest. A HELLP szindrómás betegeknek jelentősen magasabb SGOT, SGPT és LDH értékük és szignifikánsan alacsonyabb vérlemezkesszámuk volt, mint akár a súlyos praeclampsziás, akár az egészséges kontroll csoportba tartozó nőknek.

5.2.3. táblázat. A HELLP szindrómás, a súlyos praeclampsziás és az egészséges várandós kontrollok klinikai és laboratóriumi jellemzői⁶

	HELLP szindróma (n = 10)	Súlyos praeclampsia (n = 20)	Egészséges kontroll (n = 20)
Életkor (év)	27 (26-31)	27 (23-32,5)	28,5 (26-32)
BMI a terhesség előtt (kg/m ²)	23,2 (20,9-25,7)	21,5 (19,7-25,5)	22,0 (19,7-24,2)
Dohányzás	0(0%)	2(10%)	0 (0%)
Primipara	9 (90%)	12 (60%)	14 (70%)
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	179 (170-180)**	180 (170-190)**	120 (110-120)
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	115 (110-120)**	120 (110-125)**	70 (70-80)
Gesztációs idő a vérvétel idején (hét)	32,5 (29-35)	33 (30-34)	33 (30-35)
Gesztációs idő szüléskor (hét)	32,5 (30-35)**	33,5 (32,5-35)**	39 (38-40)
Újszülött születési súlya (g)	1405 (1000- 2200)**	1665 (1160- 2075)**	3475 (3100-3650)
Magzat növekedési visszamaradása (%)	5 (50%)*	10 (50%)**	0 (0%)
Thrombocyta szám (/μl)	84 (48-120)**	233 (195-285)	179 (155-221)

⁶ A szérumban fetuin-A koncentráció kivételével a táblázatban szereplő paramétereket dr. Molvarec Attila mérte. Az ő MTA doktori értekezésében 70 egészséges várandós, 67 praeclampsziás terhes adatai szerepelnek (dr. Molvarec Attila: Angiogén és immunológiai tényezők vizsgálata praeclampsziában, MTA doktori értekezés, 2016, 13. táblázat, 66. oldal.)

5.2.3. táblázat. A HELLP szindrómás, a súlyos praeclampsias és az egészséges várandós kontrollok klinikai és laboratóriumi jellemzői⁶

	HELLP szindróma (n = 10)	Súlyos praeclampsia (n = 20)	Egészséges kontroll (n = 20)
SGOT (U/l)	133 (106-202)**	17 (14-23)	20 (17-23)
SGPT (U/l)	110 (96-322)**	8 (6-15)	11 (9-16)
LDH (U/l)	839 (760-1537)**	189 (142-212)	149 (119-170)
Szérum CRP (mg/l)	43,9 (27,1-84,5)**	6,5 (2,7-10,7)*	2,5 (1,1-6,7)
Szérum fetuin-A (mg/l)	588 (492-660)*	654 (576-768)[§]	738 (666-804)

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz képest, §: $p < 0,01$ a HELLP szindróma csoporthoz képest. Folyamatos változók: medián (25%-75% percentilis) érték; HELLP: haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count szindróma; BMI: testtömeg (body mass) index; SGOT: szérum glutamát-oxalacetát transzamináz; SGPT: szérum glutamát-piruvát transzamináz; LDH: laktát dehidrogenáz; CRP: C-reaktív protein

Kruskal-Wallis tesztel a vizsgált három csoport CRP ($p < 0,001$) és fetuin-A ($p < 0,005$) értéke között szignifikáns különbségeket találtunk. A post hoc tesztekkel a CRP koncentráció szignifikánsan magasabb volt a HELLP szindrómás és a súlyos praeclampsias csoportban, mint a kontrollokban. Ezen túlmenően a HELLP szindrómás csoport CRP koncentrációja a súlyos praeclampsiasokhoz képest is magasabb volt ($p = 0,001$). A szérum fetuin-A koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt a HELLP szindrómás csoportban, mint a súlyos praeclampsiasokban ($p < 0,05$) vagy az egészséges kontrollokban ($p < 0,01$).

5.2.3. Megbeszélés

Az anyai szérum fetuin-A koncentrációt praeclampsiasban vagy HELLP szindrómában előttünk nem vizsgálták. Tudomásom szerint azóta sem jelent meg közlés a szérum fetuin-A koncentráció alakulásáról HELLP szindrómában. A fetuin-A expresszió csökkenését praeclampsiasban később mások is megfigyelték [245-247].

A praeclampsiasban talált szérum fetuin-A koncentráció csökkenésének több oka lehet. A legvalószínűbb negatív akut fázis fehérje jellegéből adódik: a proinflammatorikus citokinek gátolják átírását és szintézisét [90]. Emellett szól a CRP koncentrációval talált szignifikáns negatív korreláció is. Praeclampsiasban a zsírszövetbeli makrofágok fokozott TNF α (TNFSF2) termelődése is kimutatható [233]. Ahogy az egészséges várandósok és a GDM-es betegeknél említettük – bár a placentában is termelődik fetuin-A –, a keringő fehérje

legnagyobb részét a máj termeli, így valószínű, hogy a praeclampsziában és HELLP szindrómában észlelt alacsony koncentráció is a hepatikus szintézis csökkenéséből ered. Az ösztrogének szintén befolyásolhatják termelődését, ahogy posztmenopauzában és ösztrogénpótlás során szerzett megfigyelések bizonyítják [248]. Praeclampsziában csökkent ösztrogén szint figyelhető meg [249].

A talált eltérések további magyarázata, illetve következménye lehet, hogy a fetuin-A fokozza az apoptotikus sejtek makrofágok által történő phagocytosisát [241, 250, 251]. Az anyai keringésbe jutó trophoblast törmelék eltakarítása során így a fetuin-A koncentráció csökkenésének konzumpciós komponense is lehet. Elméletileg a vizelettel történő fokozott ürítés is szóba jön [215], de a fetuin-A szérumszint és vizeletkoncentrációja nem korrelál egymással glomeruláris, policisztás és intersticiális vesebetegségekben [252].

A szérumszintű fetuin-A koncentráció diagnosztikus értéke praeclampsziában megegyezett a CRP-ével. A vizsgálatok végzésének idején került előtérbe a fetuin-A és a testtömeg-index kapcsolata. Azóta bebizonyosodott, hogy a szérumszintű fetuin-A szint pozitívan korrelál a BMI-vel. Vizsgálatunk értékét az adja, hogy az alacsony fetuin-A szint a BMI-től is függetlenül jelezte a praeclampsziát.

A praeclampsziás betegek vizsgálata során az anyai szérumszintű fetuin-A koncentráció nem különbözött lényegesen a magzati növekedés visszamaradása és annak hiánya esetén. Ezt a megfigyelést később mások is megerősítették, sőt a magzati és az újszülöttkori fetuin-A koncentráció nem különbözött a normális és a visszamaradt főtáji növekedés esetében [47]. Ez ellentmondani látszik annak a GDM-ben levont feltételezésnek, hogy a fetuin-A negatívan szabályozná a magzati csontnövekedést. Az ellentmondás magyarázata lehet, hogy a fetuin-A másképp hat egészséges terhességben és a vizsgált, egymástól eltérő terhességi patológiájú kórképekben (GDM, praeclampsia). A koncentráción túl, a molekula poszttranszlációs modifikálásának (foszforilációjának, glikolizációjának) is szerepe lehet a csontnövekedés szabályozásában [23]. Ismert, hogy krónikus gyulladásos állapotban, így májcirrhosisban nő az akut fázis fehérjék, így a fetuin-A és az $\alpha 1$ -acid glikoprotein szénhidrát-deficiens – ConA-val nem reagáló – formájának aránya [156]. A fetuin-A szializációjának jelentős hiányossága volt megfigyelhető az intrauterin növekedés elmaradását mutató újszülöttek plazmájában [48]. Az inzulinrezisztencia a praeclampsia jól ismert kockázati tényezője [253], és ezen keresztül befolyásolni képes a magzati növekedést.

A jelen tanulmányban azt találtuk, hogy az egészséges várandósokhoz képest a szérumban a fetuin-A koncentráció csökkent praeeclampsziás betegekben, valamint negatívan korrelált a szisztolés vérnyomás és a CRP értékekkel. A szérumban a fetuin-A szint éppolyan pontossággal különítette el a két csoportot, mint a CRP. A fetuin-A expresszió csökkenését később mások is megfigyelték [245, 246, 254].

A placenta oxidatív stressznek történő kitettségére más proteomikai vizsgálatok eredményei is utalnak. Johnstone és mtsai számos fehérje (aktin, glutation S-transzferáz, peroxiredoxin 6, aldoláz-reduktáz, hsp60 és hsp70, β -tubulin, subunit proteasome, ezrin, protein diszulfid izomeráz, foszfoglicerát mutáz 1) expressziójának csökkenését észlelték cytotrophoblast sejtekben, de a fetuin-A expressziója fokozódott az egészséges kontrollokhoz képest [255]. Mások is leírták a fetuin-A fokozottabb expresszióját praeeclampsziában egészséges terhesekhez viszonyítva [256]. Gómez és mtsai vizsgálataiban a fetuin-A csökkentette a koraterhességből származó extravillózus trophoblastok életképességét és inváziós képességét, növekedési faktorok jelenlétében és hiányában egyaránt. A fetuin-A csökkentette az ILGF-fel kezelt trophoblastok IRS1 és a tirozin-foszforilált IRS1 expresszióját. A döntően afroamerikai személyekben az anyai fetuin-A szintet magasabbnak találták [257]. Az emelkedett (≥ 600 mg/l) fetuin-A gyakoribb volt a praeeclampsziás, mint a kontroll esetekben, még a cukorbetegségre, hypertoniára és az elhízásra történő igazítás után is [257].

Az ellentétes megfigyelések egyik magyarázatát adhatják Sanhal és mtsainak megfigyelései, miszerint a koraterhességben, a 34. hét előtt kialakuló praeeclampsziában az anyai vérben mérhető fetuin-A csökken az egészséges várandósokéhoz képest [258]. Az általuk meghatározott fetuin-A vágóérték (19,6 ng/ml) alatti szint csökkenése 79%-os szenzitivitással és 83%-os specificitással jelezte a 34. hét előtt kialakuló praeeclampsziát – jobban, mint a többi paraméter (anyai életkor, BMI, terhességek száma, terhesség alatti súlynövekedés, haskörfogat). A 34. héten túl jelentkező praeeclampsziás betegek fetuin-A szintjét magasabbnak találták a kontrollokénál, de a későterhességi csoportban a kontrolloknak is alacsonyabb fetuin-A szintjük volt, mint a 34. hét előttieknek [258]. A mi praeeclampsziás betegeink közül csak 19 volt korai kezdetű. A korai és késői kezdetű praeeclampszia fetuin-A szintjében nem volt szignifikáns különbség. Anyai vagy magzati fertőzés nem fordult elő, ez a mi vizsgálatunkban kizárási kritérium volt.

Nem tisztázott, hogy a praeeclampsia kialakulásának második lépcsőjében hogyan alakul a fetuin-A szintézise a májban és a méhlepényben. A pozitív akut fázis fehérje CRP-vel talált negatív korreláció mégis a szisztémás gyulladás során felszabaduló proinflammatorikus citokinek hatására utal.

Az ellentétes megfigyeléseket magyarázva az sem zárható ki, hogy az egyes mérési módszerek a fetuin-A mellett a fetuin-B-t is mérhetik. A fetuin-A és a fetuin-B aminosav sorrendjében jelentős átfedés van: 17% a konzervált és 24% a hasonló szekvencia [16]. Mások szerint az aminosav szekvencia még nagyobb: a homológia 42–46% között van [97]. Mindkét molekula szintézise fokozódik elhízásban, zsírmájban, mindkettő fokozza az inzulinrezisztenciát [259]. A fetuin-B elengedhetetlen a sikeres megtermékenyítéshez [260], a fetuin-A-nak nincs ilyen tulajdonsága. A fetuin-B a fetuin-A-hoz hasonlóan nem csak a májban, hanem a placentában is termelődik [50], a terhesség előrehaladtával koncentrációja valószínűleg növekszik, de hosszsmetszeti vizsgálatról nincs közlés. Az eclampsiában megfigyelt fetuin-A szint emelkedéséről beszámoló közleményekben nem szerepel, hogy a használt mérési módszerek, így Gomez [257] vagy Park [256] ELISA kitje (BioVendor LLC, Candler, NC, USA, ill. BioVendor, Heidelberg, Németország) keresztreagál-e fetuin-B-vel.

Az alacsony szérumszintű fetuin-A koncentráció a praeeclampsiának nem csak markere lehet, hanem szerepe lehet a betegség kifejlődésében is, mivel fő feladata a magzat védelme TNF α (TNFSF2) ellen [94]. Emellett a fetuin-A gátolja a lágyszövetek kalcifikációját [81]. Az érfal meszesedésével járó fokozott falmerevség praeeclampsiában is kimutatható [261].

Alacsony szérumszint esetén a fetuin-A antiinflammatorikus tulajdonságai is kevésbé érvényesülnek: a fetuin-A gátolja a perifériás vér lymphocytáinak IL-2 termelését [128], opszoninként szükséges a makrofág deaktiváláshoz *in vitro* [262], gátolja a TNF α (TNFSF2) termelést [263] és fokozza az apoptotikus sejtek phagocytosisát [250].

A fetuin-A koncentráció prognosztikai jelentőségének ellentmondani látszik az a vizsgálat, melyben 200 várandós nő fetuin-A szintjét követték [254]. Közülük 40 esetben alakult ki praeeclampsia. A praeeclampsiás betegek fetuin-A szintjét itt is alacsonyabbnak találták. Ugyanakkor nem találtak szignifikáns különbséget a diagnózis felállítását megelőző időszakban a pre-term praeeclampsiában és az egészséges terhességben mért fetuin-A szint

között [254], ami arra enged következtetni, hogy a fetuin-A prognosztikai szerepe valószínűleg alacsony⁷.

A HELLP szindrómás betegek vizsgálatakor a normotenzív egészséges várandósokhoz képest a CRP koncentráció emelkedését és a fetuin-A szint csökkenését találtuk. Az ebben a kórképben mért alacsonyabb fetuin-A és magasabb CRP értékek a HELLP szindróma nélküli praeeclampsiahoz képest sokkal intenzívebb gyulladásos reakcióra utalnak. Valószínűleg a kis esetszámmal magyarázható, hogy bár a súlyos praeeclampsias betegek szérum fetuin-A szintje alacsonyabb volt, mint az egészségeseké, a különbség mégsem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

Régóta ismert, hogy a szérum CRP szint magasabb praeeclampsiában és HELLP szindrómában az egészséges terhességhez képest [266], és szintje pozitívan korrelál a praeeclampsia súlyosságával [267]. Bár korábban vitatták [268], a CRP mégis hasznosnak bizonyult a praeeclampsia előrejelzésében [269-272].

Összefoglalva, a vizsgált terhességi kórképekben talált CRP emelkedés és fetuin-A szint csökkenés a szisztémás gyulladással magyarázható.

⁷ Mai ismereteink szerint a plazma sFLT1/PIGF (szolubilis Fms – vascularis endothelialis growth factor-1-szerű tirozin kináz 1/placentáris növekedési faktor) arány a praeeclampsia jelenlegi legjobb prediktora, mely a korai preeclampsziát 89%-os szenzitivitással és 97% specifitással, a jelzi előre. A késői preeclampsziában ezek az értékek 74% és 89% [264, 265].

6. A szérum fetuin-A koncentráció vizsgálata szívinfarktust túlélő betegekben

6.1. A szérum fetuin-A koncentráció anyagcsere és gyulladásos paraméterekkel való kapcsolatának vizsgálata szívinfarktust túlélő betegekben

Vizsgálatainkat megelőzően több tanulmányban is kimutatták, hogy a fetuin-A koncentráció pozitívan korrelál az érlemezés mértékével [273-276], valamint a szívinfarktus és a stroke megjelenésével [95]. Néhány vizsgálat pedig ellentétes eredménnyel zárult, azaz a fetuin-A csökkenése fokozott artériás érfalmerevséggel [277], atheroscleroticus plakk kalcifikációval [278, 279] és cukorbetegben perifériás érbetegséggel [280] társult.

Az adiponektin a fehér zsírszövet által termelt 247 aminosavból álló fehérje. Fokozza a perifériás szövetek inzulinérzékenységét, csökkenti a T2DM kialakulásának kockázatát [281, 282]. Koncentrációja csökken elhízásban, inzulinrezisztenciával járó állapotokban és T2DM-ben [282]. Az adiponektin serkenti a zsírsavak β -oxidációját. Szintjének csökkenése emelkedett LDL és oxidizált LDL koncentrációval, csökkent HDL koleszterin szinttel jár [283]. Az emelkedett adiponektin szint csökkenti a CRP termelést, gátolja a proinflammatorikus $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) hatását [284]. Mindezek alapján gyulladásellenes, anti-atherogén hatású.

A ghrelin legnagyobb részben a gyomorban termelődő, 28 aminosavból álló peptid, mely acetilált formájában aktív. A ghrelin aktív növekedési hormont felszabadító peptid, a növekedési hormon szekretagóg receptor endogén ligandja. Növekedési hormont felszabadító és orexigén hatását az agyban specifikus receptorokhoz kötődve fejt ki. Számos folyamatban, így az energiaegyensúly, a testsúly fenntartásában, a cukor- és a zsíranyagcsere szabályozásában vesz részt. Étkezés, glukózfogyasztás csökkenti a ghrelin koncentrációt [285], akárcsak az inzulin infúzió [286]. Az inzulin receptor jelátvitel és az inzulinszekréció befolyásolásán keresztül a ghrelinnek hatása van a glukóz-homeosztázisra. Gátolja az inzulinszekréciót [287]. E két hormon, a ghrelin és az inzulin kölcsönösen gátolja egymást, plazmaszintjük is negatívan korrelál egymással.

A ghrelin kardiovaszkuláris protektív hatással is rendelkezik. Tágítja az artériákat, ezáltal csökkenti a vérnyomást és a szív utóterhelését. Csökkenti az intersticiális fibrózist, védi a

szívizomsejteket az apoptózistól. A ghrelin csökkenti a szimpatikus idegrendszer működését, alacsonyabb szívfrekvenciát, csökkent értónust és noradrenalin szintet eredményezve [288, 289].

A leptin 167 aminosav hosszúságú, a hosszú láncú helikális citokinek közé tartozó fehérje [290]. Döntően a fehér zsírszövetben képződik, de a trophoblastok és az amnionsejtek is termelik. Szerepe van a táplálékfelvételben, az energiafogyasztásban és az energiaegyensúly kialakításában. Plazmaszintjét a zsírszövet mennyisége határozza meg, ezzel arányos, és az energiamérleg szerint változik: elhízott emberekben magasabb. A leptin expressziója és szekréciója szorosan korrelál a BMI mértékével és a zsírsejtek nagyságával. Hosszú távon szabályozza a testtömeget. A leptin a zsírraktárak állapotáról közvetít a hypothalamusba, ezáltal jelentős szerepe van az energia homeosztázis folyamatában. A neuropeptid Y és más orexigén rendszer gátlása révén csökkenti az étvágyat, fokozza az opiomelanocortin termelést és gátolja a ghrelin felszabadulását a gyomorban [291]. A periférián a hasnyálmirigy szigetsejtjeihez kötődve a leptin gátolja az inzulinszekréciót [292]. Az elhízás, az inzulinrezisztencia és a T2DM markere [293]. A leptin szint pozitívan korrelál a trigliceridekével, a lipoprotein(a)-val, az ApoA1-gyel és a glukózzal, és negatív korrelációban van a HDL-koleszterinnel T2DM betegekben. Ugyanakkor fokozza a proinflammatorikus IL-6 és CRP termelését [293].

Az emelkedett leptin szint fokozza a szív-érrendszeri betegségek (szívinfarktus, szívelégtelenség, stroke, bal kamra hypertrophia) kockázatát [294-297], melyért a szívizomban lévő leptinreceptorok lehetnek felelősek [298].

A rezisztin 108 aminosavból álló, 12,5 kD molekulatömegű fehérje, mely nevét egérmodellben inzulinrezisztenciát okozó hatásáról kapta, de a humán rezisztin is inzulinrezisztenciát indukál [299]. A rezisztin szint emelkedett elhízott [300] és T2DM-es személyekben, szintje pozitívan korrelál a BMI-vel, az inzulinrezisztenciával, a HOMA-IR értékével, az össz-koleszterin, triglicerid, leptin szinttel és negatívan korrelál a HDL és az adiponektin koncentrációval [301].

A rezisztin gyulladásos folyamatokban betöltött szerepe is igazolt. Fokozza a leukocytatorzás és a kemotaxis folyamatában részt vevő érsejt (vascular cell) adhézións molekula-1 (VCAM-1), az intercelluláris adhézións molekula-1 (ICAM-1) és a kemokin ligand 2 expresszióját [302]. A fehérvérsejt proliferációt befolyásoló mikrobiális lipopoliszacharid (LPS) és az interleukin típusú citokinek szintén hatással vannak a rezisztin szintre [303].

Az adhéziós molekulák mellett a gyulladásos citokinek expressziójának fokozása révén endothel diszfunkciót okoz és hozzájárul az atherosclerosis kialakulásához; a szívinfarktus kockázati tényezőjének is tartják [302, 304, 305].

Eredményeink publikálását megelőzően kevés tanulmány foglalkozott a fetuin-A és a fent említett adipokinek koncentrációja közötti kapcsolattal. Negatív korrelációt írtak le a fetuin-A és az adiponektin szint között koronáriabetegekből [306] és nagy kockázatú, de nem érbeteg személyekben [229]. A fetuin-A és az adiponektin génje egymás mellett helyezkedik el a 3. kromoszóma T2DM és metabolikus szindróma fogékonysági régiójában [108, 109]. A fetuin-A és a leptin szint között pozitív korrelációt írtak le látszólag egészséges populációban, de nem posztinfarktusos betegekben [307]. A fetuin-A és a rezisztin koncentráció közötti kapcsolatot előttünk nem vizsgálták.

Célul tűztük ki a szérumban fetuin-A koncentráció vizsgálatát szívinfarktust túlélő betegekben. A fent leírt, az érlemezés kialakulása során talált ellentmondások kiküszöbölése céljából választottuk az atherosclerosis kemény végpontjának számító szívinfarktust túlélő betegeket.

Először is szeretnénk tudni, hogy a fetuin-A koncentráció hogyan változik posztinfarktusos betegekben. Másodszor, választ kívántunk kapni arra a kérdésre, hogy a fetuin-A metabolikus hatása vagy a gyulladásban betöltött szerepe dominál-e a koronáriszklerózis kialakulásában. Ezért vizsgáltuk a fetuin-A és egyes adipokinek (adiponektin, leptin, rezisztin) és a pozitív akut fázis fehérje CRP, valamint a TNF α (TNFSF2) proinflammatorikus citokin szint közötti kapcsolatot.

6.1.1. Betegek és módszerek

A vizsgálatban részt vevő személyeket és az alkalmazott laboratóriumi módszereket az általános metodikai részben írtuk le. A fetuin-A szintet RID-val, a CRP-t particle-enhanced nefelometriával határoztuk meg.

6.1.2. Eredmények

A betegek adatait a 6.1.1. táblázat mutatja. A posztinfarktusos betegek kövérebbek voltak az egészséges kontrollokhoz képest, szérumban össz-koleszterin és triglicerid koncentrációjuk is magasabb, HDL-koleszterin szintjük alacsonyabb volt, de egyik lipid paraméter sem korrelált szignifikánsan a fetuin-A értékekkel (6.1.2. táblázat). A szérumban adiponektin és

ghrelin alacsonyabb, a leptin, rezisztin, CRP és TNF α (TNFSF2) szint magasabb volt a kontrollokéhoz képest.

6.1.1. táblázat. A posztinfarktusos betegek és az egészséges kontroll személyek klinikai adatai (átlag $\pm$ SD)

Paraméter	Kontroll	Posztinfarktusos beteg	p [#]
N (férfi / nő)	81 (46 / 35)	171 (120 / 51)	0,036 [§]
Életkor (év)	60 $\pm$ 7	62 $\pm$ 6	0,800
BMI (kg/m ²)	22,4 $\pm$ 2,4	28,0 $\pm$ 4,1	< 0,001 (5,26*10 ⁻²⁴)
Diabétesz (nincs / van)	0 / 81	118 / 53	-
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,0 $\pm$ 1,1	5,29 $\pm$ 1,2	0,030
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,44 $\pm$ 0,46	1,21 $\pm$ 0,28	0,037
Triglicerid (mmol/l)	1,40 $\pm$ 0,6	1,85 $\pm$ 0,98	0,012
Glukóz (mmol/l)	4,5 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 1,6	< 0,001 (1,59*10 ⁻¹⁵)
Inzulin	5,21 $\pm$ 1,12	23,73 $\pm$ 15,53	< 0,001 (7,81*10 ⁻²⁹)
Adiponektin (μ g/ml)	12,77 $\pm$ 3,15	9,04 $\pm$ 4,31	< 0,001 (7,75*10 ⁻¹²)
Leptin (ng/ml)	12,17 $\pm$ 9,16	31,89 $\pm$ 18,36	< 0,001 (1,27*10 ⁻¹¹)
Rezisztin (ng/ml)	6,40 $\pm$ 2,66	9,70 $\pm$ 6,49	< 0,001 (9,9*10 ⁻⁵)
CRP (mg/l)	1,95 $\pm$ 1,43	4,04 $\pm$ 3,98	< 0,001 (5,76*10 ⁻¹¹)
Ghrelin (pg/ml)	338 $\pm$ 31	241 $\pm$ 59	< 0,001 (6,80*10 ⁻²⁵)
TNF α (pg/ml)	4,07 $\pm$ 0,24	6,13 $\pm$ 1,77	< 0,001 (4,34*10 ⁻²⁴)

#: Mann-Whitney teszt; §: χ^2 teszt; BMI: testtömeg index; HDL: high density cholesterolin; CRP: C-reaktív protein; TNF α : tumor nekrozis faktor- α (TNFSF2)

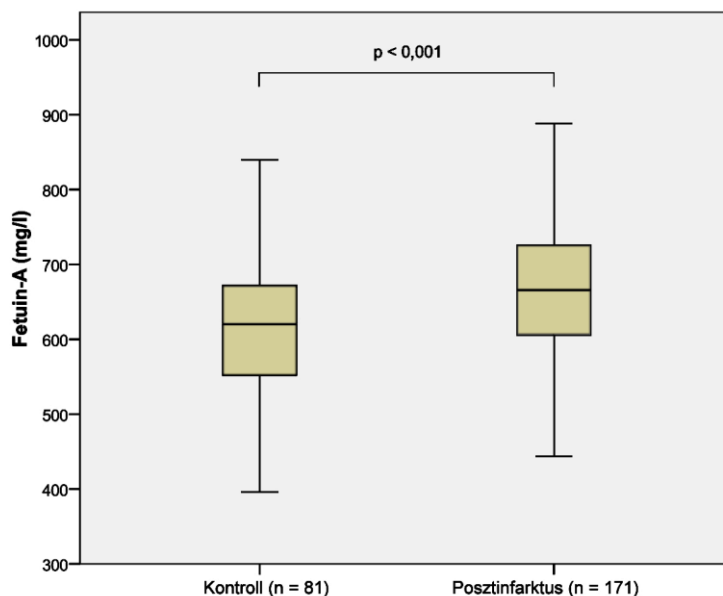
6.1.2. táblázat. A szérumban fetuin-A koncentráció és a vizsgált laboratóriumi paraméterek közötti korreláció posztinfarktusos betegekben (n = 171)

Paraméter	r [#]	p
BMI	0,342	0,035
Össz-koleszterin	-0,105	0,206
HDL-koleszterin	-0,064	0,402
Triglicerid	-0,006	0,940
Adiponektin	-0,236	0,006
Leptin	0,321	0,021
Rezisztin	0,290	0,710
CRP	-0,202	0,169
TNF α	0,017	0,822
Ghrelin	-0,111	0,150

#: Spearman-féle rank korreláció; BMI: testtömeg index; HDL: high density cholesterolin; CRP: C-reaktív protein; TNF α : tumor nekrozis faktor- α (TNFSF2)

Szérum fetuin-A koncentráció szívinfarktust túlélte betegekben

A szérum fetuin-A koncentráció szignifikánsan magasabb volt a posztinfarktusos betegekben az egészséges kontrollokhoz képest (6.1.1. ábra.).



6.1.1. ábra. Szérum fetuin-A koncentráció szívinfarktust túlélte betegekben és egészséges kontrollokban. Átlag $\pm$ SD, tartomány, Mann-Whitney $p = 4,5 \cdot 10^{-5}$.

A posztinfarktusos betegek közül 49 volt kövér ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) és 53 volt cukorbeteg (2 kivételével mind T2DM). A kontroll csoportban mindenkinek 25 kg/m^2 vagy ez alatti volt a BMI-je és senki nem volt cukorbeteg. A posztinfarktusos csoportban a kövér betegeknek enyhén magasabb fetuin-A szintjük volt, mint a nem kövéreknek ($686 \pm 102 \text{ mg/l}$, $n = 49$, vs. $668 \pm 104 \text{ mg/l}$, $n = 122$, $p = 0,109$). A fetuin-A szint pozitívan korrelált a BMI-vel (6.1.2. táblázat). A diabéteszes betegek fetuin-A átlaga minimálisan nagyobb volt, mint a nem diabéteszeseké, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ($680 \pm 108 \text{ mg/l}$, $n = 53$ vs. $670 \pm 101 \text{ mg/l}$, $n = 118$, $p = 0,371$).

Mivel az elhízás és a cukorbetegség egyaránt emelkedett fetuin-A szinttel jár, látni akartuk, hogy a nem kövér ($\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$), nem diabéteszes posztinfarktusos betegek fetuin-A szintje hogyan viszonylik az életkorban is illesztett, egészséges kontrollokéhoz. Az így szelektált posztinfarktusos betegeknek is szignifikánsan magasabb volt a szérum fetuin-A

koncentrációja (667 ± 101 mg/l, $n = 88$) az egészséges kontrollokhöz (619 ± 96 mg/l) képest ($p = 0,002$).

A fetuin-A, valamint az adiponektin, leptin, TNF α (TNFSF2) és rezisztin szint kapcsolata

A posztinfarktusos betegeknek szignifikánsan alacsonyabb adiponektin koncentrációjuk volt az egészséges kontrollokhöz képest (6.1.1. táblázat). A fetuin-A értékek negatívan korreláltak az adiponektin szinttel (6.1.2. táblázat). Mivel a fetuin-A is korrelált a BMI-vel, parciális korrelációs számítást végeztünk az elhízásnak a fetuin-A és az adiponektin kapcsolatára gyakorolt hatásának mérésére. A fetuin-A és az adiponektin közötti korreláció a BMI-re történő igazítás után is szignifikáns maradt ($r = -0,177$, $p = 0,043$). A többszörös lineáris regressziós analízis során a fetuin-A és a BMI egymástól függetlenül határozta meg a szérumban adiponektin szintet (6.1.3. táblázat, A).

6.1.3. táblázat. Az adiponektin szintet meghatározó tényezők analízise többszörös lineáris regressziós modellben posztinfarktusos betegekben

A. A szérumban adiponektin szint meghatározói		
Változó	Becslés $\pm$ SE	p
BMI	$-0,131 \pm 0,084$	0,001
Életkor	$0,027 \pm 0,053$	0,607
Fetuin-A	$-0,094 \pm 0,021$	0,014
Leptin	$-0,046 \pm 0,048$	0,348
Rezisztin	$-0,056 \pm 0,056$	0,317
TNF α	$-0,041 \pm 0,023$	0,335
Modell illeszkedése: $r^2 = 0,203$, $p < 0,001$		
B. A szérumban TNFα szint meghatározói		
Változó	Becslés $\pm$ SE	p
BMI	$0,087 \pm 0,031$	0,005
Életkor	$0,023 \pm 0,022$	0,282
Fetuin-A	$0,001 \pm 0,001$	0,870
Leptin	$-0,008 \pm 0,010$	0,432
Rezisztin	$0,110 \pm 0,019$	< 0,001
Adiponektin	$0,023 \pm 0,029$	0,434
Modell illeszkedése: $r^2 = 0,227$, $p < 0,001$		

BMI: testtömeg index, TNF α : tumor nekrosis faktor- α (TNFSF2)

A szérumban a leptin szintje magasabb volt a posztinfarktusos betegekben, és pozitívan korrelált a BMI-vel ($r = 0,265$, $p = 0,022$). A fetuin-A szintje pozitívan korrelált a leptin szinttel (6.1.2. táblázat). A BMI-re történő korrekció után azonban a fetuin-A és a leptin közötti kapcsolat már nem volt szignifikáns ($r = 0,209$, $p = 0,072$). Bár a CRP is emelkedett volt a szívinfarktust túlélő betegekben (6.2.1. táblázat), szintje nem korrelált szignifikánsan a fetuin-A értékekkel (6.1.2. táblázat).

A posztinfarktusos betegek szérumban a TNF α (TNFSF2) értéke is magasabb volt a kontrollokéhoz képest (6.1.1. táblázat). Az obese betegeknek szintén nagyobb TNF α szintjük volt a nem obesekhoz viszonyítva ($6,69 \pm 1,77$, $n = 49$ vs. $5,91 \pm 1,72$ pg/ml, $n = 122$, $p = 0,009$). A fetuin-A és a TNF α (TNFSF2) szint között ugyanakkor nem volt szignifikáns kapcsolat megfigyelhető (6.1.2. táblázat). A normális tartományban lévő TNF α (TNFSF2) szintű (≤ 4 pg/ml, a kontrollok átlaga) betegek fetuin-A szintje nem különbözött az ennél magasabb TNF α (TNFSF2) szinttel bíró betegektől (652 ± 132 pg/ml, $n = 6$ vs. 674 ± 102 $n = 165$, $p = 0,659$).

A szérumban a rezisztin koncentráció szintje magasabb volt a posztinfarktusos betegekben, mint a kontrollokban, de az értékek nem korreláltak a fetuin-A értékekkel (6.1.1. és 6.1.2. táblázat). A rezisztin ugyanakkor jól korrelált a TNF α -val (TNFSF2) ($r = 0,279$, $p < 0,001$), még a BMI-re történő korrekció után is ($r = 0,381$, $p = 0,003$). A többváltozós elemzés során a BMI és a rezisztin, de nem a fetuin-A határozta meg a TNF α (TNFSF2) szintet (6.1.2. táblázat, B). A mi vizsgálatainkban a fetuin-A és más adipokinek koncentrációja nem különbözött a metformint és/vagy aspirint szedő betegek között.

6.1.3. Megbeszélés

Az egészséges kontrollokhoz képest magasabb fetuin-A szintet találtunk szívinfarktust túlélő betegekben. Az emelkedett fetuin-A-t kapcsolatba hozták a megnövekedett intima-média vastagsággal, az artériás érfalmerevséggel és kalcifikációjával [273-276]. A fetuin-A csökkenése krónikus veseelégtelenségben egyértelműen összefügg az érlemezéssel és a kalcifikációval, azonban az eredmények nem egyértelműek megtartott vesefunkció esetén [277-280].

A fetuin-A koncentráció emelkedése és a pro-atheroscleroticus állapot összefüggése jól ismert. A fetuin-A az IRTK természetes antagonistája és szerepet játszik az inzulinrezisztencia kialakulásában [2, 308]. Magasabb szintet figyeltek meg elhízásban,

metabolikus szindrómában, T2DM-ben, nem alkoholos zsírmájban, ischaemiás stroke-ban és szívinfarktusbán [95, 117, 119, 308-310].

Egy vizsgálatban az elhízott betegeknek magasabb fetuin-A szintjük volt, mint a nem elhízottaknak, a normál glukóztoleranciájú, de elhízottak személyek fetuin-A szintje is magasabb volt, mint a normál testtömegű egészséges személyeké, így nem meglepő, hogy a legmagasabb fetuin-A szintet a kövér T2DM-es betegekben mérték [311]. Mások vizsgálatában csak az elhízás és az inzulinrezisztencia kialakulásának kezdeti szakaszát kísérte a fetuin-A szint szignifikáns emelkedése, de a további emelkedést és a T2DM kialakulását már nem [312].

Az egészséges kontrollok, valamint a nem kövér és nem diabéteszes posztinfarktusos betegek fetuin-A szintje közötti különbség kifejezettebb volt, mint a betegek közötti eltérés. Ez egybeesik Weikert és mtsai megfigyelésével, akik azt találták, hogy az emelkedett fetuin-A koncentráció és a szív-érrendszeri kockázat közötti kapcsolat függetlennek mutatkozott a cukorbetegség meglététől [95]. Így a fetuin-A az inzulinrezisztenciától független mechanizmussal is elősegítheti az atherosclerosis kialakulását. Emellett szól, hogy a szabad zsírsavak fokozzák az ahs gén expresszióját [40]. A fetuin-A gátolja az adipociták szabad zsírsavfelvételét és -tárolását [40], valamint csökkenti az adiponektin kifejeződését [229]. Az anti-atherogén hatású adiponektin fokozza a szabad zsírsavak oxidációját, így a szabad zsírsavak emelkedett szintje indirekt módon tovább növeli a fetuin-A expresszióját, circulus vitiosus fokozza az atherosclerosis. A fetuin-A és az adiponektin koncentráció negatívan korrelált egymással mind nagy kardiovaszkuláris kockázatú személyekben [229], mind pedig stabil koronáriabetegekben [306], mind az általunk vizsgált, szívinfarktust túlélő páciensekben. Ezen túlmenően a mi eredményeink alapján a fetuin-A az adiponektin szint független meghatározójának bizonyult. Amennyire keresztmetszeti vizsgálatunkból megítélhető, a fetuin-A az adiponektin szabályozásán keresztül is befolyásolja az atherosclerosis progresszióját.

A szérumban leptin koncentráció szintén emelkedett volt a kontrollokhöz képest. Akárcsak Ishibashi és mtsai egy évvel előttünk [307], mi is azt találtuk, hogy a leptin szint pozitívan korrelált a fetuin-A-val, de a leptin szintnek nem volt hatása az adiponektin vagy a TNF α (TNFSF2) koncentrációra.

A CRP és a TNF α szint magasabb volt a posztinfarktusos betegekben a kontrollokhöz képest, de egyik sem korrelált szignifikánsan a fetuin-A koncentrációval. A TNF α

(TNFSF2) szintézise mind az akut fázis reakció, mint a zsírsejt diszfunkció következtében fokozódik, azonban a fetuin-A szint viselkedése eltér ebben a két esetben. Az akut fázis reakció során a megemelkedett CRP és TNF α (TNFSF2) szint csökkent fetuin-A koncentrációval társul [84, 90]. Ugyanakkor a mi eredményeinkkel egybehangzóan számos tanulmányban magasabb fetuin-A szintet találtak atheroscleroticus betegségekben [273-276]. Hennige és mtsai tisztított fetuin-A-t adva humán monocita THP1 sejtekhez a TNF α és az IL-1 β mRNS expresszió növekedését figyelték meg, emellett a patkány zsírszövet TNF α (TNFSF2) expressziója 27-szeresére, IL-6 expressziója 174-szeresére fokozódott [229]. Az adiponektin expresszió mindkét modellben jelentősen csökkent. Vizsgálatainkban a fetuin-A koncentráció pozitívan korrelált a CRP-vel, mely egyben a szubklinikus gyulladás markere is [229]. Mi a CRP, a TNF α (TNFSF2) és a fetuin-A szint között nem találtunk statisztikailag szignifikáns korrelációt, ami arra utal, hogy a fetuin-A elsősorban nem a gyulladásos paramétereken keresztül hat az atherosclerosis kialakulására.

A rezisztin szerepet játszik mind az inzulinrezisztencia, mind az atherosclerosis kialakulásában [313]. A korábbi vizsgálatok eredményeivel együtt mi is emelkedett rezisztin szintet találtunk posztinfarktusos betegekben [314, 315]. A szérum rezisztin és a fetuin-A koncentráció kapcsolatát előttünk még nem vizsgálták. A rezisztin szint nem korrelált sem a fetuin-A-val, sem egyéb adipokinekkal, de modellünkben a szérum TNF α (TNFSF2) szint független prediktorának bizonyult, bizonyítva szerepét a szubklinikus gyulladásban és a kardiovaszkuláris betegségek létrejöttében. Cukorbetegségben (T2DM) végzett vizsgálatokban a 12 hetes aerob testmozgás szignifikánsan csökkentette mind a fetuin-A, mind a rezisztin szintet, de a két paraméter itt sem korrelált egymással [316]. Mindez arra utal, hogy részben más tényezők szabályozzák a szintézisüket, ahogy ezt később a posztinfarktusos betegeket és a referencia személyeket elkülönítő paraméterek determináns analízise során mi is észleltük.

Bár a fetuin-A és az atherogén lipid profil kapcsolatát többen leírták, mi ilyet nem találtunk. Ennek oka részben a relatíve kis esetszám, részben pedig az lehet, hogy a klinikai ajánlásoknak megfelelően a betegek 65%-a lipidcsökkentő kezelést kapott. A sztatinok fetuin-A szintet befolyásoló hatásáról ellentétes megfigyelések vannak. Két tanulmány 6 hónapos szimvasztatin kezelés fetuin-A szintet csökkentő hatásáról számolt be [317, 318], míg mások [319] és mi sem észleltünk szignifikáns különbséget a sztatin szedők és nem szedők között. A betegek legtöbbje emellett ACE-inhibitorokat, β -blokkolókat és kis dózísú aszpirint szedett. Bár nincs adat arra, hogy ez utóbbi szerek befolyásolnák a fetuin-A

szintet, mindegyik csökkenti a $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) szintet [320, 321]. A cukorbeteg legtöbbje metformint kapott, melyről egyesek leírták, hogy csökkenti a fetuin-A expresszióját és szérumkoncentrációját [222], míg mások nem találtak változást [322-324].

Összefoglalva, ezek az adatok mellett szólnak, hogy a szívinfarktust túlélő, megtartott vesefunkciójú betegek szérum fetuin-A koncentrációja emelkedett, melynek szerepe van az érlemezés kialakulásában. A fetuin-A szint emelkedése nem magyarázható pusztán az elhízással és a cukorbetegséggel. A gyulladásos paraméterekkel (CRP, $\text{TNF}\alpha$) való kapcsolat hiánya és az adiponektinnel való független kapcsolat mellett szól, hogy a fetuin-A inkább a metabolikus (inzulinrezisztencia, elhízás, zsírsejt diszfunkció), semmint a gyulladásos mechanizmussal vesz részt az atherosclerosis folyamatában ebben a betegcsoportban.

6.2. A posztinfarktusos betegeket és a referencia személyeket elkülönítő paraméterek vizsgálata

Ebben a vizsgálatsorozatban arra kerestünk választ, hogy a feljebb meghatározott laboratóriumi paraméterek közül melyek azok, amelyek a leginkább elkülönítik egymástól a referencia személyeket és a posztinfarktusos betegeket. Bár statisztikailag az összes vizsgált citokin esetében erősen szignifikáns különbséget figyeltünk meg a kontrollok és a posztinfarktusos betegek között, a legmarkánsabb eltérést az inzulin, a $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) és a ghrelin esetében kaptuk (6.1.1. táblázat).

A myocardialis infarktus akut szakában a ghrelin szint 2-3-szorosára emelkedik. Az emelkedésnek 14 nap után szerepe lehet a kardiális remodelling gátlásában [325]. Hat hónap után a ghrelin a kiindulási értékre csökken. Állatkísérletben az exogén ghrelin adása mérsékelte a szív korai remodellingjét kísérletes infarktus után [326].

A ghrelin és az atherosclerosis kapcsolatát vizsgáló eredményeink publikálásáig megjelent tanulmányokban mind csökkent [327-330], mind emelkedett [331, 332] szintről születtek közlemények. Ezirányú vizsgálataink előtt a ghrelin és annak szintjét meghatározó molekulák közötti kapcsolatot nem vizsgálták atherosclerosisban. A cukorbetegség és a szív-érrendszeri betegségek közötti kapcsolat közismert. Az acetilált ghrelin gátolja az inzulinszekréciót, ezáltal az emelkedett ghrelin szint még egészségesekben is rontja az

inzulinválaszt [333]. Vizsgálataink idején kevés adat állt rendelkezésre a ghrelin és az adipokinek közötti kapcsolatáról. Premenopauzában lévő, normál testtömegű nőkben a leptin és a ghrelin vérszintje között pozitív korrelációt találtak [334], de elhízott egyénekben már nem volt kapcsolat kimutatható a két molekula között [334, 335]. Mások nem találtak korrelációt a ghrelin és a leptin szint között peritoneális dialízisben részesülő betegekben [336]. Megint mások normoinzulinémiás nem elhízottakban és obezekben a ghrelin és a leptin között negatív interakciót figyeltek meg [337]. A ghrelinnek az atherosclerosist jellemző szubklinikus gyulladásban betöltött szerepét szintén felvetették. A ghrelin és TNF α (TNFSF2) szint kapcsolatát is vizsgálták állatokban és in vitro [338], de klinikai körülmények között nem.

