

**A fetuin-A artériás kalcifikációt gátló
hatásának vizsgálata érbetegekben**

Doktori tézisek

Dr. Szeberin Zoltán

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Acsády György egyetemi tanár,
az orvostudomány doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Kasza Gábor egyetemi adjunktus, PhD.
Dr. Szijártó Attila egyetemi tanársegéd, PhD.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Ondrejka Pál egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Jámbor Gyula egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Járai Zoltán egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2010

Bevezetés

Magyarországon és a nyugati típusú társadalmakban a szív- és érrendszeri megbetegedések ma is a haláloki statisztikák vezető helyén állnak. A megbetegedések háttérében számos esetben atherosclerosis mutatható ki. A hagyományos kockázati tényezők és szérum markerek mellett folyamatosan fedeznek fel molekulákat, melyek a klasszikus tényezők mellett, szerepet játszhatnak az érszűkület, érlemezés kialakulásában. Érsebészek, angiológusok, radiológusok által jól ismert jelenség, hogy a súlyos atherosclerosisos betegek között némelyek súlyos, diffúz artériás kalcifikációban szenvednek (pl. diabéteszes, krónikus uraemiás dializált betegek), másokban alig látható mész az érfalban, bár az artériás szűkületek, és elzáródások súlyos klinikai állapothoz vezetnek. Az extraosseális és intraarteriális kalcifikáció egyik szabályozója lehet a fetuin-A, mely számos egyéb hatása mellett szerepet játszhat az érlemezés kialakulásában. E mechanizmus megismerésének szükségessége vezetett a fetuin-A érbetegekben történő vizsgálatához.

A fetuin-A egy májban termelődő glycoprotein, mely in vitro vizsgálatok és állatkísérletek szerint erősen gátolja a

kalcium sók precipitációját és a hydroxyapatit képződést, mely a csontképződés alapvető folyamata. A humán vizsgálatok nagy része egy olyan populációból származik, melyben közismert a kifejezett, diffúz, előrehaladott extraosseális kalcifikáció: a dialízist igénylő krónikus uraemiás betegek csoportja.

Az ektópiás kalcifikációt gátló hatása mellett a fetuin-A egy negatív akut fázis fehérje, a transforming growth factor- β antagonistája, az inzulin receptor tirozin kináz aktivitását gátolja, a magasabb fetuin-A szint összefüggésben van a diabétesz kialakulásával, gátló szerepet játszik a mátrix metalloproteinázok működésének szabályozásában, a magzati csontfejlődésben nélkülözhetetlen, a csont és ásványi anyagcserében egyaránt szerepet játszik.

Célkitűzés

Vizsgálatainkkal azt kívántuk tanulmányozni, hogy a fetuin-A artériás kalcifikációt gátló szerepére utaló összefüggések igazolhatóak-e humán atherosclerotikus, nem uraemiás beteganyagban.

1. Van-e összefüggés a szérum fetuin-A szint és az artériás kalcifikáció között krónikus alsó végtagi atherosclerotikus, nem uraemiás betegekben?

Számos munkacsoport szerint a szérum fetuin-A szint alacsonyabb atherosclerotikus betegekben, mint a kontroll csoportban és kapcsolatban állhat a kardiovaszkuláris mortalitással. Az adatok nagy része uraemiás, haemodializált betegek vizsgálatán alapszik. A krónikus uraemia vagy önmagában a haemodialízis kezelés állandósult, krónikus gyulladást fenntartva befolyásolhatja a fetuin-A szintet. Ennek kiküszöbölése céljából végeztük vizsgálatunkat nem haemodializált atherosclerotikus betegekben. Arra kerestük a választ, hogy a szérum fetuin-A szint és az artériás kalcifikáció kapcsolata kimutatható-e ebben a betegcsoportban is.

2. Van-e különbség az eltérő etiológiájú aorta aneurizmával rendelkező betegek szérum fetuin-A szintje között?

Az aorta aneurizmak kialakulásának pontos patofiziológiája ma sem tisztázott. Az öröklött kötőszöveti rendellenességgel bíró betegek (pl. Marfan szindróma) és az aorta aneurizma kapcsolata ismert. Az aorta aneurizmával rendelkező betegek túlnyomó

többsége azonban atherosclerosisban szenved, ebben a csoportban nem ismert pontosan az aorta dilatációjának mechanizmusa. Az artériás kalcifikációban szerepet játszó fetuin-A szintjét aneurizmatikus betegségeken még nem vizsgálták.

Vizsgálatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogy különbözik-e a szérumban fetuin-A szintje két eltérő etiológiájú (Marfan szindróma és atherosclerosis), de hasonló morfológiai (aorta aneurizma) megjelenésű betegcsoportban.

3. Van-e összefüggés a perifériás érbetegek szérumban HSP (hősokk fehérje) 70 szintje és az artériás kalcifikáció mértéke, valamint a szérumban fetuin-A szintje között?

A nem tradicionális atherosclerosis rizikótényezők közül a HSP 70 szintje pontosan nem tisztázott kapcsolatban áll az artériás kalcifikációval. Vizsgálatunkban az atherosclerosis és az artériás kalcifikáció súlyosságát több módszerrel mértük: Fontaine klasszifikáció, boka-kar index (ABI), duplex ultrahang (UH) vizsgálattal mért carotis intima-média vastagság (IMT), UH vizsgálattal meghatározott általános kalcifikációs score. Az akut stressz állapotokban a HSP 70 szint emelkedhet, ezért

vizsgálatunkban a krónikus betegekben mértük szintjét. Arra kerestük a választ, hogy a HSP 70-nek van-e kapcsolata az artériás kalcifikációval és más nem tradicionális rizikótényezőkkel (fetuin-A, homocisztein).

Módszerek

Beteganyag

A vizsgálatba 266 beteget vontunk be a Semmelweis Egyetem Érsebészeti Klinikáján 2009. 01. 01. és 2009. 07. 31. között. A vizsgálatba történő bevonás szempontjából a klinika ambulanciáján, illetve az érsebészeti osztályon jelentkező összes beteget figyelembe vettük, atherosclerosis talaján kialakult krónikus alsó végtagi ischaemiája, aorta aneurizmája, carotis stenosisa, illetve aorta aneurizmája és Marfan szindrómája volt, és a vizsgálatba beleegyezett. Kizárási kritériumnak tekintettük, ha a beteg akut ischaemia tüneteivel jelentkezett, klinikai jelek infectióra utaltak, a beteg malignus tumorral rendelkezett, a betegnek akut vagy krónikus májbetegsége volt, dialízis kezelésben részesült, a beteg bármilyen okból immunszuppresszív kezelés alatt állt, 6 hónapon belül stroke-ot, myocardialis infarktust szenvedett el, bármilyen ér- vagy szív műtéten

(beleértve a percutan intervenciókat is) vagy egyéb súlyos betegségen vagy műtéten esett át.

Vizsgálati módszerek

A betegek bevonása után a vizsgálatunk számára készített kérdőívet töltöttünk ki a beteggel, mely kérdéseket tartalmaz a beteg demográfiai adatairól, életmódjáról, az atherosclerosis szempontjából szóba jövő rizikótenyezőkről, korábbi és jelenlegi betegségekről, műtétekről, gyógyszerszedésről, beépített idegentestről. A klasszikus Fontaine beosztást alkalmaztuk a krónikus alsó végtagi atherosclerosis klinikai súlyosságának megítélése céljából. Doppler UH készülékkel megmértük a boka-kar indexet. Duplex UH vizsgálat során megmértük az artéria carotis interna eredésénél található esetleges szűkület mértékét, és a carotis communisokban az IMT-t. A szisztémás artériás kalcifikáció megítélését duplex UH módszerrel végeztük a test hét pontján: a két carotis bifurcatióban, az infrarenalis aortán, a két artéria femoralis communisban, a mitrális és az aorta billentyűn. Az alsó végtagi atherosclerosis súlyosságát és kiterjedését az angiographiás felvételek elemzésével meghatározott Bollinger által leírt score rendszerrel számszerűsítettük.

A standard laboratóriumi vizsgálatokat reggeli éhomi vénás vérmintákból végeztük a Semmelweis Egyetem laboratóriumaiban. A fetuin-A meghatározást radiális immunodiffúziós módszerrel, a szolubilis HSP 70 szintet ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) kittel végeztük a Semmelweis Egyetem III. Belgyógyászati Klinika kutató laboratóriumában.

