

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Az érfali működés egyes új markereinek összefüggése a lipidparaméterekkel familiáris hiperkoleszterinémiás betegekben

Dr. Juhász Lilla

Témavezető: Prof. Dr. Harangi Mariann



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Az érfali működés egyes új markereinek összefüggése a lipidparaméterekkel familiáris hiperkoleszterinémiás betegekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az egészségtudományok tudományágban

Írta: dr. Juhász Lilla okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája
(Anyagcsere és endokrin betegségek megelőzése és kontrollja program) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Harangi Mariann

Az értekezés bírálói: Dr. Nagy Béla PhD

Dr. Reiber István PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

tagok: Dr. Borbély Attila PhD

Dr. Simonyi Gábor PhD

Dr. Nagy Béla PhD

Dr. Reiber István PhD

Az értekezés védésének időpontja és helyszíne:

2024. május 16. 13 óra,

A Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

Bevezetés

A familiáris hiperkoleszterinémia (FH) heterozigóta formája (HeFH) a leggyakoribb monogénis formában öröklődő anyagcsere betegség, melyet a születéstől kezdve jelentősen emelkedett össz- és alacsony sűrűségű lipoprotein/low-density lipoprotein koleszterin (LDL-C) szint, progresszív érelmeszesedés és korai vaszkuláris szövődmények kialakulása jellemez. A klinikai megjelenést és a kardiovaszkuláris szövődmények kialakulásának kockázatát azonban számos egyéb tényező is befolyásolja, így a klinikai kép változatos, és a kardiovaszkuláris kockázatbecslés ebben a betegségben nehezített. A további genetikai eltéréseken és társbetegségeken kívül egyéb kockázati tényezőknek tekinthetők a gyulladásos folyamatok, a trombózis készséget fokozó tényezők, a szénhidrát anyagcsere zavarai, valamint az egyéb lipoproteinek mennyiségében és minőségében bekövetkező változások. Minden olyan további tényező azonosítása, mely befolyásolja az érelmeszesedés kialakulását vagy progresszióját, segíthet felismerni azokat a betegeket, akik különösen nagy kockázatnak vannak kitéve. Ezen tényezők ismerete hozzájárulhat továbbá az érszövődmények kialakulásának jobb megértéséhez. Az alacsony sűrűségű lipoprotein/high-density lipoprotein (HDL) részecske általánosságban védő hatást fejt ki az érelmeszesedés kialakulásával szemben. Ennek egyik oka a HDL struktúrfehérjéinek egyikéhez, az apolipoprotein M (ApoM)-hez kapcsolt. Ez a fehérje főként a HDL részecskékhez asszociált, és a szfingozin-1-foszfát (S1P) bioaktív szfingolipid szállításában játszik szerepet, mely az endotel funkció megőrzéséhez járul hozzá. Az ApoM/S1P érfali működésre kifejtett hatása ugyanakkor meglehetősen komplex, és részben gyulladásos folyamatok által mediált. A stromaeredetű faktor-1 (SDF-1) egy konzervatív kemokin, melyet számos sejttípus, köztük az endotel termel. Az eddigi kutatások alapján az SDF-1 részt vesz az angiogenezis és az ateroszklerózis folyamatában, és szintjét a lipidanyagcsere eltérései is befolyásolják. HeFH-ban az ApoM/S1P tengelyt és az SDF-1 szintjét, illetve azok összefüggéseit a lipoprotein szubfrakciókkal, a gyulladásos markerekkel és az endotel funkcióval korábban nem vizsgálták, bár szerepük az irodalmi adatok alapján felmerül a HeFH-hoz társuló korai és súlyos lefolyású ateroszklerózis folyamatának szabályozásában. Ezen fehérjék szerepének megértése elősegítheti a pontosabb kardiovaszkuláris kockázatfelmérést és esetleges jövőbeni új gyógyszeres terápiás lehetőségek feltárását.

Irodalmi áttekintés

A familiáris hiperkoleszterinémia

Az FH a monogén anyagcsere betegségek egyik leggyakoribb formája. A betegség hátterében valamely, az LDL anyagcserében kulcsszerepet játszó fehérjét kódoló gén mutációja áll. Heterozigóta formában az FH kifejezetten gyakori, egyes európai országokban a prevalencia eléri az 1:200-250 főt. Magyarországon egy adatbányászati módszerrel elvégzett vizsgálat alapján a kórkép becsült gyakorisága az észak-alföldi régióban 1:340. A kórkép homozigóta formája ennél jóval ritkább, a korábban 1:1 milliós prevalenciát ma körülbelül 1:170.000-300.000 főre becsülik. A klinikai tünetek megjelenéséért a már születéstől kezdődően jellemző jelentősen emelkedett összkoleszterin és LDL-C szint a felelős, mely fokozza a korai érrelmeszesedés kialakulását, következésképpen generalizált érbetegséget okoz. Ezen belül különösen az iszkémiás szívbetegség (ISZB) és az akut miokardiális infarktus (AMI) korai megjelenésével kell számolni. A súlyos, homozigóta formában ezek a szövődmények akár már gyermekkorban kialakulhatnak, de a heterozigóta formában is jelentkeznek kezeletlen esetekben akár 45-50 éves korban, jellemzően nőknél 60, férfiak esetén 55 éves kor alatt. A korai és súlyos, gyorsan progrediáló érrelmeszesedés okozta szövődmények továbbá az iszkémiás stroke, a perifériás artériás érbetegség (PAD), valamint az aorta billentyű meszesedésével járó aorta stenosis. Az FH diagnózisát a genetikai vizsgálat ugyan nagymértékben elősegítheti, de a mindennapi gyakorlatban a diagnózis felállítása nem igényli e költséges és nehezen hozzáférhető, speciális laboratóriumi vizsgálatok elvégzését. A genetikai vizsgálatok helyett diagnosztikai kritériumrendszerek alkalmazását javasolják, melyek közül Európa legtöbb országában, így hazánkban is a Dutch Lipid Network Kritériumrendszer (DLNC) alkalmazása vált általánossá. A kezelés alapját a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-koenzim-A (HMG-KoA) gátló statinok jelentik. Nem megfelelő hatékonyság esetén a statin ezetimibbel történő kombinációja javasolt. A kezelés következő lépését a proprotein konvertáz subtilizin kexin-9 (PCSK9) gátló monoklonális antitestek, azaz az evolocumab vagy alirocumab, illetve a kis interferáló RNS (inclisiran) jelenti. Mind a súlyos HeFH, mind a HoFH esetén a gyógyszeres kezelés szelektív LDL aferezis kezeléssel egészíthető ki.

A familiáris hiperkoleszterinémia heterogén jellege

Az FH betegek esetén tapasztalt korai és gyors progressziójú érrelmeszesedés legfontosabb kockázati tényezőjének a szérum LDL-C szintet tekintjük. Kezeletlen FH esetén az ISZB és egyéb ateroszklerotikus érbetegségek kialakulásának kockázata 10-20-szor nagyobb, mint az