Vizsgálatainkban választ kívántunk kapni arra, hogy 1) milyen irányban változik a szérumban ghrelin koncentráció szívinfarktust túlélő betegekben, 2) mely paraméterek határozhatják meg a ghrelin szintet. Ez utóbbi vizsgálatára a ghrelin és az anyagcsere és gyulladás különböző aspektusait jellemző molekulákkal való kapcsolatot vizsgáltuk determináns analízis segítségével. Az analízis során meghatározott aspektusok (domének) a következők voltak:

1. inzulin (szénhidrát anyagcsere),
2. leptin (energia-egyensúly),
3. adiponektin és fetuin-A (zsírmáj, szénhidrát és lipid anyagcsere),
4. TNF α (TNFSF2) és rezisztin (gyulladás).

6.2.1. Eredmények

A szérumban ghrelin koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt posztinfarktusos betegekben az egészséges kontrollokhöz képest (6.1.1. táblázat). Ez a különbség megmaradt akkor is, amikor a nem diabéteszes, nem elhízott posztinfarktusos betegeket hasonlítottuk a kontrollokhöz (241 ± 54 pg/ml, $n = 88$ vs. 338 ± 31 pg/ml, $n = 81$, $p < 0,001$). A diabéteszes betegeknek magasabb inzulinszintjük volt a nem-diabéteszesekhez képest ($28,3 \pm 16,3$ μ U/ml, $n = 53$ vs. $21,7 \pm 14,8$ μ U/ml, $n = 118$, $p = 0,008$), de ghrelin szintjük nem különbözött lényegesen egymástól (231 ± 53 pg/ml vs. 245 ± 62 pg/ml, $p = 0,154$).

A szérumban a ghrelin koncentráció kapcsolata az éhomi glukóz, inzulin, adiponektin, rezisztin, fetuin-A és TNF α (TNFSF2) szinttel

Az egyváltozós elemzés során a ghrelin nem gyakorolt hatást az éhomi vércukorszintre ($r^2 = 0,003$, $\beta = 0,057$, $p = 0,459$). A ghrelin és az inzulin szint közötti korreláció mutatkozott a legerősebbnek, még a nemre és a BMI-re történő illesztés után is (6.2.1. táblázat). A diabéteszes betegekben ugyanakkor nem találtunk korrelációt a ghrelin és az inzulin szinttel. A ghrelin és az adiponektin közötti korreláció gyengült, míg a ghrelin és a rezisztin közötti szignifikancia eltűnt a nemre és a BMI-re történő igazítás után. A ghrelin szint nem korrelált szignifikánsan a fetuin-A, leptin, TNF α (TNFSF2) vagy lipid szinttel.

6.2.1. táblázat. A szérumban a ghrelin és a vizsgált citokinek közötti korreláció posztinfarktusos betegekben (n = 171)

Paraméter	$r^{\#}$	$p^{\#}$	Parciális korreláció §	$p^{\S}$
BMI	-0,049	0,523	-	-
Éhgyomri vércukor	-0,118	0,125	0,002	0,978
Inzulin	-0,369	< 0,001	-0,270	< 0,001
Adiponektin	0,307	< 0,001	0,280	0,001
Rezisztin	0,178	0,020	-0,085	0,317
Fetuin-A	-0,111	0,150	-0,035	0,679
TNF α	0,040	0,605	-0,006	0,941

#: Spearman-féle rank korreláció, §: a BMI-re és az életkorra történő igazítás után; BMI: testtömeg index; TNF α : tumor nekrozis faktor- α (TNFSF2)

Többváltozós elemzés segítségével a szérumban a ghrelin szintet meghatározó tényezőket kerestük (6.2.2. táblázat). Az inzulin és az adiponektin a ghrelin szint független meghatározójának bizonyult az életkort, a nemet, a BMI-t, az éhomi glukóz szintet, a trigliceridet, a HDL-koleszterint, az adiponektint, a rezisztint, a leptint, a TNF α (TNFSF2)-t és a fetuin-A-t magában foglaló modellben.

6.2.2. táblázat. A szérumban a ghrelin szintet meghatározó tényezők többváltozós regressziós vizsgálata posztinfarktusos betegekben (n = 171)

Paraméter	Standardizált β	p
Életkor	0,065	0,375
Nem	-0,002	0,975
BMI	0,115	0,147
Éhgyomri vércukor	0,025	0,743
Inzulin	0,327	0,001
Triglicerid	0,038	0,609
HDL-koleszterin	0,066	0,379

6.2.2. táblázat. A szérum ghrelin szintet meghatározó tényezők többváltozós regressziós vizsgálata posztinfarktusos betegekben (n = 171)

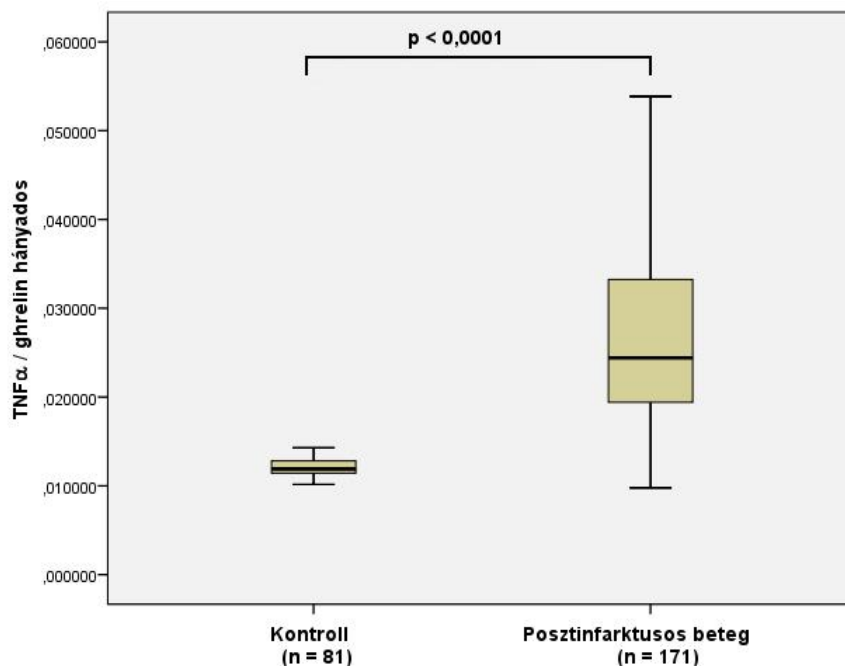
Paraméter	Standardizált β	p
Adiponektin	0,301	0,001
Rezisztin	0,108	0,188
Leptin	0,063	0,601
TNF α	0,071	0,388
Fetuin-A	0,028	0,697
A modell illeszkedése: $r^2 = 0,199$, $p < 0,001$.		

BMI: testtömeg index; HDL: high density cholesterolin; TNF α : tumor nekrosis faktor- α (TNFSF2)

Ezek után diszkrimináns analízist végeztünk annak megállapítására, hogy mekkora erővel tudja a ghrelin, az adiponektin, a leptin, a fetuin-A, a rezisztin és a TNF α (TNFSF2) megkülönböztetni egymástól az egészséges kontrollokat és a posztinfarktusos betegeket. A felsorolt fehérjék a modell csoporton belüli variabilitásának 57,5%-áért voltak felelősek (kanonikus korreláció = 0,758; Wilks-féle $\lambda = 0,426$, $p < 0,001$). A keresztvalidált klasszifikáció során a vizsgált személyek mintegy 90,1%-a (a kontrollok 100%-a és a posztinfarktusos betegek 85,4%-a) kategorizálódott helyesen.

A mátrixanalízis szerint a ghrelin volt a posztinfarktusos csoportba való tartozás legerősebb prediktora (0,760), ezt a TNF α (TNFSF2) követte (0,569). Csak ezt a két paramétert használva az esetek 89,7%-át sikerült helyesen azonosítani. A ghrelin önmagában csak az esetek 87%-át tette a helyes csoportba.

A diszkrimináns elemzés során a ghrelin és a TNF α (TNFSF2) volt a posztinfarktusos kategória legerősebb prediktora. Ugyanakkor a kettőjük korrelációja volt az összes közül a leggyengébb ($r = 0,017$). Ezért tovább vizsgáltuk a TNF α /ghrelin arányt. A betegeknek szignifikánsan magasabb TNF α /ghrelin hányadosuk volt a kontrollokhöz képest (6.2.1. ábra).



6.2.1. ábra. A posztinfarktusos betegek (n = 171) és az egészséges kontroll személyek (n = 81) TNFα/ghrelin hányadosa (Mann-Whitney teszt $p = 3,55 \cdot 10^{-35}$)

A kontrolloknál számolt legmagasabb TNFα/ghrelin hányados értékét (0,0143) vágópontnak használva az összes, ennél alacsonyabb hányados a kontroll csoportba került. A 171 posztinfarktusos betegből 165-nek (96,5%) a vágóérték feletti TNFα/ghrelin aránya volt és csak 6-nak volt a kontrollokra 100%-ban jellemző alacsony hányados-értéke.

A χ^2 teszt is erősen szignifikáns kapcsolatot mutatott a TNFα/ghrelin arány és a között, hogy a vizsgált személyek a posztinfarktusos csoportba tartoztak-e ($\chi^2 = 215,6$, hatásméret, effect size: = 0,932, $p < 0,0001$). A kockázatvizsgálat azt mutatta, hogy a magas TNFα/ghrelin hányadossal rendelkező személyeknek 11,25-szor (95% CI: 5,80–21,80) nagyobb esélyük volt arra, hogy a beteg csoportba tartozzanak.

Mivel az elhízás és a cukorbetegség egyaránt hyperinzulinaemiával jár és időközben egyértelművé vált, hogy az inzulin és a ghrelin között szoros negatív kapcsolat van, megismételtük a fenti számításokat, kiiktatva az elhízás és a cukorbetegség mint zavaró tényező hatását. Az így szelektált posztinfarktusos betegek és az egészséges kontrollok közötti különbség számos paraméter esetében megmaradt, de továbbra is a ghrelin és a TNFα esetében volt a legkifejezettebb (6.2.3. táblázat).

6.2.3. táblázat. A posztinfarktusos, nem obez és nem diabéteszes posztinfarktusos betegek és az egészséges kontroll személyek összehasonlítása (átlag $\pm$ SD)

Paraméter	Kontroll	Posztinfarktusos, nem obez, nem diabéteszes beteg	p [#]
N (férfi / nő)	81 (46 / 35)	88 (62 / 26)	0,064
Életkor (év)	60 $\pm$ 7	62 $\pm$ 6	0,019 [§]
BMI (kg/m ²)	22,4 $\pm$ 2,4	25,9 $\pm$ 2,5	< 0,001 (2,23*10 ⁻¹⁴)
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,0 $\pm$ 1,1	5,35 $\pm$ 1,1	0,028
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,44 $\pm$ 0,46	1,21 $\pm$ 0,28	0,022
Triglicerid (mmol/l)	1,40 $\pm$ 0,6	1,85 $\pm$ 0,98	0,022
Glukóz (mmol/l)	4,5 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,6	< 0,001 (4,11*10 ⁻⁹)
Inzulin	5,21 $\pm$ 1,12	20,29 $\pm$ 14,62	< 0,001 (1,42*10 ⁻¹⁹)
Adiponektin (μg/ml)	12,77 $\pm$ 3,15	9,02 $\pm$ 3,75	< 0,001 (1,04*10 ⁻⁹)
Leptin (ng/ml)	12,17 $\pm$ 9,16	28,11 $\pm$ 15,63	< 0,001 (1,30*10 ⁻⁷)
Rezisztin (ng/ml)	6,40 $\pm$ 2,66	9,06 $\pm$ 5,65	0,002
Ghrelin (pg/ml)	338 $\pm$ 31	240 $\pm$ 54	< 0,001 (7,70*10 ⁻²¹)
TNFα (pg/ml)	4,07 $\pm$ 0,24	5,98 $\pm$ 1,70	< 0,001 (4,58*10 ⁻¹⁹)

#: Mann-Whitney teszt; §: χ^2 teszt; BMI: testtömeg index; HDL: high density cholesterolin; CRP: C-reaktív protein; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2)

Az így megismételt diszkriminációs analízis során felsorolt fehérjék (ghrelin, adiponektin, leptin, fetuin-A, rezisztin és TNFα) a modellcsoporton belüli variabilitás 88,5%-át magyarázták (kanonikus korreláció = 0,941; Wilks-féle $\lambda = 0,114$, $p < 0,001$). A keresztvalidált klasszifikáció során a vizsgált személyek 87,6%-ának besorolása bizonyult helyesnek (kontrollok: 100%, posztinfarktusos betegek: 71,3%). A szerkezeti mátrix elemzése alapján a ghrelin volt a beteg csoportba tartozás legerősebb jelzője (0,756), melyet az inzulin (-0,461) és a TNFα (TNFSF2) követett (-0,266).

A csoportok jobb elkülönítése érdekében ezért a diszkriminációs analízis során kiemelkedő három protein (inzulin, ghrelin, TNFα) összekapcsolt elemzését is elvégeztünk. Az inzulin és a ghrelin között az ismerten szoros kapcsolatot találtuk, ez volt a legerősebb (standardizált $\beta = -0,620$, $p = 2,06 \cdot 10^{-19}$, $n = 169$), egymás szérumszintjét markánsan befolyásolják, ezért a gyengébb diszkriminatív erővel bíró inzulint kihagytuk a későbbi analízisből. Így a metabolikus domént a ghrelin, a gyulladásos domént a TNFα (TNFSF2) képviselte.

6.2.2. Megbeszélés

A posztinfarktusos betegek szérumban ghrelin szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az életkorban illesztett egészségesekhez képest. Kagodlou és mtsai csökkent ghrelin szintről számoltak be koronáriabetegekben, valamint negatív korrelációt találtak az a. carotis atherosclerosisával T2DM-es betegekben [327, 330]. Ezzel összhangban mások is fordított összefüggést írtak le a ghrelin és a magas vérnyomás, valamint a metabolikus szindróma között [328, 329].

A mi megfigyeléseink is azt támasztják alá, hogy a szérumban ghrelin csökken koronáriszklózisban. Az általunk vizsgált populáció heterogén volt abból a szempontból, hogy számos elhízott és diabéteszes egyént is magában foglalt. Az ezekben a praeatheroscleroticus állapotokban megfigyelt alacsony ghrelin szint hozzájárulhat az atherosclerosis kialakulásához. Ugyanakkor ezeket a betegeket kizárva is csökkent ghrelin szintet találtunk a posztinfarktusos betegek csoportjában. Mindez arra utal, hogy a ghrelin a koronáriabetegek széles csoportjában csökken, és az atherosclerosis korai jele lehet.

A szérumban ghrelin, az inzulin és az adipokinek kapcsolatát elemezve arra kerestünk választ, hogy mely molekulák határozhatják meg a ghrelin szintet és járulhatnak hozzá a csökkent ghrelin koncentrációhoz koronáriabetegekben. A ghrelin szint legerősebb meghatározójának az inzulin szint bizonyult. Az acetyl-ghrelin egészségesekben gátolni képes az inzulinszekréciót, ami magyarázza az általunk talált negatív korrelációt [333]. Mások is csökkent ghrelin koncentrációt írtak le elhízásban és cukorbetegségben [339, 340].

Mind az inzulin, mind a glukózterhelés csökkenti a ghrelin szintet [286, 341], sőt az inzulin gátolja a ghrelin aktiválását végző ghrelin O-acetyl-transferáz enzimet is [342]. Ez szintén hozzájárul az általunk megfigyelt csökkent acetylált ghrelin szinthez.

Az inzulin csökkenti a ghrelin szintet, de ezt a hatást a kövérség és a cukorbetegség jelentősen befolyásolja. A magas kiindulási ghrelin szinttel rendelkező nőkben Sondegaard és mtsai a ghrelin jelentős csökkenését figyelték meg hiperinzulinémiás euglikémiás clamp során, míg az alacsony kiindulási ghrelin szint esetén kövér betegekben a csökkenés mértéke lényegesen kisebb volt [343]. Végül is mindkét csoport hasonló ghrelin szintet ért el. Mások azt találták, hogy cukorbetegségben az inzulin infúzió okozta ghrelin csökkenés mértéke kisebb volt az egészségesekhez képest [344]. Ezek alapján feltételezzük, hogy az inzulin csak egy bizonyos mértékig, az egyénre jellemző minimális szintre képes

csökkenteni a ghrelin koncentrációt. Ezen a minimális ghrelin szinten túl a további inzulinszint emelkedés már nem csökkenti tovább a ghrelint. Feltételezzük, hogy a nem obese, nem diabéteszes posztinfarktusos betegekben mért, már emelkedett inzulin szint elégséges a ghrelin szint maximális csökkentéséhez, és a diabéteszesekben megfigyelt még magasabb inzulinszint már nem eredményez további ghrelin koncentráció csökkenést.

Az adiponektin és a ghrelin között pozitív kapcsolatot találtunk, a nemre és a BMI-re történő illesztés után is. Elhízott, valamint nem elhízott, nem inzulinrezisztens nőkben szintén pozitív kapcsolatot írtak le [334, 345]. A nem acetilált és acetilált ghrelin iv. adása nem befolyásolta [335] vagy csak átmenetileg csökkentette az adiponektin szintet [346]. Az adiponektinnek a ghrelin szintre gyakorolt hatását tudomásom szerint korábban nem vizsgálták. Valószínű, hogy a megemelkedett inzulin szint mellett a csökkent adiponektin is hozzájárul az alacsony ghrelin szinthez posztinfarktusos betegekben.

Mi sem és mások sem [336] találtak összefüggést a ghrelin és a leptin szint között. Bár Ukkola és mások negatív korrelációt figyeltek meg a ghrelin és a leptin szint között metabolikus szindrómában és T2DM-ben, de csak a magasabb leptin tartományban [332]. Erdman és mtsai szintén negatív korrelációt találtak a ghrelin és a leptin között, nem elhízott és elhízott, de normális inzulinszintű személyekben egyaránt, de hyperinzulinaemiás kövérekben és T2DM betegekben nem. Feltételezik, hogy a leptin a bazális ghrelint gátolja normoinzulinaemiában mérsékelt súlygyarapodás esetén, míg a súlyosabb elhízásért az inzulin, és nem a leptin a felelős [337]. Ezek a megfigyelések is alátámasztják a miénket, miszerint az inzulinnak nagyobb hatása van a ghrelin szintre, mint a leptinnek.

A fetuin-A és a ghrelin szint között nem találtunk kapcsolatot, hasonlóképpen a lipid szintekkel sem. Korábban a HDL-koleszterinnel pozitív, a trigliceriddel negatív korrelációt figyeltek meg [340, 347, 348]. Ennek hátterében a lipolízis gátlását, illetve a zsírsejtek triglicerid felvételének serkentését tételezték fel [349, 350]. Abban, hogy mi nem találtunk szignifikáns összefüggést a ghrelin és a lipid szintek között, szerepet játszhat az is, hogy a mi betegeink kétharmada lipidcsökkentő kezelést kapott. A triglicerid szinttel talált kapcsolat nem volt független. A roziglitazon és a metformin emeli a ghrelin szintet [351].

A szubklinikus gyulladás fontos szerepet tölt be az atherosclerosis progressziójában. Az általunk vizsgált posztinfarktusos betegeknek legalább fél évvel korábban volt szívinfarktusuk, náluk az emelkedett TNF α (TNFSF2) mégiscsak szubklinikus gyulladásra utalt. Az acetilált ghrelin gyulladást szabályozó szerepét is feltételezik. A ghrelin gátolja a

TNF α (TNFSF2) és más proinflammatorikus citokinek által indukált gyulladást, valamint csökkenti más interleukin expresszióját [338]. Mi azonban nem találtunk kapcsolatot a ghrelin és a TNF α (TNFSF2) szint között, ezért mutatkozott hányadosuk különösen alkalmasnak a kontrollok és a posztinfarktusos betegek elkülönítésére. A TNF α /ghrelin arány a koronáriabetegség új markere lehet. Ilyen irányú vizsgálatot tudtommal még nem végeztek.

Összefoglalva, adataink szerint az acetilált ghrelin szint koronáriabetegekben csökkent, a testtömegtől és a T2DM jelenlététől függetlenül. Posztinfarktusos betegekben a ghrelin szintet elsősorban az emelkedett inzulin és a csökkent adiponektin határozza meg.

7. A szérum fetuin-A koncentráció aorta aneurysmás és perifériás érszűkületes betegekben

Elmeszesedett artériafal esetén az atherosclerosis gyorsabb progressziót mutat, mely fokozott szív-érrendszeri morbiditással és halálozással jár [352]. Ismert, hogy a fetuin-A gátolja az ektópiás kalcifikációt [353, 354]. Több vizsgálat eredménye utalt arra, hogy a csökkent fetuin-A koncentráció súlyosabb fokú érlemeszesedéssel társul. Vizsgálataink idejéig főleg veseelégtelen, dializált betegektől származó adatok bizonyították ezt [355, 356]. Az alacsony fetuin-A szint fokozott halálozási kockázattal is jár, különösképpen a veseelégtelen, dializált betegek körében [352]. A megtartott vagy csak mérsékelten beszűkült veseműködésű atheroscleroticus betegekről kevés, sokszor egymásnak ellentmondó adat látott napvilágot.

Az aneurysma megjelenése az aorta súlyos atherosclerosisára utal. A fetuin-A koncentráció alakulását aneurysmás betegekben korábban nem vizsgálták.

Jelen vizsgálat célja kettős volt: egyfelől a fetuin-A koncentráció meghatározása normális vagy csak enyhén beszűkült vesefunkciójú, krónikus alsó végtagi ischaemiás betegekben, további bizonyítékot keresve a szérum fetuin-A szint és az érlemeszesedés, a kalcifikáció közötti kapcsolatra ebben a betegcsoportban, másfelől szérum fetuin-A koncentráció összehasonlítása és jellemzése volt a két, egymástól gyökeresen különböző eredetű (meszesedéssel járó és nem járó) aorta aneurysma esetén.

7.1. Betegek és módszerek

A krónikus alsó végtagi érszűkület vizsgálatba 93 beteg került beválasztásra⁸. Az érszűkület diagnózisát ultrahangos vizsgálattal és szükség esetén angiográfiával állapították meg. Az aneurysma vizsgálatba 30 atheroscleroticus eredetű (5 mellkasi és 25 hasi) aneurysmás, 15 Marfan szindróma eredetű aneurysmás beteg került beválasztásra, akik értékeit 30 egészséges kontroll személyéhez hasonlítottuk ebben a keresztmetszeti tanulmányban. Az aneurysma diagnózisát CT vizsgálattal igazolták. Mindkét vizsgálatban kizárási kritériumok voltak a következők: aneurysma rupturára utaló jel vagy egyéb érsebészeti

⁸ A vizsgált betegeket a Semmelweis Egyetem Szív- és Érsebészeti Klinikáján gondozták. Ezekben a vizsgálatokban az én a közreműködésem a következőkre terjedt ki: a szérum fetuin-A koncentráció meghatározása (az ETT 368/2009 támogatásával, melynek témavezetője voltam), az adatbázis újraértékelése, statisztikai számítások, a kézirat kritikus javítása, tanácsadás.

sürgősségi felvételi indok, akut fertőzésre utaló klinikai vagy laboratóriumi eltérés, malignus betegség, májbetegség, dialízist igénylő veseelégtelenség, immunszuppresszió, súlyos belgyógyászati vagy sebészeti állapot (szívinfarktus, stroke, trauma) az elmúlt fél évben. A PAD referencia csoporttól függetlenül az összes az alsó végtagi érszűkületes beteg adatait külön értékeltük.

Az érszűkület és meszesedés mértékét négy paraméterrel jellemeztük: boka-kar index, a. carotis intima-média vastagság (IMT), általános kalcifikációs score, és ha a beteg angiográfiára került, a Bollinger score⁹ [357]. Az alsó végtagi perifériás érszűkületes betegek esetében meghatározásra került még a Fontaine stádium (I, II/a, II/b, III, IV; II/a: 200 m járástávolság felett, II/b: 200 m alatt).

Az IMT-t mindkét a. carotis communison három ponton mérték. Az átlagos és a maximális IMT, valamint a carotis sztenózis mértéke került meghatározásra. Az elmeszesedés általános mértékének meghatározásához az artériás kalcifikációs score-t használtuk, mely hét helyen vizsgálja az érrendszert: mindkét a. carotis bifurkáció, az aorta infrarenális szakasza, mindkét a. femoralis communis, az aorta és a mitrális billentyű. Ha nem volt észlelhető meszesedés 0 pontot, ha igen, 1 pontot kapott a vizsgált személy, így a score tartománya 0–7 pont között volt [358, 359]. A billentyűmeszesedést két, egymástól független, tapasztalt kolléga vizsgálta transthoracalis echokardiográfiával. A mitrális billentyűt akkor tekintettük kalcifikáltnak, ha a parasternális rövid és hosszú tengelyben, valamint az apikális négyüregű nézetben az elülső és a hátsó vitorla és a mitralis anulus denzitása elérte az epicardiumét. Az aortabillentyű kalcifikációja akkor volt megállapítható, ha az aortagyök denzitása elérte az epicardiumét a parasternális rövid és hosszú tengelyben, valamint az apikális ötüregű nézetben.

Az a. carotis intima-média vastagságát (IMT) és az általános kalcifikációs score extrakardiális részét két, egymástól független, tapasztalt radiológus végezte, (a boka-kar index esetében egy vizsgáló), aki nem ismerte a betegek klinikai adatait. A boka-kar index az alacsonyabb alsó végtagi értéket a magasabb felső végtagival osztva került meghatározásra.

⁹ A Bollinger score a hasi aorta és az alsó végtagi artériák szűkületét és meszesedését leíró pontrendszer. Vektoriális és additív score rendszerből áll. A vektoriális score az elzáródás, szűkület vagy plakk elhelyezkedését, mintázatát mutatja (összesen 11 vizsgálati ponton). Az additív score a kimutatott eltérések súlyosságát 4 fokozatú skálán adja meg [357].

A szérumban fetuin-A koncentrációt RID-val, az általános módszereknél leírt módon határoztuk meg. A GFR-t a Cockcroft-Gault képlet segítségével számítottuk¹⁰.

A bevont személyek a vizsgálatba írásos beleegyezésüket adták. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá.

7.2. Eredmények

7.2.1. A krónikus alsó végtagi érszűkületes betegek vizsgálata

Az alsó végtagi érszűkületes és a kontroll személyek adatait a 7.1. táblázat tartalmazza. A 93 betegből 76 került műtétre, 56-nak súlyos, az életminőséget rontó claudicatio panasz volt, 20-nak pedig kritikus végtag ischaemiája. A boka-kar index 0,40-es medián értéke is a súlyos állapotú betegcsoportra utalt.

7.1. táblázat. A krónikus alsó végtagi érszűkületes betegek személyek adatai

	Perifériás érszűkület (n = 93)	Egészséges kontroll (n = 30)	p*
Életkor (év)	60,3 (54,5-65,0)	46,2 (43,0-52,0)	< 0,0001
Nem (férfi/nő)	72 / 21	12 / 18	0,002 [#]
BMI	26,2 (24,2-29,1)	26,6 (24,1-27,8)	0,645
Dohányzás (i/n)	88 / 5	2 / 28	< 0,001 [§]
Diabétesz (i/n)	33 / 60	0 / 30	< 0,001 [§]
Hipertónia (i/n)	74 / 19	2 / 28	< 0,001 [§]
Kreatinin (μmol/l)	82 (73-89)	79 (67-87)	0,004
eGFR (ml/min)	91,5 (78,2-109,7)	139,0 (110,1-165,2)	< 0,0001
CRP (mg/l)	3,60 (1,15-7,75)	2,07 (1,23-2,43)	0,114
Albumin (g/l)	42,7 (40,8-48,0)	44,9 (40,8-48,0)	0,010
Transzferrin (g/l)	2,62 (2,29-2,99)	2,56 (2,01-3,05)	0,915
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,50 (4,50-6,50)	5,50 (4,90-6,10)	0,776
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,39 (2,90-4,33)	3,12 (2,68-3,66)	0,955
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,42 (1,13-1,64)	1,51 (1,26-1,69)	0,038
Triglicerid (mmol/l)	1,70 (1,20-2,50)	1,63 (1,11-1,80)	0,098
Homocisztein (μmol/l)	14,5 (12,1-18,3)	11,0 (9,6-12,0)	< 0,0001
IMT átlag (mm)	0,82 (0,70-0,99)	0,59 (0,46-0,70)	< 0,0001
IMT maximum (mm)	1,00 (0,80-1,30)	0,63 (0,50-0,80)	< 0,0001
Arteriális kalcifikációs score	5,0 (4-6)	0 (0)	< 0,0001
Fetuin-A (mg/l)	732 (630-768)	704 (624-768)	0,357

¹⁰ $GFR = \frac{(140 - \text{életkor}) * \text{testtömeg (kg)} * (\text{férfi:1,nő:0,85})}{72 * \text{szérumban kreatinin (μmol/l)}}$

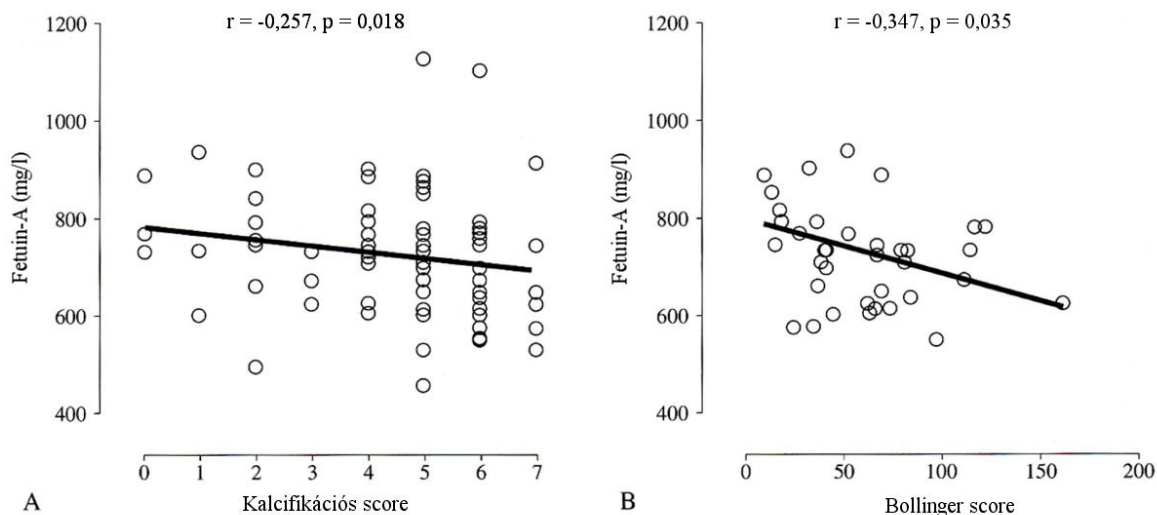
Medián (interkvartilis tartomány); *: ahol nincs külön jelölve, Mann-Whitney teszt; #: χ^2 teszt; §: Fisher teszt; BMI: testtömeg index; eGFR: becsült glomeruláris filtrációs ráta; CRP: C-reaktív protein; LDL: low density cholesterol; HDL: high density cholesterol; IMT: intima-média vastagság

A májbetegeknél megfigyeltékhez hasonlóan statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szérumbéta-A koncentráció és a szérumbéta-albumin, valamint a transzferrin szint között, valamint negatív korrelációt az általános kalcifikációs score és a Bollinger score értékével (7.2. táblázat és 7.1. ábra). A vérzsír szintekkel (össz-, LDL- és HDL-koleszterin, triglicerid) és a Fontaine-stádiumokkal nem találtunk jelentős korrelációt. A HbA1c szinttel is szignifikáns korrelációt kaptunk, de a cukorbeteg és nem diabéteszes betegek béta-A szintje nem különbözött lényegesen egymástól.

7.2. táblázat. A szérumbéta-A koncentráció és a normális vesefunkciójú alsó végtagi érszűkületes betegek paraméterei között talált korreláció

Paraméter	r [#]	p
BMI	-0,043	0,677
HbA1c	0,219	0,034
eGFR	-0,007	0,943
CRP	-0,202	0,058
Albumin	0,288	0,007
Transzferrin	0,306	0,003
Laktát	0,208	0,050
Boka-kar index	0,079	0,451
Átlagos IMT	-0,107	0,341

#: Spearman-féle rank korreláció; BMI: testtömeg index; eGFR: becsült glomeruláris filtrációs ráta; CRP: C-reaktív protein; IMT: intima-média vastagság



7.1. ábra. A szérumban lévő fetuin-A koncentráció és a kalcifikációs score (A), valamint a Bollinger score (B) közötti korreláció alsó végtagi perifériás érrendszeri betegekben.

A kalcifikációs és a Bollinger score-ral talált összefüggést tovább vizsgálva azt találtuk, hogy a legalacsonyabb tercilisbe tartozó fetuin-A szinttel rendelkező betegeknek majdnem háromszoros esélyük van magasabb kalcifikációs score elérésére, mint a legmagasabb fetuin-A tercilisbe tartozóknak (7.3. táblázat). Logisztikus regressziós modelljeinkben a fetuin-A és a kalcifikáció mértéke közötti kapcsolat az életkorra, nemre, BMI-re, cukorbetegségre, dohányzásra, vérzsírszintekre és CRP-re történő igazítás után is szignifikáns maradt.

7.3. táblázat. A szérumban lévő fetuin-A koncentráció és a súlyosabb kalcifikáció esélye közötti összefüggés perifériás érrendszeri betegekben

Modell	OR (95% C.I.)	p
Igazítatlan	2,968 (1,213-7,265)	0,017
Modell 1	2,890 (1,122-7,444)	0,028
Modell 2	3,279 (1,171-9,285)	0,024
Modell 3	3,035 (1,053-8,746)	0,040

Modell 1: életkorra, nemre, BMI-re, cukorbetegségre, dohányzásra történt igazítás

Modell 2: Modell 1 + az össz- és HDL-koleszterinre, trigliceridre történt igazítás

Modell 3: Modell 2 + CRP-re történt igazítás; OR: esélyhányados

Az atheroscleroticus és a Marfan-szindróma eredetű aneurysmás betegek összehasonlítása

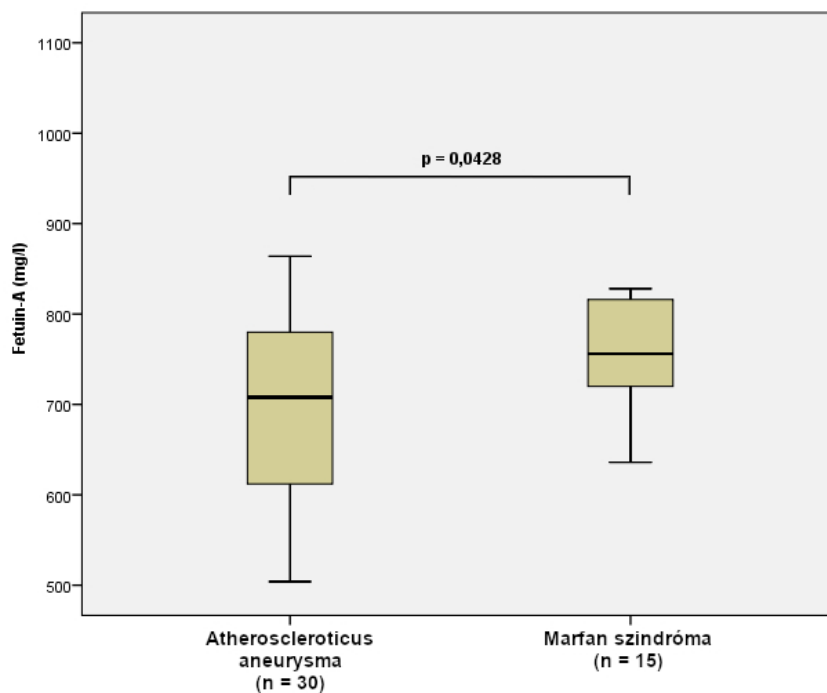
Az atheroscleroticus és a Marfan-szindróma eredetű aneurysmás betegek adatait a 7.4. táblázat tartalmazza. Az atheroscleroticus eredetű aneurysmák átlagos mérete 52 (46–60) mm (medián és interkvartilis tartomány), a Marfan-szindrómás eredetűeké 55 (50–65) mm volt. Az előbbiekből 24 esetben végeztek érműtétet, a Marfan-szindrómások mindegyikét meg kellett operálni.

7.4. táblázat. Az atheroscleroticus és a Marfan-szindróma eredetű aneurysmás betegek adatai

	Atheroscleroticus aneurysma (n = 30)	Marfan-szindróma (n = 15)	p[#]
Életkor (év)	70,8 (60,6-76,0)*	35,2 (25,3-47,6)	< 0,0001
Nem (férfi/nő)	26 / 4	8 / 7	0,026[§]
BMI	26,6 (24,2-29,8)	22,6 (19,0-25,2)	< 0,001
Dohányzás (i/n)	24 / 6	5 / 10	0,003[§]
Diabétesz (i/n)	9 / 21	1 / 14	0,129[§]
Hipertónia (i/n)	24 / 6	6 / 9	0,017[§]
Kreatinin (μmol/l)	106 (95-125)	66 (56-72)	< 0,0001
eGFR (ml/min)	60,1 (50,9-84,5)	138,1 (104,1-54,0)	< 0,0001
CRP (mg/l)	2,5 (0,7-5,6)	1,6 (1,2-2,5)	0,441
Albumin (g/l)	46,3 (43,9-49,5)	45,0 (42,6-45,7)	0,258
Transzferrin (g/l)	2,41 (2,24-2,80)	2,71 (2,53-3,17)	0,086
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,2 (4,3-6,4)	4,8 (3,9-5,6)	0,289
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,12 (2,38-4,53)	2,69 (2,07-3,49)	0,487
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,32 (1,06-1,56)	1,40 (1,12-1,62)	0,647
Triglicerid (mmol/l)	1,6 (1,3-2,7)	1,1 (0,9-2,0)	0,077
Laktát (mmol/l)	3,4 (1,9-4,9)	2,9 (1,7-4,1)	0,044
Homocisztein (μmol/l)	17,2 (13,4-21,0)	12,1 (11,4-15,0)	0,003
IMT átlag (mm)	0,75 (0,70-0,87)	0,55 (0,48-0,60)	< 0,0001
IMT maximum (mm)	0,90 (0,80-1,20)	0,60 (0,50-0,60)	< 0,0001
Artériás kalcifikációs score	5 (3-6)	0 (0-1)	< 0,0001[§]

Medián (interkvartilis tartomány), #: ahol nincs külön jelölve, Mann-Whitney teszt; §: Fisher teszt; BMI: testtömeg index; eGFR: becsült glomeruláris filtrációs ráta; CRP: C-reaktív protein; LDL: low density cholesterolin; HDL: high density cholesterolin; IMT: intima-média vastagság

A kétféle eredetű aneurysmás csoport fetuin-A szintje szignifikánsan különbözött egymástól: atheroscleroticus aneurysmások medián koncentrációja 708 mg/l (Q1-Q3: 612–780) vs. Marfan-szindrómások 756 mg/l (Q1-Q3: 708–816) mg/l ($p = 0,0428$, 7.2. ábra).



7.2. ábra. Az atheroscleroticus és a Marfan-szindróma eredetű aorta aneurysmás betegek fetuin-A koncentrációja. Medián és interkvartilis tartomány (Mann-Whitney teszt).

Az atheroscleroticus aneurysmás betegcsoportban magasabb laktát értéket is találtunk, mely szoros korrelációt mutatott a fetuin-A szinttel ($r = 0,505$, $n = 30$, $p = 0,005$), a vizsgált paraméterek közül a legszorosabbat, mely a BMI-re és a HbA1c-re történő igazítás után is szignifikáns maradt ($r = 0,432$, $p = 0,026$). A Marfan-szindrómás betegek csoportjában ugyanakkor nem volt szignifikáns kapcsolat ($r = 0,024$, $n = 15$, $p = 0,931$). Az atheroscleroticus aneurysma csoportban végzett egyváltozós regressziós vizsgálat során a laktát szint 19,7%-ban határozta meg a fetuin-A szintet (standardizált $\beta = 0,444$, $n = 28$, $p = 0,016$). Az alsó végtagi érszűkületes csoportban is hasonló, bár gyengébb összefüggést találtunk: $\beta = 0,221$, $n = 88$, $p = 0,037$).

A képalkotó vizsgálatok (a. carotis IMT és artériás kalcifikációs score) szignifikánsan nagyobb mértékű artériafal megvastagodást és meszesedést mutattak az atherosclerosis csoportban a Marfan-szindrómásokhoz képest. A szérum kreatinin szint, a nem, az életkor,

az aneurysma mérete, az átlagos IMT és az artériás kalcifikációs score hatásának megítélésére logisztikus regressziós vizsgálatot végeztünk. A felsorolt paraméterekre való igazítás során eltűnt a két csoport közötti különbség.

Egyik betegnek sem volt szüksége dialízisre, és krónikus vesebetegségük sem volt ismert, mégis jelentősen eltért egymástól az atheroscleroticus és a Marfan-szindrómás csoport szérum kreatinin és eGFR szintje (mindkét paraméterre $p < 0,0001$). Az előbbi csoportban a normálérték felső határa körüli vagy enyhén emelkedett, míg az utóbbiban bőven a normál tartományon belüli értékek szerepeltek. Az akut fázis fehérjék (CRP, albumin és transferrin) értékei nem tértek el lényegesen egymástól. Az atheroscleroticus betegek LDL-koleszterin szintje mérsékelten emelkedett volt, a többi vérsír paraméter a normál tartományban helyezkedett el. Az atheroscleroticus aneurysmás betegek 11/30 arányban szedtek sztatint. A cukorbeteg aránya sem tért el jelentősen egymástól és az egyes csoportokon belül sem találtunk szignifikáns korrelációt.

Az atheroscleroticus csoportban szignifikánsan magasabb homocisztein értéket találtunk, mely nem korrelált a fetuin-A koncentrációval. A fetuin-A értékek – az alsó végtagi érszűkületes csoportban és a májbetegeken megfigyelt módon – pozitív korrelációt mutattak a szérum transferrin szinttel ($r = 0,405$, $p = 0,007$).

Az atheroscleroticus csoportban a képalkotó vizsgálatokkal nyert adatok (átlagos és maximális a. carotis IMT, artériás kalcifikációs score) is jelentősen nagyobbak voltak, mint a Marfan-szindrómásokban ($p < 0,0001$ mindegyik esetben). Az IMT egyik értéke sem korrelált a fetuin-A szinttel (átlagos IMT: $r = -0,130$, $p = 0,502$, maximális IMT: $r = -0,113$, $p = -0,549$, az atheroscleroticus csoportban). A kappa teszttel vizsgálva a vizsgálók közötti egyezés jó volt ($\kappa = 0,777$, $p < 0,001$).

7.3. Megbeszélés

Több vizsgálat eredménye utalt arra, hogy a csökkent fetuin-A koncentráció súlyosabb fokú érrelmeszesedéssel társul. Vizsgálataink idejéig főleg veseelégtelen, dializált betegektől származó adatok bizonyították ezt [355, 356]. A hemodialízis „szerzett” fetuin-A hiányhoz vezet, részben mert a molekula filtrálódik, részben azért, mert a krónikus veseelégtelenségben meglévő szubklinikus gyulladás során felszabaduló proinflammatorikus citokinek gátolják a termelődését [44, 352, 353, 355, 360]. A fetuin-A szint és a kalcifikáció foka közötti összefüggés nem volt nyilvánvaló normális vesefunkció esetén.

Vizsgálataink előtt csak kevés adat állt rendelkezésre az ép vagy csak mérsékelten beszűkült veseműködésű, de előrehaladott atheroscleroticus betegekről. Néhány tanulmány szólt a koszorúserek [361, 362], valamint szívbillentyűk [363] meszesedéséről, valamint a perifériás érbetegségről [274, 280].