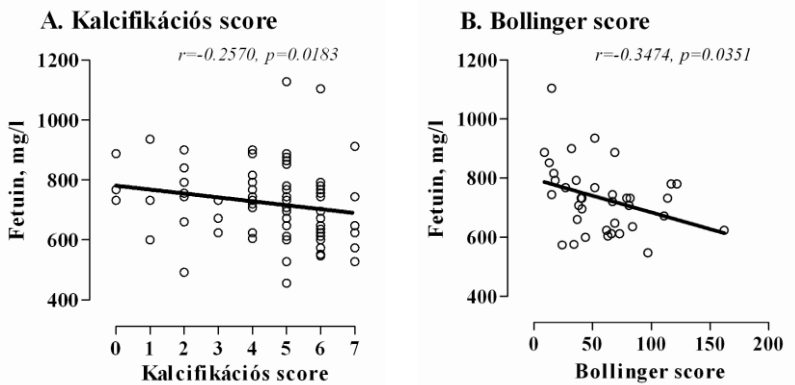
Statisztika

Mivel a változók többsége nem mutatott normál eloszlást, nonparametrikus statisztikai tesztekkel használtunk az analízisek során. Két független minta folytonos változói közötti összehasonlításhoz a Mann-Whitney U-tesztet, több csoport változóinak összehasonlítása esetén Kruskal-Wallis tesztet használtunk. A változók közötti korrelációk vizsgálatára a Spearman-féle korrelációs koefficiens értékét határoztuk meg. Bináris adatok kapcsolatának vizsgálatára többszörös logisztikus regressziós analízist végeztünk. Minden statisztikai tesztet kétoldalasan végeztünk, a próbák eredményét $p < 0,05$ értékek esetén tekintettük szignifikánsnak. A megadott értékek medián (interkvartilis tartomány) értékeknek felelnek meg, ettől eltérő esetben azt külön feltüntettük.

Eredmények

1. Szérum fetuin-A szint és az artériás kalcifikáció kapcsolatának vizsgálata krónikus alsó végtagi atherosclerotikus, nem uraemiás betegekben

Igazoltuk, hogy szignifikáns negatív irányú korreláció áll fenn a szérum fetuin-A szint és az ultrahang vizsgálattal meghatározott kalcifikációs score, valamint a fetuin-A szint és az angiographia alapján meghatározott Bollinger score között (1. ábra).



1. ábra: A szérum fetuin-A szintek és az UH vizsgálattal mért kalcifikációs score, valamint a Bollinger score kapcsolata (Spearman-féle rang korrelációs analízis)

Logisztikus regressziós analízist végeztünk a fetuin-A és a kalcifikációs score kapcsolatának egyéb tényezőktől

(kor, nem, testtömeg index /BMI/, diabétesz, dohányzás, koleszterin, triglicerid, high density lipoprotein /HDL/, C-reactive protein /CRP/) való függőségének tisztázására. Egyik modell sem változtatta meg a szérumban a fetuin-A szint és a kalcifikációs score szignifikáns kapcsolatát (2. ábra).

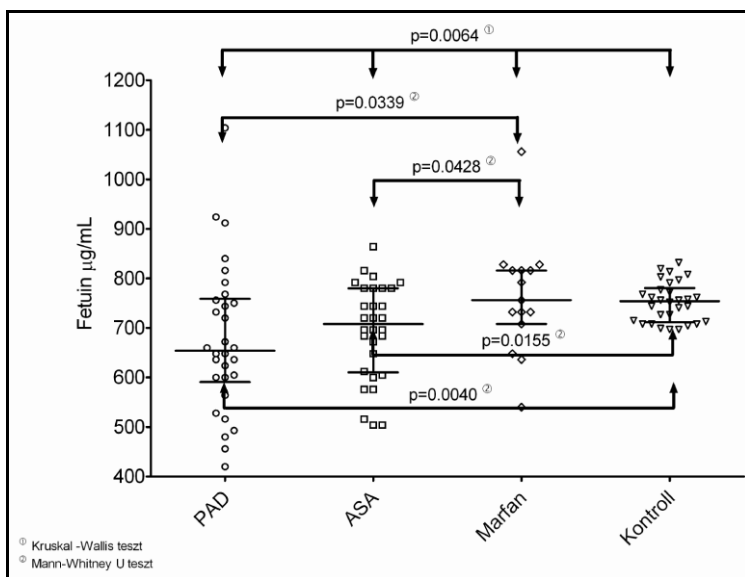
	Esélyhányados a súlyosabb artériás kalcifikációra (CI)	p érték
Nem adjusztált	2,9683 (1,2128-7,2645)	0,0172
1. modell	2,8894 (1,1215-7,4438)	0,0280
2. modell	3,2790 (1,707-9,2853)	0,0239
3. modell	3,0351 (1,0533-8,7457)	0,0398