átlag populációban. Ennek ellenére nem minden FH betegnél alakul ki vaszkuláris szövődmény, és a hagyományos kardiovaszkuláris kockázatbecslére alkalmazott módszerek, például a Framingham kockázatbecslő skála ebben a betegcsoportban nem alkalmas a kockázat felmérésére. Valójában a vaszkuláris szövődmények kialakulása és jellege igen nagy változatosságot mutat az FH betegek esetén, még az azonos genetikai eltérést hordozó betegeknél is. Így egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a klinikai kép és a kardiovaszkuláris szövődmények kialakulásához számos egyéb faktor, ezen belül genetikai és nem genetikai tényezők is hozzájárulnak. Az LDLR, ApoB100 és PCSK9 génjének patogén mutációi mellett a lipidanyagcsere működését befolyásoló egyéb genetikai variánsok hatása is befolyásolhatja a megjelenő diszlipidémia jellegét. Egyes, a lipidanyagcserében kulcsszerepet játszó gének epigenetikai módosulásai szintén jelentős hatást fejthetnek ki. Egyéb gyakori betegségek, mint az elhízás, a hipertónia és a 2-es típusú diabetes mellitus gyakran megjelennek az FH betegek esetén is, melyek szintén hatással vannak a szív- és érrendszeri betegségek kialakulására. Az endokrinológiai kórképek ugyancsak módosíthatják a lipidanyagcsere működését, ezzel a szövődmények kialakulásának esélyét FH betegeknél. Az LDL-C szint mellett természetesen lényegesek az egyéb lipidparaméterek, többek között a triglicerid és a HDL-C szintjében bekövetkező változások. Az utóbbi években kiemelt figyelem övezi a lipoprotein (a) [Lp(a)] részecskét, melynek emelkedett szintje a kardiovaszkuláris megbetegedések ismert független kockázati tényezője. Érdeemes hangsúlyozni, hogy számos korábbi vizsgálat eredménye igazolta az emelkedett Lp(a) szint gyakoribb előfordulását FH betegeknél a nem FH populációhoz viszonyítva. A már jól ismert, klasszikus kardiovaszkuláris kockázati tényezőkön kívül az utóbbi évtizedekben egyre több olyan tényezőt azonosítottak FH és nem FH betegeknél, melyek az érlemezés folyamatának valamely szakaszában szabályozó vagy befolyásoló szereppel rendelkeznek, így meghatározásuk hozzájárulhat az ateroszklerózis folyamatának mélyebb megértéséhez és az egyéni kockázat felméréséhez. Ilyen lehet például az LDL és HDL szubfrakciók meghatározása, egyes gyulladásos citokinek vagy a szérum progranulin szintje.

A hagyományos és nem hagyományos kardiovaszkuláris kockázati tényezők felmérése segíthet a pontosabb kockázatbecslésben, amely elősegíti az egyénre szabott kezelési stratégia kialakítását és populációs szinten azon betegek azonosítását, akik kiemelten nagy kockázatúak, így az új, igen hatékony, ugyanakkor költséges lipidcsökkentő kezelések alkalmazásával a legtöbbet nyernek.

HDL összetételének és funkciójának jelentősége

A HDL-t elsőként 1929-ben Michel Macheboeuf izolálta a párizsi Pasteur intézetben. A HDL egy nagy sűrűségű, kisméretű (8-10 nm), fehérjében igen gazdag lipoprotein részecske, melynek átlagos sűrűsége 1,063-1,21 g/mL. Hasonlóan más lipoprotein részecskékhez a külső hidrofíl burkot főként foszfatidilkolin, koleszterin és apolipoproteinek alkotják, míg a hidrofób mag főként trigliceridet és koleszterin-észtert tartalmaz. Emellett a HDL részecskék igen heterogének, számos egyéb mikro- és makromolekulát tartalmaznak, fehérjetartalmuk és lipidtartalmuk is igen változatos. A lipidtartalmukat főként foszfolipid, koleszterin-észter, szabad koleszterin és triglicerid adja, de számos egyéb foszfolipid, például foszfatidiletanolamin, foszfatidil-szerin és szfingomielin is jelen lehet, melyeknek funkcionális szerepe is lehet.

A HDL fehérjetartalma kifejezetten magas a többi lipoprotein részecskéhez viszonyítva, ráadásul nagyon változatos is. Eddig több mint 200 HDL-asszociált fehérjét azonosítottak. Az apolipoproteinek a HDL ún. struktúrfehérjei, amelyek a HDL szerkezetének stabilitása és a lipid transzport szempontjából is kulcsfontosságúnak tekinthetők. Legnagyobb arányban az apolipoprotein A1 (ApoA1) és az apolipoprotein A2 mutatható ki, de számos egyéb apolipoprotein is részt vesz a különböző HDL részecskék szerkezetének és működésének kialakításában.

A HDL részecske érlelmeszesedést gátló hatásáért számos, egymással részben összefüggő tulajdonsága felelős. Ide tartozik a reverz koleszterin transzport, melynek során a HDL koleszterint juttat vissza a perifériás sejtekből, például az érfali makrofágokból a májba, ahol az az epével részben kiürül, részben koleszterintartalma ismét felhasználásra kerül. A HDL antioxidáns hatásáért elsősorban maga az ApoA1, másrészt egyéb antioxidáns enzimek, köztük a humán paraoxonáz-1 (PON1) és a PAFAH felelősek, melyek gátolják a lipid peroxidációt a szabad gyökök mennyiségének csökkentésén keresztül. Érdekes emellett megemlíteni a HDL anti-trombotikus, anti-inflammatorikus, anti-apoptotikus, és endotel funkciót javító hatását is.

Az apolipoprotein M szerepe

Az apolipoprotein M (ApoM) egy 26 kDa molekulatömegű, 188 aminosavból álló fehérje, mely a lipokalin szupercsaládhoz tartozik. 1999-ben került először leírásra. Felnőttkorban a plazma koncentrációja 0,63-1,13 mmol/l közé tehető. Génje a 6. kromoszóma rövid karján helyezkedik el a 21.3 lókuszon, 6 exont tartalmaz és 2,3 kb méretű, meglehetősen konzervatív szerkezetű. Felnőttkorban főként a májban és a vesében expresszálódik, de a humán

embriogenezis során a májon és a vesén kívül a vékonybélben, a gyomorban és a vázizmokban is kifejeződik. A májsejtek által termelt ApoM elsősorban a plazmába szekretálódik, ahol lipoproteinekhez, ezen belül főként a HDL részecskékhez kötődik, de a többi lipoprotein is megtalálható, így az LDL és a kilomikron részecskéken is jelen van. Ezzel szemben a renális eredetű ApoM elsősorban a proximális tubulusok epithel sejteiben a multiligand receptor megalinhoz kötődik, mely a vizelettel szekretált ApoM reabszorpciójához szükséges. A folyamat biológiai jelentősége jelenleg nem tisztázott, feltételezik, hogy az ApoM lipokalin struktúrája képes kis lipofil ligandok megkötésére a szűrletben, megakadályozva azok vizelettel történő kiürülését.

A szfingozin-1-foszfát szerepe

A szfingozin-1-foszfát (S1P) egy bioaktív szfingozin lebontási termék. Számos, a sejt működése szempontjából alapvető szerepet tölt be, például szabályozza a sejtproliferációt, a sejtek túlélését és migrációját, ezáltal hatást gyakorol a gyulladásos folyamatokra és a vaszkuláris rendszer működésére. A S1P a sejmembrán szfingomielinjéből, majd ceramidből képződő szfingozinból jön létre a szfingozin-kináz enzim által katalizált folyamat során. A S1P lebontását a szfingozin-1-foszfát liáz enzim végzi, a folyamat során E-2-hexadecenal és foszfoetanolamin keletkezik.

Az S1P plazma koncentrációja körülbelül 200-1000 nmol/l. Amfipatikus tulajdonsága miatt az S1P szállításához hordozó fehérjék szükségesek a keringésben. Legnagyobb arányban, mintegy 65-80%-ban a HDL partikulumok ApoM fehérjéihez kötődik, míg kisebb hányada albuminhoz és egyéb lipoprotein részecskék fehérjéihez kötötten kering. A HDL részecskék közül kizárólag az ApoM tartalmúak képesek az S1P-t megkötni. Azonban az ApoM S1P kötőhelyéért az S1P más molekulákkal, például oxidált foszfolipidekkel és retinollal versenyez. Érdeemes megemlíteni, hogy a hemopoietikus sejtek, például a vörösvértestek és a vérlemezkék is jelentős mennyiségű S1P-t tárolnak. Ugyanakkor ezen sejtek nem rendelkeznek szfingozin-1-foszfát liáz enzimmel, így valószínűleg direkt módon veszik át a keringésben a HDL vagy egyéb lipoproteinek S1P tartalmát annak membránjával érintkezve. Emellett az S1P egyéb lipoprotein részecskékről is átkerülhet az HDL részecskére a foszfolipid transzfer fehérje segítségével.

A S1P biológiai hatékonysága különbözik attól függően, hogy HDL-hez vagy egyéb fehérjékhez, például albuminhoz kötötten van jelen, ugyanis a HDL-hez kötött S1P hatékonyabb az albuminhoz kötött formához képest.