Előttünk többen vizsgálták már a fetuin-A koncentráció és az érlemeszesedés kapcsolatát, az eredmények azonban ellentmondásosak. A kalcifikáció CT-vel meghatározott mértéke és a fetuin-A koncentráció pozitívan korrelált egymással nem dializált, diabéteszes nefropátiás betegeknél [273]. Ebben a tanulmányban a diabétesz mint potenciális elfedő tényező mellett etnikai tényezők is szerepet játszottak, ugyanis a latin-amerikai származású betegeknek magasabb fetuin-A szintjük volt az afroamerikaiakhoz képest. Ezzel szemben Ix és mtsai nem találtak kapcsolatot a fetuin-A koncentráció csökkenése és a halálozás között veseelégtelen, de dialízisre még nem szoruló, döntően nem diabéteszes betegeknél [364]. Szintén ők normál veseműködésű koronáriabetegeknél fordított arányosságot észleltek a fetuin-A szint és a mitrális billentyű kalcifikációja között [363]. Fiore és mtsai az alsó végtagi érszűkület mértéke és a fetuin-A szint között szintén fordított arányosságot találtak normális vesefunkciójú, de alacsony csontdensitású betegeknél [274]. Weikert és mtsai vizsgálatukban, melybe mintegy 2500 személyt vontak be, azt találták, hogy az emelkedett fetuin-A koncentráció a szívinfarktus 3,80-szoros és az ischaemiás stroke 3,93-szoros kockázatával jár [95]. Mori és mások szerint az a. carotis merevsége és a fetuin-A szint pozitívan korrelál egymással (nem túl erősen, $r = 0,200$, $p = 0,018$), mely az életkortól eltekintve minden egyéb paramétertől független volt. A vizsgált személyek között nem kis számban hiperlipidémiások is voltak [275].

Ahogy korábban említettem, a fetuin-A a kalcifikáció szisztémás inhibitora *in vitro* és *in vivo* [69, 365]. Az érlemeszesedésben betöltött szerepével kapcsolatban kimutatták, hogy a molekula a kalciumot megkötve meggátolja az ér simaizomsejtek intracelluláris kalcium emelkedésére bekövetkező pusztulását [366]. A kalcifikáció megjelenése a helyi citoprotektív mechanizmus kimerülésére utal [22].

Szignifikánsan alacsonyabb fetuin-A koncentrációt találtunk az atheroscleroticus eredetű aorta aneurysmásokban a Marfan-szindrómásokhoz képest. Ezek az eredmények további bizonyítékát adják annak, hogy a fetuin-A gátolja az artériákban a kalcifikációt ép vesefunkciójú, nem diabéteszes betegeknél is.

A szérumban fetuin-A koncentráció alakulását aorta aneurysmált betegekben csak egy tanulmányban vizsgálták. A mi vizsgálatainkat egy évvel megelőzően Schlieper és mtsai 10 „coral reef” aortás esetben (az aorta igen súlyos, ismeretlen eredetű, ritka betegségében) az aortában lerakódó mészszerű anyagban hidroxipatitot találtak, melyhez alacsony szérumban fetuin-A szint társult [367].

A hasi aorta aneurysma 90%-ban atheroscleroticus eredetű, ezért az aortafal meszesedése gyakori. A Marfan-szindrómára nem jellemző az aortafal kalcifikációja. Ultrahangos vizsgálattal nem is találtunk meszesedést az aortafalban. Nem találtunk továbbá korrelációt a fetuin-A szint és az a. carotis IMT között sem. Ennek egyik oka lehet, hogy atheroscleroticus betegeinknek súlyosan meszes eltéréseik voltak, kevés helyet hagyva az IMT méréséhez, ami a mérési pontosságot befolyásolhatta. Másrészt a vizsgálatainkat megelőzően napvilágot látott tanulmányokban szubklinikus vagy korai stádiumú érlemezsedés eseteket vizsgáltak [274, 276]. Az eltérő stádium a magyarázata annak is, hogy ezekben a vizsgálatokban pozitív korrelációt mutattak a fetuin-A koncentrációval. Az előrehaladott stádiumban (a betegek közül sokan műtetre is kerültek), már csökken a fetuin-A szint, a kalcifikáció gátlása miatt. Emellett szól az kalcifikációs score-ral talált pozitív korreláció is.

A többváltozós elemzés során nem tudtuk bizonyítani, hogy a fetuin-A koncentrációk különbsége független azon paraméterektől, melyek az egyes csoportokban szignifikánsan különböztek. Ezt részben a kis elemszám, másrészt a vizsgált paraméterek közötti kollinearitás (pl. életkor, IMT, kalcifikációs score és kreatinin) magyarázza.

A homocisztein szint magasabb volt az atheroscleroticus csoportban, de a Marfan-szindrómás betegekhez képest is. A homocisztein emelkedett koncentrációja ismert atheroscleroticus és thrombogén kockázati tényező [368]. A hiperhomociszteinémiát összefüggésbe hozzák az aorta aneurysmájával, disszekciójával, valamint a Marfan-szindrómával is (bár mi ilyen korrelációt nem tudunk kimutatni). A magasabb szint súlyosabb szív-érrendszeri eltérésekkel jár [369].

A hiperhomociszteinémia a mátrix metalloproteináz (MMP) -2 és -9 fokozott aktivációjával jár, mely az elasztin és a fibrilláris kollagén további lebontását eredményezi az aorta aneurysma tunica mediájában. A mesenchymalis sejt eredetű MMP-2 és makrofág eredetű MMP-9 együtt hozzájárul az aorta aneurysma kialakulásához [370]. Ray és mtsai kimutatták, hogy a fetuin-A védi az MMP-9-et az autolitikus lebomlástól, anélkül, hogy

enzimatis aktivitása gátlódna [371]. A fetuinok megkötik és aktiválják az MMP-2-t és az MMP-9-et [372]. A csökkent fetuin-A szint már nem lesz képes megakadályozni az MMP-9 lebomlását [371].

A szérumban kreatinin szignifikánsan magasabb, az eGFR pedig alacsonyabb volt az atheroscleroticus aneurysmák betegeiben, de még éppen a normál értékekben belül. Az atheroscleroticus betegeiben máshol is zajlik az érlemezés, így pl. a renális artériákban. A fetuin-A alakulásáról a mérsékelt fokú veseelégtelenség esetén ellentmondásos közlések vannak, de ezek az érlemezés más klinikai végpontjait vizsgálták, mint amilyen a szív-érrendszeri halálozás és az érfalmerevség [364, 373].

Az atheroscleroticus aneurysmák betegcsoportban a fetuin-A és a szérumban laktát szint között erős pozitív korrelációt találtak, a vizsgált paraméterek közül a legszorosabbat. Gyenge, bár statisztikailag szignifikáns összefüggés mutatkozott a krónikus alsó végtagi érzsűkületes betegek esetében is. A szérumban laktát és a fetuin-A koncentráció összefüggését még nem vizsgálták, egyértelműen magyarázni nem tudom. Az emelkedett szérumban tejsavszint a szöveti oxigénhiányra utal. Bár az érlemezés csoportban kissé alacsonyabb fetuin-A szintet mértek a Marfan-szindrómásokéhoz képest, felmerül annak lehetősége, hogy a hypoxia fokozza a fetuin-A szintézist. A szöveti hypoxia során képződő hypoxia által indukálható faktor-1 (HIF-1) számos gén átírását változtatja meg. Célszekvenciája (TACGTG) megtalálható a humán fetuin-A promotor gén -709. és -714. bázis közötti szakaszán. Ez a szakasz a promotor II. számú, a fetuin-A expressziót fokozó régiójában helyezkedik el (1.3.1 ábra) [42]. Emberen nem vizsgálták, állatkísérletben kimutatták, hogy a HIF-1 fokozza a fetuin-A expresszióját [374]. Ha igazolódik a hypoxia és a fetuin-A expresszió fokozódása közötti kapcsolat, az a molekula újabb alapvető funkciójára világítana rá, nevezetesen a hypoxiához való alkalmazkodáshoz (mely a magzati életben és a szülés idején életfontosságú), valamint további magyarázatát adná annak, hogy miért bizonyult védő hatásúnak az exogén fetuin-A kísérletes stroke-ban [93, 97].

Stefan és mtsai egy másik transzport tápanyag, a szabad zsírsav szintjét határozták meg, és pozitív korrelációt mutattak ki a fetuin-A szinttel. A szabad zsírsav és a fetuin-A szint együttesen határozta meg az inzulinrezisztenciát [228].

Bár más tanulmányokban kimutatták az emelkedett fetuin-A koncentráció és a cukorbetegség kapcsolatát [119, 375], mi ebben a betegcsoportban sem tudtuk ezt megerősíteni. Bizonyított, hogy az emelkedett fetuin-A szint inzulinrezisztenciához vezet

(de nem feltétlenül cukorbetegséghez). Stefan és mtsainak eredményeivel egybehangzóan mi is azt találtuk, hogy élettani glukóz szint esetén a fetuin-A koncentráció és a cukorbetegség között nem volt kapcsolat [117].

Vizsgálataink egyik korlátja a keresztmetszeti jelleg és a kis esetszám, különösen a ritka Marfan-szindrómás eseteké. Másrészt nehéz volt az atheroscleroticus aneurysma csoporthoz korban illesztett, 60–70 év közötti kontroll egyéneket találni, mivel ebben az életkorban már az egészségesnek tartott személyeknek is többnyire szubklinikus atherosclerosisuk van.

A kétféle aneurysmás csoport fetuin-A szintje közötti különbség nem volt független egyéb paraméterek hatásától, de ha az atheroscleroticus csoportot (aneurysma és PAD referencia csoport) a nem atheroscleroticusokhoz (Marfan-szindróma és egészséges kontroll) hasonlítjuk, az előbbiben talált csökkent érték a fetuin-A koncentrációnak az érlelmeszesedés kialakulásában a kalcifikációt gátló betöltött gátló szerepe mellett szól, nem veseelégtelen betegekben is.

7.4. A fetuin-A koncentráció ellentétes irányú változásának magyarázata atherosclerosisban

Posztinfarktusos betegeinkben emelkedett, a perifériás érszűkületes és az aorta aneurysmás betegekben csökkent fetuin-A koncentrációt találtunk, ugyanazzal a módszerrel mérve. Vizsgálatainkat követően mások is megfigyelték, hogy koronáriabetegség esetén szignifikánsan magasabb fetuin-A koncentráció mérhető, mint perifériás érbetegségben. A kétfajta lokalizáció közötti különbség még a NAFLD esetében is kimutatható volt (amelyre amúgy is emelkedett fetuin-A szint jellemző) [376].

A fetuin-A kétarcúsága önmagában a koronáriabetegségben is megfigyelhető volt: az alacsony fetuin-A érlelmeszesedéshez, kalcifikációhoz vezet, míg az emelkedett fetuin-A inzulinrezisztencia, szubklinikus gyulladás, a zsírraktárak fokozódása útján járul hozzá az atherosclerosis progressziójához [377].

Eredményeink alátámasztják a szérum fetuin-A koncentráció ellentmondásos változásának a fehérje szintjének „időfüggő” csökkenésével való magyarázatát.

A folyamat kezdetén észlelhető emelkedés az anyagcsere-eltérésekkel kapcsolatos (elhízás, metabolikus szindróma). A fetuin-A csökkenti az antiatherogén és antidiabetikus adiponektin szintézisét, fokozza a zsírszöveti makrofágok gyulladásos citokin termelését [98, 229]. Alapvető szerepet tölt be a lipid-indukálta inzulinrezisztencia kialakulásában is, mivel szabad zsírsavakat a makrofágok TLR-4-éhez kötve elősegíti a zsírszövet gyulladását, ami szintén inzulinrezisztenciát okoz [103].

Korábbi ismeretekkel ellentétben, miszerint felnőttekben a fetuin-A kizárólag a májban szintetizálódik, kiderült, hogy zsírsavak hatására a zsírszövet is képes termelni [101]. Az így termelődött molekula a makrofágok számára kemoattraktáns tulajdonságú, elősegítve a zsírszövetbe történő bevándorlásukat és pro-inflammatorikus (TNF α -t és IL-6-ot termelő) átalakulásukat. Ezáltal a lipid-indukálta szöveti gyulladás szignál molekulájának is tekinthető, ez úton is hozzájárulva az inzulinrezisztencia kialakulásához.

Az előrehaladott fázisban súlyos ektópiás meszesedés során a kalcium homeosztázis romlása miatt a fetuin-A szint csökken [378].

Ezzel összefügg az a megfigyelés, hogy foszfáatterheléssel az ér simaizomsejtek (VSMC) osteocalcint termelő, kalcifikáló fenotípussá alakíthatók [379]. Sejtszinten a VSMC-k mikrovezikuláiban indul meg a kalcifikáció. A sejtből kikerülő meszesedést tartalmazó vezikulák az őket felvevő VSMC-ben is kalcifikációt indítanak el. A fetuin-A mind az intracelluláris, mind a keringő mikrovezikulákban, valamint az extracelluláris matrixban is jelen van, védi a sejteket a kalcium túlterhelés ellen, gátolja az apoptózisukat, elősegíti a mikrovezikulák fagocitózisát is [22, 77, 380].

A másodlagos CPP-k fokozott képződése a fetuin-A megnövekedett felhasználásához, egyben csökkenő szérumkoncentrációjához vezet. A másodlagos CPP-k emellett a TNF α (TNFSF2), IL-6 és a CRP termelésén keresztül gyulladásos választ indítanak el, mely a májbéli fetuin-A termelést gátolja. Az extraosseális kalcifikációt gátló kapacitás kimerülésével egyre nagyobb mennyiségben képződnek a másodlagos másodlagos CPP-k. Ezek szintén képesek a VSMC-k chondro-osteogenetikus irányú transzformációjára, mátrix vezikulumok termelésére, elősegítik az extracelluláris mátrixhoz való kötődést és további meszesedési gócok képződését [381, 382].

Az utóbbi néhány évben több megfigyelés született, miszerint a fetuin-A termelésének szabályozásában a fibroblast growth factor23 (FGF23) is részt vesz. A csont

ásványianyagcseréjét szabályozó FGF23-t az osteocyták, kisebb mértékben az osteoblastok is termelik. Ahogy nemrégén kiderült, felnőttekben kis mennyiségben az osteocyták is termelnek fetuin-A-t [383]. Az FGF23 serkenti az osteocyták fetuin-A mRNS expresszióját, és a két molekula szoros egymás mellettiségben mutatható ki az osteocyták sejtmagjában [383]. Emellett az FGF23 a májban is termelődik, de nem szekretálódik [384]. Mattinzoli és mtsai kísérleteiben az FGF23 mintegy 600 pg/ml értékig fokozta, magasabb koncentrációban gátolta a fetuin-A expressziót a májsejtekben, bár a teljes koncentrációtartományban (100–12 500 pg/ml) stimulálta a fetuin-A promotert [384]. Nemcsak a fetuin-A, hanem gyulladásos citokinek, a TNF α (TNFSF2) és az IL-6 kifejeződését is serkentette. A csontszövetben termelt fetuin-A jelentősége nem ismert, a keringésben döntően a hepatikus eredetű fetuin-A mérhető.

Az FGF23 szerepe nem tisztázott, de azért érdekes ebből a szempontból, mert a másodlagos CPP-k fokozzák az FGF23 termelését [385]. A másodlagos CPP-k felszaporodásával és a fetuin-A szint csökkenésével a szervezetbe bejutó kalcium és foszfor nem a fiziológiás úton a csontok felé transzportálódik, hanem extraosseálisan rakódik le [377]. A calciphylaxis extraosseális kalcifikációval járó súlyos állapot, 50%-ot is meghaladó halálozással [386]. Elsőként mi határoztunk meg fetuin-A szintet calciphylaxisban egy, a Pécsi Tudományegyetem ÁOK II. Sz. Belgyógyászati Klinikáján kezelt betegben, mely jelentősen csökkent volt (408 mg/l vs. a normálérték referencia tartománya 501–685 mg/l) [387]. Megjegyzendő, hogy a fetuin-A és a szérum kalcium, valamint a foszfor koncentrációja között ép veseműködés esetében nem találtak korrelációt mások sem, mi sem.

Mivel a fetuin-A szint és az atherosclerosis kapcsolatát számos tényező befolyásolja (BMI, inzulinrezisztencia, cukorbetegség, egyéb gyulladásos folyamat), a fetuin-A koncentrációjának mérése nem alkalmas az érleszesedés mértékének meghatározására. Vizsgálatunk értéke, hogy normál veseműködés esetén is korrelációt mutattunk ki a meszesedés radiológiai paraméterei és a fetuin-A szint között.

Krónikus veseelégtelenségben szenvedő, dializált betegekben a csökkent szérum fetuin-A koncentráció fokozott kardiovaszkuláris halálozással társul. Prognosztikus szerepét számosan igazolták [22, 352, 354, 388, 389]. Mi ilyen betegeket nem vizsgáltunk.

8. A fetuin-A rs4917 és rs4918 polimorfizmus kapcsolata az elhízással

A fetuin-A-nak a bevezető részben említett polimorfizmusai közül mi az rs4917-et és az rs4918-at vizsgáltuk, mert – ahogy ezt később részletezem –, ellentmondásos közlések jelentek meg az irodalomban ezek jelentőségéről és hatásáról, és kíváncsiak voltunk arra, hogy találunk-e eltérést az egyes SNP-k között a mi kisszámú, de homogén csoportjaink antropológiai és anyagcsere paramétereiben. A másik ok pedig az volt, hogy a világ számos pontján meghatározták a fetuin-A fő polimorfizmusának (AHS_{G1/2}) eloszlását, azonban a Kárpát-medencében, így Magyarországon ilyen vizsgálatot még nem végeztek.

Az rs4917 polimorfizmus a fetuin-A molekula 6. exon D3 domén régióját érinti. A major variáns C nukleotidja a (bevezető szekvencia 18 aminosavával együtt számolva) a 248. helyen ACG-t, threonint, a minor variáns T allél (ATG) methionint kódol (Thr248Met) [390]. A minor variáns az amerikai kontinensen a leggyakoribb (0,403), különösen Dél-Amerikában (kis elemszámú vizsgálat Peruban: 0,600), és Dél-Ázsiában (0,184), valamint Afrikában (0,213) a legritkább.

Az rs4918 polimorfizmus a 7. exonban található, mely szintén a D3 domén régióba esik. A major variáns C nukleotidja a 256. helyen szintén threonint (ACC), a minor variáns G nukleotidja ugyanitt szerint (AGC) kódol (Thr256Ser) [390]. A G minor variáns is az amerikai kontinensen a leggyakoribb (0,412), különösen Dél-Amerikában (kis elemszámú vizsgálat Peruban: 0,594), és Dél-Ázsiában (0,184), valamint Afrikában (0,291) a legritkább.

Mindkét SNP major/minor variáns eloszlása Európában 0,676/0,324 (szélső értékek: 0,729/0,271 Toscana, Olaszország, illetve 0,615/0,385 angol és skót britek). Ezek az adatok a két SNP szoros kapcsoltságára utalnak¹¹.

A fetuin-A izoelektromos fókuszálással meghatározott variánsai közül az AHS_{G1-1}-et a (itt most a bevezető szekvencia nélkül számolt) 230. és a 238. aminosav Thr/Thr, az AHS_{G2-2}-t ugyanezek a helyeken a Met/Ser aminosav jelenti [390]. Az rs4917 és az

¹¹ www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=3:186337213-186338213;v=rs4917;vdb=variation;vf=10062 és www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=3:186337882-186338882;v=rs4918;vdb=variation;vf=10063 (megtekintve: 2020.01.04-én)

rs4918 polimorfizmusok meghatározásával e két aminosav hatását külön is tudtuk vizsgálni.

Több fetuin-A SNP anyagcsere hatását tanulmányozták. Vannak megfigyelések a szérumban fetuin-A koncentráció és az rs4917 [116, 391-393], valamint az AHSG 1-2 [394] polimorfizmus kapcsolatáról.

Az rs4917 SNP-ket kapcsolatba hozták az elhízással [99, 392], a T2DM-mel [395, 396], az érlemezéssel és a halálozással [116, 396]. Ezekben a tanulmányokban a minor variánsok protektív szerepét mutatták ki. Mások nem találtak összefüggést az SNP-vel ezekben a kórállapotokban [397-399]. A diszlipidémiát a -469 T/G (rs2077119) SNP-vel hozták kapcsolatba [395, 397].

Az rs2248690 SNP minor variánsa is alacsonyabb fetuin-A koncentrációval társult, de a cukorbetegség kockázata nem volt magasabb [396, 400]. Ez az SNP a fetuin-A promotor régiójában helyezkedik el, és hatással van a transzkripcióra, valószínűleg az AP-1-gyel történő különböző mértékű kötődés révén [401]. Az EPIC Potsdam Study-ban az rs2248690, rs4917 és a szívinfarktus kockázata közötti szoros kapcsolatot mutattak ki [116]. Mások nem találtak összefüggést az rs4917, rs2248690 és rs2518136 variánsok és a klinikai atherosclerosis között [402]. Müssig és mtsai mágneses rezonancia vizsgálattal nem találtak összefüggést az általuk vizsgált öt SNP (rs2248690, rs4831, rs2070635, rs4917 és rs1071592) és a testzsíreloszlás között [393].

A fetuin-A 6. exonjára eső rs4917 (Thr248Met) polimorfizmusával kapcsolatban több, egymásnak ellentmondó közlés jelent meg. Több szerző talált összefüggést a szérumban fetuin-A koncentrációval [116, 391-394], a diszlipidémiával [395, 397], az elhízással [99, 392, 396], a T2DM-mel [395, 396], az atherosclerosis-sal és a halálozással [116, 396], míg mások nem észleltek ilyen kapcsolatot a felsorolt klinikai állapotokban [395, 397-399].

A 7. exonban található rs4918 (Thr256Ser) polimorfizmussal kapcsolatban megfigyeltek még ellentmondásosabbakat. Lavebratt és mtsai a G allél gyakoribb megjelenését figyelték meg sovány svéd férfiak között [392]. Mások kevésbé előnyösnek találták a G allélt, mivel veseátültetett betegekben fokozott halálozással társult [403], illetve az ischaemiás stroke nagyobb kockázatát jelentette a C allélhoz képest [404].

Célul tűztük ki az rs4917 és rs4918 polimorfizmus allél magyarországi megoszlásának vizsgálatát, valamint azok kapcsolatának vizsgálatát az elhízással (BMI), a lipid státusszal

(össz-koleszterin, LDL-, HDL-koleszterin, triglicerid), a proinflammatorikus citokinekkal (TNF α) és adipokinekkal (adiponektinnel, rezisztinnel), két, egymástól független kohorszban.

8.1. Vizsgált személyek és módszerek

8.1.1. Kohorszok

Az 1. kohorszban férfi/nő arány az rs4917 esetében CC: 7/31, CT: 7/25, TT: 2/9, az rs4918-nál CC: 8/31, CT: 7/25, TT: 2/8 volt.

A 2. kohorszba az általános részben leírt posztinfarktusos betegek közül 157 beteg tartozott (103 férfi, 54 nő, életkor: $59,4 \pm 12,2$ év, átlag $\pm$ SD). Közülük 49 cukorbeteg volt, mindegyikük T2DM. A posztinfarktusos csoportba 42 obesez (BMI ≥ 30 kg/m²) és 115 nem-obesez beteg tartozott. A posztinfarktusos csoportban az egyes genotípusokhoz tartozó férfi/nő arány a következő volt: CC: 48/30 CT: 40/18 TT: 15/6.

Ebben a vizsgálat-sorozatban szerepelt egy 3. kohorsz is, melybe egyéb betegség miatt kórházba utalt 239 referencia személy (93 férfi, 146 nő, életkor: $41,8 \pm 22,2$ év) tartozott. Őket abból a célból tipizáltunk, hogy az 1. és 2. kohorszba tartozó egyénekkel együtt meghatározzuk az rs4917 és rs4918 polimorfizmusok eloszlását a magyar népességben. Ilyen hazai vizsgálat még nem történt. Mivel a 3. kohorszba tartozó személyek számos adata hiányzott, nem törekedtünk sem alcsoportok vizsgálatára, sem pedig – az SNP eloszlás vizsgálatától eltekintve – a másik két kohorsszal történő összehasonlításra. A vizsgálatot a Budapesti Károlyi Sándor Kórház Etikai Tanácsa hagyta jóvá.

8.1.2. Genotipizálás

Az rs4917 és az rs4918 SNP-k genotipizálását kompetitív allélspecifikus PCR (KASP) módszerrel (LGC Genomics, Berlin, Németország) végeztük. A PCR reakcióhoz 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) eszközt használtunk. Mintánként 20 ng genomikus DNS-t használtunk 8 μ l teljes térfogatban 37 cikluson keresztül. Az SNP klasszikus 3 klaszteres mintázatot tekintettük sikeresnek és polimorfnak. A genotipizálást 9 mintával (a CC, CT és TT genotípusok mindegyikéből 3 párhuzamos) monitoroztuk mindegyik mérés esetében. Ezeket a genotípusokat szintén a KASP rendszerrel határoztuk meg. A sikeres genotipizálás aránya 99% felett volt.

8.1.3. Egyéb laboratóriumi vizsgálatok

A szérumban fetuin-A, adiponektin, rezisztin, leptin és plazma inzulin koncentrációt az általános részben leírt módon határoztuk meg. A plazma glukóz, össz-, LDL- és HDL-koleszterin és triglicerid szint mérése rutin laboratóriumi módszerekkel történt.

8.2. Eredmények

8.2.1. A vizsgált allélok eloszlása a három kohorszban

Az rs4917 és az rs4918 allél eloszlását a 8.1. táblázat mutatja. Az allélok eloszlása egyik SNP esetében sem különbözött a két kohorszban, de látható hogy a két SNP szoros kapcsolatban van egymással.

8.1. táblázat. Az rs4917 (A) és rs4918 (B) allélok eloszlása a vizsgált kohorszokban

A. rs4917 polimorfizmus								
	Genotípus[#]				Nukleotid szám		Nukleotid frekvencia[§]	
	CC	CT	TT	Összesen	C	T	C	T
1. kohorsz	38	32	11	81	108	54	0,667	0,333
2. kohorsz	81	61	15	157	223	91	0,710	0,290
3. kohorsz	117	106	16	239	340	138	0,711	0,289
Összesen	236	199	42	477	671	283	0,703	0,297
#: A CC, CT és TT genotípus összehasonlítása a három kohorsz között. $\chi^2 = 4,471$, $p = 0,346$ §: A C és T nukleotid gyakoriságának összehasonlítása a három kohorsz között. $\chi^2 = 1,260$, $p = 0,533$								

B. rs4918 polimorfizmus								
	Genotípus[#]				Nukleotid szám		Nukleotid frekvencia[§]	
	CC	CG	GG	Összesen	C	G	C	G
1. kohorsz	39	32	10	81	110	52	0,679	0,321
2. kohorsz	80	61	15	156	221	91	0,708	0,292
3. kohorsz	118	105	16	239	341	137	0,713	0,287
Összesen	237	198	41	476	672	280	0,706	0,294
#: A CC, CG és GG genotípus összehasonlítása a három kohorsz között: $\chi^2 = 3,267$, $p = 0,514$ §: A C és G nukleotid gyakoriságának összehasonlítása a három kohorsz között: $\chi^2 = 0,702$, $p = 0,704$								

8.2.2. Az rs4917 és rs4918 allélok és az elhízás kapcsolata az 1. kohorszban

Az 1. kohorsz antropológiai paramétereit a 8.2. táblázat mutatja.

8.2. táblázat. Az rs4917 (A) és rs4918 (B) genotípusok összehasonlítása az 1. kohorszban (átlag $\pm$ SD)

A. rs4917 polimorfizmus				
Paraméter	CC homozigóta (n = 38)	CT heterozigóta (n = 32)	TT homozigóta (n = 11)	p[#]
Fetuin-A (mg/l)	609 $\pm$ 85	625 $\pm$ 88	573 $\pm$ 100	0,269
BMI (kg/m ²)	24,0 $\pm$ 1,8	24,1 $\pm$ 1,5	24,1 $\pm$ 1,6	0,831
Haskőrfogat (cm)	87 $\pm$ 11	88 $\pm$ 9	85 $\pm$ 11	0,610
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,41 $\pm$ 0,86	4,99 $\pm$ 0,83	4,80 $\pm$ 0,51	0,492
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,39 $\pm$ 0,44	2,66 $\pm$ 0,82	2,28 $\pm$ 0,32	0,020 0,027^s
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,33 $\pm$ 0,14	1,55 $\pm$ 0,28	1,57 $\pm$ 0,30	0,174
Triglicerid (mmol/l)	1,91 $\pm$ 1,14	1,69 $\pm$ 0,88	1,54 $\pm$ 0,72	0,497
TNFα (pg/ml)	4,11 $\pm$ 0,27	4,09 $\pm$ 0,02	3,89 $\pm$ 0,21	0,017 0,037^s
Ghrelin (pg/ml)	337 $\pm$ 26	343 $\pm$ 30	322 $\pm$ 22	0,111
Adiponektin (μ g/ml)	12,2 $\pm$ 3,40	12,8 $\pm$ 2,80	13,8 $\pm$ 2,74	0,101
Rezisztin (ng/ml)	6,76 $\pm$ 2,31	5,60 $\pm$ 2,57	6,95 $\pm$ 3,36	0,113
Leptin (ng/ml)	10,6 $\pm$ 8,85	14,1 $\pm$ 9,55	13,3 $\pm$ 9,69	0,277
C-peptid (ng/ml)	1,08 $\pm$ 0,34	1,13 $\pm$ 0,40	1,10 $\pm$ 0,31	0,846
Glukóz (mmol/l)	4,56 $\pm$ 0,42	4,41 $\pm$ 0,37	4,29 $\pm$ 0,40	0,102
C-peptid / plazma glukóz	0,24 $\pm$ 0,80	0,26 $\pm$ 0,09	0,26 $\pm$ 0,07	0,723
Inzulin (μ U/ml)	5,26 $\pm$ 1,15	5,13 $\pm$ 1,10	5,54 $\pm$ 0,73	0,337
HOMA-IR	1,04 $\pm$ 0,32	1,09 $\pm$ 0,38	1,06 $\pm$ 0,30	0,846

B. rs4918 polimorfizmus				
Paraméter	CC homozigóta (n = 39)	CG heterozigóta (n = 32)	GG homozigóta (n = 10)	p[#]
Fetuin-A (mg/l)	605 $\pm$ 84	627 $\pm$ 85	613 $\pm$ 117	0,185
BMI (kg/m ²)	23,9 $\pm$ 1,7	24,1 $\pm$ 1,4	24,5 $\pm$ 1,6	0,257
Haskőrfogat (cm)	87 $\pm$ 11	88 $\pm$ 8	87 $\pm$ 10	0,872
Össz-koleszterin (mmol/l)	4,98 $\pm$ 1,07	4,96 $\pm$ 0,83	5,13 $\pm$ 1,35	0,930
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,13 $\pm$ 0,64	2,65 $\pm$ 0,82	1,93 $\pm$ 0,40	0,292
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,39 $\pm$ 0,20	1,54 $\pm$ 0,27	1,49 $\pm$ 0,41	0,597
Triglicerid (mmol/l)	1,85 $\pm$ 1,13	1,71 $\pm$ 0,88	1,64 $\pm$ 0,75	0,950
TNFα (pg/ml)	4,11 $\pm$ 0,25	4,10 $\pm$ 0,20	3,85 $\pm$ 0,22	0,013 0,007^s
Ghrelin (pg/ml)	336 $\pm$ 26	343 $\pm$ 29	321 $\pm$ 24	0,090
Adiponektin (μ g/ml)	12,3 $\pm$ 3,37	12,7 $\pm$ 2,87	14,3 $\pm$ 2,30	0,131

B. rs4918 polimorfizmus				
Paraméter	CC homozigóta (n = 39)	CG heterozigóta (n = 32)	GG homozigóta (n = 10)	p[#]
Rezisztin (ng/ml)	6,64 ± 2,24	5,76 ± 2,67	6,96 ± 3,52	0,264
Leptin (ng/ml)	10,7 ± 9,2	13,8 ± 9,2	14,1 ± 9,8	0,109
C-peptid (ng/ml)	1,07 ± 0,31	1,15 ± 0,42	1,07 ± 0,29	0,247
Glukóz (mmol/l)	4,58 ± 0,42	4,39 ± 0,36	4,22 ± 0,34	0,052
C-peptid / plazma glukóz	0,23 ± 0,08	0,26 ± 0,10	0,25 ± 0,06	0,400
Inzulin (μU/ml)	5,30 ± 1,16	5,05 ± 0,99	5,62 ± 0,93	0,348
HOMA-IR	1,01 ± 0,33	1,11 ± 0,40	1,03 ± 0,28	0,554

#: Kruskal-Wallis teszt; §: CC vs. TT, ill. CC vs. GG post-hoc p, ha a Kruskal-Wallis tesztben $p < 0,05$; BMI: testtömeg index; LDL: low density koleszterin; HDL: high density koleszterin; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2); HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance

A többszörös összehasonlítás során az egyes rs4917 genotípusok esetében csak az LDL-koleszterin és a TNFα (TNFSF2) koncentráció esetében találtunk szignifikáns eltérést. A T allél megjelenésével az össz-koleszterin érték is csökkent, bár a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A CC homozigótáknak magasabb LDL-koleszterin és TNFα (TNFSF2) szintjük volt, mint a TT homozigótáknak (Mann-Whitney teszt, $p = 0,017$, mindkét esetben). A T nukleotid jelenléte szintén alacsonyabb össz-koleszterin ($4,08 \pm 0,51$ vs. $5,41 \pm 0,86$ mmol/l, $n = 43$, $p = 0,018$), LDL-koleszterin ($2,13 \pm 0,21$ vs. $3,03 \pm 0,72$ mmol/l, $p = 0,020$) és TNFα (TNFSF2) ($3,90 \pm 0,21$ vs. $4,10 \pm 0,24$ pg/ml, $n = 38$, $p = 0,010$), magasabb leptin ($13,91 \pm 9,47$ vs. $10,62 \pm 8,85$ ng/ml, $p = 0,029$) szinttel társult, mint a nem-T nukleotid esetében.

Az rs4918 genotípusok összehasonlításakor csak a TNFα (TNFSF2) koncentrációk között találtunk szignifikáns különbséget. A nem G hordozókhoz ($n = 39$) képest a G nukleotid jelenléte ($n = 42$) szignifikánsan alacsonyabb TNFα (TNFSF2) ($3,85 \pm 0,22$ vs. $4,10 \pm 0,23$ pg/ml, $p = 0,003$), magasabb leptin ($13,9 \pm 9,23$ vs. $10,7 \pm 9,19$ ng/ml, $p = 0,036$) és alacsonyabb adiponektin ($12,4 \pm 3,14$ vs. $14,3 \pm 2,30$ μg/ml, $p = 0,047$) szinttel társult.

8.2.3. Az rs4917 és rs4918 allélok és az elhízás kapcsolata a 2. kohorszban

Az rs4917 genotípusok többszörös összehasonlítása során szignifikáns különbségeket találtuk a derékkörfogatban (8.3. táblázat). A BMI és a haskörfogat szintén csökkenő trendet mutatott a T allél megjelenésekor. A T allélt hordozóknak ($n = 76$) szignifikánsan alacsonyabb BMI-jük ($27,2 \pm 4,6$ vs. $28,6 \pm 3,8$ kg/m², $p = 0,019$), haskörfogatuk (101 ± 12

vs. 103 ± 10 cm, $p = 0,040$) és derékkörfogatuk (102 ± 9 vs. 106 ± 8 cm, $p = 0,003$) volt, mint a T nukleotid hiányakor ($n = 81$).

Az rs4918 SNP-k többszörös összehasonlításakor a derékkörfogatban találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést, de a minor variáns G allél megjelenésekor csökkenő BMI trendet figyeltünk meg. A G allélt hordozóknak ($n = 76$) szignifikánsan alacsonyabb BMI-jük ($27,3 \pm 4,6$ vs. $28,6 \pm 3,8$ kg/m², $p = 0,017$) és derékkörfogatuk (102 ± 9 vs. 106 ± 8 cm, $p = 0,002$) volt, mint a G nukleotid hiányában ($n = 81$). Egyéb paraméterek, a haskörfogatot is beleértve (101 ± 12 vs. 104 ± 10 cm, $p = 0,168$), nem különböztek szignifikánsan a G és nem G csoport között.

8.3. táblázat. Az rs4917 (A) és rs4918 (B) genotípusok összehasonlítása a 2. kohorszban (átlag $\pm$ SD)

A. rs4917 polimorfizmus				
Paraméter	CC homozigóta (n = 81)	CT heterozigóta (n = 61)	TT homozigóta (n = 15)	p [#]
Fetuin-A (mg/l)	668 ± 112	689 ± 112	641 ± 103	0,483
BMI (kg/m ²)	$28,6 \pm 3,8$	$27,2 \pm 4,5$	$27,5 \pm 5,0$	0,065
Haskörfogat (cm)	103 ± 10	101 ± 13	100 ± 11	0,418
Derékkörfogat (cm)	106 ± 8	102 ± 9	102 ± 9	0,009 0,034^s
Össz-koleszterin (mmol/l)	$5,37 \pm 1,25$	$5,12 \pm 1,13$	$5,53 \pm 1,24$	0,623
LDL-koleszterin (mmol/l)	$3,39 \pm 0,44$	$2,66 \pm 0,82$	$2,28 \pm 0,32$	0,567
HDL-koleszterin (mmol/l)	$1,23 \pm 0,28$	$1,20 \pm 0,28$	$1,13 \pm 0,29$	0,275
Triglicerid (mmol/l)	$1,90 \pm 1,17$	$1,75 \pm 0,80$	$1,67 \pm 0,58$	0,963
TNF α (pg/ml)	$6,09 \pm 1,72$	$6,15 \pm 1,88$	$5,89 \pm 1,75$	0,841
Ghrelin (pg/ml)	$241 \pm 62,1$	$241 \pm 58,4$	$236 \pm 54,9$	0,955
Adiponektin (μ g/ml)	$9,45 \pm 4,35$	$8,63 \pm 4,30$	$8,53 \pm 3,21$	0,419
Rezisztin (ng/ml)	$9,25 \pm 5,72$	$10,19 \pm 7,11$	$8,93 \pm 4,03$	0,784
C-peptid (ng/ml)	$3,33 \pm 2,26$	$3,05 \pm 1,79$	$3,87 \pm 3,35$	0,897
Glukóz (mmol/l)	$5,52 \pm 1,67$	$5,93 \pm 1,74$	$5,43 \pm 0,75$	0,317
C-peptid / plazma glukóz	$0,73 \pm 0,41$	$0,66 \pm 0,42$	$0,74 \pm 0,49$	0,283
Inzulin (μ U/ml)	$24,09 \pm 16,02$	$22,14 \pm 12,93$	$27,62 \pm 22,62$	0,883
HOMA-IR	$5,56 \pm 3,58$	$5,61 \pm 3,30$	$5,62 \pm 3,93$	0,956

B. rs4918 polimorfizmus				
Paraméter	CC homozigóta (n = 81)	CG heterozigóta (n = 61)	GG homozigóta (n = 15)	p[#]
Fetuin-A (mg/l)	682 ± 125	680 ± 94	611 ± 102	0,185
BMI (kg/m ²)	28,6 ± 3,8	27,2 ± 4,5	27,5 ± 5,0	0,048 0,204 [§]
Haskőrfogat (cm)	103 ± 10	101 ± 12	100 ± 11	0,333
Derékkőrfogat (cm)	106 ± 8	102 ± 9	102 ± 9	0,005 0,026[§]
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,38 ± 1,26	5,10 ± 1,13	5,43 ± 1,25	0,673
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,23 ± 0,97	3,11 ± 0,96	3,32 ± 0,76	0,618
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,23 ± 0,28	1,20 ± 0,27	1,10 ± 0,27	0,112
Triglicerid (mmol/l)	1,90 ± 1,17	1,76 ± 0,80	1,66 ± 0,58	0,934
TNFα (pg/ml)	6,07 ± 1,70	6,15 ± 1,88	5,89 ± 1,75	0,848
Ghrelin (pg/ml)	240 ± 62,3	241 ± 58,3	236 ± 54,9	0,945
Adiponektin (μg/ml)	9,29 ± 4,13	8,63 ± 4,30	8,53 ± 3,21	0,486
Rezsztin (ng/ml)	9,24 ± 5,73	10,19 ± 7,11	8,93 ± 4,03	0,756
Leptin (ng/ml)	32,2 ± 19,3	29,2 ± 18,0	31,0 ± 10,6	0,676
C-peptid (ng/ml)	3,36 ± 2,26	3,05 ± 1,79	3,87 ± 3,35	0,866
Glukóz (mmol/l)	5,51 ± 1,68	5,93 ± 1,74	5,43 ± 0,75	0,275
C-peptid / plazma glukóz	0,74 ± 0,40	0,66 ± 0,42	0,74 ± 0,49	0,210
Inzulin (μU/ml)	24,2 ± 16,0	22,1 ± 12,9	27,6 ± 22,6	0,850
HOMA-IR	5,56 ± 3,58	5,61 ± 3,29	5,62 ± 3,91	0,977

#: Kruskal-Wallis teszt; §: CC vs. TT, ill. CC vs. GG post-hoc p, ha a Kruskal-Wallis tesztben $p < 0,05$; BMI: testtömeg index; LDL: low density koleszterin; HDL: high density koleszterin; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2); HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance

8.2.4. A diabéteszes és nem diabéteszes betegek összehasonlítása a 2. kohorszban

Az rs4917 SNP vizsgálata során a 2. kohorszban 49 diabéteszes egyén volt. Laboratóriumi paramétereiket a 8.4. táblázatban hasonlítjuk össze.

8.4. táblázat. A posztinfarktusos diabéteszes és nem diabéteszes betegek laboratóriumi paramétereinek összehasonlítása az rs4917 (A) és az rs4918 (B) SNP vizsgálata során (átlag ± SD)

A. rs4917 polimorfizmus			
Paraméter	Diabéteszes (n = 49)	Nem diabéteszes (n = 108)	p[#]
Fetuin-A (mg/l)	679 ± 110	670 ± 112	0,464
BMI (kg/m ²)	28,8 ± 4,47	27,7 ± 3,93	0,176

8.4. táblázat. A posztinfarktusos diabéteszes és nem diabéteszes betegek laboratóriumi paramétereinek összehasonlítása az rs4917 (A) és az rs4918 (B) SNP vizsgálata során (átlag $\pm$ SD)

A. rs4917 polimorfizmus			
Paraméter	Diabéteszes (n = 49)	Nem diabéteszes (n = 108)	p[#]
Haskőrfogat (cm)	104 $\pm$ 12	101 $\pm$ 11	0,232
Derékkőrfogat (cm)	105 $\pm$ 9	104 $\pm$ 8	0,420
Derék/csípőkőrfogat hányados	0,99 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,07	0,418
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,27 $\pm$ 1,18	5,30 $\pm$ 1,23	0,645
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,16 $\pm$ 0,89	3,26 $\pm$ 0,91	0,393
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,17 $\pm$ 0,24	1,23 $\pm$ 0,29	0,386
Triglicerid (mmol/l)	1,94 $\pm$ 1,03	1,81 $\pm$ 0,95	0,455
TNF (pg/ml)	6,12 $\pm$ 2,01	6,13 $\pm$ 1,66	0,653
Ghrelin (pg/ml)	231 $\pm$ 53	245 $\pm$ 62	0,154
Adiponektin (μg/ml)	9,32 $\pm$ 5,06	8,92 $\pm$ 3,95	0,971
Rezsztin (ng/ml)	10,7 $\pm$ 7,62	9,23 $\pm$ 5,89	0,316
Leptin (ng/ml)	35,7 $\pm$ 20,5	29,6 $\pm$ 16,8	0,393
Proinzulin (pmol/l)	13,9 $\pm$ 8,79	13,4 $\pm$ 8,01	0,722
C-peptid (ng/ml)	3,91 $\pm$ 2,25	3,00 $\pm$ 2,13	0,008
C-peptid / plazma glukóz	0,66 $\pm$ 0,39	0,71 $\pm$ 0,42	0,351
Glukóz (mmol/l)	7,19 $\pm$ 2,13	5,03 $\pm$ 0,68	<0,001
Inzulin (μU/ml)	28,3 $\pm$ 16,3	21,7 $\pm$ 14,8	0,008
HOMA-IR	7,69 $\pm$ 3,46	4,67 $\pm$ 3,04	<0,001

B. rs4918 polimorfizmus			
Paraméter	Diabéteszes (n = 48)	Nem diabéteszes (n = 109)	p[#]
Fetuin-A (mg/l)	683 $\pm$ 108	670 $\pm$ 113	0,374
BMI (kg/m ²)	28,8 $\pm$ 4,51	27,7 $\pm$ 3,93	0,187
Haskőrfogat (cm)	104 $\pm$ 12	101 $\pm$ 10	0,200
Derékkőrfogat (cm)	105 $\pm$ 10	104 $\pm$ 8	0,510
C-peptid (ng/ml)	3,93 $\pm$ 2,27	3,00 $\pm$ 2,13	0,008
C-peptid / plazma glukóz	0,66 $\pm$ 0,39	0,71 $\pm$ 0,42	0,351
Glukóz (mmol/l)	7,08 $\pm$ 1,99	5,03 $\pm$ 0,68	<0,001
Inzulin (μU/ml)	28,4 $\pm$ 16,4	21,7 $\pm$ 14,8	0,008
HOMA-IR	7,62 $\pm$ 3,45	4,67 $\pm$ 3,04	<0,001
HOMA-B	194 $\pm$ 133	260 $\pm$ 147	0,004

#: Mann-Whitney teszt; BMI: testtömeg index; LDL: low density cholesterin; HDL: high density cholesterin; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2); HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance; HOMA-B: Homeostasis Model Assessment - béta sejt funkció

A cukorbeteg és nem diabéteszes posztinfarktusos csoport csak az inzulinrezisztencia paramétereiben (glukóz, C-peptid, HOMA-IR és HOMA-B) különbözött egymástól, de az

elhízást direkt jellemző paraméterekben nem. A kis esetszám miatt nem volt lehetőség a CC (n = 25) és a TT (n = 3) homozigóták vagy a C allélt hordozók (n = 46) és a C allélt nem hordozók (n = 3) összehasonlítására a diabéteszes csoporton belül. A vizsgált paraméterek nem különböztek egymástól a T allél jelenlétében (n = 24) vagy hiányában (n = 25).