2. ábra: A fetuin-A és az UH vizsgálattal megállapított artériás kalcifikációs score közötti kapcsolat logisztikus regressziós analízise

2. Az eltérő etiológiájú aorta aneurizmával rendelkező betegek (atherosclerosis és Marfan szindróma) szérumban a fetuin-A szintje közötti eltérés vizsgálata

A fetuin-A szérumban a szintek mérése az alábbi eredményeket hozta: a kapott fetuin-A értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a perifériás érbetegekben (PAD: 654 $\mu\text{g/ml}$ /600-756/) és az atherosclerotikus aneurizmás csoportban (ASA: 708

/612-780/), mint a Marfan szindrómásokban (756 /708-816/) és az egészséges kontrol csoportban (754 /713-777/), (medián /IQR/ értékek). A vizsgálatunk lényegét tekintve szignifikáns különbséget találtunk a két különböző etiológiájú aneurizmás csoport között: $p=0,0428$. (3. ábra).

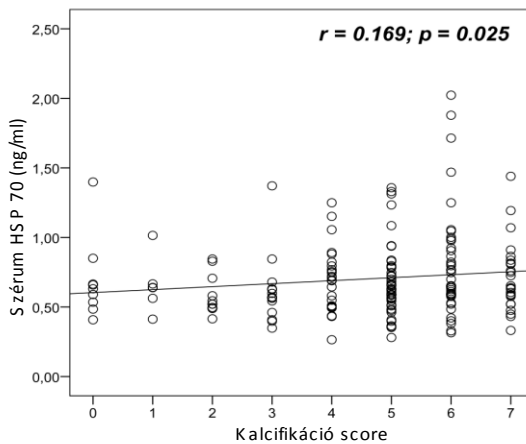


3. ábra: A szérum fetuin-A szintek scatter plot diagrammal történő ábrázolása a különböző betegcsoportok között

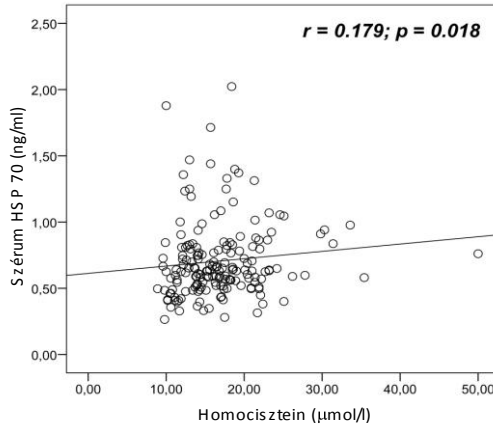
Hasonlóan szignifikáns volt a különbség az ASA és a kontroll csoport, illetve a Marfan szindrómás és a PAD csoportok összevetésében is.

3. Perifériás érbetegek szérum HSP 70 szintje és az artériás kalcifikáció mértéke, valamint a szérum fetuin-A szintje közötti kapcsolatok vizsgálata

A Hsp70 szint és a kalcifikációs score, valamint a homocisztein szintek között szignifikáns kapcsolatot találtunk. Az összefüggéseket scatter plot diagramon ábráztuk (4.a. és b. ábra).



4.a. ábra: A szérum Hsp70 szint kapcsolata a kalcifikációs score-ral perifériás érbetegekben (scatter plot diagram)



4.b. ábra: A Hsp70 és homocisztein szint kapcsolata perifériás érbetegekben (scatter plot diagram)

A korrelációs vizsgálat analízise során szignifikáns kapcsolatot találtunk a Hsp70 szérum szintje és a kor, a szérum bilirubin és gamma GT szint között is. Nem találtunk szignifikáns korrelációt a Hsp70 szérum koncentráció és a fetuin-A szint között.

Univariáns analízis során azt találtuk, hogy a Hsp70 szérum értékek felső kvartilisába (Hsp70 koncentráció $>0,7296$ ng/ml) tartozó betegeknek több, mint kétszeres esélye van arra, hogy a legsúlyosabban kalcifikált csoportba tartozzanak (KS= 6-7). A Hsp70 szint és az artériás kalcifikáció súlyosságának kapcsolatát

logisztikus regressziós analízissel vizsgáltuk. A kor, a nem, a dohányzás, a CRP és homocisztein lehetséges hatását vizsgáltuk az esélyhányadosra; a fenti faktorokkal elvégzett korrekció után is szignifikáns maradt az összefüggés a Hsp70 és az artériás kalcifikációs score között (5. táblázat). (Az esélyhányadosokat és a 95 % konfidencia intervallumokat (CI) logisztikus regressziós analízissel számítottuk. 1. modell: korra, nemre, eGFR-re adjusztálva, 2. modell: 1. modell + dohányzás, 3. modell: 2. modell + CRP, 4. modell: 3. modell + homocisztein)