Másrészt a HDL anti-aterogén funkciójának hatékonysága jelentős mértékben függ az S1P tartalmától. A legfontosabb anti-aterogén funkciók az endotel sejtek nitrogén-monoxid (NO) termelésének elősegítése az endoteliális nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) aktivitás fokozásával, ezáltal az NO függő vazodilatáció elősegítése, a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF α) indukált adhézis molekulák termelésének gátlása, az endotel sejt barrier erősítése, az endotel sejtek proliferációjának és túlélésének, valamint az angiogenezis folyamatának elősegítése. Továbbá a szívmuscle sejtek hipoxiás és reperfüziós károsodásának kivédése, az érfa simaizomsejtek adhézis molekuláinak gátlott expressziója és fokozott prosztaciklin termelése. Az S1P kulcsszerepét támasztják alá azon megfigyelések, melyek alapján az S1P delipidálással történő eltávolítása, az S1P elleni neutralizáló antitestek adása, vagy a mesterséges S1P mentes HDL létrehozása a HDL működését jelentős mértékben károsítja.

A stromaeredetű faktor-1 jelentősége

A stromaeredetű faktor-1 (stromal derived factor-1; SDF-1), vagy másnéven C-X-C motif ligand 12 (CXCL12) egy konzervatív kemokin, melyet számos sejt típus, köztük a csontvelő sejtjei, ez endotel és epitel sejtek, valamint különböző daganatos sejtek is képesek termelni. Legfontosabb receptora a C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 (CXCR4), amely a G-proteinhez kötött receptor család tagja, szerkezetileg hét transzmembrán domén alkotja. A CXCR4 számos sejt felszínén kimutatható, expresszálják simaizomsejtek, endotel sejtek és hemopoietikus sejtek, emellett asztrociták, mikroglia és neuron sejtek is.

Az SDF-1 szerepét fiziológias és patológias körülmények között igen intenzíven vizsgálták az elmúlt néhány évben. Az eddigi kutatások eredményei alapján az SDF-1 direkt módon vesz részt az angiogenezis folyamatában az endotel progenitor sejtek megkötésével az endotel sejtek felszíni CXCR4 receptorain keresztül. Emellett az SDF-1 indirekt módon is képes elősegíteni az angiogenezis folyamatát, mégpedig az endotel sejtek proangiogenetikus citokin termelésén keresztül, melyek közül a CXCL1, a CXCL8 és a VEGF szerepe emelendő ki.

Emellett az SDF-1-et kimutatták az érlemezsedéses plakkokban és szerepe az ateroszklerózis folyamatában több ponton is felmerült. Az intercelluláris adhézis molekula-1 (ICAM-1) expressziójának fokozásán keresztül elősegíti az endotel progenitor sejtek érfa felhoz történő kikötődését, emellett a monociták transzendoteliális migrációját.

Az LDL és HDL szubfrakciók meghatározása

A méretben, töltésben, összetételben és sűrűségben igen eltérő LDL és HDL részecskéket alcsoportokra, ún. szubfrakciókra oszthatjuk, melyek meghatározása nem része a rutin

laboratóriumi meghatározásoknak és a mindennapi klinikai gyakorlatnak, ugyanakkor ismeretük tudományos szempontból elősegítheti az LDL és HDL funkció jobb megértését.

Számos laboratóriumi módszer létezik a lipoprotein szubfrakciók meghatározására, amelynek klasszikus, ún. gold standard módszere az analitikai ultracentrifugálás. Az ultracentrifugálás során az LDL a 1,019-1,063 g/ml-es, míg a HDL az 1,063-1,021 g/ml denzitású lipoprotein frakciót jelenti. Alkalmazzák emellett a sűrűséggradiens ultracentrifugálást, a gradiens gélelektroforézist, a 2D gélelektroforézist és a mágneses magrezonancia spektroszkópiát, valamint a nagy felbontású ion-mobilitás technikát. A szubfrakciók meghatározásában igen nagy előrelépés volt a kereskedelmi forgalomban megvásárolható, standardizált, könnyen értékelhető Lipoprint módszer (Quantimetrix. Corp. Redondo Beach, CA, USA), mely egy csöves nem gradiens gélelektroforézis. Ezzel a módszerrel méretük alapján az LDL szubfrakciós kittel maximálisan hét LDL szubfrakció, míg a HDL szubfrakciós kittel tíz HDL szubfrakció különíthető el, amelyeket az LDL esetén két alcsoportba: nagy (LDL1-2) és kis (LDL3-7) LDL szubfrakcióra, a HDL esetén három alcsoportba: nagy (HDL1-3), közepes (HDL4-7) és kis (HDL8-10) HDL szubfrakcióra oszthatunk.

Hasonló módon történik a HDL szubfrakciók szétválasztása is. Itt azonban a VLDL, IDL és LDL részecskék nem válnak el, hanem a felvitel helyén maradnak, míg a cső alján az albumin leggyorsabban mozgó sávja válik láthatóvá. E két sáv között választódik el a 10 különböző HDL szubfrakció.

Érdeemes megjegyezni, hogy a szubfrakciók meghatározása során alkalmazott különböző módszerek eltérő tulajdonságú szubfrakciók elkülönítését teszik lehetővé, amely megnehezíti az egyes tanulmányok eredményeinek összehasonlítását és a lipid szubfrakciók jelenőségének megértését.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki kezeletlen HeFH betegekben és kontroll csoportban:

- a szérum S1P és ApoM szint meghatározását,
- az S1P, illetve az S1P/ApoM arány lipid paraméterekkel való összefüggésének,
- ezen belül a HDL és LDL szubfrakciók arányával való korrelációjának,
- valamint az S1P/ApoM arány gyulladásos, oxidatív és endotel funkciós paraméterekkel való összefüggésének vizsgálatát.

Emellett célul tűztük ki ugyanezen beteg és kontroll csoportban:

- a szérum SDF-1 szint meghatározását,
- a szérum SDF-1 szint összefüggésének vizsgálatát a lipid paraméterekkel,
- ezen belül a HDL és LDL szubfrakciók arányával,
- továbbá gyulladásos, oxidatív és endotel funkciós paraméterekkel való összefüggésének vizsgálatát.

Betegek és módszerek

Vizsgálati populáció

Nyolcvanegy heterozigóta FH-s (ötvenöt nő és huszonhat férfi) beteget, valamint harminckét egészséges kontroll személyt vontunk be vizsgálatunkba. A betegek bevonása a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Klinika A épület Lipid Szakrendelésén megjelent betegek közül történt. Minden FH-s beteg heterozigóta volt (HeFH) egy bizonyított LDL-receptor génmutációval, vagy teljesítette a DLCN FH diagnosztikus kritériumait. Az FH-s betegeket Lipid Szakrendelésünkre háziorvos, kardiológus és neurológus irányította az FH diagnózisának felállítása és a megfelelő kezelése bevezetése céljából. A bevonáskor a betegek azonban még nem részesültek lipidcsökkentő gyógyszeres kezelésben. A kórelőzmény adatai rögzítésre kerültek, dokumentáltuk az akut miokardiális infarktus, a stroke, a carotis stenosis és a perifériás artériás betegség előfordulását. A kontroll egyének bevonása Klinikánk általános belgyógyászati ambulanciájáról történt. Az általános ambulanciánkra rutinszerűen beutalt betegek mintáit használtuk kontrollként. Olyan kontroll személyeket választottunk ki, akik nem részesültek gyógyszeres kezelésben, korábban krónikus betegségben nem szenvedtek és nem volt akut betegség miatti kezelésük az elmúlt három hónapban. Ezenkívül a kontroll személyek esetén a fizikális vizsgálat, az elektrokardiogram, a laboratóriumi vizsgálatok, beleértve a lipidparamétereket, nem mutattak eltérést a referenciatartományhoz képest. Kizárási kritérium volt továbbá az 1-es és 2-es típusú cukorbetegség, az alkoholizmus, a májbetegség, az autoimmun és endokrin betegség fennállása. Rosszindulatú daganatos betegségben szenvedő egyének, valamint várandós nők szintén kizárásra kerültek. A résztvevőket részletesen tájékoztattuk a kutatásról, akik részvételi szándékukat írásbeli beleegyezésükkel erősítették meg. A vizsgálati protokollt a helyi és regionális etikai bizottságok hagyták jóvá (DE RKEB/IKEB 4775-2017, időpont: 2020. április 3. és az ETT TUKEB 34952-1/2017/EKU, a beérkezés időpontja: 2017. június 30.), valamint a tanulmányt a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük el.