A 2. kohorszban az rs4918 SNP-re sikeresen tipizált betegek között eggyel kevesebb cukorbeteg és eggyel több nem cukorbeteg volt (8.4. táblázat). A nem cukorbeteghez hasonlítva itt is csak az inzulinrezisztencia előbb felsorolt paramétereiben találtunk eltérést a két csoport között, de az elhízás paramétereiben nem. A kis esetszám miatt itt sem volt lehetőség a CC (n = 24) és a GG (n = 3) homozigóták vagy a C allélt hordozók (n = 45) és a C allélt nem hordozók (n = 3) összehasonlítására a diabéteszes csoporton belül. A vizsgált paraméterek nem különböztek egymástól a G allél jelenlétében (n = 24) vagy hiányában (n = 24).

A 2. kohorszban az rs4917 SNP nem cukorbetegeket vizsgálva a CC homozigótákat (n = 50) a TT homozigótákhoz (n = 8) hasonlítva nem találtunk különbséget egyik paraméterben sem, a C (n = 56) és a nem C (n = 52) allélt hordozók között sem. A nem cukorbetegek között a T allélt hordozók és nem hordozók BMI-je, has- és derékkörfogata ebben a kohorszban is jelentősen különbözött egymástól (8.5. táblázat).

8.5. táblázat. A 2. kohorsz nem cukorbetegai között az rs4917 T allélt hordozók és nem hordozók paramétereinek összehasonlítása (átlag ± SD)

Paraméter	T allél (n = 52)	nem-T allél (n = 56)	p [#]
Fetuin-A (mg/l)	669 ± 122	671 ± 108	0,941
BMI (kg/m²)	26,4 ± 4,0	28,6 ± 3,8	0,002
Haskőrfogat (cm)	98 ± 11	104 ± 9	0,034
Derékkőrfogat (cm)	101 ± 7	106 ± 8	<0,001
Derék/csípőkőrfogat hányados	0,98 ± 0,08	0,97 ± 0,06	0,400
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,31 ± 1,22	5,28 ± 1,25	0,540
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,34 ± 0,91	3,20 ± 0,91	0,566
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,21 ± 0,28	1,25 ± 0,31	0,485
Triglicerid (mmol/l)	1,72 ± 0,80	1,82 ± 1,09	0,820
TNFα (pg/ml)	6,05 ± 1,61	6,07 ± 1,71	0,944
Adiponektin (μg/ml)	8,99 ± 4,23	9,05 ± 3,79	0,606
Rezisztin (ng/ml)	9,19 ± 5,35	8,91 ± 5,09	0,731
Glukóz (mmol/l)	5,08 ± 0,65	4,97 ± 0,66	0,432
Inzulin (μU/ml)	22,0 ± 16,6	21,4 ± 13,2	0,708

#: Mann-Whitney teszt; BMI: testtömeg index; LDL: low density cholesterolin; HDL: high density cholesterolin; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2)

Az rs4918 SNP vizsgálatakor a 2. kohorszban nem cukorbetegeket vizsgálva nem találtunk jelentős különbséget a CC (n = 57) és a GG (n = 12) homozigóták között. Ugyanakkor a G allélt hordozóknak (n = 52) szignifikánsan alacsonyabb fetuin-A szintjük (602 ± 108 vs. 676 ± 110 mg/l, $p = 0,043$), BMI-jük ($26,4 \pm 4,0$ vs. $28,7 \pm 3,8$ kg/m², $p = 0,001$) és derékkörfogatuk (100 ± 7 vs. 106 ± 8 cm, $p < 0,001$) volt, mint a G allélt nem hordozóknak (n = 57). A haskörfogat átlaga is alacsonyabb volt az előbbi csoportban (99 ± 11 vs. 103 ± 10 cm, $p = 0,068$).

8.2.5. A 2. kohorsz obez és nem obez betegeinek összehasonlítása

Az rs4917 SNP-re tipizált posztinfarktusos betegek közül 42 volt elhízott (BMI ≥ 30 kg/m²). A normál testtömegű betegekhez képest paramétereik a BMI, a has- és a derékkörfogatban, a derék/csípőkörfogat, valamint a C-peptid/plazma glukóz hányadosban tértek el egymástól, de a TNF α (TNFSF2) szintjük is jelentősen magasabb volt (8.6. táblázat).

8.6. táblázat. A 30 kg/m² feletti és alatti BMI-jű posztinfarktusos betegek összehasonlítása (átlag $\pm$ SD)

A. rs4917 polimorfizmus			
Paraméter	Obez (n = 42)	Nem obez (n = 115)	p[#]
Fetuin-A (mg/l)	685 ± 112	669 ± 108	0,198
BMI (kg/m²)	$33,2 \pm 3,01$	$26,0 \pm 2,43$	<0,0001
Haskörfogat (cm)	$112 \pm 8,38$	$98 \pm 9,52$	<0,0001
Derékkörfogat (cm)	112 ± 9	102 ± 7	<0,0001
Derék/csípőkörfogat hányados	$1,01 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,08$	0,0001
Össz-koleszterin (mmol/l)	$5,20 \pm 1,32$	$5,33 \pm 1,14$	0,394
LDL-koleszterin (mmol/l)	$3,20 \pm 0,93$	$3,23 \pm 0,89$	0,619
HDL-koleszterin (mmol/l)	$1,14 \pm 0,23$	$1,24 \pm 0,29$	0,079
Triglicerid (mmol/l)	$1,99 \pm 1,05$	$1,79 \pm 0,95$	0,056
TNFα (pg/ml)	$6,69 \pm 1,77$	$5,91 \pm 1,72$	0,009
Ghrelin (pg/ml)	$250 \pm 71,7$	237 ± 53	0,524
Adiponektin (μ g/ml)	$8,53 \pm 4,78$	$9,24 \pm 4,12$	0,198
Rezsztin (ng/ml)	$11,6 \pm 8,14$	$8,96 \pm 5,58$	0,057
Leptin (ng/ml)	$38,1 \pm 20,5$	$29,9 \pm 17,4$	0,122
Proinzulin (pmol/l)	$13,9 \pm 7,67$	$13,4 \pm 8,53$	0,511
C-peptid (ng/ml)	$3,76 \pm 2,41$	$3,10 \pm 2,10$	0,097
C-peptid /plazma glukóz arány	$0,78 \pm 0,42$	$0,66 \pm 0,41$	0,021
Glukóz (mmol/l)	$5,69 \pm 1,47$	$5,70 \pm 1,71$	0,553

8.6. táblázat. A 30 kg/m² feletti és alatti BMI-jű posztinfarktusos betegek összehasonlítása (átlag ± SD)

A. rs4917 polimorfizmus			
Paraméter	Obez (n = 42)	Nem obez (n = 115)	p[#]
Inzulin (μU/ml)	27,0 ± 17,0	22,4 ± 14,8	0,106
HOMA-IR	6,25 ± 3,56	5,35 ± 3,40	0,120
HOMA-B	260 ± 153	230 ± 143	0,264

B. rs4918 polimorfizmus			
Paraméter	Obez (n = 43)	Nem obez (n = 114)	p[#]
Fetuín-A (mg/l)	699 ± 126	661 ± 105	0,053
BMI (kg/m²)	23,1 ± 2,9	26,0 ± 2,4	<0,001
Haskőrfogat (cm)	112 ± 8	98 ± 10	<0,001
Derékkőrfogat (cm)	111 ± 8	102 ± 7	<0,001
Derék/csípőkőrfogat hányados	1,00 ± 0,07	0,96 ± 0,08	<0,001
Össz-koleszterin (mmol/l)	5,20 ± 1,31	5,29 ± 1,14	0,520
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,14 ± 0,99	3,20 ± 0,90	0,653
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,14 ± 0,23	1,22 ± 0,29	0,107
Triglicerid (mmol/l)	1,99 ± 1,04	1,80 ± 0,95	0,066
TNFα (pg/ml)	6,69 ± 1,77	5,91 ± 1,72	0,009
Adiponektin (μg/ml)	8,53 ± 4,78	9,24 ± 4,12	0,198
Rezsztin (ng/ml)	11,6 ± 8,13	8,96 ± 5,58	0,057
Leptin (ng/ml)	38,1 ± 20,5	29,9 ± 17,4	0,122
C-peptid (ng/ml)	3,76 ± 2,41	3,10 ± 2,10	0,097
Glukóz (mmol/l)	5,69 ± 1,47	5,70 ± 1,71	0,553
Inzulin (μU/ml)	27,0 ± 16,9	22,4 ± 14,8	0,106

#: Mann-Whitney teszt; BMI: testtömeg index; LDL: low density cholesterolin; HDL: high density cholesterolin; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2); HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance; HOMA-B: Homeostasis Model Assessment - béta sejt funkció

A 30 kg/m² alatti BMI-jű betegeket az elhízottakkal összehasonlítva azt találtuk, hogy az előbbiekben az rs4917 esetében CC genotípus ritkábban, a TT pedig gyakrabban fordul elő (8.7 táblázat, A). Az rs4918 esetében a GG genotípussal figyeltük meg ugyanezt, bár a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns. A soványság és a minor allélok közötti összefüggés a T, illetve a G nukleotidok eloszlását nézve még nyilvánvalóbbá vált (8.7 táblázat, B). Az elhízott betegek genotípus és allél szerinti alcsoport analízise nem mutatott jelentős különbségeket.

8.7. táblázat. Az rs4917 és rs4918 SNP genotípusok (A) és allélok (B) eloszlása a BMI 30 kg/m² alatti és feletti posztinfarktusos betegek között

A

rs4917 polimorfizmus				
	Genotípus			
BMI	CC	CT	TT	Összesen
≥ 30 kg/m ²	28	11	3	42
< 30 kg/m ²	53	50	12	115
Összesen	81	61	15	157
$\chi^2 = 5,241, p = 0,073$				
rs4918 polimorfizmus				
	Genotípus			
BMI	CC	CG	GG	Összesen
≥ 30 kg/m ²	29	11	3	43
< 30 kg/m ²	52	50	12	114
Összesen	81	61	15	157
$\chi^2 = 5,980, p = 0,050$				
Lineáris asszociációs érték: 4,596, p = 0,032				

B

rs4917 polimorfizmus			
	Allél		
BMI	T	nem T	Összesen
≥ 30 kg/m ²	14	28	42
< 30 kg/m ²	62	53	115
Összesen	76	81	157
$\chi^2 = 5,217, p = 0,022$			
RR: 0,618, 95% CI: 0,390-0,979			
OR: 0,427, 95% CI: 0,204-0,895			
rs4918 polimorfizmus			
	Allél		
BMI	G	nem G	Összesen
≥ 30 kg/m ²	14	29	43
< 30 kg/m ²	62	52	114
Összesen	76	81	157
$\chi^2 = 5,957, p = 0,015$			
RR: 0,599, 95% CI: 0,377-0,951			
OR: 0,405, 95% CI: 0,194-0,846			

BMI: testtömeg index

Érdekes módon a BMI-nek az rs4917 TT genotípussal és a T alléllal való összefüggése a 2. kohorszba tartozó összes beteg esetében szignifikáns volt, de ez az összefüggés éppen a nem diabéteszes betegekben volt a legkifejezettebb (8.8. táblázat). A BMI és az rs4918 SNP

(mind a CC, CG GG genotípus, mind a C allél) csak a nem diabéteszesekben mutatott szignifikáns kapcsolatot. A minor G variáns esetén alacsonyabb BMI-t figyeltünk meg. A kövér betegeket a genotípusok és allélok szerint alcsoportokra osztva nem találtunk szignifikáns különbséget az antropometrikus és metabolikus paraméterekben.

8.8. táblázat. A BMI, valamint az rs4917 és rs4918 SNP polimorfizmus közötti kapcsolat posztinfarktusos betegekben. A: rs4917 genotípusok (CC, CT, TT), B: rs4917 allélok (T, nem T), C: rs4918 genotípusok (CC, CG, GG), D: rs4918 allélok (G, nem G)

A

	Genotípus	BMI (kg/m ²)				Összesen
		0-25	26-29	30-39	40-	
Nem diabéteszes betegek	CC	16	21	19	0	56
	CT	22	15	3	0	40
	TT	5	4	2	1	12
	Összesen	43	40	24	1	108
	$\chi^2 = 19,676, p = 0,003$ Lineáris asszociációs érték: 3,733, p = 0,030					
Diabéteszes betegek	CC	10	6	9	0	25
	CT	7	6	7	1	21
	TT	1	2	0	0	3
	Összesen	18	14	16	1	49
	$\chi^2 = 4,256, p = 0,642$ Lineáris asszociációs érték: 0,000, p = 1,000					
2. kohorsz, összes beteg	CC	26	27	28	0	81
	CT	29	21	10	1	61
	TT	6	6	2	1	15
	Összesen	61	54	40	2	157
	$\chi^2 = 12,296, p = 0,056$ Lineáris asszociációs érték: 2,650, p = 0,104					

BMI: testtömeg index

B

	Allél	BMI (kg/m ²)				Összesen
		0-25	26-29	30-39	40-	
Nem diabéteszes betegek	T	27	19	5	1	52
	nem T	16	21	19	0	56
	Összesen	43	40	24	1	108
	$\chi^2 = 11,949, p = 0,008$ Lineáris asszociációs érték: 8,108, p = 0,004					
Diabéteszes betegek	T	8	8	7	1	24
	nem T	10	6	9	0	25
	Összesen	18	14	16	1	49
	$\chi^2 = 1,738, p = 0,628$					

	Allél	BMI (kg/m ²)				Összesen
		0-25	26-29	30-39	40-	
2. kohorsz, összes beteg	Lineáris asszociációs érték: 0,103, p = 0,748					
	T	35	37	12	2	76
	nem T	26	27	28	0	81
	Összesen	61	54	40	2	157
	$\chi^2 = 9,578$, p = 0,023 Lineáris asszociációs érték: 4,307, p = 0,038					

BMI: testtömeg index

C

	Genotípus	BMI (kg/m ²)				Összesen
		0-25	26-29	30-39	40-	
Nem diabéteszes betegek	CC	13	22	22	0	57
	CG	16	20	4	0	40
	GG	5	4	2	1	12
	Összesen	34	46	28	1	109
	$\chi^2 = 19,671$, p = 0,003 Lineáris asszociációs érték: 4,416, p = 0,036					
Diabéteszes betegek	CC	7	8	9	0	24
	CG	6	5	9	1	21
	GG	1	2	0	0	3
	Összesen	14	15	18	1	48
	$\chi^2 = 4,201$, p = 0,649 Lineáris asszociációs érték: 0,011, p = 0,918					
2. kohorsz, összes beteg	CC	20	30	31	0	81
	CG	22	25	13	1	61
	GG	6	6	2	1	15
	Összesen	48	61	46	2	157
	$\chi^2 = 11,479$, p = 0,075 Lineáris asszociációs érték: 3,314, p = 0,075					

BMI: testtömeg index

D

	Allél	BMI (kg/m ²)				Összesen
		0-25	26-29	30-39	40-	
Nem diabéteszes betegek	G	21	24	26	1	52
	nem G	13	22	22	0	57
	Összesen	34	46	28	1	109
	$\chi^2 = 11,908$, p = 0,008 Lineáris asszociációs érték: 7,420, p = 0,006					
Diabéteszes betegek	G	7	7	9	1	24
	nem G	7	8	9	0	24
	Összesen	14	15	18	1	48
	$\chi^2 = 1,067$, p = 0,785 Lineáris asszociációs érték: 0,111, p = 0,739					

	Allél	BMI (kg/m ²)				Összesen
		0-25	26-29	30-39	40-	
2. kohorsz, összes beteg	G	28	31	15	2	76
	nem G	20	30	31	0	81
	Összesen	48	61	46	2	157
	$\chi^2 = 11,479$, $p = 0,075$ Lineáris asszociációs érték: 3,314 $p = 0,075$					

BMI: testtömeg index

8.2.6. A 2. kohorsz nem obez, nem diabéteszes betegeinek jellemzése

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az 1. kohorszban megfigyelt különbségek megvannak-e azokban a posztinfarktusos betegekben is, akik mentesek az elhízástól és a cukorbetegségtől mint zavaró tényezőktől. Az rs4917 SNP vizsgálatkor ebben az alcsoportban ($n = 83$) nem találtunk különbséget sem a CC ($n = 32$) és a TT ($n = 5$) homozigóták között, sem pedig a C ($n = 74$) és a nem C ($n = 9$) csoportok között. A T hordozóknak azonban még ekkor is szignifikánsan alacsonyabb BMI-jük ($25,3 \pm 2,6$, $n = 46$, vs. $26,5 \pm 2,3$ kg/m², $n = 37$, $p = 0,048$), derékkörfogatuk (99 ± 7 vs. 103 ± 6 cm, $p = 0,026$) volt, mint a T allél hiányában. A haskörfogat átlaga is kisebb volt a T allél csoportban ($97,7 \pm 10$ vs. $99,2 \pm 8$ cm), de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Az egyéb vizsgált paraméterek nem különböztek egymástól.

Az rs4918 SNP analízise során a nem obez, nem diabéteszes csoportban ($n = 83$) a CC ($n = 37$), CG ($n = 37$) és a GG genotípusok ($n = 9$) nem különböztek egymástól. A G allél ($n = 37$) mégis szignifikánsan kisebb derékkörfogattal ($103 \pm 6,8$ vs. $99 \pm 7,3$ cm, $p = 0,026$) és enyhén alacsonyabb BMI-vel ($25,3 \pm 2,6$ vs. $26,5 \pm 2,3$ kg/m², $p = 0,048$) társult, mint a G-t nem hordozókban ($n = 46$). Más paraméterben nem találtunk eltérést.

8.3. Megbeszélés

Magyarországon fetuin-A polimorfizmus meghatározást még nem végeztek. Az rs4917 C/T és az rs4918 C/G allél eloszlása megfelelt az európai populáció átlagának.

Az 1. kohorsz vizsgálatkor az általunk vizsgált személyek kis száma ellenére eredményeink arra utalnak, hogy a fetuin-A rs4917 SNP T és rs4918 G nukleotid jelenléte kedvezőbb lipid státusszal és TNF α (TNFSF2) szinttel társul az egészséges személyek körében. Emellett a leptin szint is magasabb volt a minor variánsok esetében, ami szintén a soványságra kedvezőbb. Mindkét genotípus szignifikánsan korrelált a leptin szinttel (CC/CT/TT: $r = 0,224$, $p = 0,044$, CC/CG/GG: $r = 0,227$, $p = 0,042$), mely eltűnt a BMI-re

történő igazítás után. A leptin és a fetuin-A szint nem korrelált egymással. Az rs4918:G esetében adiponektint is csökkentnek találtuk a C allél meglétéhez képest, mely a csökkent zsírszöveti szekrécióval magyarázható. Ismert, hogy a fetuin-A gátolja az adiponektin szintézisét [229], de nem tudjuk, hogy az egyes SNP-k gátló hatása különbözik-e egymástól.

A kedvezőbb antropológiai paraméterekkel (BMI-vel, has- és derékkörfogattal) fennálló kapcsolat a 2. kohorszban volt megfigyelhető, különösen a nem cukorbeteg csoportban. Az egyes allélok szerinti alcsoport analízis a diabéteszesek kis száma miatt nem volt végezhető, de ezek a különbségek szignifikánsak maradtak a nem kövér, nem cukorbetegek között. A soványság itt is a T és a G allél gyakoribb előfordulásával mutatott összefüggést.

A két kohorsz természetesen különbözött egymástól az elhízás és az anyagcsere paraméterek tekintetében, hiszen az 1. kohorszba normál (25 kg/m^2 alatti) BMI-jű, egészséges személyek tartoztak, míg a 2. kohorszba a szív-érrendszeri kemény végponttal bíró (posztinfarktusos) betegek, akiknek számos kardiovaszkuláris kockázati tényezőjük volt (elhízás, T2DM, érbetegség, emelkedett proinflammatorikus citokin szintek).

Számos tanulmány foglalkozott az rs4917 és az rs4918 polimorfizmus jelentőségével a hiperlipidémia, elhízás és cukorbetegség kialakulásában [2, 110, 308-310]. Ezek közül több jutott arra következtetésre, hogy a fetuin-A-nak szerepe van ezek kialakulásában, de az egyes polimorfizmusok jelentőségéről már megoszlanak a vélemények.

A fetuin-A IRTK gátló hatásáról szóló más munkacsoporttól származó [110] és saját közlések indították meg a molekulának az inzulinrezisztenciával és az elhízással való kapcsolatának vizsgálatát. A fetuin-A elhízott és kövér emberekből emelkedik, míg a bariatrikus gyomorműtétet követően csökken, Roux-en-Y gyomor bypass műtéten átesett betegek 16 hónapos követése után 34%-kal [98]. Egy másik tanulmány már 3 nappal a műtét után alacsonyabb értékeket írt le, itt azonban igen valószínű a műtéti beavatkozáshoz társuló akut fázis reakció hatása [405]. Ix és mtsai 508, jó állapotú, 70–79 év közötti személy 5 éves követése során azt találták, hogy bár a vizsцерális zsírszövet 6%-kal csökkent ez idő alatt, minden egyes SD-vel (420 mg/l) magasabb fetuin-A szint a zsigeri zsírszövet 5,5%-os emelkedésével járt együtt [52]. A fetuin-A szérumkoncentrációja összefügg a testsúllyal, azonban az ok-okozati kapcsolat nem ismert a kettő között.

Az rs4917 minor T allélt gyakoribbnak találtuk sovány személyekben. Lavebratt és mtsai szerint az rs49TT és az rs4918 GG haplotípusok az rs2593813:G-vel együtt a soványságra jelentenek nagyobb hajlamot svéd férfiakban [392]. Az rs4917 a teljes zsírtartalommal is kapcsolatot mutatott [393]. Egy ugyanonnan származó, korábbi közlemény nőkben nem talált összefüggést az rs4917 és az elhízás között [397]. Egy másik, életmódot befolyásoló tanulmányban az rs4917 homozigóták jobban fokozták az izomtömegüket és az alapanyagcseréjüket, esetükben erősebben csökkent a zsírszövet mennyisége, mint a T allél esetében, de az rs4917 variánsok és a BMI csökkenése nem korreláltak egymással [99]. Megint mások semmilyen kapcsolatot nem találtak az rs4917 SNP-k és az elhízás között [395, 397].

A cukorbetegség vonatkozásában egy tanulmányban az rs4917 polimorfizmus nem mutatott kapcsolatot a diabétesszel [398]. Egy másikban a CC allél rosszabb HOMA-IR-rel, emelkedett éhgyomri és 2 órás OGTT plazma inzulin szinttel társult a TT variánshoz képest. A CC variáns ezen kívül diszlipidémiával is társult. Ugyanakkor sem az elhízással, sem a cukorbetegséggel nem volt kimutatható összefüggés [395]. Jensen és mtsai ellenben 65 év feletti személyeket vizsgálva szoros kapcsolatot találtak a fetuin-A rs4917 és rs224869 variánsai és a fetuin-A szint között ($p < 0,0001$) [391]. A magasabb glukóz értékhez magasabb fetuin-A szint társult. Ennek ellenére nem tudtak kapcsolatot kimutatni a genetikailag meghatározott fetuin-A koncentráció, valamint a T2DM kockázata vagy az éhomi glukóz szint között. A kaukázusi ($n = 2893$) és a kisebb számú ($n = 542$) afroamerikai populáció hasonló trendet mutatott, de az utóbbiban már nem volt szignifikáns különbség. Ezek a megfigyelések a fetuin-A oki szerepe ellen szólnak a T2DM kialakulásában [391]. A fetuin-A polimorfizmusok és a T2DM közötti oki kapcsolatot sem ezzel, sem egy későbbi Medeli randomizációs vizsgálattal nem sikerült igazolni [406].

Több tanulmányban jutottak mégis arra a következtetésre, hogy az emelkedett szérum fetuin-A fokozza a cukorbetegség kockázatát [117, 407, 408]. Ugyanakkor a fetuin-A szint diabéteszben nem követi az egészséges vagy kövér személyekben megfigyelt trendeket [375, 396]. Egyéb befolyásoló tényezők – mint a hiperlipidémia [67, 68], az antidiabetikus [77] és a vérzsírszintet csökkentő kezelés [78] – hatását is számításba kell venni diabéteszben. Jensen és mtsainak összesen 3810, 65 év feletti, nem kövér, nem diabéteszes személy bevonásával készült prospektív tanulmányában a szérum fetuin-A koncentráció fordítottan volt arányos a kardiovaszkuláris mortalitással [34]. Cukorbetegben azonban ez a trend megfordult. Az elhízásnak és az inzulinrezisztenciának a nem cukorbetegben

is hasonló módosító hatása volt. Ily módon az emelkedett fetuin-A szint és a csökkent mortalitás kapcsolata csak a nem elhízott, a medián alatti HOMA-IR-rel rendelkező személyek esetében volt megállapítható [34].

A vérsírszintekkel kapcsolatban egy tanulmányban a CC genotípus alacsonyabb összkoleszterin szinttel társult, mint a TT variáns [397]. Ezzel ellentétben a csehországi Post-Monica Study-ban nem találtak kapcsolatot a koleszterin érték és a fetuin-A variánsok között [409]. A CC homozigótáknak magasabb triglicerid szintjük volt a T allélt hordozókhoz képest. Ez a tanulmány nem erősítette meg az rs4917 SNP-knek az LDL-koleszterinre, az elhízásra vagy a vércukor szintre gyakorolt hatásait [409]. A mi eredményeinkkel egybehangzóan Andersen és mtsai sem találtak különbséget CC és a TT variánsok össz- és HDL-koleszterin, valamint triglicerid szintjei között [395].

Elméletben mind a fetuin-A koncentráció vagy a molekula szerkezeti eltérése magyarázhatja az általunk vizsgált fetuin-A polimorfizmusok eltérő hatását.

Az első jelentés [390] óta több tanulmányban megfigyelték, hogy a fetuin-A egyik minor variánsa (AHSG-2) alacsonyabb szérumkoncentrációval társul [116, 392, 393]. Az általunk vizsgált SNP-kben ilyen szignifikáns összefüggést nem találtunk, nem csak a CC és TT homozigóták, de az rs4917CC:rs4918CC és rs4917TT:rs4918GG egyének között sem, valószínűleg a kis esetszám miatt. A mi eredményeink szerint a 2. kohorsz GG homozigótáinak fetuin-A szint átlaga alacsonyabb is volt, mint a CC homozigótáké, bár a különbség nem volt szignifikáns (611 ± 102 vs. 682 ± 125 mg/l, $p = 0,185$, 8.3. táblázat).

A fetuin-A single nucleotid polimorfizmusai (SNP-k: AHSG1-1, 1-2 és 2-2) és szérumkoncentrációja között ugyancsak leírtak összefüggéseket. Így a 2-2 genotípus magasabb szérum foszfor értékkel társul, mint az 1-1 genotípus [394]. Az AHSG 2-2 genotípust hordozó nők lumbális csigolya és femorális csontsűrűsége nagyobb, mint az 1-1 homozigótáké [410]. Az rs4918:G minor variánst hordozó dializált veseelégtelen betegekben alacsonyabb fetuin-A mérhető, és ezeknek a betegeknek nagyobb kalcifikációs, össz- és kardiovaszkuláris mortalitási kockázatuk van, mint a C allél esetében [354]. Ezek jelentősége azonban jóval kisebb, mint a metabolikus és proinflammatorikus citokinek hatása.

A több mint 2400 személy bevonásával készült EPIC Potsdam Study-ban Fisher és mtsai szoros kapcsolatot találtak az rs4917 és a szívinfarktus előfordulása között [116]. A CC

variánsban talált magasabb fetuin-A koncentrációt mintegy 21%-ban ez az allél határozta meg: minden egyes C allélhoz a fetuin-A szint 35 mg/l-es emelkedése társult. A C allél jelenléte fokozott kockázatot jelentett a szívinfarktus kialakulására (RR: 1,34, 95% CI: 1,05–1,70). A szerzők másik három SNP-t (rs2248690, rs2070633, rs2070635) vizsgálva is a major variánsok szoros kapcsolatát találták a fetuin-A emelkedésével. Mind közül az rs4917-tel volt a legszorosabb kapcsolat. Az emelkedett fetuin-A-val talált szoros kapcsolat alapján a fetuin-A patogenetikai szerepét is felvetették szív-érrendszeri betegségekben [116]. Ahogy fent említettem, valószínűleg a kis esetszám miatt ilyen összefüggést a major és a minor homozigóták között mi nem tudtunk megfigyelni.

Mások a G allél meglétét kevésbé kedvezőnek találták. Egy, dializált betegeken végzett követéses vizsgálatban a CG és a GG genotípus alacsonyabb fetuin-A szinttel és enyhén fokozott halálozással társult, de nem lehetett bizonyítani az alacsonyabb fetuin-A szint halálos kimenetelt okozó szerepét [411]. Megjegyzendő, hogy krónikus veseelégtelen betegeken éppen az alacsony fetuin-A fokozza a halálos kimenetel kockázatát [354]. Az előző tanulmánnyal összhangban mások is azt találták, hogy az rs4918 G alléllal alacsonyabb fetuin-A szinttel jár együtt [394], mely az aorta fokozott elmeszesedésével és a veseátültetett betegek nagyobb halálozásával társul. Ma és mtsai szerint a G allél a C-vel szemben az ischaemiás stroke fokozott kockázatát jelzi Kínában az északi Han népességben [404].

Ugyanakkor érdekes, hogy még az egészséges, normál tartományban lévő BMI-jű személyek TNF α (TNFSF2) szintje is eltér egymástól (mindkét vizsgált SNP esetében), azaz az rs4917:T és az rs4918:G alacsonyabb TNF α (TNFSF2) és az utóbbi alacsonyabb adiponektin és mindkettő magasabb leptin szinttel jár, mint a T vagy a G allél esetében. Ezeket a különbségeket a 2. kohorszban már nem észleltük, valószínűleg a szubklinikus gyulladás és az elhízás zavaró hatása miatt.

Az egyes SNP-k elvileg eltérő molekulaszervezetet, következésképpen eltérő aktivitást eredményezhetnek. Emellett jelenleg csak egy megfigyelés ismert, miszerint az rs4917 TT (Met/Met) variáns meglétekor szubkután zsírszövetekben a β 2-agonista terbutalinra kialakuló lipolízis több mint egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint a Thr/Thr és a Thr/Met genotípus esetén ($p = 0,0008$) [412]. Ez a β 2-receptor aktivitás 35-szörös emelkedésének felelt meg. A hatás független volt a BMI-től és a derékkörfogattól. Ugyanakkor a β 1-agonista dobutamin vagy az α 2A-agonista klonidin esetében nem volt megfigyelhető különbség az

egyes rs4917 SNP-k között [412]. A minor variánssal társuló fokozott lipolitikus aktivitásnak szerepe lehet a testsúlyregulációban és magyarázhatja az általunk megfigyelt kedvezőbb antropológiai paramétereket is. Az rs4918 SNP-khez társuló funkcionális különbségeket nem közöltek, holott ilyen várható, mert a 256. aminosav egyben glikozilációs hely is.

A fetuin-A molekuláris hatásmechanizmusát illetően ismert, hogy a szabad zsírsavak az NF κ B-n keresztül fokozzák a fetuin-A szintézist [40]. A szabad zsírsav–fetuin-A komplex a TLR4-hez kötődve gyulladásos jeleket és inzulinrezisztenciát generál [103]. Ezt a feltételezett molekuláris mechanizmust támasztják alá Stefan és mtsai klinikai megfigyelései is, akik fordított arányosságot találtak a szérumban fetuin-A és zsírsav koncentráció, valamint az inzulinérzékenység között azokban a személyekben, akiknek fetuin-A és szabad zsírsavszintje a medián felett volt [228]. A szérumban fetuin-A és a szabad zsírsavak statisztikailag is egymással interakcióban határozták meg az inzulinérzékenységet. A fetuin-A, a szabad zsírsav, valamint az inzulinérzékenység között erősen szignifikáns, majdnem lineáris dózis-hatás görbét tudtak felállítani [228]. Mai ismereteink szerint a fetuin-A „összekötő kapocs” az anyagcsere-betegségek és a gyulladás között [40, 103, 413], ugyanakkor még nem történt olyan vizsgálat, melyben az egyes SNP-k szabad zsírsav- és TLR4-kötő aktivitását, hasonlóképpen az inzulin-receptor foszforilációra gyakorolt hatását tanulmányoznák.

Egyre több megfigyelés szól amellett, hogy etnikai tényezők is magyarázhatják a különböző fetuin-A genotípusok ellentétes hatásait és feltételezett szerepét. Az AHS2-2 minor variáns magasabb ösztadiol szinttel és nagyobb csontsűrűséggel társul kaukázusi nőkben [414]. Kaukázusi populációban Jiang is kapcsolatot talált az AHS2-SacI (rs4918) polimorfizmus és a csontgeometria között, de kínaiakban nem [415]. Más vizsgálok szintén jelentős különbségeket találtak a kaukázusi és a kínai népesség között a csontdenzitást meghatározó gének (így a fetuin-A és annak SacI, rs4918 SNP variánsai) tekintetében [416, 417].

Többen megfigyelték a fizikai aktivitás fetuin-A szintet csökkentő hatását [316, 418, 419]. Malin és mtsai vizsgálatában 7 napos aerobik gyakorlat 11%-os fetuin-A csökkenést eredményezett 12 elhízott egyénben, anélkül, hogy testtömegük jelentősen csökkent volna. Ugyanezen szerzők később 20 idősebb egyénben azt találták, hogy a 12 hetes fizikai aktivitás átlagosan 6,4 kg fogyást és a fetuin-A szint 8%-os csökkenését eredményezte

[420]. Mások a zsírtömeg és a derékkörfogot csökkenésének ellenére sem észlelték a fetuin-A szint csökkenését 6 hetes fizikai aktivitás hatására [421]. Külön figyelemre méltó Mathews és mtsainak vizsgálata, mely során napi négyszeri, egyenként 350 kalóriát égető fizikai aktivitás nem változtatta meg az össz-fetuin-A koncentrációt, de jelentősen csökkentette a molekula Ser312 helyén lévő foszforiláltságát [422]. Vizsgálatuk a fizikai aktivitásnak a fetuin-A poszttranszlációs modifikációjára gyakorolt lehetséges hatására mutat rá.

A fizikai aktivitás formájának, időtartamának és erősségének is hatása van a fetuin-A szintre, akárcsak a molekula polimorfizmusának. Suchanek és mtsai az életmód (diéta és fizikai aktivitás együtt) változtatásának hatását vizsgálva észlelték, hogy a Thr247Met (rs4917 SNP) polimorfizmus Thr/Thr homozigótáiban (major variáns) jobban növekedett a tiszta izomtömeg és az 1 kg-ra jutó alpanyagcsere szint, de a BMI vagy a fetuin-A koncentrációban nem volt különbség a major és a minor variáns között [99].

A keresztmetszeti elrendezés nem tette lehetővé oki kapcsolat felállítását a vizsgált SNP-k és az antropológiai, valamint az anyagcsere-paraméterek között. Vizsgálatunk másik korlátja a viszonylag kis elemszám, mely miatt nem végezhattünk alcsoport analízist az obez és a diabéteszes betegek körében. Emellett az antidiabetikus terápia, valamint a posztinfarktusos betegek kötelező sztatín kezelése elfedheti az eltérő SNP-k okozta (valószínűleg azért kismértékű) különbségeket.

A fent leírt, egymásnak ellentmondó vizsgálatok közül a mi (kaukázusi populáción végzett) vizsgálataink eredményei is azokat támogatják, akik szerint a fetuin-A inkább az elhízással áll kapcsolatban, mint a cukorbetegséggel, valamint az rs4917:T és az rs4918:G minor kedvezőbb paraméterekkel társul, mint a C allél.

9. A szérumban fetuin-A koncentráció és a PPAR α intron 7 G/C, a PPAR γ 2 Pro12Ala és a PPAR γ C161T polimorfizmus közötti kapcsolat

A peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok (PPAR-ok) a ligand-aktivált transzkripciósfaktorok nukleáris hormonreceptor szupercsaládjának tagjai. A human fetuin-A multifunkcionális glikoprotein, melynek szerepe van az elhízás [99, 392, 423], az inzulinrezisztencia [308], a metabolikus szindróma [310, 423], a T2DM [117, 119, 407], a zsírsejt-diszfunkció [40] és a zsírmáj [308] kialakulásában. A PPAR-ok alcsoportjai (PPAR α , PPAR β/δ és PPAR γ (γ 1, γ 2)) ugyancsak fontos szerepet játszanak ezen folyamatok kialakulásában [424-426].

Számos megfigyelés sejteti a szérumban fetuin-A és a különböző PPAR-ok aktivitása közötti kapcsolatot. A pioglitazon direkt gátló hatásának bizonyult a hepatikus fetuin-A expresszióra patkányban [324] és emberben [323]. A PPAR γ inhibitor GW9602 a hatást megfordította.

A PPAR γ és PPAR α polimorfizmusok, valamint a hiperlipidémia, a glukóz homeosztázis és a cukorbetegség között szintén megfigyeltek kapcsolatot. Így a PPAR α intron 7 polimorfizmus C allélja gyakrabban fordult elő szívinfarktusos és diszlipidémiás betegekben [427]. A PPAR γ exon 6 C161T polimorfizmus T alléljának protektív jelentőséget tulajdonítanak a koronáriabetegséggel szemben kínai populációban [428], míg mások fokozott kockázatot figyeltek meg erre a betegségre [426].

Ezek alapján kézenfekvőnek látszott, hogy megvizsgáljuk, van-e összefüggés egyes PPAR polimorfizmusok (PPAR α intron 7 G2467C, PPAR γ (PPAR γ 2 Pro12Ala és PPAR γ exon 6 C161T) és a szérumban fetuin-A koncentráció között, illetve befolyással van-e a PPAR polimorfizmus a fetuin-A szintre. Ezt az összefüggést korábban nem vizsgálták.

9.1. Betegek és módszerek

A PPAR α intron 7 G/C polimorfizmus tanulmányozásához 244 személyt vontunk be (120 férfi, 124 nő, életkor: $60,1 \pm 11,2$ év, átlag $\pm$ SD) (1. csoport). Az 1. csoport 79 referencia személyből (15 férfi, 64 nő életkor: $61,0 \pm 9,4$ év) és 165, szívinfarktust túlélő betegből (105 férfi, 60 nő, életkor: $59,6 \pm 12,2$ év) állt.

A két PPAR γ polimorfizmussal kapcsolatban 327 egyént vizsgáltunk (161 férfi, 166 nő, életkor: $57,9 \pm 13,0$ év) (2. csoport). Ebbe a csoportba 162 referencia egyén (61 férfi, 101 nő, életkor: $56,1 \pm 13,8$ év) és az 1. csoportban leírt 165 posztinfarktusos beteg tartozott.

A genotipizálás több mint 99%-ban volt sikeres mindkét csoportban. A genotípusok követték a Hardy-Weinberg equilibriumot.

9.1.1. A PPAR polimorfizmusok meghatározása

A PPAR α és a PPAR γ variánsokat restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus (PCR-RFLP) módszerrel határoztuk meg.

A PPAR α G2467C intron7 polimorfizmus (rs4253778) esetében az 5' forward primer nukleotid sorrendje ACA ATC ACT CCT TAA ATA TGG TGG, a 3' reverz primeré AAG TAG GGA CAG ACA GGA CCA GTA volt. A PCR terméket TaqI restrikciós enzimmel bontottuk (New England Biolabs, Boston, MA, USA), mely a vad típust hordozók esetében egy 266 bp hosszú fragmentet, a mutáns allélt hordozóknál egy 216 és egy 50 bp hosszú fragmentet eredményezett. Az amplifikáció paraméterei a következők voltak: 94°C 15 perc, 30-szor 94 C 30 s, 50°C 20 s, 72°C 30 s [429].

A PPAR γ 2 Pro12Ala (rs1801282) polimorfizmus esetében az 5' forward primer nukleotid sorrendje GCC AAT TCA AGC CCA GTC, a mutagén 3' reverz primeré of GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G volt. A PCR terméket Bst U1 enzimmel emésztettük (New England Biolabs, Boston, MA, USA), mely a vad típust hordozóknál egy 270 bp, a mutáns allélt hordozóknál két (227 és 43 bp hosszú) szakaszt hozott létre. A PCR paraméterei a következők voltak: 95 C 15 perc, 35-szor 94 C 30 s, 65 C 45 s, 72 C 1 perc [430].

Az PPAR γ exon 6 C161T (rs3856806) polimorfizmus esetében az 5'forward primer nukleotid sorrendje CAA GAC AAC CTG CTA CAA GC, a 3'reverz primeré TCC TTG TAG ATC TCC TGC AG volt. A PCR terméket PmlI enzimmel bontottuk (New England Biolabs, Boston, MA, USA), mely a vad típus esetén egy 120 és egy 80 bp hosszúságú, a mutáns allél esetén egy 200 bp hosszú nukleotid szakaszt adott. Az amplifikációs paraméterek a következők voltak: 94 C 15 perc, 30-szor 94 C 30 s, 56 C 30 s, 72 C 30 s [431].

9.1.2. Egyéb laboratóriumi vizsgálatok

A szérumban fetuin-A koncentrációt RID-val határoztuk meg, az általánosan használt módszereknél leírtak szerint. A plazma glukózt rutin hexokináz, az inzulin szintet elektrokemilumineszcens (ELCIA) módszerrel határoztuk meg. A HOMA-IR-t a Matthews és mtai által megadott képlet alapján számoltuk [432].

9.2. Eredmények

9.2.1. A vizsgált személyek

A vizsgált személyek jellemzőit a 9.1. táblázat mutatja.