	Esélyhányados a súlyosabb artériás kalcifikációra (CI)	p érték
Nem adjusztált	2,189 (1,156-4,144)	0,016
1. modell	2,110 (1,066-4,175)	0,032
2. modell	2,233 (1,054-4,730)	0,036
3. modell	2,403 (1,115-5,181)	0,025
4. modell	2,264 (1,021-5,020)	0,044

5. táblázat: A Hsp70 és az artériás kalcifikációs score összefüggése

Következtetések

1. A szérum fetuin-A szint és a szisztémás artériás kalcifikáció súlyossága között negatív korreláció áll fenn előrehaladott krónikus alsó végtagi atherosclerotikus, infekciómentes, normál veseműködésű betegekben. Ez újabb betegcsoportban támasztja alá a fetuin-A érfalmeszesedést gátló feltételezett hatását. Eszerint nem az 5. stádiumú krónikus vesebetegség és a haemodializált betegek krónikus infekciós állapota magyarázza az alacsony fetuin-A szint és a fokozott artériás kalcifikáció kapcsolatát.

2. Kimutattuk, hogy a fetuin-A szint szignifikánsan különbözik az eltérő etiológiájú aorta aneurizmás betegekben: az atherosclerotikus betegekben alacsonyabb, mint a Marfan szindrómásokban. Ez a megfigyelés újabb kontroll csoportban igazolja a fetuin-A lehetséges gátló szerepét az artériás kalcifikációban. Az aneurizmák képződésében a fetuin-A jelentőségének megismerése további vizsgálatokat igényel.

3. Igazoltuk, hogy a Hsp70 szérum szint egyéb atherosclerotikus rizikótényezőktől függetlenül pozitív korrelációt mutat az artériás kalcifikáció mértékével. A magas Hsp70 szintű betegek artériafal meszesedése

vizsgálatunk szerint súlyosabb mértékű, ez előjelezheti a várható kardiovaszkuláris események bekövetkeztét.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Szeberin Z., Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Bíró G, Sótonyi P. Széplaki G. Prohászka Z, Szabolcs Z. Kalabay L. Acsády G. Fetuin-A serum levels in patients with aortic aneurysms of Marfan syndrome and atherosclerosis (European Journal of Clinical Investigation, DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02393.x) **IF: 2,643**

Krepuska M, **Szeberin Z.**, Sótonyi P, Sarkadi H, Fehérvári M, Apor A, Rimely E, Prohászka Z, Acsády G: Serum level of soluble Hsp70 is associated with the severity of atherosclerosis (elfogadva, Cell Stress & Chaperones **IF: 2,167**

Egyéb közlemények:

Szeberin Z., Nemes B., Nemes A.: Arteria hepatica communis aneurysma ruptura Magyar Sebészet, 2000, 53. 70-72

Szeberin Z., Pápay J., Bíró G., Nemes A.: Alsó végtagi vénás kompressziós tüneteket okozó eredetű leiomyosarcoma az inguinális régióban, Magyar Sebészet, 2000, 53. 21-23

Sepa Gy., Dzsinih Cs., Szabó A., Nemes A., **Szeberin Z.**:
Térdhajlati verőér leszorítása, Magyar Sebészet 2000, 53. 17-20

Szabó G., Laczkó Á., **Szeberin Z.**, Windisch M., Százados M.,
Kristóf V., Acsády Gy.: Anatomikus és extraanatomikus
reconstructiók az arteria iliaca rendszer occlusiv betegségeiben,
Magyar Sebészet, 2001, 54. Suppl. 60-62

Bíró G., Szabó A., **Szeberin Z.**, Nemes A.: Homograft beültetéssel
végzett artériás reconstructiók, Magyar Sebészet, 2001, 54. S. 63-67

Laczkó Á., Szabó G., **Szeberin Z.**, Nemes B., Bobek I., Kristóf V.,
Selmei L., Acsády Gy.: Érsebészeti és intervencionális radiológiai
beavatkozások előkészítése trombolízis alkalmazásával, Magyar
Sebészet, 2001, 54. Suppl. 69-73

Acsády Gy., Laczkó Á., Szabó A., Szabó G., **Szeberin Z.**, Gálfy I.,
Turbók E., Nemes A.: Az érsebészeti szövődmények kezelési
lehetőségei, Magyar Sebészet, 2001, 54. Suppl. 75-80