Vérvétel és laboratóriumi paraméterek mérése

A vizsgálatba bevonásra került betegektől és kontroll személyektől 12 órás éhezést követően vénás vérvétel történt. A szérum mintákat 10 perces 3500 g-n történő centrifugálással választottuk el 4 °C-on. A mintákból a lipidanyagcserére jellemző paraméterek meghatározása a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében standard laboratóriumi

módszerekkel történt Cobas c600 típusú analizátorral (Roche, Ltd, Mannheim, Németország). A szérum összkoleszterin és a triglicerid koncentráció meghatározása enzimatis, kolorimetriás módszerrel, a HDL-C és az LDL-C esetében homogén enzimatis módszerrel (Roche HDL-C plus 3rd generation és Roche LDL-C plus 2nd generation) történt. Az apolipoprotein A1 (ApoA1), az apolipoprotein B (ApoB) és a lipoprotein (a) [Lp(a)] meghatározás immunturbidimetriás módszerrel történt (Tina-quant Apolipoprotein A-1 ver.2, Tina-quant Apolipoprotein B ver.2 és Tina-quant Lipoprotein(a) ver2). A vizsgálatok elvégzése a gyártó által megadott útmutató szerint történt. További laboratóriumi mérésekhez a szérum mintákat -70 °C-on tároltuk, és két hónapon belül felhasználásra kerültek.

A szfingozin-1-foszfát (S1P) szint mérése

Az S1P szint meghatározása enzimhez kapcsolt immunszorbens assay (ELISA) kittel történt (Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA), a gyártó által megadott útmutató szerint. Az értékek µg/ml-ben kerültek megadásra.

Az apolipoprotein M (ApoM) szint mérése

A szérum apoM szintek meghatározása ELISA kit (BioVendor – Laboratori medicina a.s., Brno, Csehország) felhasználásával történt a gyártó által megadott útmutató szerint és az értékek µg/ml-ben kerültek megadásra.

A stromaeredetű faktor-1 (SDF-1) szint mérése

A szérum SDF-1 szint meghatározása enzimhez kapcsolt immunszorbens assay kittel történt (ELISA, Cat. No. DY350-05, R&D Systems Europe Ltd, Abington, Egyesült Királyság) a gyártó által megadott útmutató szerint. Az értékek pg/ml-ben kerültek megadásra.

Az oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein (oxLDL) szérum szintjének mérése

Az oxLDL szérum koncentráció meghatározása egy kereskedelmi szendvics ELISA kit (Cat. No. 10-1143-01, Mercodia AB, Uppsala, Svédország) felhasználásával történt, amelyben két monoklonális antitest irányul az oxidált apolipoprotein B molekula különálló antigén determinánsai ellen. Az oxLDL mérések szenzitivitása <1 mU/l volt, illetőleg a mérésre szolgáló intra- és inter-assay variabilitás 5,5-7,3% és 4-6,2% volt.

A szolubilis intercelluláris adhézións molekula-1 (sICAM-1), a szolubilis vaszkuláris adhézións molekula-1 (sVCAM-1), mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) és szolubilis CD40 ligand (sCD40L) szérúm szint mérése

A szérúm sICAM-1, sVCAM-1, MMP-9 és sCD40L meghatározása kereskedelmi szendvics ELISA kitek felhasználásával történt (R&D Systems Europe Ltd., Abington, Anglia). Az ELISA vizsgálatokat a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. Az intra-assay variáció 3,7-5,2 % (sICAM-1), 2,3-3,6% (sVCAM-1), 3,5-5,5 % (MMP-9) és 4,5-5,4% (sCD40L) voltak, illetőleg az inter-assay variáció 4,4-6,7% (sICAM-1), 5,5-7,8% (sVCAM-1), 4,9-8,0 % (MMP-9) és 6,0-6,4% (sCD40L) voltak. A koncentráció értékeket ng/ml-ben adtuk meg.

A szérúm mieloperoxidáz koncentráció (MPO) mérése

A szérúm MPO koncentráció meghatározása egy kereskedelmi forgalomban kapható szendvics ELISA kit (R&D Systems Europe Ltd., Abington, Anglia) felhasználásával történt a gyártó utasításai szerint. A variációk intra- és inter-assay együtthatója 6,5-9,4 % volt.

A PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitások meghatározása

A szérúm PON1 arileszteráz aktivitást fenilacetát szubsztráttal (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) mértük, illetőleg a fenilacetát hidrolízisét szobahőmérsékleten 270 nm-en követtük. A szérúm PON1 paraoxonáz és sóstimulálta aktivitás meghatározása mikrotiter tárgylemezen, kinetikus félautomatizált módszerrel történt, szubsztrátként paraoxont (O,O-diethyl-O-p-nitrofeiyl-foszfát, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) használtunk, a paraoxon hidrolízisét szobahőmérsékleten 405 nm-en követtük.

A szérúm LDL és HDL szubfrakciók meghatározása poliakrilamid gélelektroforézissel

A szérúm LDL és HDL lipoprotein szubfrakciók elválasztása elektroforetikus módszerrel történt poliakrilamid gélen Lipoprint módszerrel (Lipoprint System, Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA). 25 µl szérúmot adtunk a poliakrilamid gélcsovekhez, valamint 200 és 300 µl gél oldatot töltöttünk bele egyenként, amely lipofil festékként szudánfeketét tartalmaz. A csöveket szobahőmérsékleten 30 percig fotopolimerizáltuk, majd 3 mA/csó áramerősség mellett elektroforetizáltuk. Az elektroforézis kádban a gyártó által biztosított humán kontroll szérúmot is futtatunk (Lipasure Serum Lipoprotein Control, Quantimetrix Corp, Redondo Beach, CA, USA). Ezt követően az elektroforézis során keletkező sávokat ArtixScan M1 digitális szkennel (Microtek

International Inc., Hsinchu, Taiwan) felhasználásával szkenneltük, majd Lipoware szoftverrel elemeztük (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA).

Az LDL-szubfrakciós analízis során hét LDL szubfrakciót detektáltunk a VLDL és HDL sávja között (Cat. No. 48-7002). A nagy LDL (nagy LDL %) arányát az LDL1 és az LDL2 százalékanak összegeként határoztuk meg, illetőleg a kis LDL (kis LDL %) arányát az LDL3-LDL7 összegeként határoztuk meg. Az LDL szubfrakciók koleszterin koncentrációját úgy határoztuk meg, hogy a szubfrakciók görbe alatti területét megszoroztuk a minta teljes koleszterin koncentrációjával. A számított teljes LDL-C, a Midbands C-A és az LDL-szubfrakciókra (LDL1-LDL7) vonatkozó koleszterin összegéből áll, és nagyban korrelál a közvetlenül mért LDL-C értékével. A HDL szubfrakciós analízis során tíz HDL szubfrakciót detektáltunk (Cat. No. 48-9002). Nagy (HDL1–3), közepes (HDL4–7) és kis (HDL8–10) HDL szubfrakciókat különítettünk el a VLDL/IDL/LDL és albumin sávok között. A HDL szubfrakciók koleszterin tartalmát a Laboratóriumi Medicina Intézet által meghatározott HDL-C alapján, a Lipoware szoftver használatával kalkuláltuk a szubfrakciók görbe alatti terület alkalmazásával.

Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzéseket a Statistica 13.5.0.17 szoftver (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA), és a GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) alkalmazásával végeztük. A statisztikai erő kalkulálása az SPH Analytics online kalkulátor (SPH Analytics LTD., Alpharetta, GA, USA) alkalmazásával történt. A statisztikai erő mindkét vizsgálati elrendezésben 0,8 (0,98) felett volt. Két kategorikus változó közötti különbséget Chi-négyzet próbával számítottuk ki. Az eloszlás normalitását a Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A csoportok közötti összehasonlítást a normál eloszlású változók esetén Student-féle párosítatlan t-próbával, nem normál eloszlású változók esetén Mann-Whitney U-próbával végeztük. Az adatokat az átlag $\pm$ SD vagy medián (felső-alsó kvartilis) formájában jelenítettük meg. Pearson korrelációt használtuk a kiválasztott változók közötti kapcsolat vizsgálatára. Többszörös regressziós analízist végeztünk annak meghatározására, hogy mely változók a szérumszén-dioxid (S₁P), illetve az SDF-1 szint független prediktorai. A $p \leq 0,05$ értéket tekintettük statisztikai szempontból szignifikánsnak.