9.1. táblázat. A vizsgált személyek jellemzői

	1. csoport (n = 244)		2. csoport (n = 327)	
	Referencia személyek (n = 79)	Posztinfarktusos betegek (n = 165)	Referencia személyek (n = 162)	Posztinfarktusos betegek (n = 165)
Nem (férfi / nő)	15 / 64	105 / 60	61 / 101	105 / 60
Életkor (év, átlag ± SD)	61,0 ± 9,4	59,6 ± 12,2	56,1 ± 13,8	59,6 ± 12,2
BMI (kg/m²)	24,1 ± 1,6	28,1 ± 4,2**	27,4 ± 0,4	28,1 ± 4,2*
Elhízás (nincs / van)	68 / 11	46 / 119**	78 / 84	46 / 119**
Diabétesz fennállása (nincs / van)	79 / 0	112 / 53**	139 / 23	112 / 53**
HOMA-IR	1,0 ± 0,2	6,2 ± 4,6**	1,5 ± 1,5	6,1 ± 4,6**

*: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, a referencia személyekhez képest; Mann-Whitney teszt; BMI: testtömeg index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance

A posztinfarktusos betegek 65%-a szedett sztatint és 70%-uk aszpirint. Az ezekkel a gyógyszerekkel kezelt és nem kezelt betegek szérumban fetuin-A koncentrációja nem tért el lényegesen egymástól (sztatint szedők: 687 ± 122 vs. nem szedők: 636 ± 81 mg/l, $p = 0,204$, aszpirint szedők: 665 ± 120 vs. nem szedők: 672 ± 124 mg/l, $p = 0,795$).

9.2.2. A *PPARα* intron 7 G/C, a *PPARγ2* Pro12Ala és a *PPARγ* exon 6 C161T allélek eloszlása a posztinfarktusos betegek és a referencia személyek között

A *PPARα* és *PPARγ* allélok frekvenciáját a 9.2. táblázat mutatja. A *PPARγ* Pro12Ala és a *PPARα* intron 7 G/C allélok frekvenciája nem különbözött lényegesen a posztinfarktusos betegek a referencia egyének között. A posztinfarktusos betegek csoportjában azonban a *PPARγ* exon 6 C161T T allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő a referencia egyénekhez képest.

9.2. táblázat. A *PPARα* intron 7 G/C, a *PPARγ2* Pro12Ala és a *PPARγ* exon 6 C161T allélek eloszlása a vizsgált posztinfarktusos betegek és a referencia egyének csoportjában

	Allélfrekvencia	χ^2	RR (95% CI)	OR (95% CI)	p [#]
PPARα intron 7 G/C (rs4253778)					
G	P: 0,827 R: 0,817	0,086	1,013 (0,927-1,107)	1,077 (0,657-1,764)	0,769
C	P: 0,173 R: 0,183				
PPARγ2 Pro12Ala (rs1801282)					
Pro12	P: 0,862 R: 0,879	0,4279	0,980 (0,924-1,040)	0,858 (0,543-1,357)	0,513
Ala12	P: 0,138 R: 0,121				
PPARγ exon 6 C161T (rs3856806)					
C	P: 0,874 R: 0,946	10,25	0,924 (0,880-0,969)	0,395 (0,220-0,709)	0,001
T	P: 0,126 R: 0,054				

PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor; P: posztinfarktusos betegek; R: referencia egyének; #: χ^2 teszt

9.2.3. A *PPARα* intron 7 G2467C variánsok és a szérumban a fetuin-A koncentráció kapcsolatának vizsgálata

A CC genotípussal rendelkező egyének szérumban a fetuin-A koncentrációja magasabb volt, mint a GG genotípusúaké (9.3. táblázat). A domináns modellben (azaz C vs. non-C nukleotid) a minor variáns C allél szignifikánsan magasabb szérumban a fetuin-A szinttel járt együtt, mint a non-C allél. A recesszív modellben (azaz G vs. non-G nukleotid) nem volt

különbség a két variánshoz társuló fetuin-A szint között (651 ± 107 mg/l, $n = 238$ vs. 662 ± 171 mg/l, $n = 6$, $p = 0,702$).

9.3. táblázat. Szérum fetuin-A koncentráció a PPAR α intron 7 G2467C SNP genotípusok (A) és allélok (B) esetén

A. PPAR α intron 7 G2467C polimorfizmus						
GG		GC		CC		
Fetuin-A mg/l	n	Fetuin-A mg/l	n	Fetuin-A mg/l	n	p
641 $\pm$ 150	164	671 $\pm$ 110	74	662 $\pm$ 170	6	0,040 [#]

B. PPAR α intron 7 G2467C allélek				
C allél		non-C		
Fetuin-A mg/l	n	Fetuin-A mg/l	n	p
670 $\pm$ 114	80	641 $\pm$ 105	164	0,018 [§]

PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor; #: Kruskal-Wallis teszt; §: Mann-Whitney teszt

Az életkortól eltekintve a fetuin-A koncentráció szignifikáns korrelációt mutatott a 9.4. táblázatban feltüntetett paraméterekkel. Gyenge, de statisztikailag szignifikáns kapcsolatot találtunk a fetuin-A szint és a PPAR α intron 7 GG/GC/CC genotípusok, valamint a C allél, de nem a G allél között. Parciális korrelációs analízis során a fetuin-A és a PPAR α intron 7 GG/GC/CC genotípusok között kapcsolat már nem volt szignifikáns a BMI-re, a diabétesz meglétére, a HOMA-IR-re és a posztinfarktus státuszra történő igazítást követően (9.5. táblázat). A C allél és a fetuin-A szint közötti korreláció szintén elvesztette szignifikanciáját a BMI-re, a diabétesz státuszra, a HOMA-IR-re történő korrekcióval, de megmaradt a posztinfarktus státusszal történő igazítás után.

9.4. táblázat. A szérum fetuin-A és a vizsgált paraméterek közötti korreláció (n = 244)

Paraméter	Korrelációs koefficiens [#]	p [#]
BMI	0,167	0,009
Diabétesz státusz (nincs / van)	0,133	0,038
HOMA-IR	0,205	0,001
Életkor	-0,109	0,188
Nem	-0,168	0,017
Posztinfarktus státusz (nem / igen)	0,277	< 0,001
PPAR α GG/GC/CC	0,144	0,025
PPAR α C allél	0,151	0,018
PPAR α G allél	0,025	0,700

BMI: testtömeg index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance; PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor; #: Spearman korreláció

9.5. táblázat. A szérumban fetuin-A koncentráció és a PPAR α intron 7 G/C genotípus, valamint a C allél közötti parciális korreláció (n = 244)

Igazítva az alábbiakra:	GG/GC/CC genotípus		C allél	
	Korrelációs koefficiens	p	Korrelációs koefficiens	p [#]
BMI	0,100	0,125	0,107	0,095
Diabétesz státusz (nincs / van)	0,108	0,092	0,115	0,072
HOMA-IR	0,116	0,072	0,123	0,056
Posztinfarktus státusz (nem / igen)	0,122	0,058	0,131	0,041

BMI: body mass index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance #: Spearman korreláció

A fenti paraméterek mint független változók és a szérumban fetuin-A koncentráció mint függő változó (prediktor) közötti egyváltozós lineáris regressziós analízis eredményeit a 9.6. táblázat mutatja. A fetuin-A gyenge, de statisztikailag szignifikáns kapcsolatot mutatott minden vizsgált prediktorral, a PPAR α intron 7 G/C genotípusokat és a C allélt is beleértve, de az életkorral nem, ezért az életkort a további számítások során kihagytuk.

9.6. táblázat. A fetuin-A koncentráció és a metabolikus paraméterek közötti egyváltozós regressziós vizsgálat eredményei (n = 244)

Prediktor	Standardizált β	p
BMI	0,146	0,023
Diabétesz státusz (nincs / van)	0,136	0,034
HOMA-IR	0,163	0,011
Posztinfarktus státusz (nem / igen)	0,212	0,001
Életkor	-0,137	0,098
Nem	-0,149	0,027
PPARα GG/GC/CC	0,131	0,042
PPARα C allél	0,140	0,029

BMI: testtömeg index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance; PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy vajon a PPAR α intron 7 G/C genotípus vagy a C allél meghatározza-e a fetuin-A koncentrációt többszörös regressziós modellben (9.7. táblázat).

Az életkor kivételével az összes független változót szerepeltetve a modellben, a PPAR α intron 7 GG/GC/CC genotípus és a C allél volt a fetuin-A szint egyetlen statisztikailag szignifikáns determinánsa. A backward stepwise regression modellben a posztinfarktus státusz, és a PPAR α intron 7 GG/GC/CC, valamint C allél bizonyult a fetuin-A koncentráció legerősebb meghatározójának.

9.7. táblázat. A PPAR α intron 7 G/C genotípusok, a C allél és a szérumban a fetuin-A koncentráció közötti kapcsolat többszörös regressziós vizsgálata (n = 244)

	PPAR α intron 7 GG/GC/GG		PPAR α intron 7 C allél	
Prediktor	Standardizált β	p	Standardizált β	p
Az összes prediktor szerepeltetve				
BMI	0,027	0,708	-0,024	0,743
Diabétesz státusz (nincs / van)	0,054	0,474	0,045	0,551
HOMA-IR	0,037	0,651	0,035	0,666
Posztinfarktus státusz (nem / igen)	0,130	0,127	0,132	0,121
Nem	-0,079	0,260	-0,083	0,242
PPARα intron 7 genotika[#]	0,134	0,036	0,144	0,024
	Modell illeszkedése: p = 0,006		Modell illeszkedése: p = 0,005	

	PPAR α intron 7 GG/GC/GG		PPAR α intron 7 C allél	
Prediktor	Standardizált β	p	Standardizált β	p
Backward stepwise regresszió				
Posztinfarktus státusz (nem / igen)	0,214	0,001	0,215	0,001
PPARα intron 7 genotika[#]	0,135	0,032	0,144	0,021
	Modell illeszkedése: p < 0,001		Modell illeszkedése: p < 0,001	

[#]: A PPAR α intron 7 GG/GC/GG genotípusok regressziós paramétereit a táblázat 2. és 3., a PPAR α intron 7 C allélét a 4. és 5. oszlopa tartalmazza. PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor; BMI: body mass index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance

9.2.4. A PPAR γ 2 Pro12Ala variánsok és a szérumban a fetuin-A koncentráció közötti kapcsolat vizsgálata

A Pro/Pro és a Pro/Ala genotípusú személyeknek szignifikánsan magasabb fetuin-A szintjük volt, mint az Ala/Ala genotípussal rendelkezőknek (Pro/Pro: 681 $\pm$ 131 mg/l,

$n = 247$, Pro/Ala: 706 ± 131 mg/l, $n = 75$, Ala/Ala: 565 ± 116 mg/l, $n = 5$, $p = 0,043$, Kruskal-Wallis teszt). A recesszív (azaz Pro vs. no-Pro) modellben a Pro aminosavat meghatározó allélhoz magasabb fetuin-A szint társult, mint a nem prolint meghatározóhoz (687 ± 131 mg/l, $n = 322$ vs. 565 ± 116 mg/l, $n = 5$, $p = 0,047$, Mann-Whitney teszt). A fetuin-A koncentrációk nem különböztek egymástól a recesszív modellben (azaz Ala vs. non-Ala) (698 ± 143 mg/l, $n = 80$ vs. 681 ± 131 mg/l, $n = 247$, $p = 0,287$).

Szignifikáns kapcsolat volt kimutatható a szérumban a fetuin-A koncentráció, valamint a BMI, a HOMA-IR, a nem és a Pro allél között, de a diabétesz fennállásával, a posztinfarktus státusszal, a PPAR γ 2 Pro/Pro, Pro/Ala, Ala/Ala genotípusok vagy az Ala-t meghatározó alléllal nem (9.8. táblázat). Ezért ezt a két utóbbi paramétert kihagytuk a további számításokból. A fetuin-A szint és a Pro allél közötti korreláció elvesztette szignifikanciáját a BMI-re és a nemre, de nem a HOMA-IR-re történő igazítás után (9.9. táblázat).

9.8. táblázat. A szérumban a fetuin-A és a vizsgált paraméterek közötti korreláció (n = 327)

Paraméter	Korrelációs koefficiens [#]	p [#]
BMI	0,426	< 0,001
Diabétesz státusz (nincs / van)	0,102	0,064
HOMA-IR	0,129	0,027
Nem	-0,178	0,008
Posztinfarktus státusz (nem / igen)	0,098	0,078
PPAR γ 2 Pro/Pro, Pro/Ala, Ala/Ala	0,050	0,365
PPARγ2 Pro allél	0,130	0,018
PPAR γ 2 Ala allél	0,052	0,349

#: Spearman korreláció; BMI: body mass index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance; PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor

9.9. táblázat. A szérumban a fetuin-A koncentráció és a PPAR γ 2 Pro allél közötti parciális korreláció (n = 327)

Igazítva az alábbiakra:	Korrelációs koefficiens [#]	p [#]
Nem igazított	0,130	0,018
BMI	0,069	0,215
HOMA-IR	0,129	0,027
Nem	0,129	0,055

#: Spearman korreláció; BMI: body mass index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance

Az egyváltozós regressziós elemzés során a fetuin-A (függő változó) gyengén, de szignifikánsan korrelált a BMI-vel és a PPAR γ 2 Pro alléll mint független változókkal (9.10. táblázat). A PPAR γ 2 Pro allél elvesztette prediktor szerepét akkor, amikor a regressziós modellben a BMI-t is szerepeltettük (9.10. táblázat utolsó sor).

9.10. táblázat. A szérumban fetuin-A koncentráció és a prediktor paraméterek közötti egyváltozós regressziós analízis (n = 327)

Prediktor	Standardizált β	p
BMI	0,520	< 0,001
Diabétesz státusz (nincs / van)	0,065	0,239
HOMA-IR	0,059	0,291
Posztinfarktus státusz (nem / igen)	0,137	0,013
PPARγ2 Pro allél	0,127	0,022
PPAR γ 2 Pro allél + BMI	0,059 0,512	0,215 < 0,001

BMI: body mass index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance; PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor

A többszörös backward stepwise regressziós modellben a posztinfarktus státusz ($\beta = 0,111$, $p = 0,041$) és a BMI ($\beta = 0,426$, $p < 0,001$) bizonyult a fetuin-A koncentráció legerősebb meghatározójának.

9.2.5. A PPAR γ exon 6 C161T variánsok és a szérumban fetuin-A koncentráció közötti kapcsolat vizsgálata

Nem találtunk jelentős különbséget sem a különböző PPAR γ exon 6 C161T genotípusokat, sem a C vs. non-C, sem a T vs. non-T allélokat hordozók fetuin-A szintje között (9.11. táblázat). A fetuin-A koncentráció sem korrelált ezekkel a variánsokkal (9.12. táblázat).

9.11. táblázat. A különböző PPAR γ exon 6 C161T polimorfizmusokat és allélokat hordozó személyek szérumban fetuin-A koncentrációja (n = 327)

PPAR γ exon 6 C161T polimorfizmus						
CC		CT		TT		
Fetuin-A mg/l	n	Fetuin-A mg/l	n	Fetuin-A mg/l	n	p [#]
690 $\pm$ 133	270	661 $\pm$ 125	54	641 $\pm$ 104	3	0,340

#: Kruskal-Wallis teszt

PPAR γ exon 6 C161T Ala allél				
C		non-C		
Fetuin-A mg/l	n	Fetuin-A mg/l	n	p [§]
685 $\pm$ 132	324	641 $\pm$ 104	3	0,674
T		non-T		
Fetuin-A mg/l	n	Fetuin-A mg/l	n	p [§]
659 $\pm$ 123	57	690 $\pm$ 133	270	0,138

§: Mann-Whitney teszt; PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor

9.12. táblázat. A szérum fetuin-A koncentráció és a különböző PPAR γ exon 6 C161T polimorfizmusok közötti kapcsolat (n = 327)

PPAR γ exon 6 C161T genotípus, allél	Korrelációs koefficiens	p [#]
CC/CT/TT genotípus	-0,082	0,137
C allél	0,023	0,675
T allél	-0,082	0,138

#: Spearman korreláció; PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor

A posztinfarktusos csoportban 3 minor variáns (TT) homozigóta volt, a referencia csoportban egy sem. A posztinfarktusos betegek genotípus eloszlása ezért szignifikánsan eltért a referencia csoporttól (CC/CT/TT: 130/37/3 vs. 140/17/0, p = 0,006). A T allél gyakrabban fordult elő a posztinfarktusos betegek között (40/170 = 23.5% vs. 17/157 = 10.8%, p = 0,002). Ennek megfelelően a CC genotípusú posztinfarktusos betegeknek szignifikánsan alacsonyabb fetuin-A szintjük volt, mint a referencia egyéneknek (668 $\pm$ 113 mg/l, n = 130 vs. 710 $\pm$ 146 mg/l, n = 140, p = 0,037).

9.3. Megbeszélés

Mivel a vizsgálati személyek számos olyan paraméterrel rendelkeztek, melyekről tudjuk, hogy befolyásolják a fetuin-A szintet (életkor, BMI, diabétesz megléte, inzulinrezisztencia, szívinfarktus utáni állapot), regressziós modellben becsültük meg ezek hatásának erősségét.

A PPAR α lipid szenzorként ismert, részt vesz a mikroszomális ω -oxidációban, a mitokondriális és peroxiszomális β -oxidációban, energiaégetést és csökkent zsírtárolást eredményez [425]. A PPAR α intron 7, minor C variáns a major G variánshoz képest csökkent aktivitású. A C haplotípusról kimutatták, hogy elősegíti a T2DM korai megjelenését [429] és gyakoribb infarktust túlélő betegekben [426, 427]. Doney és mtsai szerint a szívinfarktus kockázata nagyobb a C, mint a G allél meglétekor [433]. Mi is azt találtuk, hogy a C allél nagyobb fetuin-A szinttel jár, és a többszörös regressziós vizsgálat

is azt mutatta, hogy a fetuin-A szintet szorosan meghatározza az infarktus utáni állapot és a PPAR α intron 7 G/C polimorfizmus is. Bár a C allél nem volt gyakoribb a mi infarktusos betegeink között, a magasabb fetuin-A koncentráció ebben a csoportban is káros hatású lehet. Az emelkedett fetuin-A szint a zsírmáj markere, melyet a zsírsavak csökkent β -oxidációja jellemez [308].

A fetuin-A-t felnőtt emberben csaknem kizárólag a máj parenchymasejtjei termelik [434]. A PPAR α is főleg a májban fejeződik ki. Mai ismereteink szerint a fetuin-A olyan endogén ligand, mely a szabad zsírsavakhoz kötődik és egyben a TLR-4 Toll-like receptorokhoz is, ezáltal összekötve a kóros anyagcsere-állapotokat (hiperlipidémia, inzulinrezisztencia) és a szubklinikus gyulladást [103]. Elhízásban a fetuin-A kemokinként szervezi a makrofágok migrációját és adipocitákká történő alakulásukat [101]. Ezt a molekuláris szinten kimutatott „hiányzó kapcsolatot” Stefan klinikai vizsgálatai is megerősítették [228]. Ezek az eredmények összhangban vannak a mi megfigyeléseinkkel is, miszerint a szubklinikus gyulladás és atherosclerosis kemény végpontját jelentő infarktust túlélő állapot és a PPAR α intron 7 C allél bizonyult a fetuin-A szint legerősebb meghatározójának az általunk vizsgált személyekben.

A PPAR γ 2 Pro12Ala polimorfizmus esetében az Ala allél jelenléte véd a T2DM kialakulásával szemben, a Pro allélt metabolikusan hátrányosabbnak írják le [435]. Ezzel egybehangzóan az általunk vizsgált személyekben a Pro allél csak a legalább túlsúlyos egyéneknél (BMI > 25 kg/m²) fordult elő. Az Ala/Ala homozigóta variáns csak a normális testtömeg indexűek között (BMI $\leq$ 25 kg/m²) volt megfigyelhető. Ennek ellenére még az Ala-t hordozó személyekben is magasabb fetuin-A szinttel társult az elhízás, mint a normál testsúlyú egyéneknél. A cukorbetegnek is magasabb fetuin-A szintjük volt, mint a nem diabéteszeseknek, de ezt a különbséget csak a Pro/Pro major allél homozigótákban volt statisztikailag szignifikáns (704 ± 124 mg/l, n = 64 vs. 673 ± 132 mg/l, n = 183, p = 0,020). Mivel a fetuin-A az inzulin receptor tirozin kináz természetes inhibitora, feltételezhető, hogy a Pro allél fokozott inzulinrezisztenciát közvetít. Valóban, mi is azt találtuk, hogy a minor Ala variáns gyakoribb a nem diabéteszesek között ($68/251 = 27,1\%$) a cukorbetegekkel összehasonlítva ($12/76 = 15,8\%$, p = 0,044). Ez egybeesik Vergotine és mtsainak megfigyeléseivel, akik szerint a PPAR γ 2 Pro allél az IRS1Gly972-vel együtt fokozza az inzulinrezisztenciát [436]. A másik oldalról az Ala minor allél védő hatásának bizonyult iráni és kínai populációban [437, 438]. A mi modellünkben azonban a fetuin-A kapcsolata a BMI-vel és a posztinfarktusos státusszal sokkal szorosabbnak bizonyult, mint

az inzulinrezisztenciával (diabétesz státusz vagy HOMA-IR). A Pro allél magasabb fetuin-A szinttel társult a nem diabéteszes csoportban is, mely magyarázza a diabétesz státusszal és a HOMA-IR-rel kapott gyenge korrelációt is. A fetuin-A inzulinrezisztenciát növelő hatásának ismeretében a Pro alléllal talált gyenge kapcsolata magyarázhatja a Pro allél káros hatásait is.

A PPAR γ C161T variánsoknak a fetuin-A koncentrációra gyakorolt hatásának vizsgálatakor kaptuk a legkevésbé meggyőző eredményeket. Három minor homozigóta (TT) személyt találtunk az posztinfarktusos betegek között, a referencia személyek között pedig egyet sem. Ez egybevág Qian és mtsainak megfigyeléseivel, miszerint ugyan nincs összefüggés a koronáriabetegség és a T hordozó állapot között, de ezeknek a személyeknek nagyobb kockázatuk van akut koronária szindróma kialakulására [426]. Wu és mtsai a T allél enyhe védő szerepét találták kínaiakban, de más populációban nem [428]. Mi sem találtunk jelentős kapcsolatot a fetuin-A szint és a C161T genotípusok, allélok között sem a posztinfarktusos, sem a referencia csoportban, sem pedig a nem obez, nem diabéteszes egyéneket vizsgálva. Eredményeink arra utalnak, hogy a fetuin-A koncentrációval a PPAR γ C161T-nek van a leggyengébb kapcsolata a három vizsgált PPAR polimorfizmus közül. Mivel a PPAR γ főleg a zsírszövetben termelődik, kapcsolata a hepatikus eredetű fetuin-A-val valószínűleg nem is lehet olyan szoros, mint a PPAR α esetében.

Bár nem teljesen tisztázott, több megfigyelés utal a PPAR variánsok és a fetuin-A szintézis kapcsolatának molekuláris alapjára. A metformin fetuin-A szintézist gátló hatását a PPAR α aktiválásán keresztül fejt ki patkánymodellben [223], míg Mori és munkatársai ezt nem tudták emberben kimutatni [323]. Elhízott egyéneknél a PPAR α -agonista fenofibrát csökkenti a fetuin-A expressziót T2DM fennállásakor, de nélküle is [439]. Másfelől Mori és mtsai azt találták, hogy a PPAR γ -agonista pioglitazon erősen gátolja a fetuin-A expressziót [323]. Mind a PPAR α , mind a PPAR γ felregulálódása a fetuin-A és az NF κ B lefelé regulálódásával (az utóbbi a TLR4-JUN-NF κ B úton keresztül), valamint az AMPK kináz aktivitás fokozódásával járt együtt [223, 439-441]. A palmitinsavról, melynek oxidációját a PPAR α erőteljesen serkenti, kimutatták, hogy elősegíti az NF κ B kötődését a fetuin-A promoterhez [40]. Így egy kevésbé aktív PPAR α variáns végül is fokozott fetuin-A expressziót eredményezhet.

A fetuin-A promoter régióban [42] PPAR α és PPAR γ responzív elemek (PPRE-k) után kutatva nem találtunk direkt nukleotid megfelelést ¹².

Vizsgálataink korlátja, hogy az elemszám nem volt kellően nagy a minor variánsok megfelelő elemzéséhez, valamint az a tény, hogy a vizsgált személyeket nem illesztettük a környezeti tényezőkre, a gyógyszeres kezelésre és az étrendjükben lévő telített és telítetlen zsírok mennyiségére, melyek szintén befolyásolhatják a PPAR aktivitást [442].

Összefoglalva, eredményeink szoros kapcsolatra utalnak a szérumban lévő fetuin-A koncentráció és a PPAR α intron 7 G/C, valamint a PPAR γ 2 Pro12Ala variánsok között, magasabb szintet mutatva a C allél jelenlétekor az előbbi, a prolint kódoló allél jelenlétekor az utóbbi esetben. Ezeket az összefüggéseket jelentősen befolyásolja az elhízás és a cukorbetegség jelenléte.

¹² A fetuin-A 4058 bázispár hosszúságú promoter régióját internetes hozzáférésű elemző programmal elemeztük (Dragon PPAR Response Element (PPRE) Spotter v.2.0, www.cbrc.kaust.edu.sa/ppre/manual.php, megtekintve: 2020.01.04-én)

10. Autoimmun betegségek, *Helicobacter pylori* fertőzés és a fetuin-A koncentráció kapcsolata

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) a gyomor savtermelő részét kolonizáló, obligát gyulladáskeltő Gram-negatív baktérium. A *H. pylori* fertőzés és a krónikus gasztritisz, a peptikus fekély, a MALT lymphoma és a gyomorrák közötti kapcsolat régóta ismert [443-446], emellett felvetették szerepét az inzulinrezisztencia [447] és a metabolikus szindróma [447] kialakulásában is. Egyes tanulmányok szerint a *H. pylori* fokozza a nem alkoholos zsírmáj kialakulásának kockázatát [448], mások ezt tagadják [449]. Ezen extraintesztinális eltérések kialakulásában a fetuin-A szerepét is kiterjedten vizsgálták.

A fetuin-A koncentráció alakulásáról *H. pylori* fertőzésben egymásnak ellentmondó közlések jelentek meg. Kebapcilar és mtsai magasabb CRP és migrációt gátló faktor (MIF) és alacsonyabb fetuin-A koncentrációt találtak *H. pylori* pozitív személyekben az egészséges kontrollokhoz képest [450]. Az eradikációt követően a MIF és a CRP szignifikánsan csökkent, míg a fetuin-A szignifikánsan emelkedett a kiindulási értékhez képest.

Ezzel ellentétben Manolakis és mtsai a fetuin-A szint emelkedését találták *H. pylori* pozitív betegekben [451]. A különbség az életkorra, a nemre, a dohányzási szokásokra, a BMI-re, a vérzsírokra és a CRP szintre történő igazítás után is szignifikáns maradt. A szérumban inzulin és a HOMA-IR szintén emelkedett volt, sőt a HOMA index és a fetuin-A szint között pozitív korrelációt figyeltek meg. Ennek alapján feltételezték, hogy a *H. pylori* fertőzésben a megnövekedett inzulinrezisztenciáért részben vagy egészben az emelkedett fetuin-A koncentráció lenne felelős [451].

A *H. pylori* fertőzésnek számos autoimmun betegség kialakulásában már régóta szerepet tulajdonítanak, számos mechanizmust feltételezve, mint amilyen a krónikus gyulladás [452], a molekuláris mimikri [453], valamint a B lymphocyták aktivációja, mely RF, anti-DNS, anti-foszfatidil-kolin antitest termelődéssel jár [454].

Vizsgálataink idején már számos bizonyíték szólt a *H. pylori* fertőzés autoimmun thrombocytopeniás purpurát indukáló, illetve súlyosbító hatásáról [455, 456]. A jelenleg érvényes Maastricht V ajánlásban szerepel az ITP-s betegek *H. pylori* szűrése és pozitív eredmény esetén eradikációja felnőttekben [457]. Rheumatoid arthritisben a *H. pylori* eradikációja a betegség minden aktivitási paraméterében javulást idézett elő, a

kontrollokban viszont nem [458]. Egy tanulmányban a primer Sjögren-szindrómás betegek mintegy 80%-ában volt *H. pylori* ellenes antitest kimutatható [459]. A prevalencia szignifikánsan magasabb volt más autoimmun betegségekben az egészséges egyéneknél mérthez képest. Szisztémás sclerosisban is emelkedett szeroprevalenciát figyeltek meg [460-462], valamint leírták az eradikáció jótékony hatását Raynaud-szindrómában is [463]. Mindezekkel ellentétben SLE-s és DM/PM-es betegekben nem észleltek magasabb *H. pylori* ellenes antitest titert [459].

Ezen előzmények alapján a fetuin-A koncentráció és a *H. pylori* fertőzöttség közötti kapcsolat vizsgálatakor a következőkre kerestünk választ:

1. Megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a *H. pylori* szeropozitív és -negatív betegek fetuin-A koncentrációja között, és ha igen, ezt milyen mértékben befolyásolják azok az anyagcsere és gyulladásos paraméterek, melyekkel a fetuin-A kimutatottan korrelál.
2. A *H. pylori* ellenes antitestek mérése nagyszámú poliszisztémás autoimmun betegben és egészséges kontrollban. Van-e különbség az egészséges kontroll személyek és autoimmun betegek *H. pylori* fertőzöttségi aránya között?

10.1. A *Helicobacter pylori* átvészeltség és a fetuin-A kapcsolata

10.1.1. Betegek és módszerek

A Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinikán gondozott, összesen 117 SLE-s beteget: 14 férfit, 103 nőt, életkor: 43 (31–55) év, medián (Q1-Q3) vontunk be a vizsgálatba. A betegség diagnózisát a nemzetközileg elfogadott kritériumok alapján állítottuk fel [464]. A betegek egyike sem kapott eradikációs kezelést fél éven belül.

A szérumban fetuin-A koncentrációt RID-val határoztuk meg, az általános vizsgálati módszerekben leírt módon. A *H. pylori* ellenes IgG osztályú antitesteket ELISA módszerrel határoztuk meg (NovaLisa kit, NovaTec, Dietzenbach, Németország, pozitív: 1,0 egység felett).

10.1.2. Eredmények

A *Helicobacter pylori* IgG negatív és pozitív betegek összehasonlítása

A *H. pylori* negatív és pozitív betegek összehasonlítását a 10.1.1. táblázat mutatja. A két csoport csak a fetuin-A koncentráció tekintetében tért el egymástól jelentősen.

10.1.1. táblázat. A Helicobacter pylori IgG negatív és pozitív SLE-s betegek összehasonlítása (medián és 25-75% kvartilis értékek)

Paraméter	Helicobacter IgG negatív (n = 55)	Helicobacter IgG pozitív (n = 62)	p [#]
Életkor (év)	40 (31-49)	49 (31-58)	0,087
Nem (férfi/nő)	9/46	5/57	0,167 [§]
BMI (kg/m ²)	23 (22-26)	23 (20-27)	0,346
Fetuin-A mg/l	476 (408-544)	517 (456-603)	0,020
CRP (mg/l)	3,98 (1,37-9,44)	3,45 (1,37-8,58)	0,669
IgG (g/l)	12,5 (10,0-15,3)	11,8 (10,3-13,3)	0,525
IgA (g/l)	2,44 (1,76-3,56)	2,26 (1,46-3,24)	0,303
IgM (g/l)	1,06 (0,71-1,71)	1,32 (0,76-1,77)	0,611
We (mm/h)	22 (14-40)	23 (10-38)	0,569
Összfehérje (g/l)	73 (64-76)	72 (68-75)	0,439
Albumin (g/l)	42 (35-47)	43 (38-45)	0,661
Vörösvértest szám (*10 ⁶ /μl)	4,3 (4,0-4,7)	4,2 (4,0-4,4)	0,288
Hematokrit	0,38 (0,35-0,42)	0,37 (0,36-0,40)	0,304
Hemoglobin (g/l)	128 (115-141)	125 (115-134)	0,172
Fehérvérsajt szám (/μl)	6100 (5100-8570)	6755 (5075-9273)	0,574
Glukóz (mmol/l)	4,58 (4,15-5,02)	4,73 (4,31-5,47)	0,331
Szérum kreatinin (μmol/l)	70 (64-81)	68 (59-81)	0,535
Bilirubin (μmol/l)	8,9 (6,8-12,4)	7,6 (6,0-10,7)	0,110
SGOT (U/l)	23 (19-29)	18 (15-25)	0,055
SGPT (U/l)	19 (15-34)	17 (12-23)	0,081
Alkalikus foszfatáz (U/l)	91 (60-166)	70 (53-144)	0,242
Koleszterin (mmol/l)	5,05 (4,13-5,61)	4,91 (4,02-5,61)	0,799
Triglicerid (mmol/l)	1,18 (0,93-1,71)	0,97 (0,70-1,65)	0,081
C3 (g/l)	81 (47-113)	87 (65-125)	0,131
Anti-DNS (IU/ml)	12 (5-42)	18 (5-48)	0,799
Anti-C1q (U/ml)	18 (9-35)	17 (10-28)	0,792
SLEDAI	6,0 (2-17)	4 (3-10)	0,245

CRP: C-reaktív protein; We: Westergren érték; BMI: testtömeg index; SGOT: szérum glutamát-oxalacetát transzamináz; SGPT: szérum glutamát-piruvát transzamináz; C3: C3 komplement komponens; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; #: ha nincs külön jelölve, Mann-Whitney teszt; §: χ^2 teszt

A H. pylori státusz és a fetuin-A koncentráció gyenge, de statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt mutatott egymással ($r = 0,203$, $p = 0,028$, $n = 117$). Ennek megfelelően a H. pylori pozitív betegek szignifikánsan nagyobb aránya esett a magasabb fetuin-A koncentráció kvartilis tartományokba, mint a H. pylori negatív betegeké (10.1.2. táblázat). Ugyanakkor a szérum fetuin-A koncentráció és az anti-H. pylori IgG szint már nem

korrelált egymással, sem az összes betegben ($r = 0,141$, $p = 0,154$, $n = 117$), sem pedig a *H. pylori* pozitív betegekben ($r = 0,104$, $p = 0,448$, $n = 62$).

10.1.2. táblázat. A *H. pylori* pozitív és negatív betegek száma a szérumbetuin-A koncentráció kvartiliseiben

	Q1 0-435	Q2 436-510	Q3 511-568	Q4 569-	Összesen
<i>H. pylori</i> IgG negatív	19	13	14	9	55
<i>H. pylori</i> IgG pozitív	10	19	13	20	62
Összesen	29	32	27	29	117
$\chi^2 = 7,736$, $p = 0,052$; lineáris asszociációs együttható = 4,867, Spearman $r = 0,205$, $p = 0,027$					

Q1-Q4: a szérumbetuin-A koncentráció (mg/l) a négy kvartilis tartománya

A betuin-A koncentráció és a betegek egyéb paramétereinek közötti kapcsolat vizsgálata

A szérumbetuin-A koncentráció és az egyes paraméterek közötti egyváltozós regressziós analízis eredményét a 10.1.3. táblázat mutatja. Szignifikáns kapcsolatot kaptunk a vörösvértest-süllyedéssel, a fehérvérsejt számmal, a CRP-vel, a szérumbösszfehérje és albumin szinttel, az SLE aktivitási paramétereinek közül a SLEDAI indexszel és szignifikanciaközeli korrelációt a C3 komplement komponens szintjével, de a 10.1.1. táblázatban feltüntetett többi paraméterrel nem (10.1.3. táblázat).

10.1.3. táblázat. A szérumbetuin-A koncentráció és az egyes vizsgált laboratóriumi paraméterek közötti kapcsolat regressziós vizsgálata

Paraméter	Igazított r^2	Standardizált β	p
Életkor	-0,008	-0,026	0,780
BMI	-0,005	0,085	0,440
We	-0,123	-0,364	< 0,001
Fehérvérsejt	0,111	-0,347	0,001
CRP	0,090	-0,300	0,002
Szérumbösszfehérje	0,122	0,349	0,001
Szérumbalbumin	0,168	0,409	< 0,001
C3	0,024	0,181	0,051
Anti-DNS	-0,002	0,086	0,369
Anti-C1q	-0,009	0,0001	0,997
SLEDAI	0,053	-0,278	0,010

BMI: testtömeg index; We: Westergren érték; CRP: C-reaktív protein; C3: C3 komplement komponens; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index

A következőkben a fetuin-A szinttel szignifikáns kapcsolatot mutató öt paraméter (az összfehérje helyett a szérum albumin) és a *H. pylori* státusz viszonyát többszörös lineáris regressziós modellben vizsgáltuk (10.1.4. táblázat). A fetuin-A csak a szérum albuminnal mutatott statisztikailag szignifikáns és a fehérvérsejt számmal szignifikanciaközelit kapcsolatot, de a *H. pylori* státusszal vagy a SLEDAI indexszel már nem.

10.1.4. táblázat. A szérum fetuin-A koncentráció és az egyváltozós analízis során szignifikáns összefüggést mutató paraméterek többváltozós vizsgálata

Prediktor	Standardizált β (95% C.I.)	p
We	-0,067 (-1,351 – 0,829)	0,634
Fehérvérsejtszám	-0,215 (-0,011 – 0,000)	0,058
CRP	-0,134 (-0,896 – 0,265)	0,281
Szérum albumin	0,293 (0,421 – 7,526)	0,029
<i>H. pylori</i> státusz (pozitív/negatív)	0,163 (-11,937 – 74,057)	0,154
SLEDAI	0,026 (-3,075 – 3,881)	0,818
A modell illeszkedése: $r^2 = 0,275$, igazított $r^2 = 0,207$, $p = 0,002$		

We: Westergren érték; CRP: C-reaktív protein; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index

10.1.3. Megbeszélés

A *Helicobacter* fertőzést átvészelt és nem fertőzött betegek szérum fetuin-A koncentrációja ugyan szignifikánsan eltért egymástól, azonban az eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy az eltérés oka mégsem a *H. pylori* átvészeltségben keresendő. A vizsgált paraméterek közül itt is, akárcsak májcirrhosisban, a szérum albuminnal talált pozitív összefüggés bizonyult a legerősebbnek.

Mind csökkent [450], mind emelkedett [451] fetuin-A koncentrációt észleltek aktív *H. pylori* fertőzésben. A csökkenést az akut fázis reakcióval magyarázták. Az emelkedésre molekuláris magyarázat nem született, hanem annak következményes anyagcsere-eltéréseire (az inzulinrezisztenciára és a NAFLD gyakoriságának fokozódására) hivatkoztak [117, 447, 451, 465]. Több megfigyelés utal a fetuin-A protektív, gyulladáscsökkentő szerepére is, ezeket a HANO-ban találatknál részletezem. Emellett *Helicobacter* fertőzésben megfigyelték az adiponektin szintjének csökkenését is [466]. Az adiponektin és a fetuin-A kölcsönösen gátolja egymás szintézisét [229], ami szintén magyarázhatja a fetuin-A szint emelkedését.

A fenti két keresztmetszeti vizsgálat jelentősen különbözött egymástól. Az elsőben [450] jelentősen fiatalabb és soványabb egyének vettek részt, és nem volt köztük cukorbeteg, elhízott, szív-érrendszeri kockázattal bíró személy sem, szemben a második vizsgálattal [451]). A diagnózist az elsőben urea kilégzési teszttel, a másodikban szövettani vizsgálattal állították fel. Ezen túl az első (Kebapcilar, [450]) vizsgálatban használt ELISA módszer (BioVendor, Cseh Köztársaság) négy nagyságrenddel kisebb koncentrációval számolt ($28,7 \pm 7,7$ ng/ml vs. $0,77 \pm 0,03$ g/l), mint a második vizsgálat másik (BioSource Europe, Belgium) ELISA kittel kapott eredménye. A különbség sokkal inkább a betegek beválasztásából, életkorából, BMI-jéből adódott, és nem magából a *H. pylori* fertőzésből [466].

A *H. pylori* fertőzést mi szerológiai vizsgálattal igazoltuk, ami nem akut infekciót, hanem csak átvészeltséget jelez. Összefoglalva, a mi keresztmetszeti vizsgálatunkkal nem tudtuk igazolni, hogy az átvészelt *H. pylori* fertőzés önmagában hatással lenne a szérumban a fetuin-A koncentrációra.

10.2. *Helicobacter pylori* fertőzés poliszisztémás autoimmun betegekben

10.2.1. Betegek és módszerek

A betegek a Pécsi Tudományegyetem ÁOK II. Sz. Belgyógyászati Klinika gondozottjai voltak. Negyvenkilenc SLE-s (10 férfi, 39 nő, életkor: $41,7 \pm 15,4$ év, átlag $\pm$ SD), 14 PM/DM-es (2 férfi, 12 nő, életkor: $48,1 \pm 12,7$ év), 21 RA-s (6 férfi, 15 nő, életkor: $46,0 \pm 17,6$ év), 55 sclerodermás (6 férfi, 49 nő, életkor: $49,9 \pm 12,1$ év), 33 NDC-s (életkor: $42,5 \pm 11,7$ év) és 26 primer Raynaud-szindrómás beteget (6 férfi, 20 nő, életkor: $39,4 \pm 10,6$ év) vontunk be a tanulmányba. Az autoimmun betegségek diagnózisát a nemzetközileg elfogadott kritériumrendszerek alapján állítottuk fel [464, 467-472]. Kontrollként egészséges véradók csoportját használtuk ($n = 349$, 228 férfi, 121 nő, életkor: $45,9 \pm 9,8$ év).

10.2.1.1. A *Helicobacter pylori* ellenes IgG antitestek meghatározása

A *H. pylori* ellenes IgG antitesteket indirekt ELISA módszerrel (Mikrogen GmbH, Martinsried, Németország) mértük. Szolid fázishoz kötött rekombináns *H. pylori* antigéneket $10 \mu\text{l}$ 1:100 hígítású humán szérummal inkubáltunk 1 órán át 37°C -on. Mosás után a lemezeket peroxidázzal jelzett anti-humán IgG antitestekkel inkubáltuk 30 percen át

37°C-on. Újabb mosást követően az ellenanyag titert szobahőmérsékleten tetrametilbenzidin (TMB) oldattal határoztuk meg. A reakciót fél óra múlva foszforsavval állítottuk le. Az OD-t 450 nm-en mértük. Az eredményeket index értékben határoztuk meg. A vágóértéket a nagyszámú kontrollcsoport eredménye alapján határoztuk meg. A pozitív kontroll (azaz a kalibrátor) és a faktor érték együttesét használtuk az optikai denzitás (OD) vágóértékének megállapításához. A faktor értéke minden kit tanúsítványában külön adott volt. Laboratóriumunkban az OD vágóértéke 1,0-nak adódott. Az 1,0 és az ez alatti értékeket esetén *H. pylori* negatívnak, az 1,0 felettieket pozitív (fertőzött) esetnek minősítettük.

10.2.2. Eredmények

10.2.2.1. A *Helicobacter pylori* ellenes antitestek autoimmun betegek és egészséges kontrollok szérumban

A *H. pylori* ellenes antitesteket mindkét kontrollcsoportban (összesen 349 személyben) és 198, különböző autoimmun beteg (nem differenciált autoimmun betegség, scleroderma, SLE, primer Raynaud-szindróma, rheumatoid arthritis, PM/DM) szérumban határoztuk meg. A *H. pylori* ellenes antitestek szintje szignifikánsan magasabb volt az autoimmun betegcsoportban a kontrollcsoportéhoz képest: 2,4 (0,7–5,4) vs. 1,4 (0,5–3,0), az index medián értéke (25%–75% interkvartilis, $p < 0,0001$). A különbség az életkorra és a nemre történő igazítás után is szignifikáns maradt ($p = 0,014$).

A betegek és az egészséges kontrollok *H. pylori* indexe közti szignifikáns különbség az NDC és az SSc csoportban észlelt magasabb *H. pylori* fertőzés prevalenciájából származott (82%, ill. 78%, 10.2.1. táblázat).

10.2.1. táblázat. A *Helicobacter pylori* előfordulása egyes autoimmun betegségeken

Vizsgált személyek	Vizsgált / pozitív személyek száma (<i>H. pylori</i> prevalencia) [#]	<i>H. pylori</i> index medián (Q1-Q3 tartomány)
Egészséges kontroll	349/206 (59%)	1,50 (0,50-3,95)
Nem differenciált kötőszöveti betegség (NDC)	33/27 (82%)*	3,40 (1,10-6,00)*
Szisztémás sclerosis (SSc)	55/43 (78%)**	3,50 (1,40-5,65)**
Szisztémás lupus erythematosus (SLE)	49/28 (57%)	1,50 (0,60-4,40)
Primer Raynaud-szindróma	26/12 (46%)	2,25 (0,60-5,35)
Rheumatoid arthritis (RA)	21/11 (52%)	1,65 (0,60-4,75)

10.2.1. táblázat. A Helicobacter pylori előfordulása egyes autoimmun betegségekben

Vizsgált személyek	Vizsgált / pozitív személyek száma (H. pylori prevalencia) [#]	H. pylori index medián (Q1-Q3 tartomány)
Polymyositis/dermatomyositis (PM/DM)	14/11 (79%)	2,10 (0,50-4,35)
p	0,0049 (χ^2 teszt)	0,0029 (Kruskal-Wallis teszt)

[#]: H. pylori index > 1; *p<0,05, **p<0,01, Fisher-féle exakt teszt és Dunn post hoc teszt az 1. és a 2. oszlopra

Az ANOVA és post hoc tesztel a H. pylori index medián értéke szignifikánsan magasabb volt nem differenciált kötőszöveti betegségben (NDC) és szisztémás sclerosiban (SSc). Ezzel ellentétben a H. pylori fertőzés nem fordult elő jelentősen gyakrabban az SLE-s, a primer Raynaud-szindrómás, a RA-s vagy a PM/DM-es betegekben, mint az egészséges kontroll személyekben.