Szeberin Z., Bíró G., Sótónyi P., Soós P., Százados M., Árkossy O.,
Berta K., Acsády Gy.: Proximális radio-cephalikus autológ fistulák
szerepe a haemodialízis kezelés biztosításában, Magyar Sebészet,
2006, 59. 421-8

Szeberin Z., Szabó A., Gósi G., Szabó G.: Kezelési határterületek
heveny artériás kórképekben, Háziorvos Továbbképző Szemle, 2006,
4. 64-9

Szabó G., **Szeberin Z.**, Bíró G.: Jósló tünetetek jelentősége a szekunder stroke prevenciójában, Háziorvos Továbbképző Szemle, 2006, 4. 54-8

Szeberin Z., Bíró G, Sótonyi P, Soós P, Százados M, Árkossy O, Berta K, Acsády G: The role of autologous antebrachial arteriovenous fistula in the strategy of access planning for chronic uremic patients on hemodialysis. Minerva Urologica e Nefrologica, 2007, 59, 231-6

Szeberin Z., Bíró G., Szabó G. V., Százados M., Nemes B., Dzsinič Cs.: Aorto-bifemorális graft készítése vena femoralis superficialisból, Érbetegségek, 2007, 14. 7-11

Szabó Gy., Laczkó Á., Becker D., Molnár L., Fülöp G., Szilágyi Sz., **Szeberin Z.**, Acsády Gy, Merkely B.: Kardiogén sokkal szövődött miokardiális infarktus primer PCI-t követő intraaorticus ballonpumpa kezelése bilaterális arteria iliaca communis elzáródás miatt bal arteria axillaris felőli behelyezéssel, Cardiologia Hungarica, 2007, 4. 276-81

Dzsinič Cs., Hüttl K., Bodor E., Nemes A., Bíró G., Szabó G., **Szeberin Z.**, Bodor G., Windisch M., Gálfy I., Széphelyi K.: Hybrid megoldások az aortaív sebészetében, Magyar Sebészet, 2007, 60. 494-500

Szabó G. V., **Szeberin Z.**, Bíró G., Laczkó Á., Dzsiniich Cs., Acsády Gy.: Bilateralis carotis interna aneurysma, Magyar Sebészet, 2007, 60. 262-6

Szabolcs Z., Veres G., Hüttl T., Bíró G., Tóth A., **Szeberin Z.**, Windisch M., Acsády G.: Egyszerű sebészi módszer az aorta ascendensben elhelyezkedő nagy, lebegő thrombus eltávolítására, Orvosi Hetilap, 2007, 148. 363-6

Tóth A, Kispál G, Ungvári E, Viola M, **Szeberin Z.**, Pásztai J, Molnár K, Gacs M, Fűzi M.: First report of heterogeneously vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (hVISA) causing fatal infection in Hungary. Journal of Chemotherapy, 2008, 20. 655-6 **IF: 0,843**

Paukovits TM, Haász J, Molnár A, **Szeberin Z.**, Nemes B, Varga D, Hüttl K, Bérczi V, Léránt G.: Transfemoral endovascular treatment of proximal common carotid artery lesions: a single-center experience on 153 lesions. Journal of Vascular Surgery., 2008, 48. 80-7 **IF: 3,770**

Molnár AA, Apor A, Kristóf V, Nádasy GL, **Szeberin Z.**, Monos E, Acsády G, Préda I, Bérczi V.: Generalized alterations in the biomechanical properties of large veins in non-thrombotic thrombophilic young patients. International Angiology, 2008, 27. 247-52 **IF: 1,418**

Szeberin Z., Firneisz G., Bíró G., Szabó G. V., Sótónyi P., Windisch M., Krepuska M., Sípos F., Mihály E., Acsády Gy.: B típusú aortadissectio sebészi kezelése kokaint használó beteg esetében, Orvosi Hetilap, 2009, 3. 129-31

Szeberin Z.: Krónikus dialízis szükségessége és halálozási arány dialízist igénylő heveny veseelégtelenség túlélői között MOTESZ Magazin, 2010, 1. 55-7

Szeberin Z., Münch Z., Fehérvári M., Bíró G., Entz L., Acsády Gy.: Ezüst-acetáttal bevont Dacron grafftal végzett rekonstrukciós érműtétek középtávú eredményei, Magyar Sebészet, 2010 (közlésre elfogadva)