Eredmények

A lipid szintek, gyulladásos és oxidatív markerek HeFH betegek és kontrollok esetén

A HeFH csoportban szignifikánsan magasabb szérumszintű összcholesterol, LDL-C, triglicerid, apoB100 és Lp(a) szintet találtunk a kontroll csoporthoz viszonyítva, míg a HDL-C és az ApoA1 szint esetén nem volt szignifikáns különbség. Bár szignifikánsan magasabb volt a PON1 arilészteráz aktivitás a HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva, a PON1 paraoxonáz és sóstimulált paraoxonáz aktivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget. A szérumszintű oxLDL, mieloperoxidáz, sICAM-1 és TNF α szérumszintje szignifikánsan magasabb volt a HeFH betegekben a kontrollokhoz képest, míg a sVCAM-1, sCD40L és hsCRP szérumszintje nem különbözött szignifikánsan a két csoportban.

Szérumszintű S1P és ApoM szintek HeFH betegekben és a kontroll csoport esetén

A szérumszintű ApoM és S1P szintek szignifikánsan magasabbak voltak HeFH betegek esetén a kontroll csoporthoz viszonyítva. Nem találtunk szignifikáns különbséget az ApoM és S1P szintek tekintetében HeFH betegekben vaszkuláris szövődmények nélkül (nonVSZ), illetve vaszkuláris szövődmények (VSZ) esetén, így az akut miokardiális infarktus, stroke, artéria carotis szűkület, perifériás artériás betegség esetén (ApoM: VSZ $3,79 \pm 0,62$ vs. nonVSZ $3,73 \pm 0,53$ $\mu\text{g/ml}$, $p=0,7$; S1P: VSZ $7,63 \pm 1,08$ vs. nonVSZ $7,75 \pm 2,06$ ng/ml , $p=0,8$). Nem találtunk szignifikáns különbséget az S1P/ApoM arány tekintetében HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva (2120 ± 700 vs. 2290 ± 740 , $p=0,2$).

Az LDL és HDL szubfrakciók szintje és aránya a HeFH betegek és a kontrollok esetén

A VLDL és IDL szubfrakciók aránya és szintje, valamint az IDL szubfrakció szintje szignifikánsan magasabb volt HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva. Mind a nagy és kis LDL szubfrakció aránya szignifikánsan magasabb volt a HeFH betegekben, míg az átlagos LDL méret szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben a kontrollokhoz viszonyítva. A HDL szubfrakciók tekintetében a nagy és közepes HDL szubfrakció aránya és szintje alacsonyabb, míg a kis HDL szubfrakció aránya és szintje magasabb volt HeFH betegekben a kontrollokhoz képest.

S1P szintek és HDL szubfrakciók összefüggése HeFH betegek és a kontrollok esetén

Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a nagy HDL szubfrakció és S1P szint között a teljes vizsgálati populációban és a HeFH betegekben. A közepes HDL szubfrakció nem korrelált az

S1P szinttel. A kis HDL szubfrakció pozitívan korrelált az S1P szinttel a teljes vizsgálati populációt tekintve és a HeFH betegek körében.

Az S1P szintek és a sVCAM-1, a PON1, sCD40L és a MMP-9 szintek közötti összefüggés HeFH betegek és a kontrollok esetén

Szignifikáns negatív korrelációt figyeltünk meg a sVCAM-1 és S1P szint között HeFH betegekben. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a PON1 arileszteráz aktivitás, sCD40L és S1P szint között. Az S1P/ApoM arány szignifikáns negatív korrelációt mutatott az sVCAM-1 szinttel ($r=-0,197$; $p=0,037$), míg pozitív korrelációt találtunk az S1P/ApoM aránya és a sCD40L szintje esetén ($r=0,28$; $p=0,00027$).

Az S1P független prediktorai

Többszörös regressziós analízist végeztünk, amelynek eredménye szerint az S1P szint független prediktora a PON1 arileszteráz aktivitás ($\beta =0,281$; $p<0,01$) és a nagy HDL aránya ($\beta =0,35$; $p<0,001$). Az elemzésbe a következő változókat vettük bele: triglicerid logaritmus, nagy HDL (%), kis HDL (%), sVCAM-1, ApoM, PON1 arileszteráz aktivitás, MMP-9, sCD40L logaritmus.

Az SDF-1 szintek HeFH betegekben és kontrollok esetén

Szignifikánsan alacsonyabb SDF-1 szintet találtunk HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva ($71,3 \pm 39,7$ vs. $150,6 \pm 55,4$ pg/ml, $p<0,001$). Továbbá a nők esetén tendenciózusan magasabb SDF-1 szint volt megfigyelhető a férfiakhoz képest. Nem találtunk szignifikáns különbséget az SDF-1 szint tekintetében nők és férfiak között sem a HeFH betegek esetében ($78,2 \pm 39,9$ vs. $59,1 \pm 36,9$ pg/ml, $p=0,07$), sem a kontrollokban ($166,5 \pm 55,3$ vs. $129,8 \pm 66,6$ pg/ml, $p=0,14$).

Az SDF-1 szintek és a lipid paraméterek, lipoprotein szubfrakciók, gyulladásos és oxidatív markerek összefüggése HeFH betegekben és a kontrollok esetén

Szignifikáns negatív korrelációt találtunk az SDF-1 szint és az összkoleszterin, a triglicerid, az LDL-C és az ApoB100 szintek között a teljes vizsgálati populációban. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a HDL-C, az ApoA1 és az SDF-1 szint között. Szignifikáns negatív korrelációt észleltünk a VLDL, IDL és nagy LDL szubfrakciók tekintetében, míg az átlagos LDL méret pozitív korrelációt mutatott az SDF-1 szinttel a teljes vizsgálati populációban.

Az SDF-1 szint pozitív korrelációt mutatott a nagy és közepes HDL szubfrakciókkal, míg a kis HDL szubfrakcióval negatívan korrelált. Az SDF-1 szint negatív korrelációt mutatott az oxLDL szinttel ($r=-0,51$; $p=0,01$) és az MPO aktivitás logaritmikusan kifejezett értékével (lgMPO) ($r=-0,33$; $p<0,001$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést más oxidatív és gyulladásos markerek, mint a hsCRP, TNF α , sICAM-1, sVCAM-1, sCD40L vagy a PON1 arileszteráz aktivitás tekintetében.

Az SDF-1 szint független prediktorai

Többszörös regressziós analízist végeztünk annak meghatározására, hogy mely változók a szérumban SDF-1 szint független prediktorai. Az első modellben az összkoleszterin, triglicerid, LDL-C, ApoB100, VLDL, IDL, nagy LDL, átlagos LDL méret, nagy HDL, közepes HDL, kis HDL, oxLDL és MPO szintet vizsgáltuk.

A második modellben a változókat biológiai relevanciájuk alapján szelektáltuk, az összkoleszterin, triglicerid, ApoB100, VLDL, átlagos LDL méret, nagy HDL, kis HDL, oxLDL és MPO szintet vizsgáltuk. Mindkét statisztikai modellben a VLDL és az oxLDL volt az SDF-1 szint független prediktora.

Az összefüggéseket HeFH betegekben és a kontrollokban külön is meghatároztuk, és hasonló tendenciát találtunk mind a HeFH betegek, mind a kontrollok esetén. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az átlagos LDL méret, nagy HDL és az SDF-1 között HeFH betegek esetén, míg az SDF-1 és triglicerid, valamint VLDL esetén szignifikáns negatív korrelációt találtunk a kontrollokban.

Az új eredmények összefoglalása

A kezeletlen HeFH betegekben, illetve nemből és BMI-ben illesztett kontroll csoportban:

- A szérumban ApoM és S1P szintek szignifikánsan magasabbak voltak HeFH betegek esetén a kontroll csoporthoz viszonyítva.
- Szignifikáns negatív összefüggést találtunk a nagy HDL szubfrakció és az S1P szint között a teljes vizsgálati populációban és HeFH betegekben.
- Szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a kis HDL szubfrakció és az S1P szint között a teljes vizsgálati populációban és a HeFH betegekben.
- Szignifikáns negatív összefüggést figyeltünk meg a sVCAM-1 és S1P szintek között HeFH betegekben. Szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a PON1 arileszteráz aktivitás, sCD40L és az S1P szintek között.