10.2.3. Megbeszélés

Autoimmun betegekben emelkedett H. pylori prevalenciát és magasabb anti-IgG átlagot láttunk, de ez a differencia kizárólag az NDC-s és az SSc-s betegekben mért magasabb antitest szintből adódott. A fertőzés jelzőjeként meghatározott H. pylori index (> 1) is csak ebben a két betegcsoportban volt magasabb, mint az egészséges kontrollokban, a többi betegségben nem.

A H. pylori és az autoimmun betegségek közötti kapcsolatnak kiterjedt irodalma van [473]. Az AARDA (American Autoimmune Related Diseases Association) által 2014-ben számon tartott 156 autoimmun vagy autoimmunitáshoz köthető betegségből 95-ben keresték a H. pylori fertőzéssel való kapcsolatot¹³. A H. pylori-ellenes antitestek előfordulását NDC-ben előttünk nem vizsgálták.

Korábban mások sem találtak meggyőző és konzekvens különbséget SLE-s, primer Raynaud-szindrómás, RA-s vagy PM/DM-es betegek és egészségesek H. pylori prevalenciája között, sem a miénket megelőző, sem az azt követő prevalencia vizsgálatokban. Napvilágot láttak közlemények a H. pylori fertőzésnek az immunrendszert

¹³ <http://www.aarda.org/diseaselist> (megtekintve: 2020.01.04-én)

stimuláló és gátló hatásáról is (összefoglalva: [473, 474]), de a *H. pylori* patogén szerepét nem sikerült bizonyítani ezekben az autoimmun betegségekben [457].

Ugyanakkor a *H. pylori* fertőzés NDC-ben előforduló magasabb frekvenciájának jelentősége lehet az egyes definitív autoimmun kórképek, így az SSc felé történő differenciálódás szempontjából. A megromlott gasztrointesztinális motilitáson és a kedvező kolonizációs feltételeken túl a *H. pylori* indukálta immunológiai változások és a sclerodermában megfigyelhető immunológiai eltérések hasonlósága is magyarázhatja a fertőzés gyakoribb előfordulását ebben a betegségben.

Reynauer és mtsai 12 SSc-s beteg közül 5-ben mutattak ki *H. pylori* fertőzést urea kilégzési teszttel (42%), mások 11 PSS-es betegből 7-ben mértek emelkedett anti-*H. pylori* IgG szintet (64%) [460, 461]. Yazawa és mtsai szintén emelkedett anti-*H. pylori* IgG szintet találtak 124 sclerodermás beteg közül 69-ben (56%), mely szignifikáns korrelációt mutatott a nyelőcső diszmotilitással [462]. Többben is beszámoltak SSc-s betegekben szignifikánsan gyakoribb IgG osztályú *H. pylori* ellenes antitestekről az egészséges kontrollokhoz képest, a mi eredményeink megjelenése előtt [475] és után [476]. Egy tanulmányban a szövettani vizsgálattal igazolt *H. pylori* fertőzés kimutathatóan korrelált a bőr-, a gyomor-bélrendszeri és az ízületi tünetek súlyosságával [477]. Mások nem találtak gyakoribbnak a sclerodermás betegek *H. pylori* szeropozitivitását a kontrollokhoz képest [478], sőt voltak, akik a reflux oesophagitist [479] és a Barrett-oesophagust [480] is ritkábbnak találták a *H. pylori* fertőzött sclerodermás betegekben. Ez utóbbi vizsgálat megítélhetőségét azonban csökkenti, hogy az összes beteg tartós protonpumpa-gátló kezelésben részesült.

A prevalencia különbségein alapuló megfigyelések nem jelentenek oki kapcsolatot, ez a mi megfigyeléseink korlátja is. Ugyanakkor valódi összefüggésre utal az a vizsgálat, melynek során, bár nem találtak különbséget a sclerodermás betegek és az egészséges kontrollok *H. pylori* prevalenciája között, kimutatták, hogy a *H. pylori* pozitív SSc-s betegek 90%-a virulens CagA törzzsel fertőződött, a szeropozitív nem SSc-s betegekben ez az arány csak 37% volt [481].

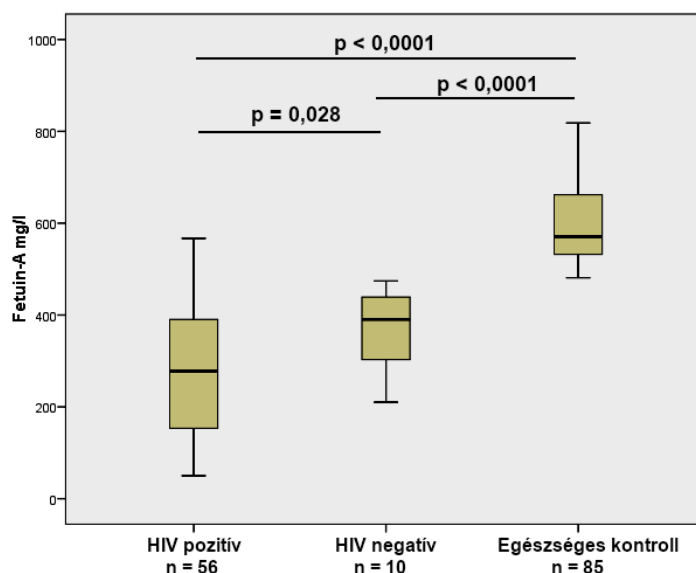
11. A fetuin-A koncentráció vizsgálata egyéb betegségekben

11.1. Szérum fetuin-A koncentráció HIV negatív és HIV pozitív betegekben

A szérum fetuin-A koncentrációt 56, anonim szűrésen HIV pozitívnak és 10, HIV negatívnak bizonyult egyén szérumából végeztük. Az adatokat 85 egészséges kontroll személy (47 férfi, 38 nő, életkor: $39,6 \pm 11,9$ év, átlag $\pm$ SD) értékeivel hasonlítottuk össze. A mintákat az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet Halmi úti HIV szűrőállomása bocsájtotta rendelkezésre.

A fetuin-A meghatározásokat RID módszerrel végeztük. Egyéb laboratóriumi paraméterekkel történő összehasonlításra emiatt és a vérvétel anonim volta miatt nem kerülhetett sor.

A szérum fetuin-A koncentrációt alacsonyabbnak találtuk a HIV pozitív, mint a HIV negatív személyekben, de a HIV negatív személyek értékei is alacsonyabbak voltak az egészséges kontrollokénál (11.1.1. ábra).



11.1.1. ábra. Szérum fetuin-A koncentráció anonim HIV szűrésen vizsgált és egészséges személyekben. A páronkénti összehasonlítás Mann-Whitney teszt p értékei láthatók. Kruskal-Wallis teszt, Tamhane post-hoc teszt: $p = 0,022$ a HIV pozitív és HIV negatív személyek között.

A fetuin-A molekula szerepéről HIV fertőzésben semmit nem tudunk, szérumszintjének alakulásáról is igen kevés adat áll rendelkezésre. Egy korai vizsgálat szerint nincs a fertőzésre hajlamosító polimorfizmus [482]. Barbai és mtsai 15, igen aktív antiretrovirális kezelésben (HAART) részesülő beteg IL-2 (Proleukin) kezelése során a fetuin-A koncentráció azonnali csökkenését, majd 2-3 héten belül történő visszaállását észlelték [6]. A RID-val mért értékek az általunk mérttel egy nagyságrendben voltak. Az eredmények összevetését mégis nehezíti, hogy nem történt összehasonlítás egészséges kontrollokkal, valamint az antiretrovirális kezelés önálló hatását sem lehetett megítélni.

Így a HIV pozitívokban talált alacsonyabb fetuin-A értékek oka lehet maga a vírusinfekció, de az sem kizárt, hogy a HIV fertőzéshez társuló gyulladásos folyamat és a következményes akut fázis reakció vitte a személyek egy részét szűrővizsgálatra. Az IL-2 kezelés hatására a pozitív akut fázis fehérje CRP szintje szintén csak átmenetileg emelkedett náluk [6] és egy másik tanulmányban [483]. HIV pozitív betegek közül Barbai és mtsai emelkedett CRP-t találtak *M. avium*-mal és *Cryptosporidium*-mal fertőzött két betegükben [6]. Eredményeink arra utalnak, hogy a HIV fertőzés során nem alakul ki az akut fázis fehérjék paradox irányú változása, ahogy azt a HCV hepatitis esetében megfigyeltük.

11.2. A szérum fetuin-A koncentráció követése hereditær angioneurotikus ödémában (HANO)

A C1-inhibitor (C1-INH) hiánnyal járó hereditær angioödéma (C1-INH-HANO) autoszomális domináns betegség, melyet a csökkent C1-INH aktivitás jellemez. Az esetek 80%-ában a C1-INH molekula antigénszintje alacsony (I-es típus), 20%-ában megfelelő a molekula koncentrációja, de működése csökkent (II-es típus). A C1-INH-nak fékező szerepe van a komplement, a kontakt, a vérárvadási és a fibrinolitikus rendszerek szabályozásában. Hiánya ezen enzimrendszerek kontrollálatlan, spontán aktiválódásával jár. A kontakt-kinin rendszer aktiválódása a nagy molekulatömegű (HMWK) kininogénből bradykinin felszabadulásával jár. A bradykinin értágulatot, fokozott érpermeabilitást, az extracelluláris térbe történő plazmaszivárgást és ödémaképződést okoz [484-486].

A HANO-s rohamok a végtagokat, az arcot, a törzset, a genitáliákat érintik. A gyomor-béltraktus nyálkahártyájának ödémája akut hasi katasztrófát utánozhat, a felső légutakban kialakuló vizenyő pedig fulladással fenyeget. Fertőzés, mechanikus trauma, szellemi

megerőltetés, hormonális változások és gyógyszerek: ösztrogének és antiogenzin konvertáló enzim (ACE) gátlók hajlamosítanak a rohamok kialakulására [487, 488].

Újabb vizsgálati eredmények a HANO és az atherosclerosis kapcsolatára is rávilágítanak. Demitürk és mtsai csökkent koronáriaáramlási rezervet mutattak ki HANO-s betegekben, mely mikrovaszkuláris endotheliális károsodásra utal [489], míg mások csökkent ujj-plethysmographiás mérési eredmények és aszimmetrikus dimetilarginin szintek alapján jutottak ugyanerre a következtetésre [490].

Korai vizsgálatok kimutatták a fetuin-A immunmoduláns szerepét, azaz csökkentik a PHA indukálta blasztos transzformációt [128] és fokozzák az opszonizációt és a fagocitózist [250, 491].

A fetuin-A molekula a cisztatin szupercsalád tagja [21, 26]. A cisztatinok proteináz inhibitorok. A család tagjaira cisztatin domének tandem ismétlődése jellemző (a fetuin-A-ban és B-ben, valamint a hisztidinben gazdag glikoproteinben kettő, a nagy molekulatömegű kininogénben három [21]). A fetuin-A-ban az A lánc prolinban gazdag karboxi-terminális régiójának aminosav sorrendje a C1q komplement komponens kollagénszerű doménjében található emlékeztet [18].

A fetuin-A, a C1q és a HMW kininogén közötti szerkezeti hasonlóság, valamint a fetuin-A proteolitikus érzékenysége [21] miatt találtuk érdekesnek a fetuin-A, valamint egyéb gyulladásos markerek, így a CRP és a TNF α (TNFSF2) koncentrációjának vizsgálatát HANO-s betegekben, az egészséges kontrollokhoz viszonyítva, valamint roham előtt és alatt. A szérum fetuin-A koncentrációt HANO-ban előttünk még nem vizsgálták.

11.2.1. Betegek és módszerek

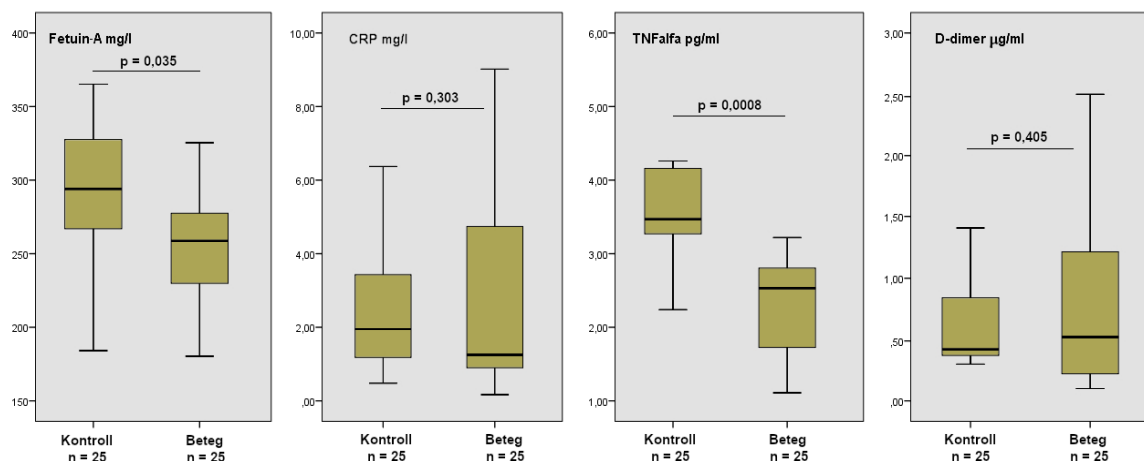
Huszonöt HANO-s beteg (8 férfi, 17 nő, életkor: 31, 27–39 év, medián, Q1-Q3), 20 I-es, 5 II-es típusú HANO-s beteg rohammentes és roham alatt levett vérmintáját hasonlítottuk össze 25 egészséges kontrolléval (15 férfi, 10 nő, életkor: 30, 27–35 év). A HANO diagnózisát a családfa-analízis, a klinikai tünetek és a komplement-analízis segítségével állítottuk fel (alacsony C1-INH antigén szint és/vagy aktivitás, alacsony normális C4 és normális C1q szint). Tíz beteg tartós profilaxisban részesült (9 danazol és 1 tranexámsav). A többi 15 beteg nem kapott profilaxist. A heveny ödémás rohamot humán plazma eredetű C1-INH koncentráttummal (Berinert, CSL Behring, Marburg, Németország) kezeltük. Az ödémás roham elhelyezkedése, valamint a tünetek jelentkezésétől a kezelésig eltelt idő a

Nemzeti HANO regiszterben került rögzítésre. A betegek közül 12-nek submucosus (közöttük 7 hasi, 2 felső légúti), 12-nek subcutan és 1-nek kevert lokalizációjú rohama volt. A kontrollcsoportot 25 egészséges, gyógyszert nem szedő személy (10 férfi, 15 nő, életkor: $32,5 \pm 7,8$ év) alkotta. A betegek és az egészséges kontrollok életkora és nemi eloszlása statisztikailag nem tért el egymástól. A rohammentes időszak vérmintáit a szokásos éves kontrollvizsgálatok alkalmával, a rohamos mintákat a kezelés megkezdése előtt, a tünetek jelentkezését követő 6 órán belül vettük le. A rohamok idején egy betegnek sem volt infekcióra utaló klinikai tünete. A natív, EDTA-s és citrátos vérmintákat -70°C -on tároltuk felhasználásig.

Mindegyik paramétert a beteg ugyanazon aliquotjából határoztuk meg. Az aliquotokat egyenlő hosszúságú ideig olvasztottuk. A plazma fetuin-A és $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) koncentrációt ELISA-val (BioVendor, Csehország, ill. Thermofisher Scientific Inc, Waltham, USA) határoztuk meg, a gyártó utasításai szerint. A CRP szintet EDTA-s vérből kémiai analízissel (Beckman Coulter Inc., California, USA) mértük. A D-dimer koncentrációt citrátos vérből latex agglutinációs immunturbidimetriás módszerrel COAG XL koagulométeren a Dia-D-DIMER teszttel (Diagon Ltd., Budapest) határoztuk meg. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá.

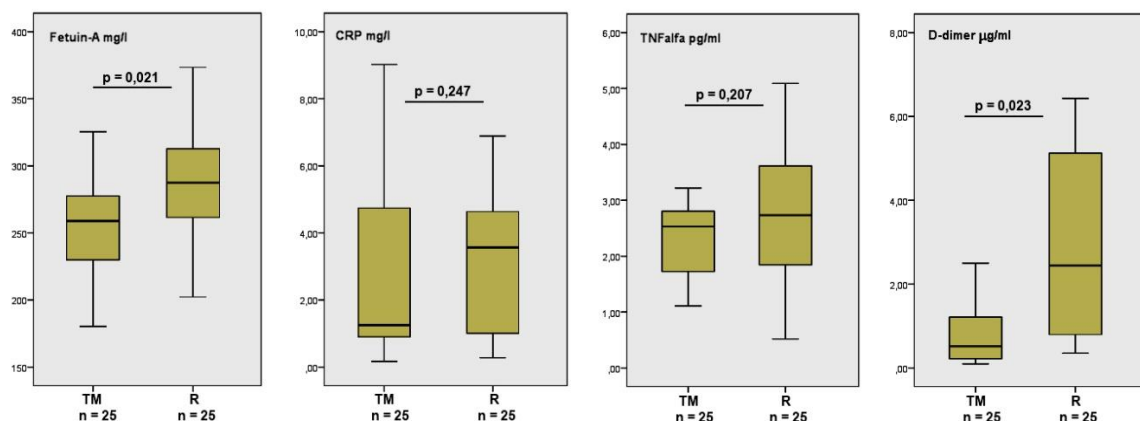
11.2.2. Eredmények

Az egészséges kontrollokhoz képest a rohammentes állapotban lévő HANO-s betegeknek szignifikánsan alacsonyabb fetuin-A és $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) koncentrációjuk volt (11.2.1. ábra). A CRP és a D-dimer szintje nem különbözött jelentősen a két csoport között.



11.2.1. ábra. Egészséges személyek és hereditær angioneurotikus ödémás betegek szérumban fetuin-A, CRP, TNFα és D-dimer koncentrációja. Medián és kvartilis értékek. Az összehasonlítás Mann-Whitney teszttel történt. CRP: C-reaktív protein; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2)

A rohamok alatt a fetuin-A szint jelentősen emelkedett a rohammentes állapothoz képest (11.2.2. ábra). Ezzel ellentétben a roham alatt és a rohammentes periódusban mért CRP és TNFα (TNFSF2) koncentráció nem különbözött lényegesen egymástól. A D-dimer szint szignifikánsan emelkedett a roham alatt a rohammentes periódushoz képest és magasabb volt, mint az egészséges kontrollokban ($p < 0,006$). A thromboemboliás betegségekben az általánosan elfogadott 0,5 μg/ml-es határértékkel szemben az általunk használt Diagon kit a 0,7 μg/ml-es értékkel harmonizál legjobban [492], ezért a rohammentes időszakban kapott érték negatívnak tartható.



11.2.2. ábra. Hereditær angioneurotikus ödémás betegek rohammentes időszakban és roham alatt mért szérumban fetuin-A, CRP, TNFα és D-dimer koncentrációja. Medián és kvartilis értékek. Az összehasonlítás Wilcoxon-teszttel történt. TM: rohammentes időszak; R: roham alatt; CRP: C-reaktív protein; TNFα: tumor nekrozis faktor-α (TNFSF2)

A rohammentes periódusban a szérum fetuin-A szint nem korrelált sem a CRP-vel ($r = -0,111$, $p = 0,598$), sem a $\text{TNF}\alpha$ -val (TNFSF2) ($r = 0,021$, $p = 0,939$), sem a D-dimerrel ($r = 0,327$, $p = 0,172$), sem azok egymással. Roham alatt a fetuin-A szintén nem korrelált sem a CRP-vel ($r = 0,189$, $p = 0,377$), sem a $\text{TNF}\alpha$ -val (TNFSF2) ($r = -0,134$, $p = 0,634$), de a D-dimer szinttel sem ($r = -0,314$, $p = 0,177$). A tartós profilaxist kapó és az abban nem részesülő betegek fetuin-A szintje sem különbözött szignifikánsan egymástól.

A betegeket a roham lokalizációja szerint is csoportosítottuk (11.2.2. táblázat). A szérum fetuin-A koncentráció a subcutan ödémás roham esetében jelentősen emelkedett a rohammentes periódushoz képest. Submucosus roham esetén is észleltük a különbséget roham alatti és a nyugalmi időszak értéke között, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns.

11.2.2. táblázat. A szérum fetuin-A, CRP és $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) koncentrációja a rohamok lokalizációja szerint hereditár angioneurotikus ödémás betegekben

	Rohammentes periódus	Roham alatt	$p^{\#}$
Subcutan roham (n = 12)			
Fetuin-A (mg/l)	254 (200-273)	295 (260-325)	0,033
CRP (mg/l)	1,19 (0,99-6,16)	3,61 (0,79-4,44)	0,722
$\text{TNF}\alpha$ (ng/ml)	2,19 (1,70-2,83)	2,73 (1,75-3,71)	0,237
D-dimer, ($\mu\text{g/ml}$)	0,52 (0,22-0,74)	1,15 (0,41-4,47)	0,110
Submucosus roham (n = 12)			
Fetuin-A (mg/l)	265 (241-297)	286 (262-320)	0,308
CRP (mg/l)	1,84 (0,71-4,41)	3,64 (1,34-5,66)	0,272
$\text{TNF}\alpha$ (ng/ml)	2,58 (1,11-2,88)	3,17 (1,80-4,75)	0,310
D-dimer, ($\mu\text{g/ml}$)	0,72 (0,17-2,19)	2,44 (1,07-16,52)	0,116

Medián (25-75 percentilis) értékek. Az összehasonlítás Wilcoxon-tesztel történt. CRP: C-reaktív protein; $\text{TNF}\alpha$: tumor nekrosis faktor- α (TNFSF2)

11.2.3. Megbeszélés

A fetuin-A koncentrációt HANO-ban még nem vizsgálták. A rohammentes HANO-s betegekben talált, az egészséges kontrollokhoz képest csökkent szérum fetuin-A koncentráció nem magyarázható a molekula negatív akut fázis tulajdonságával [84, 90], mert a CRP és a $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) nem emelkedett ennek megfelelően. A betegeknek nem volt dokumentált fertőzésük a roham alatt. Mivel a fetuin-A koncentráció egyik betegcsoportban sem korrelált sem a CRP, sem a $\text{TNF}\alpha$ (TNFSF2) szinttel, az egészségesekhez képest talált csökkenés mechanizmusa valószínűleg független az akut fázis reakciótól.

A tünetmentes betegek TNF α (TNFSF2) koncentrációja is az egészséges kontrollok alatt volt. Mások (Demitürk és mtsai) [493] és a Semmelweis Egyetem Angioödéma Központ munkatársai (Veszeli és Farkas) is ezt találták korábban egy másik betegcsoportban [494]. Demitürk csak az I-es típusú HANO-ban észlelte, a II-es típusban nem.

A TNF α (TNFSF2) szintet a danazol kezelés is csökkenthette, ahogy ezt endometriosis kezelése során megfigyelték [495], de a HANO danazol kezelése során ezt még nem vizsgálták.

A szérum fetuin-A koncentráció meglepő módon szignifikánsan emelkedett a HANO-s rohamok alatt, különösképpen a subcutan formában. A roham alatti fetuin-A emelkedés elvileg lehetne a hemokoncentráció hatása is, azonban ennek ellene szól, hogy a vizsgált többi paraméter (CRP, TNF α) koncentrációja nem emelkedett a roham alatt.

Számos megfigyelés szól ugyanakkor a fetuin-A gyulladáscsökkentő szerepe mellett. A molekula neutrofil granulocitákban gátolja a szuperoxid gyökök felszabadulását [496], deaktiválja a makrofágokat [262]. Nélkülözhetetlen a spermin TNF α (TNFSF2) felszabadulást gátló hatásának létrejöttéhez [94] és direkt módon gátolja a kórokozó-kapcsolt molekuláris mintázat (pathogen-associated molecular pattern, PAMP)-indukálta high mobility group box 1 (HMGB1) felszabadulást az elsődleges immunválasz során [93]. Emellett a fibrózis kialakulásában központi szerepet játszó TGF β antagonistája [27] és segíti a sebgyógyulást [497].

A fetuin-A erőteljesen és specifikusan gátolja a karragén (tengeri hínárból előállított, lineáris kéntartalmú poliszacharid-család) indukálta TNF α (TNFSF2) felszabadulást és ödémaképződést patkányban [263]. Szintén patkányban az exogén fetuin-A adása védő hatásának bizonyult kísérletesen előidézett cerebrális ischaemiában [97]. A védő hatás a helyi TNF α (TNFSF2) termelés gátlásában, az infarcerált terület méretének és az ödémás terület csökkenésében nyilvánult meg.

Emellett az ischaemiás szövetekből és szeptikus sokkban felszabaduló késői proinflammatorikus citokin, a HMGB1 2-3-szorosára emeli a fetuin-A koncentrációt [498]. A TNF α -val (TNFSF2) és az IL-1 β -val együtt a HMGB1 szintén fokozza az érpermeabilitást [499]. A fetuin-A szint emelkedés biológiai jelentősége ezáltal az érpermeabilitás csökkentése, az ödémaképződés gátlása, a gyulladás késői fázisának csökkentése, az endothel barrier funkciójának megőrzése.

Az angioödémás roham alatt észlelt fetuin-A szint emelkedés másik magyarázata a kinin-bradykinin rendszer aktiválódása lehet. Az utóbbi években érdekes közlések láttak napvilágot, melyek a bradykinin rendszer és a fetuin-A kapcsolatára utalnak. Az 1-es típusú bradykinin receptor (BR1) a gyulladás által indukált receptor. A BR1-re knock-out egerek fetuin-A koncentrációja csökkent a vad típusúakhoz képest [500]. Ezen túlmenően, ezeknek az egereknek – a fetuin-A hiányára jellemzően – csökkent inzulinrezisztenciájuk van és védettek a magas zsírtartalmú étrend indukálta zsírmájjal szemben is [308]. Így nem kizárt, hogy a BR1 receptor aktiválódása a fetuin-A szintézis fokozódásával jár együtt.

A vizsgált HANO-s betegek CRP szintje nem változott lényegesen, sem a kontrollokhoz viszonyítva, sem pedig a rohamok előtt vagy alatt. Ez egybehangzik Oshawa megfigyeléseivel, aki a leukocitózis ellenére normális CRP szintet talált, még hasi roham esetén is [501].

Mások viszont a betegek 20%-ában még rohammentes periódusban emelkedett CRP szintet mértek, mely a következő 24 órában tovább nőtt, főleg, ha a betegnek hasi rohama volt [502]. A jelenséget az állandóan jelen lévő szubklinikus gyulladással és rohamok alatt a bakteriális LPS transzlokáció stimuláló hatásával magyarázták [502]. A CRP koncentráció eltérésnek a mintavétel eltérő időzítése is oka lehet. Hofmann vizsgálataiban a CRP emelkedése a roham elején (az első 5–24 órában) volt észlelhető, szemben a 7. és 22. napon mért értékekkel. Ezzel egybehangzóan Veszeli és mtsai egy másik betegcsoportban (n = 26) a CRP-t emelkedettnek találták a rohammentes időszakban is, mely a roham alatt, a neutrofil aktiváció során tovább nőtt [494]. Ez némileg ellentmond a mi eredményeinknek, mivel a rohamos vérmintákat az első 6 órában vettük le. Az esetkontrollos felépítés és kis esetszám a vizsgálataink korlátja. Az irodalmi adatokkal egybehangzóan a rohamok alatt a D-dimer szint emelkedett [503-505].

Összefoglalva, a szérumban fetuin-A koncentráció vizsgálatának nincs diagnosztikus értéke HANO-ban, de a subcutan roham alatt tapasztalható emelkedés védő szerepre utal. A szérumban fetuin-A koncentráció emelkedésének oka az endothelium károsodás által kiváltott fokozott szintézis lehet, mely a barrier funkciót védi.

12. A szérum fetuin-A koncentráció meghatározásának nyitott kérdései

A fetuin-A koncentráció mérésével és értékelésével kapcsolatban még több kérdés nyitott [506]. A legfontosabb a referencia értékek és a standard mértékegységek hiánya. Utoljára a RID-val történt mérések idején törekedtek arra, hogy abszolút értékben meghatározzák a fetuin-A szérumkoncentrációját. A poliklonális antiszérumot használó RID-val mért 600 mg/l körüli normálérték az össz-fetuin-A koncentrációnak felel meg. Később, az ELISA-val történő mérések során ez már nem számított annyira fontosnak. A referencia értékek és a standard mértékegységek hiánya miatt a későbbi tanulmányokban mért értékek eloszlása alapján képzett csoportok (medián alatt és felett, tercilisek, kvartilisek stb.) összehasonlításakor nem volt szempont az egységes referencia értékek meghatározása. Mivel számos tényező befolyásolja a fetuin-A koncentrációt, nehéz életkori referencia értékeket felállítani, különösképpen nehéz csecsemő- és gyermekkorban [506].

A manapság használt, kereskedelmi forgalomban lévő ELISA kitek nem összemérhetők. Annak ellenére, hogy egyre nagyobb számban látnak napvilágot a fetuin-A ról szóló közlemények, alig kap figyelmet az a tény, hogy a leírt koncentrációk (akár az egészséges kontrollok értékei is) nagyfokban eltérnek egymástól. Mindaddig egyetlen tanulmányban foglalkoztak a ma kereskedelmi forgalomban lévő ELISA kitek közötti eltérés lehetséges molekuláris mechanizmusával [507]. Smith és mtsai a Biovendor (Modrice, Csehország) és az Epitope Diagnostics (San Diego, USA) ELISA kitjeit hasonlították össze normális vesefunkciójú és krónikus veseelégtelen betegektől származó mintákon. Mindkét kitet széles körben használják. Igen gyenge egyezést találtak az ezekkel kittel meghatározott értékek között: ugyanazon mintán az utóbbival több mint kétszer magasabb értékeket mértek, mint az előbbivel (a regressziós egyenes paraméterei a veseelégtelenek csoportjában: $y = 2,52x - 0,05$, $r^2 = 0,694$). Az eltérést a két kit glikozilált plazma fetuin-A iránti affinitásának különbözőségével magyarázták [507]. A glikoziláció mellett a foszforiláció is befolyásolhatja a használatban lévő ELISA kitek érzékenységét és a mérés pontosságát, de ennek a hatását még nem vizsgálták. Mindezek miatt a fetuin-A mérések eredményei csak viszonylagosan hasonlíthatók össze egymással.

Saját tapasztalataim is alátámasztják Hausler és mtsai álláspontját, miszerint a régebbi assay-k (RID, EID) specifikusabbak (bár szerinte egyben kevésbé pontosak) a ma általánosan használt ELISA-hoz képest [44]. Egy 2019-ben megjelent vizsgálatban használt

fetuin-A ELISA kit IACV és IECV értéke 5-10% [221], ami nem jobb, mint az általunk használt RID esetében. Egy RID vizsgálat ára az ELISA-nak közelítőleg harmadára becsülhető.

A gyártók leírásában vagy a tudományos közleményekben nem hozzáférhető, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő ELISA kitek milyen glikoziláltságú és foszforiláltságú fetuin-A-t, annak melyik epitópját ismerik fel. Ezért addig ezek nem tekinthetők jobbnak a hagyományos RID-hoz képest, korszerűségük, gyorsaságuk, specificitásuk ellenére sem.

Nem ismert a fehérje koncentráció változásának fiziológias ritmusa. Ugyanazon egyénben ismételt fetuin-A koncentrációt csak az akut fázis reakció időbeli lefutásának, vagy hetekig-hónapokig tartó követés céljából mértek, de a diurnális ritmus feltérképezésére nem történt vizsgálat. Irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a fetuin-A szint hétről hétre változik [508].

13. Összefoglalás: A szérum fetuin-A koncentráció meghatározásának gyakorlati jelentősége

A fetuin-A koncentrációját számos klinikai tanulmányban vizsgálták. Kicsit sarkosan fogalmazva, alig van olyan betegség, melyben ne határozták volna meg a szérum szintjét. Mégis, immár 60 évvel a molekula felfedezését követően sem találta meg helyét, biomarker szerepét. Ez azért is elgondolkodtató, mert a molekula élettani szérumkoncentrációja jelentős (az első leírók és mi is kb. 600 mg/l-t mértünk). Ezt a késlekedést részben magyarázza a molekula multifunkcionális jellegének fokozatos felismerése (különböző doménjei eltérő szerepet töltenek be), valamint a korábban tárgyalt életmódi tényezők és a genetikai polimorfizmusának szérumszintre gyakorolt hatása [394].

A fetuin-A számos funkciója közül az irodalom a kalcifikáció gátlásának tulajdonít elsősorban szerepet: súlyos veseelégtelen, dializált betegekben a csökkent koncentráció egyértelműen rossz prognosztikai marker [352, 388, 389]. Az egyéb kórképek közül a nem alkoholos eredetű zsírmájban (NAFLD) észlelhető emelkedést is többen megfigyelték [222, 465], de követéses vizsgálatot nem végeztek. Bár a molekulának kétségtelenül szerepe van az atherosclerosis kialakulásában, a korábban említett, két lépcsős, ellentétes irányú változás miatt az össz-fetuin-A szérumszint nem alkalmas a folyamat diagnosztizálására. A molekula egyes polimorfizmusai (rs4917, rs4918) befolyásolhatják a molekula funkcióját, de a variánsok közötti különbséget felülírják metabolikus tényezők, elsősorban az elhízás és a cukorbetegség.

Munkámban az össz-fetuin-A koncentráció változását mértem. Eredményeim alapján a szérumkoncentráció diagnosztikus hasznosíthatóságát azokban a kórképekben látom, ahol a legmarkánsabb eltéréseket találtam, ezek:

1. A krónikus májbetegségek, így a májcirrhosis követése, kimenetelének előrejelzése. Mivel a fetuin-A részt vesz a csontszövet mineralizációjában, különösen ígéretes lehet vizsgálata a krónikus májbetegségekhez társuló csontfolyamatokban.
2. Bár a 24. hétig kötelezően elvégzendő OGTT-vel a GDM diagnózisa megállapítható, a fetuin-A szintnek prognosztikai jelentősége lehet az ismételt GDM kialakulásában.

A szabadon keringő és a CPP-ben jelen lévő fetuin-A külön-külön történő meghatározására már történtek kísérletek [381, 385], de rutin klinikai vizsgálat nem. Heiss és mtsai szerint

az elsődleges CPP a keringő fetuin-A legfeljebb 5%-át tartalmazza [28]. A foszfofetuin-A, a CPP-ben kötött és szabad fetuin-A arány, valamint a molekula eltérő glikoziláltságú formáinak nagyszámú betegen történő célzott vizsgálata tovább szélesítheti a fetuin-A meghatározás indikációját.

14. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. A bakulovírus expressziós rendszerben termelt humán rekombináns fetuin-A foszforilált és dózisfüggő módon gátolja a patkány embrió fibroblasztokból (Rat-I sejtekből) és a patkány izomsejtekből származó inzulin receptor tirozin kináz aktivitását.
2. A csökkent szérum fetuin-A koncentráció az alkoholos májcirrhosis halálozásának jó prognosztikai mutatója. A csökkent fetuin-A koncentráció inkább a hepatocita diszfunkció és kevésbé az akut fázis reakció következménye. A primer biliaris cholangitis és Wilson-kór eredetű májcirrhosisban a szérum fetuin-A szint a betegség súlyosságával arányosan csökken. Wilson-kórban az 510 mg/l és ez alatti fetuin-A koncentráció szignifikánsan nagyobb cirrhosis-gyakorisággal társul. A fetuin-A koncentráció nem függ össze a H1069Q gén mutációjával.
3. Krónikus C-vírus hepatitiszes betegekben a pozitív és negatív akut fázis fehérjék koncentrációja paradox irányban változik, mely visszafordul az interferon- α és ribavirin kezelésre reszponder betegekben.
4. A gesztációs diabéteszes betegeknek a 3. trimeszterre szignifikánsan magasabb fetuin-A koncentrációjuk van, mint az egészséges várandósoknak. Az anyai szérum fetuin-A koncentráció pozitívan korrelál a BMI-vel GDM-ben, valamint az inzulinrezisztencia indirekt paramétereivel (éhomiai C-peptid és C-peptid/vércukor arány) mind GDM-es betegekben, mind egészséges várandósokban. Az anyai szérum fetuin-A szint pozitívan korrelál az anyai TNF α (TNFSF2) és a leptin értékekkel mindkét várandós csoportban, valamint negatívan korrelál az újszülöttek antropológiai paramétereivel.
5. A szérum fetuin-A koncentráció szignifikánsan csökken praeeclampsiában és HELLP szindrómában. Praeeclampsiában az alacsony fetuin-A szint az anyai életkortól, a BMI-től és a gesztációs időtől is függetlenül jelzi a praeeclampsiát.
6. A szívinfarktust túlélő, megtartott vesefunkciójú betegek szérum fetuin-A koncentrációja nem korrelál a rezisztin szinttel, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a fetuin-A döntően metabolikus úton és kevésbé a gyulladásos mechanizmussal vesz részt az érlemezés folyamatában ebben a betegcsoportban. A szérum TNF α /ghrelin hányados igen jó arányban különíti el az

egészséges kontrollokat és az atherosclerosis kemény végpontját jelentő szívinfarktust túlélte betegeket.

7. A fetuin-A koncentráció fordítottan korrelál az érlemezsedés mértékét jelző kalcifikációs és a Bollinger score-ral.
8. A fetuin-A rs4917 C/T és az rs4918 C/G allél polimorfizmus magyarországi eloszlása megfelel az európai populáció átlagának.
9. Egészséges, nem elhízott egyéneknél a fetuin-A rs4917 polimorfizmus minor T allélja alacsonyabb TNF α (TNFSF2) és magasabb leptin szinttel társul, mint a nem T allél. Az rs4918 polimorfizmus minor G allélja ugyancsak alacsonyabb TNF α (TNFSF2) és adiponektin és magasabb leptin szinttel társul a major C allélhoz képest.
10. A PPAR α intron 7 G2467C polimorfizmus C allélja szignifikánsan magasabb szérumban fetuin-A szinttel jár együtt, mint a non-C allél. A PPAR γ 2 Pro12Ala polimorfizmus Pro allélja szintén magasabb fetuin-A szinttel társul, de ez a kapcsolat nem független a BMI-től és a posztinfarktus státusztól.
11. Nem differenciált kötőszöveti betegségben gyakrabban fordul elő H. pylori pozitivitás, mint más poliszisztémás autoimmun betegségben.
12. Hereditár angioneurotikus ödémában a fetuin-A koncentráció szignifikánsan alacsonyabb az egészségesekéhez képest. Roham alatt azonban emelkedik, melynek endothel-protektív, érpermeabilitást csökkentő hatása lehet.

15. Saját közlemények jegyzéke

15.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben

1. **Kalabay L**, Mathur S, Bobin S, Arnaud P. Electrophoretic and isoelectric focusing analysis of human recombinant α 2-HS glycoprotein: Analysis of the posttranslational events. *Electrophoresis* 17(3): 529-532. (1996)
Független idéző¹⁴: 5, függő idéző: 4, összes idéző: 9
2. **Kalabay L**, Chavin K, Lebreton JP, Robinson KA, Buse MG, Arnaud P. Human recombinant α 2-HS glycoprotein is produced in insect cells as a full length inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase. *Hormone and Metabolism Research* 30(1): 1-6. (1998)
Független idéző: 31, függő idéző: 10, összes idéző: 41
3. **Kalabay L**, Jakab L, Fekete B, Prohászka Z, Benkő Zs, Telegdy L, Lőrincz Zs, Závodszky P, Arnaud P, Füst G. Human fetuin/ α 2HS-glycoprotein level as a novel indicator of liver cell function and short-term mortality in patients with liver cirrhosis and liver cancer. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 14(4): 389-394. (2002)
Független idéző: 54, függő idéző: 15, összes idéző: 69
4. **Kalabay L**, Fekete B, Czirják L, Horváth L, Daha MR, Veres A, Fónyad G, Horváth A, Viczián Á, Singh M Hoffer I, Füst G, Romics L, Prohászka Z. *Helicobacter pylori* infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60. *Helicobacter* 7(4): 250-256. (2002)
Független idéző: 34, függő idéző: 1, összes idéző: 35
5. **Kalabay L**, Cseh K, Pajor A, Baranyi É, Csákány Gy.M, Melczer Zs, Speer G, Kovács M, Siller Gy, Karádi I, Winkler G. Correlation of maternal serum fetuin/ α 2-HS-glycoprotein concentration with maternal insulin resistance and anthropometric parameters of neonates in normal pregnancy and gestational diabetes. *European*

¹⁴ A WoS/Scopus rendszerben szereplő független idézettségek

Journal of Endocrinology 147(2): 243-248. (2002)

Független idéző: 66, függő idéző: 3, összes idéző: 69

6. **Kalabay L**, Nemesánszky E, Csepregi A, Pusztay M, Dávid K, Horváth G, Ibrányi E, Telegdy L, Pár A, Bíró A, Fekete B, Gervain J, Horányi M, Ribiczey P, Csöndes M, Kleiber M, Walentin Sz, Prohászka Z, Füst G. Paradoxical alteration of acute phase protein levels in patients with chronic hepatitis C treated with interferon- α -2b.