- Az S1P/ApoM arány szignifikáns negatív összefüggést mutatott az sVCAM-1 szintjével, míg pozitív összefüggést találtunk az S1P/ApoM aránya és a sCD40L esetén.
- Többszörös regressziós analízist végeztünk, amelynek eredménye szerint az S1P szint független prediktora a PON1 arilesteráz aktivitás és a nagy HDL aránya.

Továbbá:

- Szignifikánsan alacsonyabb SDF-1 szintet találtunk HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva.
- Szignifikáns negatív korrelációt találtunk az SDF-1 szint és az összkoleszterin, a triglicerid, az LDL-C és az ApoB100 szintek között a teljes vizsgálati populációban.
- Szignifikáns negatív összefüggést észleltünk az IDL és nagy LDL szubfrakciók tekintetében, míg az átlagos LDL méret pozitív összefüggést mutatott az SDF-1 szinttel a teljes vizsgálati populációban.
- Az SDF-1 szint pozitív korrelációt mutatott a nagy és közepes HDL szubfrakciókkal, míg negatív korrelációt találtunk az SDF-1 szint és a kis HDL szubfrakció között.
- Az SDF-1 szint negatív korrelációt mutatott az oxLDL és az MPO szinttel. Nem találtunk szignifikáns összefüggést az SDF-1 szint, illetve más oxidatív és gyulladásos markerek, mint a hsCRP, TNF α , sICAM-1, sVCAM-1, sCD40L vagy a PON1 arilesteráz aktivitás között.
- Többszörös regressziós analízist végeztünk, mely alapján a szérumban SDF-1 szint független prediktorai a VLDL és az oxLDL szint.

Megbeszélés

Epidemiológiai adatok bizonyítják, hogy az alacsony HDL-C szint a kardiovaszkuláris betegségek kockázati tényezője, azonban egyetlen klinikai vizsgálat sem tudta bizonyítani a HDL-C szint emelésének kedvező hatását a kardiovaszkuláris kockázat csökkentésében. A kedvező kardiovaszkuláris hatásért a HDL funkció és nem a HDL-C koncentráció a felelős, így a HDL funkció javítása releváns terápiás célpont lehet, figyelembe véve a HDL számos ateroprotektív funkcióját. A terápiás célpontok kiválasztásában a szabályozó útvonalak pontosabb megismerése és a szabályozásban résztvevő biomarkerek azonosítása lehet az első lépés. A HDL-hez kötött S1P fontos oki szerepet tölt be számos HDL funkcióban, mint például az endoteliális homeosztázis fenntartásában, az artériás vazodilatációban és a kardioprotektivitásban. A legtöbb eddigi vizsgálatban egészséges egyénekben tanulmányozták a HDL funkciót, így azonban hiányoztak a HDL diszfunkciót eredményező HDL-S1P tengely betegség asszociált változásai, tehát a HDL diszfunkció számos aspektusa tisztázatlan. Az általunk elvégzett klinikai vizsgálat volt az első, amely HeFH betegcsoportban tanulmányozta az S1P szintjét, a HDL szubfrakciók megoszlását, a HDL funkciót és a gyulladásos markerek változását. Korábbi kis létszámú HeFH betegcsoporton végzett vizsgálatoktól eltérően magasabb S1P és ApoM szintet találtunk HeFH betegekben. Egy korábbi vizsgálattal ellentétben, az S1P és ApoM koncentrációk hasonlóak voltak HeFH betegekben vaszkuláris szövődmények esetén és vaszkuláris szövődményektől mentes esetekben is. Korábban nem vizsgálták az S1P és ApoM szérumszintjét nagyobb, nem rokon FH beteg populációban.

Korábbi prospektív vizsgálatok eredményei igazolták, hogy számos gyulladáskeltő biomarker használható a későbbi kardiovaszkuláris esemény bekövetkeztének előrejelzésére. Ezen biomarkerek az érlelmeszesedés folyamatának több fázisában vesznek részt a habos sejt képződéstől egészen a plakk ruptúra kialakulásáig. Míg az inflammatorikus citokinek és adhézis molekulák, mint a sVCAM-1, sICAM-1 szintjének emelkedése az aterogenezis korai fázisában figyelhető meg; addig az oxLDL, MMP-k, sCD40L szintek növekedése a plakk destabilizálódása és a közeli plakk ruptúra esetén detektálható. Az általunk vizsgált HeFH betegekben a szérumszint S1P negatív korrelációt mutatott az sVCAM-1 szinttel, míg az sCD40L koncentráció között pozitív korreláció, az MMP-9 esetében pedig pozitív tendencia volt megfigyelhető. Korábbi vizsgálatok bizonyítják, hogy az S1P transzportjára a HDL-asszociált ApoM felelős, amely az S1P1 és annak 3 receptorán keresztül antiaterogén és vaszkuloprotektív hatásokat fejt ki, míg az S1PR2-n keresztül a makrofágok ateroszklerotikus plakkban történő retencióját és az ateroszklerózis propagációját segíti elő. Következésképpen a HeFH betegekben mért magasabb ApoM és S1P koncentrációk nem feltétlenül kedvező

hatásúak. Keul és mtsai bizonyították, hogy a HDL-hez kötött S1P potens anti-inflammatorikus hatást fejt ki simaizom sejteken a TNF α által stimulált gyulladásos gének, köztük az MMP-9 gátlásával. Vizsgálatunkban pozitív összefüggést találtunk a szérumban S1P és MMP-9 között, ami arra enged következtetni, hogy a késői ateroszklerotikus plakkban válaszüakcióként fejeződik ki az S1P.

HeFH betegekben a HDL-asszociált enzimek funkciója gyakran megváltozik és károsodott fenotípus alakul ki. A HDL antioxidáns hatásaiban kulcsszerepe van a HDL felszínéhez kötött PON1 enzimnek. A PON1 hidrolizálja az oxidált lipideket és védi az LDL-t, valamint a biológiai membránokat a peroxidációtól, ezáltal csökkenti az endogén oxidatív stresszt, amely véd az érlemezésedés ellen. Korábban FH betegekben alacsonyabb PON1 arileszteráz aktivitást találtak. Ezzel szemben az MPO egy prooxidáns enzim, amelyet főképpen neutrofilek és monociták termelnek és expressziója reaktív intermedierek képződéséhez vezet. Jelen vizsgálatunkban, a vártól eltérő módon magasabb PON1 arileszteráz aktivitást találtunk HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva. Fontos megjegyezni, hogy kezeletlen HeFH betegek kerültek bevonásra, hogy kiszűrjük a statinok PON1 aktivitásra gyakorolt ismert kedvező hatását. Vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns különbséget a PON1 paraoxonáz és sóstimulált paraoxonáz aktivitás tekintetében HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva, míg korábbi megfigyelésekhez hasonlóan magasabb oxLDL és MPO szintet találtunk, amely magasabb oxidatív stressz jelenlétére utalhat. Többszörös regressziós analízis alapján megállapítható, hogy a PON1 arileszteráz aktivitás az S1P független prediktív faktora, amely szoros kapcsolatot jelez az S1P és a HDL-asszociált antioxidáns aktivitása között.

A saját adataink összhangban vannak az irodalmi adatokkal, miszerint a nagy és közepes HDL szubfrakciók aránya és koncentrációja alacsonyabb, ezzel szemben a kis HDL szubfrakció aránya és koncentrációja magasabb HeFH betegekben a kontroll csoporthoz képest. Nemrégiben megjelent irodalmi adat, hogy idős, koronária betegségben nem szenvedő HeFH betegekben magasabb a nagy HDL részecskék koncentrációja, amely arra enged következtetni, hogy ezek a részecskék eltérő funkcióval bírnak, mint a kis HDL részecskék. Következésképpen elmondható, hogy a HDL szubfrakciók arányának vizsgálata pontosabb kockázatbecslést tesz lehetővé HeFH betegekben, mint a rutinszerűen alkalmazott HDL-C koncentráció meghatározása. Eredményeink igazolásához azonban további vizsgálatok szükségesek.