International Immunology 16(1): 51-54. (2004)

Független idéző: 22, függő idéző: 1, összes idéző: 23

7. Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, **Kalabay L**, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J.Jr. Association of increased serum heat shock protein 70 and C- reactive protein concentrations and decreased serum alpha2-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis elevated liver enzymes and low platelet count. Journal of Reproductive Immunology 73(2): 172-179. (2007)

Független idéző: 28, függő idéző: 14, összes idéző: 42

8. **Kalabay L**, Gráf L, Vörös K, Jakab L, Benkő Zs, Telegdy L, Fekete B, Prohászka Z, Füst G. 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 Gastroenterology 7: 15. (2007)

Független idéző: 32, függő idéző: 4, összes idéző: 36

9. Molvarec A, **Kalabay L**, Derzsy Z, Szarka A, Halmos A, Stenczer B, Arnaud P, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J.Jr. Preeclampsia is associated with decreased serum alpha2-HS glycoprotein (fetuin-A) concentration. Hypertension Research 32(8): 665-669. (2009)

Független idéző: 26, függő idéző: 6, összes idéző: 32

10. Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Bíró G, Sótónyi P, Széplaki Z, Szabolcs Z, Prohászka Z, **Kalabay L**, Acsády Gy. Fetuin-A serum levels in patients with aortic aneurysms of Marfan syndrome and atherosclerosis. European Journal of Clinical Investigation 41(2): 176-182. (2011)

Független idéző: 5, függő idéző: 2, összes idéző: 7

11. Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Széplaki G, Prohászka Z, **Kalabay L**, Acsády Gy. Serum Fetuin-A levels inversely correlate with the severity of arterial calcification in patients with chronic lower extremity

atherosclerosis without renal disease. *International Angiology* 30(5): 474-480. (2011)

Független idéző: 11, függő idéző: 2, összes idéző: 13

12. Vörös K, Gráf L Jr, Prohászka Z, Gráf L, Szenthe P, Kaszás E, Böröcz Z, Cseh K, **Kalabay L.** Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. *European Journal of Clinical Investigation* 41(7): 703-709. (2011)

Független idéző: 26, függő idéző: 4, összes idéző: 30

13. Vörös K, Prohászka Z, Kaszás E, Alliquander A, Terebesy A, Horváth F, Janik L, Sima Á, Forrai J, Cseh K, **Kalabay L.** Serum ghrelin level and TNF-alpha/ghrelin ratio in patients with previous myocardial infarction. *Archives of Medical Research* 43(7): 548-554. (2012)

Független idéző: 8, függő idéző: 0, összes idéző: 8

14. Vörös K, Cseh K, **Kalabay L.** A fetuin-A szerepe cardiovascularis betegségekben. *Orvosi Hetilap* 155(1): 16–23. (2014)

Független idéző: 6, függő idéző: 0, összes idéző: 6

15. Temesszentandrás Gy, Vörös K, Böröcz Z, Kaszás E, Prohászka Z, Falus A, Cseh K, **Kalabay L.** Association of human fetuin-A rs4917 polymorphism with obesity in two cohorts. *Journal of Investigative Medicine* 63(3): 548-553. (2015)

Független idéző: 6, függő idéző: 1, összes idéző: 7

16. Temesszentandrás Gy, Vörös K, Márkus B, Böröcz Z, Kaszás E, Prohászka Z, Falus A, Cseh K, **Kalabay L.** Human fetuin-A rs4918 polymorphism and its association with obesity in healthy persons and in patients with myocardial infarction in two Hungarian cohorts. *Medical Science Monitor* 22: 2742-2750. (2016)

Összes idéző: 4, független idéző: 4, függő idéző: 0

17. Márkus B, Vörös K, Supák D, Melczer Zs, Cseh K, **Kalabay L.** Association of PPAR alpha intron 7 G/C, PPAR gamma 2 Pro12Ala, and C161T polymorphisms with serum fetuin-A concentrations. *PPAR Research Article ID 7636019*, 8 p. (2017)

Független idéző: 1, függő idéző: 0, összes idéző: 1

18. Márkus B, Veszeli N, Temesszentandrás Gy, Farkas H*, **Kalabay L*.** Serum fetuin-A, tumor necrosis alpha and C-reactive protein concentrations in patients with

hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency. Orphanet Journal of Rare Diseases 14: 67. (2019)

*Megosztott utolsó szerzők

Független idéző: 0, függő idéző: 0, összes idéző: 0

Rövid közlemények

1. **Kalabay L**, Szalay F, Nemesánszky E, Telegdy L, Jakab L, Romics L. Decreased serum alfa2-HS-glycoprotein concentration in patients with primary biliary cirrhosis. [correspondence] Journal of Hepatology 26(6): 1426-1427. (1997)

Független idéző: 6, függő idéző: 4, összes idéző: 10

2. Arnaud P, **Kalabay L**. Alpha2HS-glycoprotein: a protein in search of a function. [Commentary] Diabetes/Metabolism Research and Reviews 18(4): 311-314. (2002)

Független idéző: 24, függő idéző: 1, összes idéző: 25

Könyvfejezet

1. **Kalabay L**, Prohászka Z, Füst G, Benkő Zs, Telegdy L, Szalay F, Tóth K, Gráf L, Jakab L, Pozsonyi T, Arnaud P, Fekete B, Karádi I. Human fetuin/α2HS-glycoprotein levels in sera of patients with liver disease. In: Liver Cirrhosis: New Research. Chen TM. (ed.) Nova Science Publishers Inc., Hauppauge New York USA 63-75. (2005)

Független idéző: 1, függő idéző: 0, összes idéző: 1

Az értekezés alapját képező közlemények független idézettsége összesen: 396

Hozzászólás

1. Wittmann I, Degrell P, Molnár GA, Tamaskó M, Nagy KM, Schmidt E, Fehér E, **Kalabay L**, Laczy B, Wagner L, Wagner Z, Nagy J. Diagnosis and succesful management of calciphylaxis in a pancreas-kidney transplant patient. [hozzászólás]

Nephrology Dialysis Transplantation 20(7): 1520-1521. (2005)

Független idéző: 3, függő idéző: 1, összes idéző: 4

Correction in: Nephrology Dialysis Transplantation 20(10): 2295. (2005)

Független idéző: 1, függő idéző: 0, összes idéző: 1

15.2. Az értekezésben nem tárgyalt, de a témához kapcsolódó további nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben

1. Spangelo BL, DeHoll PD, **Kalabay L**, Bond BR, Arnaud P. Neurointermediate pituitary lobe cells synthesize and release interleukin-6 in vitro: effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 β . Endocrinology 135(5): 556-563. (1994)
Független idéző: 51, függő idéző: 5, összes idéző: 56
2. Bíró L, Domján Gy, Falus A, Jakab L, Cseh K, **Kalabay L**, Tarkovác G, Kramer J, Prohászka Z, Jákó J, Füst, G, Császár A. Relationship among levels of complement components acute phase proteins and some cytokines in patients with multiple myeloma. European Journal of Clinical Investigation 28(8): 679-686. (1998)
Független idéző: 22, függő idéző: 3, összes idéző: 25
3. Jakab L, **Kalabay L**. The acute phase reaction syndrome: the acute phase reactants phase (a review). Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 45(3-4): 409-418. (1998)
Független idéző: 14, függő idéző: 10, összes idéző: 24
4. Horváth L, Czirják L, Fekete B, Jakab L, Pozsonyi T, **Kalabay L**, Romics L, Miklós K, Varga L, Prohászka Z, Nagy E, Daha MD, Füst G. High levels of antibodies against C1q are associated with disease activity but not with organ manifestations in SLE patients. Clinical and Experimental Rheumatology 19(6): 667-672. (2001)
Független idéző: 57, függő idéző: 8, összes idéző: 65
5. Horváth L, Császár A, Falus A, Dieplinger H, Hováth A, Puskás É, Halm G, Bányai A, Pálóczi K, László E, **Kalabay L**, Romics L, Füst G. IL-6 and lipoprotein (a) [Lp(a)] concentrations are related only in patients with high apo(a) isoforms in monoclonal gammopathy. [Short Communication] Cytokine 18(6): 340-343. (2002)
Független idéző: 3, függő idéző: 0, összes idéző: 3

6. Bakos N, Fekete B, Prohászka Z, Füst G, **Kalabay L**. High prevalence of IgG and IgA antibodies to 19 kD *Helicobacter pylori*-associated lipoprotein in chronic urticaria. *Allergy* 58(7): 663-667. (2003)

Független idéző: 37, függő idéző: 0, összes idéző: 37

7. Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandrás Gy, Pozsonyi T, **Kalabay L**, Varga L, Gombos T, Blaskó B, Bíró A, Madsen HO, Radics J, Gergely P, Füst G, Cziráj L, Garred P, Fekete B. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the *MBL2* gene. *Clinical Immunology* 125(3): 230-236. (2007)

Független idéző: 25, függő idéző: 2, összes idéző: 27

8. Márkus B, Herszényi L, Matyasovszky M, Vörös K, Torzsa P, Rurik I, Tulassay Zs, **Kalabay L**. The diagnosis and therapy of *Helicobacter pylori* infection in Hungary - comparison of strategies applied by family physicians and internists. *Digestive Diseases* 37(6): 434-443. (2019)

Független idéző: 1, függő idéző: 0, összes idéző: 1

16. Tudománymetriai adatok

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	189	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	46	689	821
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	16	23	51
szakcikk, magyar nyelvű	---	76	57	89
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	29	47	79
rövid közlemény	---	22	43	56
II. Könyv	9	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	9	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	2	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	7	---	---
III. Könyvrészlet	22	---	---	---
idegen nyelvű	---	3	1	3
magyar nyelvű	---	4	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	15	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	8	---	0	1
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	22	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	206	860	1100
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	228	---	860	1100
V. További tudományos művek	15	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	11	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	4	13
Olthalmak, szabadalmak	---	0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	1	---	0	1
Összes hivatkozás¹	---	---	864	1114
Hirsch index⁶	20	---	---	---
g index⁶	30	---	---	---
Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás		
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	26	337		
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	74	301		
A tudományos fokozat (Kandidátus) elnyerése utáni (1993) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	149	991		
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	91	257		
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	69	6,19%		
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	171		
Jelentés, guideline	0	0		
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0		

Megjegyzések:

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

17. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet:

dr. Jakab Lajos egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Immunológiai Munkacsoportjának vezetőjének, aki felkeltette érdeklődésemet a fetuin-A iránt,

dr. Cseh Károly egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, aki kezdetektől fogva segítette munkámat és hasznos tanácsokkal látott el,

†**dr. Romics László egyetemi tanárnak**, az MTA rendes tagjának, hogy a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójaként támogatta munkámat,

dr. Karádi István egyetemi tanárnak, az MTA rendes tagjának, aki a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójaként támogatta munkámat,

dr. Prohászka Zoltán egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, aki a Magyar Tudományos Akadémia Füst György Komplement Laboratóriuma vezetőjeként lehetővé tette a fetuin-A meghatározások elvégzését és hasznos tanácsokkal látott el a vizsgálatok megszervezésével és elemzésével kapcsolatban,

†**dr. Füst György egyetemi tanárnak**, az MTA doktorának, a Magyar Tudományos Akadémia Atherosclerosis Kutatócsoportja egykori vezetőjének, aki lehetővé tette a fetuin-A meghatározások elvégzését,

dr. Falus András egyetemi tanárnak, az MTA rendes tagjának, aki kezdettől fogva segítette munkámat és lehetővé tette a fetuin-A rs4917 és rs4918 SNP-k meghatározását,

dr. Závodszy Péter egyetemi tanárnak, az MTA rendes tagjának, az MTA Enzimológiai Intézet volt vezetőjének és **Lőrincz Zsoltnak**, a fetuin-A bakulovírus expressziós rendszerben való termeltetésében nyújtott segítségéért,

dr. Fekete Béla egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Immunológiai Részlege vezetőjének hasznos tanácsaiért,

dr. Pozsonyi Teréz egyetemi docensnek, az orvostudomány kandidátusának és **dr. Jakab László adjunktusnak** a vizsgált betegek toborzásáért és adataiért,

†**dr. Telegdy László osztályvezető főorvosnak** és **dr. Benkő Zsuzsannának** (Fővárosi Szent László Kórház III. Belgyógyászati Osztály) a számos májbeteg adataiért,

dr. Szalay Ferenc egyetemi tanárnak, az MTA doktorának a Semmelweis Egyetem I. Sz. Belgyógyászati Klinika Hepatológiai Ambulanciáján gondozott PBC-s és Wilson-kóros betegek szérummintáiért, laboratóriumi adataiért és a hasznos tanácsokért,

dr. Szeberin Zoltán egyetemi docensnek és munkatársainak: **dr. Fehérvári Mátyásnak**, **dr. Krepuska Miklósnak**, **dr. Apor Astridnak**, **dr. Rimely Endrének**, **dr. Sarkadi Hunornak**, **dr. Bíró Gábornak**, **dr. Sótonyi Péter egyetemi tanárnak**, **dr. Széplaki Gábornak**, **dr. Szabolcs Zoltán egyetemi tanárnak** a Semmelweis Egyetem Érsebészeti Klinikáján kezelt betegek adatainak, szérummintájának és **dr. Acsády György egyetemi tanárnak**, az MTA doktorának, a Klinika akkori igazgatójának a vizsgálatok engedélyezéséért,

dr. Ian Dicksonnak, a Brunel University (Uxbridge, Nagy-Britannia) Biokémiai és Biológiai Intézet laborvezetőjének, ösztöndíjas látogatásom során a fetuin-A szeparálásában nyújtott segítségéért,

†**dr. Philippe Arnaud egyetemi tanárnak** (Medical University of South Carolina, Charleston, USA) a rekombináns fetuin-A előállításában és az inzulin receptor tirozin kináz hatásának vizsgálatában nyújtott segítségéért,

dr. Nemesánszky Elemér c. egyetemi tanárnak, **dr. Csepregi Antal** és **dr. Pusztai Mária főorvosnak** (Budai Irgalmasrendi Kórház), †**dr. Dávid Károly** és **dr. Horváth Gábor főorvosnak** (Belügyminisztérium Központi Kórház), **dr. Pár Alajos egyetemi tanárnak** (Pécsi Tudományegyetem ÁOK I. Sz. Belgyógyászati Klinika), **dr. Gervain Judit főorvosnak** (Szent György Kórház, Székesfehérvár), **dr. Ribiczei Pál főorvosnak** (Zalaegerszegi Megyei Kórház, Zalaegerszeg), **dr. Csöndes Mihály főorvosnak** (Petz Aladár Oktató Kórház, Győr) a krónikus HCV hepatitises betegek szérummintáiért és **dr. Horányi Margit főorvosnak** (Országos Molekuláris Diagnosztikai Centrum) a HCV mennyiségi meghatározásáért,

dr. Czirják László egyetemi tanárnak, az MTA doktorának (Pécsi Tudományegyetem ÁOK Klinikai Központ Reumatológiai és Immunológiai Klinika) az autoimmun betegek adataiért és szérummintáiért,

dr. Pajor Attila egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, **dr. Molvarec Attila egyetemi docensnek**, az MTA doktorának, **dr. Melczer Zsolt egyetemi docensnek** (Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika), **dr. Szalai János főorvosnak** (Budaörsi Egészségügyi Központ), **dr. Baranyi Éva főorvosnak** (Magyar Honvédség Egészségügyi Központ), **dr. Csákány M. György főorvosnak** (Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház és Rendelőintézet) a gesztációs diabéteszes és a praeeklampsziás és HELLP szindrómás betegek adataiért és szérummintáiért, valamint **dr. Siller György főorvosnak** (Budapest XIII. kerületi Egészségügyi Szolgálat), **dr. Speer Gábornak** (Interlab Kft.), **dr. Winkler Gábor főorvosnak**, az MTA doktorának (Szent János Kórház) a vizsgálatban való közreműködéséért,

dr. Farkas Henriette egyetemi tanárnak, az MTA doktorának (Semmelweis Egyetem Angioödéma Centrum) a hereditær angioneurotikus ödémás betegek és a vizsgálatához tartozó kontroll személyek szérummintáiért, valamint **Veszeli Nórának** a fetuin-A, CRP és TNF α koncentráció ELISA módszerrel történő meghatározásáért,

dr. Török-Nagy Beátának és **dr. Vajda Zoltánnak** (Semmelweis Egyetem Központi Laboratórium) a hereditær angioneurotikus ödémás betegek D-dimer koncentrációjának meghatározásáért,

Tanítványaimnak, **dr. Vörös Krisztián adjunktusnak**, **dr. Márkus Bernadettnek** (Semmelweis Egyetem Családorvosi Tanszék) és **dr. Temesszentandrás György tanársegédnek** (Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika) munkáját,

Nagyné Vers Máriának (Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika) a fetuin-A koncentráció és a többi glikoprotein koncentráció meghatározásáért,

Walentin Szilviának, **dr. Imreh Éva főorvosnak**, **dr. Kleiber Monika főorvosnak**, **Szigeti Antalnénak** és **Kovács Margitnak** (Semmelweis Egyetem Kútvölgyi Klinikai Tömb) az ott kezelt betegek laboratóriumi vizsgálatáért,

Vángor Mónikának (Semmelweis Egyetem Genetikai, Immunológiai és Sejtbiológiai Intézet) a fetuin-A rs4917 és rs4918 SNP-k meghatározásáért,

Az **Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok** OTKA T-021113, T-220125, TO49266 és T-046496 KON, az Oktatási Minisztérium **Felsőoktatási Kutatási és**

Fejlesztési Pályázat (FKFP) FKFP 0103/2000, valamint az Egészségügyi Minisztérium az ETT 066/1999, 278/2003 és 368/2009 sz. alatt nyújtott pályázati támogatásáért,

Családomnak, biztatásáért és türelméért.

18. Irodalomjegyzék

1. Jahnen-Dechent W, Schinke T, et al. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem*. 1997;272(50):31496-31503.
2. Mathews ST, Singh GP, et al. Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes*. 2002;51(8):2450-2458.
3. Kalabay L. Az alpha-2-HS glycoprotein és a fibronectin élettani és klinikai jelentősége. Kandidátusi értekezés. Budapest 1992.
4. Kis E, Cseprekál O, et al. Effects of bone and mineral metabolism on arterial elasticity in chronic renal failure. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(12):2413-2420.
5. Bódis J, Peti AM, et al. Serum and follicular fluid fetuin-A in women undergoing in vitro fertilization. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(9):1313-1318.
6. Barbai VH, Ujhelyi E, et al. Changes in the levels of some acute-phase proteins in human immunodeficiency virus-1 infected patients, following interleukin-2 treatment. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(1):134-141.
7. Nemcsik J, Kiss I, et al. Arterial stiffness, vascular calcification and bone metabolism in chronic kidney disease. *World J Nephrol*. 2012;1(1):25-34.
8. Pedersen KO. Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature*. 1944;154(3914):575.
9. Heremans JF. Les Globulines Sériques du Système Gamma: Arscia, Bruxelles and Masson, Paris; 1960. p. 103-105.
10. Schmid K, Bürgi W. Preparation and properties of the human plasma Ba-alpha2-glycoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1961;47:440-453.
11. Schultze HE, Heide K, et al. Charakterisierung eines niedermolekularen α 2-Mukoids aus Humanserum. *Naturwissenschaft*. 1962;49:15.
12. Dickson IR, Poole AR, et al. Localisation of plasma alpha2HS glycoprotein in mineralising human bone. *Nature*. 1975;256(5516):430-432.
13. Ashton BA, Triffitt JT, et al. Isolation and partial characterization of a glycoprotein from bovine cortical bone. *Eur J Biochem*. 1974;45(2):525-533.
14. Triffitt JT. Plasma proteins present in human cortical bone: enrichment of the alpha2HS-glycoprotein. *Calcif Tissue Res*. 1976;22(1):27-33.
15. Dziegielewska KM, Brown WM, et al. The complete cDNA and amino acid sequence of bovine fetuin. Its homology with alpha 2HS glycoprotein and relation to other members of the cystatin superfamily. *J Biol Chem*. 1990;265(8):4354-4357.
16. Olivier E, Soury E, et al. Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *Biochem J*. 2000;350:589-597.
17. Lee CC, Bowman BH, et al. Human alpha 2-HS-glycoprotein: the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single mRNA transcript. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(13):4403-4407.
18. Yoshioka Y, Gejyo F, et al. The complete amino acid sequence of the A-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. *J Biol Chem*. 1986;261(4):1665-1676.
19. Lin YH, Franc V, et al. Similar albeit not the same; in-depth analysis of proteoforms of human serum, bovine serum and recombinant human fetuin. *J Proteome Res*. 2018.
20. Araki T, Yoshioka Y, et al. The position of the disulfide bonds in human plasma alpha 2 HS-glycoprotein and the repeating double disulfide bonds in the domain structure. *Biochim Biophys Acta*. 1989;994(3):195-199.
21. Kellermann J, Haupt H, et al. The arrangement of disulfide loops in human alpha 2-HS glycoprotein. Similarity to the disulfide bridge structures of cystatins and kininogens. *J Biol Chem*. 1989;264(24):14121-14128.
22. Jahnen-Dechent W, Heiss A, et al. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res*. 2011;108(12):1494-1509.
23. Haglund AC, Ek B, et al. Phosphorylation of human plasma alpha(2)-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo. *Biochem J*. 2001;357:437-445.
24. Goustin AS, Abou-Samra AB. The "thrifty" gene encoding Ahsg/Fetuin-A meets the insulin receptor: Insights into the mechanism of insulin resistance. *Cell Signal*. 2011;23(6):980-990.

25. Gejyo F, Chang JL, et al. Characterization of the B-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. The complete amino acid sequence and primary structure of its heteroglycan. *J Biol Chem.* 1983;258(8):4966-4971.
26. Elzanowski A, Barker WC, et al. Cystatin domains in alpha-2-HS-glycoprotein and fetuin. *FEBS Letters.* 1988;227(2):167-170.
27. Demetriou M, Binkert C, et al. Fetuin/alpha 2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J Biol Chem.* 1996;271(22):12755-12761.
28. Heiss A, Pipich V, et al. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J.* 2010;99(12):3986-3995.
29. Cai MM, Smith ER, et al. The role of fetuin-A in mineral trafficking and deposition. *Bonekey Rep.* 2015;4:672.
30. Brylka L, Jahnen-Dechent W. The role of fetuin-A in physiological and pathological mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2013;93(4):355-364.
31. Schinke T, Koide T, et al. Human histidine-rich glycoprotein expressed in SF9 insect cells inhibits apatite formation. *FEBS Lett.* 1997;412(3):559-562.
32. Herrmann M, Schafer C, et al. Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res.* 2012;111(5):575-584.
33. Hortin G, Green ED, et al. Sulphation of proteins secreted by a human hepatoma-derived cell line. Sulphation of N-linked oligosaccharides on alpha 2HS-glycoprotein. *Biochem J.* 1986;235(2):407-414.
34. Goustin AS, 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.
35. Auberger P, Falquerho L, et al. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell.* 1989;58(4):631-640.
36. Kellermann J, Thelen C, et al. Arrangement of the disulphide bridges in human low-Mr kininogen. *Biochem J.* 1987;247(1):15-21.
37. Nawratil P, Lenzen S, et al. Limited proteolysis of human alpha2-HS glycoprotein/fetuin. Evidence that a chymotryptic activity can release the connecting peptide. *J Biol Chem.* 1996;271(49):31735-31741.
38. Lodish HF. Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor. *Trends Biochem Sci.* 1991;16(10):374-377.
39. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, et al. Fetuin-A and CD40 L plasma levels in acute ischemic stroke: differences in relation to TOAST subtype and correlation with clinical and laboratory variables. *Atherosclerosis.* 2010;208(1):290-296.
40. Dasgupta S, Bhattacharya S, et al. NF-kappaB mediates lipid-induced fetuin-A expression in hepatocytes that impairs adipocyte function effecting insulin resistance. *Biochem J.* 2010;429(3):451-462.
41. Osawa M, Umetsu K, et al. Structure of the gene encoding human alpha 2-HS glycoprotein (AHSG). *Gene.* 1997;196(1-2):121-125.
42. Banine F, Gangneux C, et al. Structural and functional analysis of the 5'-transcription control region for the human alpha 2-HS glycoprotein gene. *Biochim Biophys Acta-Gene Struct Expr.* 1998;1398(1):1-8.
43. Banine F, Gangneux C, et al. Positive and negative elements modulate the promoter of the human liver-specific alpha2-HS-glycoprotein gene. *Eur J Biochem.* 2000;267(4):1214-1222.
44. Häusler M, Schafer C, et al. The physiologic development of fetuin-A serum concentrations in children. *Pediatr Res.* 2009;66(6):660-664.
45. Dziegielewska KM, Matthews N, et al. Alpha 2HS-glycoprotein is expressed at high concentration in human fetal plasma and cerebrospinal fluid. *Fetal Diagn Ther.* 1993;8(1):22-27.
46. Dziegielewska KM, Mollgard K, et al. A fetuin-related glycoprotein (alpha 2HS) in human embryonic and fetal development. *Cell Tissue Res.* 1987;248(1):33-41.
47. Briana DD, Boutsikou M, et al. Serum fetuin-A/alpha2-HS-glycoprotein in human pregnancies with normal and restricted fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(11):826-830.

48. Karamessinis PM, 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.
49. Wigger M, Schaible J, et al. Fetuin-A serum concentrations in healthy children. *Ann Clin Biochem*. 2009;46(Pt 6):511-513.
50. Denecke B, Graber S, et al. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J*. 2003;376:135-145.
51. Dickson IR, Bagga M, et al. Variations in the serum concentration and urine excretion of alpha 2HS-glycoprotein, a bone-related protein, in normal individuals and in patients with osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int*. 1983;35(1):16-20.
52. Ix JH, Wassel CL, et al. Fetuin-A and change in body composition in older persons. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4492-4498.
53. Lichtenauer M, Wernly B, et al. Specifics of fetuin-A levels in distinct types of chronic heart failure. *J Clin Lab Anal*. 2017.
54. Mathews ST, Rakhade S, et al. Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350(2):437-443.
55. Laughlin GA, McEvoy LK, et al. Fetuin-A, a new vascular biomarker of cognitive decline in older adults. *Clin Endocrinol*. 2014;81(1):134-140.
56. Smith ER, Nilforooshan R, et al. Plasma fetuin-A is associated with the severity of cognitive impairment in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(2):327-333.
57. Geroldi D, Minoretti P, et al. Genetic association of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Italians. *Neurosci Lett*. 2005;386(3):176-178.
58. Takagi Y, Shimokawa H, et al. Immunohistochemical localization of alpha 2HS glycoprotein in dentin. *Calcif Tissue Int*. 1990;47(1):40-45.
59. Matsushima K, Cheng M, et al. Purification and physicochemical characterization of human alpha 2-HS-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1982;701(2):200-205.
60. Binkert C, Demetriou M, et al. Regulation of osteogenesis by fetuin. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28514-28520.
61. Dickson IR, Millar EA, et al. Evidence for abnormality of bone-matrix proteins in osteogenesis imperfecta. *Lancet*. 1975;2(7935):586-587.
62. Dickson IR, Bagga MK. Changes with age in the non-collagenous proteins of human bone. *Connect Tissue Res*. 1985;14(1):77-85.
63. Barbieri D, Pazzaglia UE, et al. Variations in alpha-2-HS glycoprotein level in neoplastic disease with and without involvement of bone. *Italian J Orthop Traumatol*. 1987;13(4):535-539.
64. Ashton BA, Smith R. Plasma alpha-2-HS-glycoprotein concentration in Paget's disease of bone - its possible significance. *Clin Sci*. 1980;58(5):435-438.
65. Quelch KJ, Cole WG, et al. Noncollagenous proteins in normal and pathological human bone. *Calcif Tissue Int*. 1984;36(5):545-549.
66. Seto J, Busse B, et al. Accelerated growth plate mineralization and foreshortened proximal limb bones in fetuin-A knockout mice. *PLoS One*. 2012;7(10):e47338.
67. Schafer C, Heiss A, et al. The serum protein alpha(2)-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest*. 2003;112(3):357-366.
68. Price PA, Thomas GR, et al. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem*. 2002;277(6):3926-3934.
69. Schinke T, Amendt C, et al. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20789-20796.
70. Heiss A, Jahn-Dechent W, et al. Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids. *Biointerphases*. 2007;2(1):16-20.

71. Heiss A, Eckert T, et al. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14815-14825.
72. Holt SG, Smith ER. Fetuin-A-containing calciprotein particles in mineral trafficking and vascular disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(10):1583-1587.
73. Nishio S, Iseda T, et al. Inhibitory effect of calcium phosphate-associated proteins on calcium oxalate crystallization: alpha 2-HS-glycoprotein, prothrombin-F1 and osteopontin. *BJU International.* 2000;86(4):543-548.
74. Wu YX, Li CY, et al. Patients with nephrolithiasis had lower fetuin-A protein level in urine and renal tissue. *Urolithiasis.* 2014;42(1):29-37.
75. Stejskal D, Karpisek M, et al. Urine fetuin-A values in relation to the presence of urolithiasis. *BJU Int.* 2008;101(9):1151-1154.
76. Hou YC, Lu CL, et al. Emerging role of vitamins D and K in modulating uremic vascular calcification: The aspect of passive calcification. *Nutrients.* 2019;11(1).
77. Reynolds JL, Skepper JN, et al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-A in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol.* 2005(10):2920-2930.
78. Zhang P, Shen H, et al. Intraperitoneal administration of fetuin-A attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver failure in mouse. *Dig Dis Sci.* 2014;59(8):1789-1797.
79. Rittenberg B, Partridge E, et al. Regulation of BMP-induced ectopic bone formation by Ahsg. *J Orthop Res.* 2005;23(3):653-662.
80. Szweras M, Liu D, et al. Alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19991-19997.
81. Jahnke-Dechent W, Schafer C, et al. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med (Berl).* 2008;86(4):379-389.
82. Osawa M, Yuasa I, et al. Haplotype analysis of the human alpha 2-HS glycoprotein (fetuin) gene. *Ann Hum Genet.* 2001;65:27-34.
83. van Oss CJ, Bronson PM, et al. Changes in the serum alpha glycoprotein distribution in trauma patients. *J Trauma.* 1975;15(5):451-455.
84. Lebreton JP, Joisel F, et al. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J Clin Invest.* 1979;64(4):1118-1129.
85. Lim P, Moutereau S, et al. Usefulness of fetuin-A and C-reactive protein concentrations for prediction of outcome in acute coronary syndromes (from the French Registry of Acute ST-Elevation Non-ST-Elevation Myocardial Infarction [FAST-MI]). *Am J Cardiol.* 2013;111(1):31-37.
86. Snyder S, Durham BC, et al. Serum lipids and glycoproteins in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1975;90(5):582-586.
87. Lim P, Collet JP, et al. Fetuin-A is an independent predictor of death after ST-elevation myocardial infarction. *Clin Chem.* 2007;53(10):1835-1840.
88. Baskies AM, Chretien PB, et al. Serum glycoproteins in cancer patients: first report of correlations with in vitro and in vivo parameters of cellular immunity. *Cancer.* 1980;45(12):3050-3060.
89. Snyder S, Ashwell G. Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy. *Clin Chim Acta.* 1971;34(3):449-455.
90. Daveau M, Christian D, et al. The synthesis of human alpha-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells. *FEBS Letters.* 1988;241(1-2):191-194.
91. Daveau M, Davrinche C, et al. Partial hepatectomy and mediators of inflammation decrease the expression of liver alpha 2-HS glycoprotein gene in rats. *FEBS Letters.* 1990;273(1-2):79-81.
92. Li W, Zhu S, et al. A hepatic protein, fetuin-A, occupies a protective role in lethal systemic inflammation. *PLoS One.* 2011;6(2):e16945.

93. Wang H, Sama AE. Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):625-633.
94. Wang H, Zhang M, et al. Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet*. 1997;350(9081):861-862.
95. Weikert C, Stefan N, et al. Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation*. 2008;118(24):2555-2562.
96. Dziegielewska KM, Brown WM, et al. Fetuin - an acute phase protein in cattle. *J Comp Physiol B-Biochem Syst Environ Physiol*. 1992;162(2):168-171.
97. Wang H, Li W, et al. Peripheral administration of fetuin-A attenuates early cerebral ischemic injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(3):493-504.
98. Brix JM, Stingl H, et al. Elevated Fetuin-A concentrations in morbid obesity decrease after dramatic weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):4877-4881.
99. Suchanek P, Kralova-Lesna I, et al. An AHSG gene variant modulates basal metabolic rate and body composition development after a short-time lifestyle intervention. *Neuroendocrinol Lett*. 2011;32 Suppl 2:32-36.
100. Summers LK, Fielding BA, et al. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2002;45(3):369-377.
101. Chatterjee P, Seal S, et al. Adipocyte fetuin-A contributes to macrophage migration into adipose tissue and polarization of macrophages. *J Biol Chem*. 2013;288(39):28324-28330.
102. Samocha-Bonet D, Tam CS, et al. Raised circulating fetuin-a after 28-day overfeeding in healthy humans. *Diabetes Care*. 2014;37(1):e15-16.
103. Pal D, Dasgupta S, et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature Medicine*. 2012;18(8):1279-1285.
104. Choi KM, Han KA, et al. The effects of caloric restriction on fetuin-A and cardiovascular risk factors in rats and humans: a randomized controlled trial. *Clin Endocrinol*. 2013;79(3):356-363.
105. Hwang JJ, Thakkar B, et al. Circulating fetuin-A levels are not affected by short and long-term energy deprivation and/or by leptin administration. *Metabolism*. 2014;63(6):754-759.
106. Perez-Sotelo D, Roca-Rivada A, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue express and secrete functional alpha2hsglycoprotein (fetuin a) especially in obesity. *Endocrine*. 2016.
107. Choquette AC, Lemieux S, et al. Evidence of a quantitative trait locus for energy and macronutrient intakes on chromosome 3q27.3: the Quebec Family Study. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):1142-1148.
108. Vionnet N, Hani EH, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet*. 2000;67(6):1470-1480.
109. Kissebah AH, Sonnenberg GE, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(26):14478-14483.
110. Srinivas PR, Wagner AS, et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol*. 1993;7(11):1445-1455.
111. Agarwal S, Chattopadhyay M, et al. Fetuin-A downregulates adiponectin through Wnt-PPARgamma pathway in lipid induced inflamed adipocyte. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863(1):174-181.
112. Sun Q, Cornelis MC, et al. Plasma levels of fetuin-A and hepatic enzymes and risk of type 2 diabetes in women in the U.S. *Diabetes*. 2013;62(1):49-55.
113. Yin L, Cai WJ, et al. Association of plasma Fetuin-A and clinical characteristics in patients with new-onset type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(1):991-999.
114. Mathews ST, Srinivas PR, et al. Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. *Life Sciences*. 1997;61(16):1583-1592.
115. Laughlin GA, Barrett-Connor E, et al. Sex-specific association of fetuin-A with type 2 diabetes in older community-dwelling adults: the Rancho Bernardo study. *Diabetes Care*. 2013;36(7):1994-2000.

116. Fisher E, Stefan N, et al. Association of AHSG gene polymorphisms with fetuin-A plasma levels and cardiovascular diseases in the EPIC-Potsdam study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(6):607-613.
117. Stefan N, Fritsche A, et al. Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(10):2762-2767.
118. Stefan N, Haring HU, et al. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1(2):152-162.
119. Ix JH, Wassel CL, et al. Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA*. 2008;300(2):182-188.
120. Guo VY, Cao B, et al. Fetuin-A levels and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Acta Diabetol*. 2018;55(1):87-98.
121. Sujana C, Huth C, et al. Association of fetuin-A with incident type 2 diabetes: Results from the MONICA/KORA Augsburg study and a systematic meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2018.
122. Roshanzamir F, Miraghajani M, et al. The association between circulating fetuin-A levels and type 2 diabetes mellitus risk: systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(1):33-47.
123. Leite-Browning ML, McCawley LJ, et al. Interactions of alpha 2-HS-glycoprotein (fetuin) with MMP-3 and murine squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2002;21(5):965-971.
124. Tajirian T, Dennis JW, et al. Regulation of human monocyte proMMP-9 production by fetuin, an endogenous TGF-beta antagonist. *J Cell Physiol*. 2000;185(2):174-183.
125. Hedrich J, Lottaz D, et al. Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases. *Biochemistry*. 2010;49(39):8599-8607.
126. Mellgren RL, Huang X. Fetuin A stabilizes m-calpain and facilitates plasma membrane repair. *J Biol Chem*. 2007;282(49):35868-35877.
127. Ohnishi T, Nakamura O, et al. Effect of phosphorylated rat fetuin on the growth of hepatocytes in primary culture in the presence of human hepatocyte-growth factor. Evidence that phosphorylated fetuin is a natural modulator of hepatocyte-growth factor. *Eur J Biochem*. 1997;243(3):753-761.
128. Jakab L, Jakab L, et al. The effect of the alpha 2-HS-glycoprotein on the mitogen-induced lymphoblastic transformation and IL-2 production. *Acta Physiol Hung*. 1991;77(1):25-31.
129. Baskies AM, Chretien PB, et al. Serum levels of alpha-2-HS-glycoprotein and acute-phase proteins correlate with cellular immunity in cancer-patients. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1978;19(MAR):221-221.
130. Swallow CJ, Partridge EA, et al. alpha2HS-glycoprotein, an antagonist of transforming growth factor beta in vivo, inhibits intestinal tumor progression. *Cancer Res*. 2004;64(18):6402-6409.
131. Kundranda MN, Henderson M, et al. The serum glycoprotein fetuin-A promotes Lewis lung carcinoma tumorigenesis via adhesive-dependent and adhesive-independent mechanisms. *Cancer Res*. 2005;65(2):499-506.
132. Lewis JG, Andre CM. The effect of alpha 2HS glycoprotein on lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin. *Immunol Commun*. 1984;13(1):35-47.
133. Sakwe AM, Koumangoye R, et al. Fetuin-A ({alpha}2HS-glycoprotein) is a major serum adhesive protein that mediates growth signaling in breast tumor cells. *J Biol Chem*. 2010;285(53):41827-41835.
134. Ribon D, Westman-Brinkmalm A, et al. Elevated levels of alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein in CSF of patients with low-grade gliomas. *Tumour Biol*. 2003;24(2):94-99.
135. Anderson NL, Anderson NG. Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and alpha 2 HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;88(1):258-265.
136. Sanger F, Nicklen S, et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-5467.
137. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1983;132(1):6-13.

138. Jahnen-Dechent W, Trindl A, et al. Posttranslational processing of human alpha 2-HS glycoprotein (human fetuin). Evidence for the production of a phosphorylated single-chain form by hepatoma cells. *Eur J Biochem.* 1994;226(1):59-69.
139. Boutin B, Feng SH, et al. The genetic polymorphism of alpha 2-HS glycoprotein: study by ultrathin-layer isoelectric focusing and immunoblot. *Am J Hum Genet.* 1985;37(6):1098-1105.
140. Kaushik S. Ser312 fetuin-A phosphorylation and its association with serum lipids in metabolic syndrome. [Electronic Theses and Dissertations]. Alabama, AL, USA: Auburn University; 2008.
141. Rauth G, Pöschke O, et al. The nucleotide and partial amino-acid-sequences of rat fetuin - identity with the natural tyrosine kinase inhibitor of the rat insulin-receptor. *Eur J Biochem.* 1992;204(2):523-529.
142. Srinivas PR, Goustin AS, et al. Baculoviral expression of a natural inhibitor of the human insulin receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;208(2):879-885.
143. Ren G, Kim T, et al. Phosphorylation status of fetuin-A is critical for inhibition of insulin action and is correlated with obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;317(2):E250-e260.
144. Arnaud P, Emerson DL, et al. Interaction of alpha 2-HS-glycoprotein with immobilized triazine dyes. *Biochim Biophys Acta.* 1983;749(3):270-275.
145. McClain DA, Maegawa H, et al. A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis. *J Biol Chem.* 1987;262(30):14663-14671.
146. Robinson KA, Sens DA, et al. Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes.* 1993;42(9):1333-1346.
147. Burant CF, Treutelaar MK, et al. In vitro and in vivo activation of the insulin receptor kinase in control and denervated skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1986;261(19):8985-8993.
148. Block NE, Komori K, et al. Skeletal muscle insulin-receptor kinase. Effects of substrate inhibition and diabetes. *Diabetes.* 1991;40(12):1691-1700.
149. Arnaud P, Miribel L, et al. Alpha 2-HS glycoprotein. *Methods in Enzymology.* 1988;163:431-441.
150. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
151. Mathews ST, Srinivas PR, et al. Alpha(2)-HS glycoprotein (human fetuin), a specific and reversible inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Diabetes.* 1998;47:A442-A442.
152. Brown WM, Saunders NR, et al. Fetuin - an old friend revisited. *Bioessays.* 1992;14(11):749-755.
153. Haasemann M, Nawratil P, et al. Rat tyrosine kinase inhibitor shows sequence similarity to human alpha 2-HS glycoprotein and bovine fetuin. *Biochem J.* 1991;274(Pt 3):899-902.
154. Moser C, Geiger H, et al. Quantitative determination of single serum proteins during acute hepatitis in childhood. *Eur J Pediatr.* 1978;128(2):123-128.
155. Imanishi T. Clinical and experimental studies on the profiles of serum proteins in acute hepatic injury. *Gastroenterol Jpn.* 1981;16(5):493-505.
156. Jezequel M, Seta NS, et al. Modifications of concanavalin A patterns of alpha 1-acid glycoprotein and alpha 2-HS glycoprotein in alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta.* 1988;176(1):49-57.
157. Goldberg DM, Kapur BM. Enzymes and circulating proteins as markers of alcohol abuse. *Clin Chim Acta.* 1994;226(2):191-209.
158. Christensen E. Prognostic models including the Child-Pugh, MELD and Mayo risk scores - where are we and where should we go? *J Hepatol.* 2004;41(2):344-350.
159. Kamath PS, Wiesner RH, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology.* 2001;33(2):464-470.

160. Cholongitas E, Papatheodoridis GV, et al. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22(11-12):1079-1089.
161. Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology.* 2007;45(3):797-805.
162. Kim WR, Biggins SW, et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N Engl J Med.* 2008;359(10):1018-1026.
163. Guy J, Somsouk M, et al. New model for end stage liver disease improves prognostic capability after transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(11):1236-1240.
164. Torre D, Zeroli C, et al. Serum levels of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis. *Clin Infect Dis.* 1994;18(2):194-198.
165. Geneva-Popova M, Murdjeva M. Study on proinflammatory cytokines (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha) and IL-2 in patients with acute hepatitis B. *Folia Med (Plovdiv).* 1999;41(1):78-81.
166. Huang YS, Hwang SJ, et al. Serum levels of cytokines in hepatitis C-related liver disease: a longitudinal study. *Chinese Medical Journal; Free China ed (Taipei).* 1999;62(6):327-333.
167. Müller C, Zielinski CC. Interleukin-6 production by peripheral blood monocytes in patients with chronic liver disease and acute viral hepatitis. *J Hepatol.* 1992;15(3):372-377.
168. Sun Y, Tokushige K, et al. Elevated serum interleukin-6 levels in patients with acute hepatitis. *J Clin Immunol.* 1992;12(3):197-200.
169. Sekiyama KD, Yoshida M, et al. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol.* 1994;98(1):71-77.
170. Kimura F, Miyazaki M, et al. Increased serum interleukin-6 level and reduction of hepatic acute-phase response after major hepatectomy. *Eur Surg Res.* 1996;28(2):96-103.
171. Kalabay L, Cseh K, et al. Serum alpha 2-HS glycoprotein concentration in patients with hematological malignancies. A follow-up study. *Ann Hematol.* 1991;63(5):264-269.
172. Lapinski TW. [Activation of acute phase proteins in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha 2a]. *Pol Merkur Lekarski.* 2001;10(57):138-142.
173. Bíró L, Varga L, et al. Changes in the acute phase complement component and IL-6 levels in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alpha-2b. *Immunol Lett.* 2000;72(2):69-74.
174. Dumestre-Perard C, Ponard D, et al. Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. *Clin Exp Immunol.* 2002;127(1):131-136.
175. Singaravelu R, Blais DR, et al. Activity-based protein profiling of the hepatitis C virus replication in Huh-7 hepatoma cells using a non-directed active site probe. *Proteome Sci.* 2010;8:5.
176. Okazaki T, Yamazaki K, et al. Alpha2-HS glycoprotein is an essential component of cryoglobulin associated with chronic hepatitis C. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(2):e17-18.
177. Trendelenburg M, Schifferli JA. Cryoglobulins in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol.* 2003;133(2):153-155.
178. Ali SA, Nassif WM, et al. Alterations in serum levels of fetuin A and selenoprotein P in chronic hepatitis C patients with concomitant type 2 diabetes: A case-control study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016;40(4):465-470.
179. Oguz A, Atay AE, et al. Predictive role of acute phase reactants in the response to therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gut Liver.* 2013;7(1):82-88.
180. Dabrowska MM, Panasiuk A, et al. Signal transduction pathways in liver and the influence of hepatitis C virus infection on their activities. *World J Gastroenterol.* 2009;15(18):2184-2189.
181. Kato N, Yoshida H, et al. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology.* 2000;32(2):405-412.
182. Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol.* 2005;2(2):92-100.
183. Haqshenas G, Wu J, et al. Signalome-wide assessment of host cell response to hepatitis C virus. *Nat Commun.* 2017;8:15158.
184. Ray RB, Steele R, et al. Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF-kappaB regulation is linked to genomic variation. *Virus Res.* 2002;87(1):21-29.