Végezetül, meg kell említenünk vizsgálatunk limitációit. Nem mértük az S1P és HDL részecskék közvetlen kapcsolatát. A HDL-S1P komplex meghatározása

folyadékkromatográfiai tömegspektrometriás módszerrel lehetséges, amely rendkívül időigényes és költséges módszer, nem elérhető a mindennapi klinikai gyakorlatban, így nem alkalmazható biomarkerként. Emelne továbbá a vizsgálatunk értékét a képalkotó modalitások alkalmazása az érlelmeszesedés súlyosságának becslésére az aorta, az artéria carotisok és perifériás artériák érintettsége esetén. Mindezek ellenére, eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy HeFH betegpopulációban nagyobb, hosszú távú követéses vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy feltárjuk az S1P által történő szabályozó útvonalak szerepét a HDL funkciójában.

HeFH betegekben a jelentősen emelkedett LDL-C és az LDL részecskék akkumulációja az érfalban korai generalizált érlelmeszesedéshez és jelentősen emelkedett kardiovaszkuláris kockázathoz vezet. Korábban számos prediktív score rendszer alkalmazását javasolták FH-s betegekben, mint az FH-Risk-Score-t és a SAFEHEART regisztert, melyek olyan klasszikus kockázati tényezőket vettek figyelembe, mint az összkoleszterin és LDL-C szint. Ezen rizikóbecslő skálák alkalmazása beépült a mindennapi klinikai gyakorlatba HeFH betegek gondozása során, azonban más kockázati tényezők figyelembevétele jelentősen javíthatja a rizikóbecslés pontosságát és a kimenet becslését HeFH betegekben. Sürgető feladat tehát, hogy az LDL-C mellett további potenciális kockázati tényezőket azonosítsunk. Számos korábbi vizsgálatnak sem sikerült igazolnia az emelkedett LDL-C és az ateroszklerotikus kardiovaszkuláris események közötti kapcsolatot, amely további lipoprotein szubfrakciók és gyulladásos citokinek kardiovaszkuláris rizikóban betöltött szerepét valószínűsíti a HeFH betegcsoportban. Következésképpen fontos kutatási terület az újonnan felismert kemokinek szerepének vizsgálata ebben a specifikus betegpopulációban.

Az SDF-1, másnéven CXCL12, a CXCR4 és a CXCR7 receptorokon keresztül részt vesz a gyulladásos válaszreakcióban és az agyi neuromodulációban. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy iszkémiás stroke után az SDF-1 α és a CXCR4 upregulációja figyelhető meg az iszkémiás penumbra területén, míg a perifériás vérben az SDF-1 iszkémiás poszt-kondicionális emelkedése észlelhető a fehérjeképződés fokozódásával az iszkémiás adaptáció részeként. Megfigyelések szerint az endotel progenitor sejtek (EPC-k) sérült vagy iszkémiás területre történő toborzásában, valamint homing-jában az SDF-1 is szerepet is játszik, mely az angiogén és repair funkciók szempontjából fontos folyamat. Az SDF-1-nek szerepe lehet az EPC mobilizációban és proliferációban, valamint az EPC-k adhézios kapacitásának szabályozásában a CXCR4 és CXCR7 receptorokon keresztül. Az SDF-1 érlelmeszesedésben betöltött szerepét az artériák endotel sejtjei által termelt SDF-1 határozza meg. Az endotel

sejtek által termelt SDF-1 a totál plazma SDF-1 koncentrációjának körülbelül 25 %-a, a fennmaradó részt egyéb sejtek, mint adipociták, hepatociták termelik, melyek funkcionális következményei ez idáig nem ismertek. Az általunk vizsgált HeFH betegcsoportban a szérumban SDF-1 koncentráció körülbelül fele volt az egészséges populáció SDF-1 koncentrációjának. A csökkent keringő SDF-1 szint hátterében az endotel sejtek csökkent termelése állhat, egyéb, az SDF-1 termelést befolyásoló, jelenleg ismeretlen mechanizmusok mellett. Habár a szérumban SDF-1 mérsékelten magasabb volt nők esetén a férfiakhoz képest, a különbség nem volt szignifikáns.

Meglehetősen kevés és ellentmondásos irodalmi adat áll rendelkezésre az SDF-1 szint és a lipid paraméterek összefüggéseiről. Egy kis létszámú korábbi vizsgálatban az SDF-1 szint szignifikánsan magasabb volt férfi betegek esetén mérsékelt diszlipidémia esetén a kontrollokhoz képest. Diszlipidémiás férfiak esetén alacsonyabb SDF-1 szintet találtak szűrés nélküli diszlipidémiás betegekhez képest, továbbá negatív tendenciát figyeltek meg az SDF-1 és összkoleszterin/HDL-C arány tekintetében. Az SDF-1 és HDL-C közötti pozitív korreláció csak nők esetén volt megfigyelhető. Egy a Framingham Heart Study résztvevőit vizsgáló tanulmányban a szérumban SDF-1 kvartilisek növekedésével magasabb LDL-C és triglicerid, illetve alacsonyabb HDL-C szint volt jellemző. Érdekes módon ebben a vizsgálatban az átlagos szérumban SDF-1 koncentráció 1894 pg/ml (min-max: 742 - 17633 pg/ml) volt, amely körülbelül öt-, tízszerese más vizsgálatokban talált értékekhez képest. A fenti irodalmi adatokkal ellentétben, jelen vizsgálatunkban szoros negatív korrelációt találtunk az SDF-1 és ApoB100-at tartalmazó lipoproteinek között, míg az SDF-1 független prediktora a VLDL szubfrakció volt. Az utóbbi eredmények azt mutatták, hogy a kardiovaszkuláris események kockázata szempontjából a VLDL jelentősége nagyobb, mint az LDL-é. Ez azzal magyarázható, hogy a VLDL nagyobb koleszterin mennyiséget szállít, mint a kis LDL, és a VLDL könnyebben rakódik le az érfa intimájában, ahol alacsony fokú gyulladást okoz direkt és indirekt mechanizmusokon keresztül, és emellett fokozhatja az SDF-1 expresszióját. Bár az FH-ra nem jellemző a trigliceridben gazdag partikulumok emelkedett jelenléte, az FH egyre gyakrabban társul egyéb kórállapotokkal, például az elhízással, mely a trigliceridben gazdag részecskék, mint a VLDL és IDL emelkedett szintjével jár, így magasabb triglicerid szintet eredményez. Korábbi vizsgálatok felvetették, hogy a gyulladásos citokinek, mint a TNF α és az interleukin-6 szuppresszív hatást fejtenek ki az SDF-1 szintre férfi hiperlipidémiás betegekben. A saját vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a gyulladásos markerek és az SDF-1 között. A magasabb hsCRP által jelzett fokozott szisztémás gyulladás csökkentheti az SDF-1 termelést HeFH betegekben.

Korábban nem vizsgálták az SDF-1 és a lipid szubfrakciók közötti összefüggéseket. A HeFH betegekben szignifikánsan magasabb kis sűrű LDL koncentrációt, alacsonyabb átlagos LDL méretet, alacsonyabb nagy és közepes HDL szubfrakció arányt, ezzel szemben magasabb kis HDL szubfrakció arányt találtunk a kontrollokhöz képest, ahogy azt korábban közöltük. Eredményeink szerint az SDF-1 szint pozitív korrelációt mutatott az átlagos LDL mérettel, a nagy és közepes HDL szubfrakciókkal, bár a megfigyelések jelentőségének igazolása céljából további vizsgálatok szükségesek.