185. Yen TS. Nuclear factor kappaB and hepatitis C - Is there a connection? *Hepatology*. 2000;31(3):785-787.
186. Girard S, Vossman E, et al. Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signaling revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology*. 2004;40(3):708-718.
187. Li Q, Pene V, et al. Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK-alpha in lipogenesis and viral assembly. *Nat Med*. 2013;19(6):722-729.
188. Qiu C, Liu X, et al. Estrogen increases the transcription of human alpha2-Heremans-Schmid-glycoprotein by an interplay of estrogen receptor alpha and activator protein-1. *Osteoporos Int*. 2014;25(4):1357-1367.
189. Polyak SJ, Khabar KS, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol*. 2001;75(13):6095-6106.
190. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1999;19(2):157-169.
191. Eckels DD, Tabatabail N, et al. In vitro human Th-cell responses to a recombinant hepatitis C virus antigen: failure in IL-2 production despite proliferation. *Hum Immunol*. 1999;60(3):187-199.
192. Patel K, Lucas JE, et al. High predictive accuracy of an unbiased proteomic profile for sustained virologic response in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2011;53(6):1809-1818.
193. Arber N, Moshkowitz M, et al. Elevated serum iron predicts poor response to interferon treatment in patients with chronic HCV infection. *Dig Dis Sci*. 1995;40(11):2431-2433.
194. Martin-Vivaldi R, Nogueras F, et al. Response of chronic hepatitis C to interferon-alpha treatment and relationship with iron metabolism. *Rev Esp Enferm Dig*. 1997;89(7):523-530.
195. Verma-Gandhu M, Peterson MR, et al. Effect of fetuin, a TGFbeta antagonist and pentoxifylline, a cytokine antagonist on hepatic stellate cell function and fibrotic parameters in fibrosis. *Eur J Pharmacol*. 2007;572(2-3):220-227.
196. Szalay F, Büki B, et al. Interleukin-6 plasma level in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1995;108:A1181.
197. Huerre C, Uzan G, et al. The structural gene for transferrin (TF) maps to 3q21----3qter. *Ann Genet*. 1984;27(1):5-10.
198. Firneisz G, Lakatos PL, et al. Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *Am J Med Genet*. 2002;108(1):23-28.
199. Nazer H, Ede RJ, et al. Wilson's disease: clinical presentation and use of prognostic index. *Gut*. 1986;27(11):1377-1381.
200. Klein D, Lichtmanegger J, et al. Gene expression in the liver of Long-Evans cinnamon rats during the development of hepatitis. *Arch Toxicol*. 2003;77(10):568-575.
201. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107(2):119-125.
202. Frühbeck G, Salvador J. Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia*. 2000;43(1):3-12.
203. Ducy P, Amling M, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000;100(2):197-207.
204. Suda T, Takahashi N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999;20(3):345-357.
205. Daniele S, Natali L, et al. Osteogenesis is improved by low tumor necrosis factor alpha concentration through the modulation of Gs-coupled receptor signals. *Mol Cell Biol*. 2017;37(8).
206. Maddux BA, Sbraccia P, et al. Inhibitors of insulin receptor tyrosine kinase in fibroblasts from diverse patients with impaired insulin action: evidence for a novel mechanism of postreceptor insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77(1):73-79.
207. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 1997;18(6):774-800.
208. Enli Y, Fenkci SM, et al. Serum fetuin-A levels, insulin resistance and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29(12):1036-1039.

209. Aghilla M, Adya R, et al. The hepatokine fetuin-A is increased in PCOS women. Association with metabolic syndrome and regulation by metformin. *Endocrine Abstracts*; Harrogate, UK: Society for Endocrinology BES 2012 19-22 March 2012; 2012. p. P162.
210. Holbrook J, Lara-Reyna S, et al. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res*. 2019;8.
211. Fernandez-Real JM, Lainez B, et al. Shedding of TNF-alpha receptors, blood pressure, and insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(4):E952-959.
212. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;15(7):539-553.
213. Cleve H, Dencker H. Quantitative variations of the group-specific component (Gc) and of barium-alpha2-glycoprotein of human serum in health and disease. In: H. Peeters, editor. *Proteins and Biological Fluids*. 14. Oxford, UK: Pergamon Press; 1966. p. 273-276.
214. Raynes J. Variations in the relative proportions of microheterogeneous forms of plasma glycoproteins in pregnancy and disease. *Biomed Pharmacother*. 1982;36(2):77-86.
215. Shinagawa S, Saitoh M. A study on proteins contained in urine of gestosis patients. *Biol Res Pregnancy Perinatol*. 1983;4(4):140-144.
216. Iyidir OT, Degertekin CK, et al. Serum levels of fetuin A are increased in women with gestational diabetes mellitus. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;291(4):933-937.
217. Rottenkolber M, Ferrari U, et al. The diabetes risk phenotype of young women with recent gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):E910-918.
218. Jin C, Lin L, et al. Effects of dynamic change in fetuin-A levels from the first to the second trimester on insulin resistance and gestational diabetes mellitus: a nested case-control study. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020;8(1).
219. Liu Y, Xu M, et al. Positive correlation between chronic hyperglycemia and serum fetuin-A levels in middle-aged and elderly Chinese. *J Diabetes*. 2012;4(4):351-358.
220. Lu D, Yang M, et al. A clinical research study on the respective relationships between visfatin and human fetuin A and pregnancy outcomes in gestational diabetes mellitus. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019;58(6):808-813.
221. Simjak P, Cinkajzlova A, et al. Changes in plasma concentrations and mRNA expression of hepatokines fetuin A, fetuin B and FGF21 in physiological pregnancy and gestational diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2018;67(Supplementum 3):S531-s542.
222. Haukeland JW, Dahl TB, et al. Fetuin A in nonalcoholic fatty liver disease: in vivo and in vitro studies. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(3):503-510.
223. Ismail TA, Soliman MM, et al. Molecular and immunohistochemical effects of metformin in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med*. 2015;9(5):1921-1930.
224. Farhan S, Handisurya A, et al. Fetuin-A characteristics during and after pregnancy: Result from a case control pilot study. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:896736.
225. Heaney ML, Golde DW. Soluble receptors in human disease. *J Leukoc Biol*. 1998;64(2):135-146.
226. Feig DS, Zinman B, et al. Risk of development of diabetes mellitus after diagnosis of gestational diabetes. *Cmaj*. 2008;179(3):229-234.
227. Barbour LA, McCurdy CE, et al. Chronically increased S6K1 is associated with impaired IRS1 signaling in skeletal muscle of GDM women with impaired glucose tolerance postpartum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):1431-1441.
228. Stefan N, Haring HU. Circulating fetuin-A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans. *Nat Med*. 2013;19(4):394-395.
229. Hennige AM, Staiger H, et al. Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. *PLoS One*. 2008;3(3):e1765.
230. Jialal I, Pahwa R. Fetuin-A is also an adipokine. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):73.
231. Wang CY, Su MT, et al. Fetuin-A inhibits placental cell growth and ciliogenesis in gestational diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
232. Robinson KN, Rowitz B, et al. Larger omental adipocytes correlate with greater Fetuin-A reduction following sleeve gastrectomy. *BMC Obes*. 2019;6:15.

233. Huda SS, Jordan F, et al. Visceral adipose tissue activated macrophage content and inflammatory adipokine secretion is higher in pre-eclampsia than in healthy pregnancies. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(13):1529-1540.
234. Jahnen-Dechent W, Schinke T, et al. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem*. 1997;272(50):31496-31503.
235. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33(3):130-137.
236. Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*. 2009;30 Suppl A:S38-42.
237. Saito S, Nakashima A, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601-610.
238. Herse F, LaMarca B. Angiotensin II type 1 receptor autoantibody (AT1-AA)-mediated pregnancy hypertension. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(4):413-418.
239. Sohlberg S, Mulic-Lutvica A, et al. Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: a magnetic resonance imaging study. *Placenta*. 2014;35(3):202-206.
240. Weinstein L. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1982;142(2):159-167.
241. Lewis JG, Andre CM. Enhancement of human monocyte phagocytic function by alpha 2HS glycoprotein. *Immunology*. 1981;42(3):481-487.
242. van Oss CJ, Gillman CF, et al. Opsonic properties of human serum alpha-2 HS glycoprotein. *Immunol Commun*. 1974;3(4):329-335.
243. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(1):S1-s22.
244. Joubert K. A magyar születéskori testtömeg- és testhossz standardok az 1990-96. évi országos élveszületési adatok alapján. *Magyar Nőorvosok Lapja*. 2000;63(2):155-163.
245. Kolialexi A, Tsangaris GT, et al. Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia. *Expert Rev Proteomics*. 2017;14(3):269-276.
246. Reyna-Villasmil E, Mejia-Montilla J, et al. Plasma fetuin-A in patients with preeclampsia and in healthy normotensive pregnant patients. *Perinatol Reprod Hum*. 2017;31(3):119-123.
247. Al-Hakeim HK, Ali RAM. Proteinuria as the most relevant parameter affecting fetuin-A levels in preeclampsia. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2015;32(4):267-277.
248. Hashimoto S, Miwa M, et al. Changes in 40 serum proteins of post-menopausal women. *Maturitas*. 1991;13(1):23-33.
249. Rahman SA, Hingorani V, et al. Biosynthesis of oestrogens and their inter-conversion in human placenta from normal and toxemic pregnancies. *Clin Endocrinol*. 1975;4(4):333-341.
250. Jersmann HP, Dransfield I, et al. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin Sci (Lond)*. 2003;105(3):273-278.
251. Lewis JG, Andre CM. Binding of alpha 2HS glycoprotein in peripheral blood monocytes. *Immunol Commun*. 1981;10(6):541-547.
252. Kishore BK, Gejyo F, et al. Alpha 2HS-glycoprotein in the serum and urine of patients with renal diseases. *Postgrad Med J*. 1983;59(691):304-307.
253. Sibai B, Dekker G, et al. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-799.
254. 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.
255. Johnstone ED, Sawicki G, et al. Differential proteomic analysis of highly purified placental cytotrophoblasts in pre-eclampsia demonstrates a state of increased oxidative stress and reduced cytotrophoblast antioxidant defense. *Proteomics*. 2011;11(20):4077-4084.
256. Park J, Cha DH, et al. Discovery of the serum biomarker proteins in severe preeclampsia by proteomic analysis. *Exp Mol Med*. 2011;43(7):427-435.
257. Gomez LM, 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.

258. Sanhal CY, Can Kavcar M, et al. Comparison of plasma fetuin A levels in patients with early-onset pre-eclampsia vs late-onset pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;200:108-112.
259. Meex RC, Hoy AJ, et al. Fetuin B Is a secreted hepatocyte factor linking steatosis to impaired glucose metabolism. *Cell Metab.* 2015;22(6):1078-1089.
260. Dietzel E, Wessling J, et al. Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. *Dev Cell.* 2013;25(1):106-112.
261. Tihtonen KM, Koobi T, et al. Arterial stiffness in preeclamptic and chronic hypertensive pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;128(1-2):180-186.
262. Wang HC, Zhang MH, et al. Fetuin (alpha(2)-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(24):14429-14434.
263. Ombrellino M, Wang HC, et al. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock.* 2001;15(3):181-185.
264. Verlohren S, Galindo A, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(2):161.e161-161.e111.
265. van Lieshout L, Koek GH, et al. Placenta derived factors involved in the pathogenesis of the liver in the syndrome of haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP): A review. *Pregnancy Hypertens.* 2019;18:42-48.
266. Hackenberg H, Rappe N, et al. Evidence of elevated C-reactive protein (CRP) in HELLP-syndrome. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1998;58(9):508-512.
267. Ustun Y, Engin-Ustun Y, et al. Association of fibrinogen and C-reactive protein with severity of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;121(2):154-158.
268. Teran E, Escudero C, et al. C-reactive protein during normal pregnancy and preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005;89(3):299-300.
269. Tjoa ML, van Vugt JM, et al. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Reprod Immunol.* 2003;59(1):29-37.
270. Qiu C, Luthy DA, et al. A prospective study of maternal serum C-reactive protein concentrations and risk of preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2004;17(2):154-160.
271. Srinivas SK, Sammel MD, et al. Evaluating the association between all components of the metabolic syndrome and pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22(6):501-509.
272. Deveci K, Sogut E, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35(1):94-98.
273. Mehrotra R, Westenfeld R, et al. Serum fetuin-A in nondialyzed patients with diabetic nephropathy: relationship with coronary artery calcification. *Kidney Int.* 2005;67(3):1070-1077.
274. Fiore CE, Celotta G, et al. Association of high alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin concentration in serum and intima-media thickness in patients with atherosclerotic vascular disease and low bone mass. *Atherosclerosis.* 2007;195(1):110-115.
275. Mori K, Emoto M, et al. Association of serum fetuin-A with carotid arterial stiffness. *Clinical Endocrinology (Oxf).* 2007;66(2):246-250.
276. Rittig K, Thamer C, et al. High plasma fetuin-A is associated with increased carotid intima-media thickness in a middle-aged population. *Atherosclerosis.* 2009;207(2):341-342.
277. Roos M, Richart T, et al. Fetuin-A and arterial stiffness in patients with normal kidney function. *Regul Pept.* 2009;154(1-3):39-43.
278. Emoto M, Mori K, et al. Fetuin-A and atherosclerotic calcified plaque in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2010;59(6):873-878.
279. Mori K, Ikari Y, et al. Fetuin-A is associated with calcified coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2010;21(5):281-285.
280. Eraso LH, Ginwala N, et al. Association of lower plasma fetuin-a levels with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33(2):408-410.
281. Hotta K, Funahashi T, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1595-1599.

282. Kadowaki T, Yamauchi T, et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1784-1792.
283. Lautamaki R, Ronnema T, et al. Low serum adiponectin is associated with high circulating oxidized low-density lipoprotein in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Metabolism*. 2007;56(7):881-886.
284. Klover PJ, Clementi AH, et al. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*. 2005;146(8):3417-3427.
285. Nakagawa E, Nagaya N, et al. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103(3):325-328.
286. Saad MF, Bernaba B, et al. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3997-4000.
287. Meyer C. Final answer: ghrelin can suppress insulin secretion in humans, but is it clinically relevant? *Diabetes*. 2010;59(11):2726-2728.
288. Kishimoto I, Tokudome T, et al. Ghrelin and cardiovascular diseases. *J Cardiol*. 2012;59(1):8-13.
289. Tokudome T, Otani K, et al. Ghrelin and the heart. *Peptides*. 2018.
290. Zhang F, Basinski MB, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. 1997;387(6629):206-209.
291. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(4):225-253.
292. Kulkarni RN, Wang ZL, et al. Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(11):2729-2736.
293. Wannamethee SG, Tchernova J, et al. Plasma leptin: associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2007;191(2):418-426.
294. Söderberg S, Stegmayr B, et al. High leptin levels are associated with stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2003;15(1-2):63-69.
295. Söderberg S, Ahren B, et al. Leptin is associated with increased risk of myocardial infarction. *J Intern Med*. 1999;246(4):409-418.
296. Schulze PC, Kratzsch J, et al. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2003;5(1):33-40.
297. Paolisso G, Tagliamonte MR, et al. Plasma leptin level is associated with myocardial wall thickness in hypertensive insulin-resistant men. *Hypertension*. 1999;34(5):1047-1052.
298. Wold LE, Relling DP, et al. Abrogated leptin-induced cardiac contractile response in ventricular myocytes under spontaneous hypertension: role of Jak/STAT pathway. *Hypertension*. 2002;39(1):69-74.
299. Qatanani M, Szewergold NR, et al. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(3):531-539.
300. Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, et al. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5452-5455.
301. Tokuyama Y, Osawa H, et al. Serum resistin level is associated with insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2007;56(5):693-698.
302. Verma S, Li SH, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*. 2003;108(6):736-740.
303. Adeghate E. An update on the biology and physiology of resistin. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(19-20):2485-2496.
304. Burnett MS, Lee CW, et al. The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2005;182(2):241-248.
305. Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, et al. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17(8):275-283.
306. Ix JH, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(3):406-412.

307. Ishibashi A, Ikeda Y, et al. Serum fetuin-A is an independent marker of insulin resistance in Japanese men. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(9):925-933.
308. Stefan N, Hennige AM, et al. Alpha(2)-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care*. 2006;29(4):853-857.
309. Reinehr T, Karges B, et al. Fibroblast Growth Factor 21 and Fetuin-A in Obese Adolescents With and Without Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8):3004-3010.
310. Ix JH, Shlipak MG, et al. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation*. 2006;113(14):1760-1767.
311. Zhou ZW, Ju HX, et al. Serum fetuin-A levels in obese and non-obese subjects with and without type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2018;476:98-102.
312. Erdmann J, Salmhofer H, et al. Relationship of fetuin-A levels to weight-dependent insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Regul Pept*. 2012;178(1-3):6-10.
313. Steppan CM, Bailey ST, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-312.
314. Ohmori R, Momiyama Y, et al. Associations between serum resistin levels and insulin resistance, inflammation, and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(2):379-380.
315. Pischon T, Bamberger CM, et al. Association of plasma resistin levels with coronary heart disease in women. *Obes Res*. 2005;13(10):1764-1771.
316. Zhang LY, Liu T, et al. Effect of a 12-week aerobic exercise training on serum fetuin-a and adipocytokine levels in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017.
317. Kadoglou NP, Kottas G, et al. Serum levels of fetuin-A, osteoprotegerin and osteopontin in patients with coronary artery disease: effects of statin (HMGCoA-reductase inhibitor) therapy. *Clin Drug Investig*. 2014;34(3):165-171.
318. Sun ZL, Xie QY, et al. Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:691540.
319. Hanefeld M, Schaper F, et al. Effects of pioglitazone versus simvastatin on biomarkers of inflammation in patients on high cardiovascular risk. *Horm Metab Res*. 2011;43(13):980-983.
320. Madej A, Buldak L, et al. The effects of 1 month antihypertensive treatment with perindopril, bisoprolol or both on the ex vivo ability of monocytes to secrete inflammatory cytokines. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47(11):686-694.
321. Gao XR, Adhikari CM, et al. Efficacy of different doses of aspirin in decreasing blood levels of inflammatory markers in patients with cardiovascular metabolic syndrome. *J Pharm Pharmacol*. 2009;61(11):1505-1510.
322. Esteghamati A, Afarideh M, et al. Comparative effects of metformin and pioglitazone on fetuin-A and osteoprotegerin concentrations in patients with newly diagnosed diabetes: A randomized clinical trial. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9(4):258-265.
323. Mori K, Emoto M, et al. Effects of pioglitazone on serum fetuin-A levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2008;57(9):1248-1252.
324. Ochi A, Mori K, et al. Direct inhibitory effects of pioglitazone on hepatic fetuin-A expression. *PLoS One*. 2014;9(2):e88704.
325. Kondo H, Hojo Y, et al. Roles of ghrelin in left-ventricular remodelling after acute myocardial infarction. *Heart Asia*. 2010;2(1):1-4.
326. Soeki T, Kishimoto I, et al. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(1):H426-432.
327. Kadoglou NP, Sailer N, et al. Visfatin (nampt) and ghrelin as novel markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2010;118(2):75-80.
328. Yano Y, Toshinai K, et al. Plasma des-acyl ghrelin, but not plasma HMW adiponectin, is a useful cardiometabolic marker for predicting atherosclerosis in elderly hypertensive patients. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):590-594.
329. Kotani K, Sakane N, et al. Serum ghrelin and carotid atherosclerosis in older Japanese people with metabolic syndrome. *Arch Med Res*. 2006;37(7):903-906.

330. Kadoglou NP, Lampropoulos S, et al. Serum levels of apelin and ghrelin in patients with acute coronary syndromes and established coronary artery disease - KOZANI Study. *Transl Res*. 2010;155(5):238-246.
331. Poykko SM, Kellokoski E, et al. Plasma ghrelin concentrations are positively associated with carotid artery atherosclerosis in males. *J Intern Med*. 2006;260(1):43-52.
332. Ukkola O, Poykko S, et al. Interactions between ghrelin, leptin and IGF-I affect metabolic syndrome and early atherosclerosis. *Ann Med*. 2008;40(6):465-473.
333. Tong J, Prigeon RL, et al. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*. 2010;59(9):2145-2151.
334. Krzyzanowska-Swiniarska B, Kempa A, et al. Serum acylated ghrelin, adiponectin and leptin levels in normal-weight and obese premenopausal women. *Horm Metab Res*. 2007;39(11):835-839.
335. Kiewiet RM, Hazell MJ, et al. Acute effects of acylated and unacylated ghrelin on total and high molecular weight adiponectin in morbidly obese subjects. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(6):434-438.
336. Caliskan Y, Gorgulu N, et al. Plasma ghrelin levels are associated with coronary microvascular and endothelial dysfunction in peritoneal dialysis patients. *Ren Fail*. 2009;31(9):807-813.
337. Erdmann J, Lippel F, et al. Differential association of basal and postprandial plasma ghrelin with leptin, insulin, and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(5):1371-1378.
338. Baatar D, Patel K, et al. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;340(1):44-58.
339. Tschöp M, Weyer C, et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001;50(4):707-709.
340. Poykko SM, Kellokoski E, et al. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(10):2546-2553.
341. Broglio F, Gottero C, et al. Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinol*. 2004;61(4):503-509.
342. An W, Li Y, et al. Modulation of ghrelin O-acyltransferase expression in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(4-5):707-716.
343. Sondergaard E, Gormsen LC, et al. Visceral fat mass is a strong predictor of circulating ghrelin levels in premenopausal women. *Eur J Endocrinol*. 2009;160(3):375-379.
344. Anderwald C, Brabant G, et al. Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2003;52(7):1792-1798.
345. Soni AC, Conroy MB, et al. Ghrelin, leptin, adiponectin, and insulin levels and concurrent and future weight change in overweight, postmenopausal women. *Menopause*. 2011;18(3):296-301.
346. Ott V, Fasshauer M, et al. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res*. 2002;34(11-12):640-645.
347. Nanjo Y, Adachi H, et al. Factors associated with plasma ghrelin level in Japanese general population. *Clin Endocrinol*. 2011;74(4):453-458.
348. Palik E, Birkás KD, et al. Correlation of serum ghrelin levels with body mass index and carbohydrate metabolism in patients treated with atypical antipsychotics. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;68 Suppl1:S60-64.
349. Mieguez P, St Pierre D, et al. Effect of desacyl ghrelin, obestatin and related peptides on triglyceride storage, metabolism and GHSR signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem*. 2011;112(2):704-714.
350. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1983-1993.
351. Kadoglou NP, Tsanikidis H, et al. Effects of rosiglitazone and metformin treatment on apelin, visfatin, and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2010;59(3):373-379.
352. Ketteler M, Bongartz P, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*. 2003;361(9360):827-833.

353. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res.* 2004;95(6):560-567.
354. Stenvinkel P, Wang K, et al. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int.* 2005;67(6):2383-2392.
355. Mazzaferro S, Pasquali M, et al. Serum levels of calcification inhibition proteins and coronary artery calcium score: comparison between transplantation and dialysis. *Am J Nephrol.* 2007;27(1):75-83.
356. Cozzolino M, Mazzaferro S, et al. Vascular calcification and uremia: what do we know? *Am J Nephrol.* 2008;28(2):339-346.
357. Bollinger A, Breddin K, et al. Semiquantitative assessment of lower limb atherosclerosis from routine angiographic images. *Atherosclerosis.* 1981;38(3-4):339-346.
358. Cozzolino M, Galassi A, et al. Serum fetuin-A levels link inflammation and cardiovascular calcification in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2006;26(5):423-429.
359. Guerin AP, London GM, et al. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(7):1014-1021.
360. Ciaccio M, Bivona G, et al. Changes in serum fetuin-A and inflammatory markers levels in end-stage renal disease (ESRD): effect of a single session haemodialysis. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(2):212-214.
361. Ix JH, Chertow GM, et al. Fetuin-A and kidney function in persons with coronary artery disease--data from the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(8):2144-2151.
362. Zheng S, de Las Fuentes L, et al. Relation of serum fetuin-A levels to coronary artery calcium in African-American patients on chronic hemodialysis. *Am J Cardiol.* 2009;103(1):46-49.
363. Ix JH, Chertow GM, et al. Association of fetuin-A with mitral annular calcification and aortic stenosis among persons with coronary heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Circulation.* 2007;115(19):2533-2539.
364. Ix JH, Shlipak MG, et al. Fetuin-A is not associated with mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2007;72(11):1394-1399.
365. Westenfeld R, Schafer C, et al. Fetuin-A (AHSG) prevents extraosseous calcification induced by uraemia and phosphate challenge in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(6):1537-1546.
366. Dautova Y, Kozlova D, et al. Fetuin-A and albumin alter cytotoxic effects of calcium phosphate nanoparticles on human vascular smooth muscle cells. *PLoS One.* 2014;9(5):e97565.
367. Schlieper G, Grotemeyer D, et al. Analysis of calcifications in patients with coral reef aorta. *Ann Vasc Surg.* 2010;24(3):408-414.
368. Giusti B, Porciani MC, et al. Phenotypic variability of cardiovascular manifestations in Marfan syndrome. Possible role of hyperhomocysteinemia and C677T MTHFR gene polymorphism. *Eur Heart J.* 2003;24(22):2038-2045.
369. Halazun KJ, Bofkin KA, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with the rate of abdominal aortic aneurysm expansion. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33(4):391-394; discussion 395-396.
370. Longo GM, Xiong W, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002;110(5):625-632.
371. Ray S, Lukyanov P, et al. Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1652(2):91-102.
372. Ochieng J, Warfield P, et al. Interactions of gelatinases with soluble and immobilized fetuin and asialofetuin. *Arch Biochem Biophys.* 1995;322(1):250-255.
373. Ford ML, Tomlinson LA, et al. Fetuin-A is an independent determinant of change of aortic stiffness over 1 year in non-diabetic patients with CKD stages 3 and 4. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(6):1853-1858.
374. Marques IJ, Leito JT, et al. Transcriptome analysis of the response to chronic constant hypoxia in zebrafish hearts. *J Comp Physiol B.* 2008;178(1):77-92.
375. Mori K, Emoto M, et al. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care.* 2006;29(2):468.

376. Nascimbeni F, Romagnoli D, et al. Do nonalcoholic fatty liver disease and fetuin-A play different roles in symptomatic coronary artery disease and peripheral arterial disease? *Diseases*. 2018;6(1).
377. Jirak P, Stechemesser L, et al. Clinical implications of fetuin-A. *Adv Clin Chem*. 2019;89:79-130.
378. Mori K, Emoto M, et al. Fetuin-A and the cardiovascular system. *Adv Clin Chem*. 2012(56):175-195.
379. Jono S, McKee MD, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000;87(7):E10-17.
380. Kapustin AN, Chatrou ML, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*. 2015;116(8):1312-1323.
381. Aghagolzadeh P, Bachtler M, et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis*. 2016;251:404-414.
382. Sage AP, 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.
383. Mattinzoli D, Rastaldi MP, et al. FGF23-regulated production of fetuin-A (AHSG) in osteocytes. *Bone*. 2016;83:35-47.
384. Mattinzoli D, Ikehata M, et al. FGF23 and fetuin-A interaction in the liver and in the circulation. *Int J Biol Sci*. 2018;14(6):586-598.
385. Akiyama K, Kimura T, et al. Biological and clinical effects of calciprotein particles on chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Int J Endocrinol*. 2018;2018:5282389.
386. Bhambri A, Del Rosso JQ. Calciphylaxis: a review. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2008;1(2):38-41.
387. Wittmann I, Degrell P, et al. Diagnosis and successful management of calciphylaxis in a pancreas-kidney transplant patient. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(7):1520-1521.
388. Wang AY, Woo J, et al. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(8):1676-1685.
389. Mehrotra R. Emerging role for fetuin-A as contributor to morbidity and mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2007;72(2):137-140.
390. Osawa M, Umetsu K, et al. Molecular evidence for human α 2-HS glycoprotein (AHSG) polymorphism. *Hum Genet*. 1997;99(1):18-21.
391. Jensen MK, Bartz TM, et al. Genetically elevated fetuin-A levels, fasting glucose levels, and risk of type 2 diabetes: the cardiovascular health study. *Diabetes Care*. 2013;36(10):3121-3127.
392. Lavebratt C, Wahlqvist S, et al. AHSG gene variant is associated with leanness among Swedish men. *Human Genetics*. 2005;117(1):54-60.
393. Müssig K, Staiger H, et al. AHSG gene variation is not associated with regional body fat distribution - a magnetic resonance study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;117(8):432-437.
394. Osawa M, Tian W, et al. Association of α 2-HS glycoprotein (AHSG, fetuin-A) polymorphism with AHSG and phosphate serum levels. *Hum Genet*. 2005;116(3):146-151.
395. Andersen G, Burgdorf KS, et al. AHSG tag single nucleotide polymorphisms associate with type 2 diabetes and dyslipidemia: Studies of metabolic traits in 7,683 white Danish subjects. *Diabetes*. 2008;57(5):1427-1432.
396. Jensen MK, Bartz TM, et al. Fetuin-A, type 2 diabetes, and risk of cardiovascular disease in older adults: the cardiovascular health study. *Diabetes Care*. 2013;36(5):1222-1228.
397. Dahlman I, Eriksson P, et al. α 2-Heremans-Schmid glycoprotein gene polymorphisms are associated with adipocyte insulin action. *Diabetologia*. 2004;47(11):1974-1979.
398. Siddiq A, Lepretre F, et al. A synonymous coding polymorphism in the α 2-Heremans-schmid glycoprotein gene is associated with type 2 diabetes in French Caucasians. *Diabetes*. 2005;54(8):2477-2481.
399. Lehtinen AB, Burdon KP, et al. Association of α 2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphisms with subclinical atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(1):345-352.

400. Thakkestian 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*. 2014;81(2):197-203.
401. Inoue K, Wada J, et al. Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS One*. 2013;8(10):e77118.
402. Muendlein A, Stark N, et al. Are AHSG polymorphisms directly associated with coronary atherosclerosis? *Clin Chim Acta*. 2012;413(1-2):287-290.
403. Marechal C, Schlieper G, et al. Serum fetuin-A levels are associated with vascular calcifications and predict cardiovascular events in renal transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6(5):974-985.
404. Ma S, He Z, et al. Association of AHSG gene polymorphisms with ischemic stroke in a Han Chinese population. *Biochem Genet*. 2013;51(11-12):916-926.
405. Jüllig M, Yip S, et al. Lower fetuin-A, retinol binding protein 4 and several metabolites after gastric bypass compared to sleeve gastrectomy in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2014;9(5):e96489.
406. Kröger J, Meidtnr K, et al. Circulating fetuin-A and risk of type 2 diabetes: A Mendelian randomization analysis. *Diabetes*. 2018;67(6):1200-1205.
407. Stefan N, Haring HU, et al. Association of fetuin-A level and diabetes risk. *JAMA*. 2008;300(19):2247; author reply 2247-2248.
408. Ix JH, Biggs ML, et al. Association of fetuin-a with incident diabetes mellitus in community-living older adults: the cardiovascular health study. *Circulation*. 2012;125(19):2316-2322.
409. Jurcikova L, Adamkova V, et al. Lack of association between variants within the AHSG , HCRT and NPY2R genes and anthropometrical parameters in Czech Post-Monica Study. *Balkan J Med Genet*. 2013;16(1):63-68.
410. Dickson IR, Gwilliam R, et al. Lumbar vertebral and femoral neck bone mineral density are higher in postmenopausal women with the alpha 2HS-glycoprotein 2 phenotype. *Bone Miner*. 1994;24(3):181-188.
411. Verduijn M, Prein RA, et al. Is fetuin-A a mortality risk factor in dialysis patients or a mere risk marker? A Mendelian randomization approach. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(1):239-245.
412. Lavebratt C, Dungner E, et al. Polymorphism of the AHSG gene is associated with increased adipocyte beta2-adrenoceptor function. *J Lipid Res*. 2005;46(10):2278-2281.
413. Stefan N, Haring HU. The role of hepatokines in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(3):144-152.
414. Eichner JE, Cauley JA, et al. Genetic variation in two bone-related proteins: is there an association with bone mineral density or skeletal size in postmenopausal women? *Genet Epidemiol*. 1992;9(3):177-184.
415. Jiang H, Lei SF, et al. Association and linkage analysis of COL1A1 and AHSG gene polymorphisms with femoral neck bone geometric parameters in both Caucasian and Chinese nuclear families. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(3):375-381.
416. Dvornyk V, Liu PY, et al. Contribution of genotype and ethnicity to bone mineral density variation in Caucasians and Chinese: a test for five candidate genes for bone mass. *Chin Med J (Engl)*. 2005; 118(15):1235-1244.
417. Dvornyk V, Liu XH, et al. Differentiation of Caucasians and Chinese at bone mass candidate genes: Implication for ethnic difference of bone mass. *Ann of Hum Genet*. 2003;67:216-227.
418. Malin SK, 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.
419. König D, Zdzieblik 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.
420. Malin SK, del Rincon JP, et al. Exercise-induced lowering of fetuin-A may increase hepatic insulin sensitivity. *Med Sci Sports Exerc*. 2014;46(11):2085-2090.
421. Schultes B, Frick J, et al. The effect of 6-weeks of aerobic exercise training on serum fetuin-A levels in non-diabetic obese women. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2010;118(10):754-756.

422. 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). *FASEB J.* 2014;28(1 Suppl).
423. Reinehr T, Roth CL. Fetuin-A and its relation to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4479-4485.
424. Dong CP, He L, et al. [Association of the Pro12Ala and C1431T polymorphism of the PPAR gamma2 gene and their haplotypes with obesity and type 2 diabetes]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2008;25(4):447-451.
425. Grygiel-Gorniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J.* 2014;13:17.
426. Qian Y, Li P, et al. Association between peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, delta, and gamma polymorphisms and risk of coronary heart disease: A case-control study and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(32):e4299.
427. Purushothaman S, Ajitkumar VK, et al. Association of PPARalpha Intron 7 Polymorphism with Coronary Artery Disease: A Cross-Sectional Study. *ISRN Cardiol.* 2011;2011:816025.
428. Wu Z, Lou Y, et al. The C161T polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene (PPARGgamma) is associated with risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40(4):3101-3112.
429. Flavell DM, Ireland H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(2):582-586.
430. Chuang LM, Hsiung CA, et al. Sibling-based association study of the PPARgamma2 Pro12Ala polymorphism and metabolic variables in Chinese and Japanese hypertension families: a SAPHIRE study. *Stanford Asian-Pacific Program in Hypertension and Insulin Resistance. J Mol Med (Berl).* 2001;79(11):656-664.
431. Wang XL, Oosterhof J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161-->T polymorphism and coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 1999;44(3):588-594.
432. Matthews DR, Hosker JP, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-419.
433. Doney AS, Fischer B, et al. Association of common variation in the PPARA gene with incident myocardial infarction in individuals with type 2 diabetes: a Go-DARTS study. *Nucl Recept.* 2005;3:4.
434. Triffitt JT, Gebauer U, et al. Origin of plasma alpha-2 HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature.* 1976;262(5565):226-227.
435. Doney ASF, Fischer B, et al. Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2004;47(3):555-558.
436. Vergotine Z, Yako YY, et al. Proliferator-activated receptor gamma Pro12Ala interacts with the insulin receptor substrate 1 Gly972Arg and increase the risk of insulin resistance and diabetes in the mixed ancestry population from South Africa. *BMC Genet.* 2014;15:10.
437. Motavallian A, Andalib S, et al. Association between PRO12ALA polymorphism of the PPAR-gamma2 gene and type 2 diabetes mellitus in Iranian patients. *Indian J Hum Genet.* 2013;19(2):239-244.
438. Wang X, Liu J, et al. The association between the Pro12Ala variant in the PPARgamma2 gene and type 2 diabetes mellitus and obesity in a Chinese population. *PLoS One.* 2013;8(8):e71985.
439. Noureldein MH, Abd El-Razek RS, et al. Fenofibrate reduces inflammation in obese patients with or without type 2 diabetes mellitus via sirtuin 1/fetuin A axis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015;109(3):513-520.
440. Lee HJ, Lim Y, et al. Involvement of resveratrol in crosstalk between adipokine adiponectin and hepatokine fetuin-A in vivo and in vitro. *J Nutr Biochem.* 2015;26(11):1254-1260.
441. Shen X, Yang L, et al. Fetuin A promotes lipotoxicity in beta cells through the TLR4 signaling pathway and the role of pioglitazone in anti-lipotoxicity. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;412:1-11.
442. Contreras AV, Torres N, et al. PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. *Adv Nutr.* 2013;4(4):439-452.

443. Haruma K, Okamoto S, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal disease: a comparison of endoscopic findings, histology, and urease test data. *Hiroshima J Med Sci.* 1992;41(3):65-70.
444. Kawaguchi H, Haruma K, et al. *Helicobacter pylori* infection is the major risk factor for atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol.* 1996;91(5):959-962.
445. Blaser MJ. Epidemiology and pathophysiology of *Campylobacter pylori* infections. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl 1:S99-106.
446. Parsonnet J, Hansen S, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med.* 1994;330(18):1267-1271.
447. Eshraghian A, Hashemi SA, et al. *Helicobacter pylori* infection as a risk factor for insulin resistance. *Dig Dis Sci.* 2009;54(9):1966-1970.
448. Polyzos SA, Kountouras J, et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2013;62(1):121-126.
449. Baeg MK, Yoon SK, et al. *Helicobacter pylori* infection is not associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(8):2592-2600.
450. Kebapcilar L, Bilgir O, et al. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on macrophage migration inhibitory factor, C-reactive protein and fetuin-A levels. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(8):799-802.
451. Manolakis AC, Tiaka EK, et al. Increased fetuin A levels in *Helicobacter pylori* infection: a missing link between *H. pylori* and insulin resistance? *Diabetologia.* 2011;54(2):472-474.
452. Jackson L, Britton J, et al. A population-based epidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection and its association with systemic inflammation. *Helicobacter.* 2009;14(5):108-113.
453. D'Elia MM, Appelmelk BJ, et al. Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol Med.* 2004;10(7):316-323.
454. Yamanishi S, Iizumi T, et al. Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease. *Infect Immun.* 2006;74(1):248-256.
455. Gasbarrini A, Franceschi F, et al. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1998;352(9131):878.
456. Sato R, Murakami K, et al. Development of corpus atrophic gastritis may be associated with *Helicobacter pylori*-related idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Gastroenterol.* 2011;46(8):991-997.
457. Malfertheiner P, Megraud F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut.* 2017;66(1):6-30.
458. Zentilin P, Savarino V, et al. Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for disease severity in rheumatoid arthritis? *Gastroenterology.* 1999;116(2):503-504.
459. Aragona P, Magazzu G, et al. Presence of antibodies against *Helicobacter pylori* and its heat-shock protein 60 in the serum of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 1999;26(6):1306-1311.
460. Reinauer S, Goerz G, et al. *Helicobacter pylori* in patients with systemic sclerosis: detection with the ¹³C-urea breath test and eradication. *Acta Derm Venereol.* 1994;74(5):361-363.
461. Showji Y, Nozawa R, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with connective tissue diseases. *Microbiol Immunol.* 1996;40(7):499-503.
462. Yazawa N, Fujimoto M, et al. High seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with systemic sclerosis: association with esophageal involvement. *J Rheumatol.* 1998;25(4):650-653.
463. Gasbarrini A, Massari I, et al. *Helicobacter pylori* eradication ameliorates primary Raynaud's phenomenon. *Dig Dis Sci.* 1998;43(8):1641-1645.
464. Tan EM, Cohen AS, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25(11):1271-1277.
465. Kantartzis K, Machann J, et al. The impact of liver fat vs visceral fat in determining categories of prediabetes. *Diabetologia.* 2010;53(5):882-889.
466. Polyzos SA, Kountouras J, et al. The potentially dual-faceted nature of fetuin-A in *Helicobacter pylori* infection and insulin resistance. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(5):911-912.
467. LeRoy EC, Black C, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988;15(2):202-205.

468. Alarcon GS, Williams GV, et al. Early undifferentiated connective tissue disease. I. Early clinical manifestation in a large cohort of patients with undifferentiated connective tissue diseases compared with cohorts of well established connective tissue disease. *J Rheumatol.* 1991;18(9):1332-1339.
469. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Raynaud's phenomenon: a proposal for classification. *Clin Exp Rheumatol.* 1992;10(5):485-488.
470. Arnett FC, Edworthy SM, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315-324.
471. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292(7):344-347.
472. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292(8):403-407.
473. Smyk DS, Koutsoumpas AL, et al. *Helicobacter pylori* and autoimmune disease: cause or bystander. *World J Gastroenterol.* 2014;20(3):613-629.
474. Hasni SA. Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(4):429-434.
475. Farina G, Rosato E, et al. High incidence of *Helicobacter pylori* infection in patients with systemic sclerosis: association with Sicca Syndrome. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2001;14(2):81-85.
476. Ram M, Barzilai O, et al. *Helicobacter pylori* serology in autoimmune diseases - fact or fiction? *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(5):1075-1082.
477. Radic M, Kaliterna DM, et al. Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for disease severity in systemic sclerosis? *Rheumatol Int.* 2013;33(11):2943-2948.
478. Sulli A, Seriolo B, et al. Lack of correlation between gastric *Helicobacter pylori* infection and primary or secondary Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2000;27(7):1820-1821.
479. Yamaguchi K, Iwakiri R, et al. Reflux esophagitis and *Helicobacter pylori* infection in patients with scleroderma. *Intern Med.* 2008;47(18):1555-1559.
480. Wipff J, Allanore Y, et al. Prevalence of Barrett's esophagus in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2882-2888.
481. Danese S, Zoli A, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* type I virulent strains in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2000;27(6):1568-1569.
482. Cleve H, Weidinger S, et al. AIDS: no association with the genetic systems GC (D-binding protein), ORM (orosomucoid = alpha-1-acid glycoprotein), and A2HS (alpha-2-HS-glycoprotein). *Infection.* 1988;16(1):31-35.
483. Porter BO, Shen J, et al. Interleukin-2 cycling causes transient increases in high-sensitivity C-reactive protein and D-dimer that are not associated with plasma HIV-RNA levels. *AIDS.* 2009;23(15):2015-2019.
484. Nussberger J, Cugno M, et al. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(6):1321-1322.
485. Cugno M, Nussberger J, et al. Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(3):311-317.
486. Kaplan AP, Joseph K. The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010;104(3):193-204.
487. Savarese L, Bova M, et al. Emotional processes and stress in children affected by hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency: a multicenter, prospective study. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):115.
488. Zotter Z, Csuka D, et al. The influence of trigger factors on hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:44.
489. Demirtürk M, Polat N, et al. There is an increased risk of atherosclerosis in hereditary angioedema. *Int Immunopharmacol.* 2012;12(1):212-216.
490. Firinu D, Bassareo PP, et al. Impaired endothelial function in hereditary angioedema during the symptom-free period. *Front Physiol.* 2018;9:523.
491. Lewis JG, André CM. Stimulation of human monocyte phagocytic function by alpha-2-HS glycoprotein. *New Zealand Medical Journal.* 1981;93(679):168-168.

492. Török-Nagy B, Vajda Z, et al. Kereskedelmi forgalomban használt D-dimer-tesztek vágóértékének harmonizálása. *Orv Hetil.* 2019;160(15):585-592.
493. Demirtürk M, Gelincik A, et al. Increased eNOS levels in hereditary angioedema. *Int Immunopharmacol.* 2014;20(1):264-268.
494. Veszeli N, Csuka D, et al. Neutrophil activation during attacks in patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:156.
495. Liu Y, Luo L, et al. [In vitro effect of danazol on cytokine production of macrophages in peritoneal fluid of infertile patients with endometriosis and its relationship with cytosolic free calcium concentration]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2000;35(8):479-481.
496. Terkeltaub RA, Santoro DA, et al. Serum and plasma inhibit neutrophil stimulation by hydroxyapatite crystals. Evidence that serum alpha 2-HS glycoprotein is a potent and specific crystal-bound inhibitor. *Arthritis Rheum.* 1988;31(9):1081-1089.
497. Wang XQ, Hayes MT, et al. Fetuin-A: a major fetal serum protein that promotes "wound closure" and scarless healing. *J Invest Dermatol.* 2008;128(3):753-757.
498. Wang H, Li W, et al. Role of fetuin-A in injury and infection. In: F. Veas, editor. *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins.* Shanghai, China: InTech; 2011. p. 329-344.
499. Ong SP, Lee LM, et al. Dengue virus infection mediates HMGB1 release from monocytes involving PCAF acetylase complex and induces vascular leakage in endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(7):e41932.
500. Fonseca RG, Sales VM, et al. Lack of kinin B(1) receptor potentiates leptin action in the liver. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(7):851-860.
501. Ohsawa I, Nagamachi S, et al. Leukocytosis and high hematocrit levels during abdominal attacks of hereditary angioedema. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:123.
502. Hofman ZL, Relan A, et al. C-reactive protein levels in hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol.* 2014;177(1):280-286.
503. van Geffen M, Cugno M, et al. Alterations of coagulation and fibrinolysis in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(3):472-478.
504. Csuka D, Veszeli N, et al. Comprehensive study into the activation of the plasma enzyme systems during attacks of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:132.
505. Reshef A, Zanichelli A, et al. Elevated D-dimers in attacks of hereditary angioedema are not associated with increased thrombotic risk. *Allergy.* 2015;70(5):506-513.
506. Robinson KN, Teran-Garcia M. From infancy to aging: Biological and behavioral modifiers of fetuin-A. *Biochimie.* 2016;124:141-149.
507. Smith ER, Ford ML, et al. Poor agreement between commercial ELISAs for plasma fetuin-A: An effect of protein glycosylation? *Clin Chim Acta.* 2010;411(17-18):1367-1370.
508. LaClair R, O'Neal K, et al. Precision of biomarkers to define chronic inflammation in CKD. *Am J Nephrol.* 2008;28(5):808-812.