Az oxLDL elősegíti a koronária érlemezés kialakulását azáltal, hogy fokozza a cellularitást, a makrofág aktivációt, a habos sejtek differenciálódását, a simaizomsejt proliferációt és csökkenti az endoteliális NO termelést. Az MPO az oxidatív stressz kialakulásának egyik kulcsszereplője, amely oxLDL képződéshez vezet. Az oxLDL vagy az oxLDL ellen képződő endogén antitestek jelenléte pedig szoros összefüggésbe hozható a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával, ezáltal biomarkerként használhatóak. Azonban az oxLDL prognosztikus szerepe FH-ban nem kellően bizonyított. Az LDL oxidáció mértéke nem mutatott összefüggést az előzményben szereplő kardiovaszkuláris betegséggel férfi HeFH betegek esetén, és nem találtak szignifikáns összefüggést a plazma LDL-C koncentrációja és az LDL oxidáció mértéke között. Szintén nem találtak összefüggést a carotis intima-media vastagság és az oxidatív paraméterek, keringő antitestek és oxLDL között egy nagyobb kohorsz vizsgálatban HeFH betegekben. Egy másik vizsgálatban az antitest titereket hasonlították az oxLDL szintjéhez homozigóta és heterozigóta FH betegekben, azonban nem találtak szignifikáns összefüggést az érlemezés súlyossága és az antitest titer között. A scavenger receptor lectin-like oxLDL receptor-1 (LOX1) rs11053646 genotípusa magasabb szolubilis receptor szintet eredményezett, mely fokozta a plakk instabilitást és a koronária betegség prediktora volt HeFH betegekben. Az ellentmondó eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy a klinikai gyakorlatban az oxLDL értelmezése körültekintést igényel. Az oxLDL egy összefoglaló kifejezés, amely az LDL lipid alkotórészein, valamint az ApoB-n végbemenő heterogén oxidatív változásokat reprezentálja. Az LDL nem-oxidatív változásai, mint például a deszalizáció szintén számos aterogén hatást fejthet ki, amelyet szintén figyelembe kell venni. Az irodalmi adatoknak megfelelően a szérum oxLDL és MPO koncentráció szignifikánsan magasabb volt az általunk vizsgált HeFH betegekben a kontrollokhöz képest. Érdekes módon negatív korrelációt figyeltünk meg az oxLDL és MPO, valamint SDF-1 között a vizsgált populációban, amely új eredmény. Az oxLDL bizonyult a keringő SDF-1 független prediktorának, amely valószínűsíti az oxidatív stressz szabályozó szerepét az SDF-1 termelésben.

Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy az atorvastatin hatására emelkedik az SDF-1 α szintje in vivo iszkémiás-reperfúziós károsodás esetén. Atorvastatin indukált SDF-1 α upreguláció volt megfigyelhető akut miokardális infarktus esetén patkányokban az NO-termelés anti-inflammatorikus és anti-apoptotikus hatásain keresztül. Szintén leírták, hogy a szérumban miR-548j-5p hozzájárul az angiogenezis patológiás folyamataihoz az EPC-k migrációjának és az érképződés elősegítése révén, mely összefüggést mutat az eNOS és SDF-1 szinttel. Tehát a miR-548j-5p upregulációja fokozza az érújdonképződést, amely arra enged következtetni, hogy az SDF-1 egy potenciális terápiás célpont lehet PAD esetén. Továbbá az NO-donor MPC-1011 stimulálja az angiogenezist és arteriogenezist, javítja a végtagi iszkémiát cGMP-dependens útvonalon, mely magában foglalja a VEGF-et és SDF-1 α -t. Mindezek alapján új stratégiák tervezhetőek a keringő SDF-1 szint emelése érdekében HeFH betegekben, habár a kardiovaszkuláris prevencióban is megfigyelhető hatás bizonyításához további vizsgálatok szükségesek.

Vizsgálatunk limitációit érdemes megemlítenünk. Az SDF-1 szabályozó útvonalait és a lipoprotein anyagcsere direkt szabályozó mechanizmusait nem vizsgáltuk. A DLCN diagnosztikus kritériumokat széleskörben alkalmazzák az FH diagnosztikában, mely tartalmazza az LDL-C szintet, a klinikai megjelenést, a családban előforduló korai szív-, érrendszeri betegségek előfordulását, beleértve a koronária betegséget és a PAD-t, melyek alapján az összesített pontszám szerint “definitív”, “valószínű” vagy “lehetséges” az FH diagnózisa. Emellett “definitív” az FH diagnózisa, amennyiben jelen van valamely patogén mutáció az FH-asszociált génekben. A DLCN kritériumok néhány korlátját azonban meg kell említenünk. A külső manifesztációk megjelenése nem gyakori, a családi anamnézis pedig gyakran nem elérhető vagy megbízhatatlan. A DNS meghatározás nem elérhető széleskörben és a genetikai vizsgálat eredménye néhány esetben nincs összhangban az FH fenotípusával. Továbbá fiatal FH betegek esetén a DLCN kritériumok alábecsülik az FH fennállásának valószínűségét. Mindezek ellenére eredményeink felhívják a figyelmet az SDF-1 aterogenezisben betöltött szerepére HeFH betegekben.

Összefoglalás

A nagy sűrűségű lipoprotein (HDL)-hez kötött apolipoproteinM/szfingozin-1-foszfát (ApoM/S1P) komplex egy kapocsként szolgál a HDL és az endotel sejtek között a kardiovaszkuláris betegségekben, biztosítva az ép endoteliális barriert. A stromaeredetű faktor-1 (SDF-1) egy kemokin, mely sokoldalú hatást fejt ki az érlelmeszesedés folyamatában, azonban összefüggése a hiperlipidémiával meglehetősen ellentmondásos.

Korábban HeFH betegek körében nem vizsgálták a szérumban S1P, ApoM és SDF-1 összefüggéseit a lipid paraméterekkel, lipid szubfrakciókkal, valamint a gyulladásos markerekkel. Nyolcvanegy kezelt HeFH beteget és 32 egészséges kontroll személyt vontunk be a vizsgálatunkba. A szérumban SDF-1, S1P, ApoM, oxLDL, MPO, MMP9, sCD40L, sICAM-1, sVCAM-1 és TNF α koncentrációk meghatározása ELISA módszerrel történt. A lipoprotein szubfrakciók elválasztására akrilamid gélelektroforézist (Lipoprint) alkalmaztunk. A PON1 enzim aktivitását spektrofotometriás módszerrel mértük. Az FH diagnózisának felállításához a Dutch Lipid Clinic Network Kritériumrendszert használtuk.

Szignifikánsan magasabb S1P és ApoM szinteket találtunk HeFH betegekben a kontrollokhoz képest. Negatív korrelációt figyeltünk meg az S1P és nagy HDL szubfrakció között, míg pozitív korrelációt találtunk az S1P és kis HDL szubfrakció között HeFH betegekben és a teljes vizsgálati populációban. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az S1P és sCD40L szint, MMP-9 szint és a PON1 arilesteráz aktivitás között, míg szignifikáns negatív korrelációt figyeltünk meg az S1P és sVCAM-1 között HeFH betegekben. A szérumban S1P független prediktorai a nagy HDL szubfrakció és a PON1 arilesteráz aktivitás.

Szignifikánsan alacsonyabb SDF-1 koncentrációt találtunk HeFH betegekben a kontrollokhoz képest. Szignifikáns negatív korrelációt figyeltünk a szérumban SDF-1 és az összkoleszterin, triglicerid, LDL-C és ApoB100 szintek között. Negatív összefüggés volt a szérumban SDF-1 és VLDL, IDL, nagy LDL, nagy HDL és közepes HDL szubfrakció között, míg pozitív korrelációt találtunk az átlagos LDL méret, kis HDL és SDF-1 között. Negatív korrelációt találtunk az SDF-1 és oxLDL, illetve MPO között. A szérumban SDF-1 független prediktorai az oxLDL szint és a VLDL szubfrakció.

A magasabb S1P és ApoM szintek, valamint a megfigyelt összefüggéseik a HDL szubfrakciókkal, illetve gyulladásos markerekkel HeFH betegek esetén, feltételezik az S1P és ApoM lehetséges szabályozó szerepét az intakt endoteliális funkció fenntartásában. Az SDF-1 és lipid frakciók, valamint lipid szubfrakciók között megfigyelt szoros összefüggések felhívják a figyelmet az SDF-1 és a lipídanyagcsere közös útvonalaira, illetőleg valószínűsítik az SDF-1 szabályozó szerepét az érlelmeszesedés folyamatában.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Balla Józsefnek, a DE KK Belgyógyászati Klinika igazgatójának és Prof. Dr. Paragh Györgynek, a DE ÁOK Belgyógyászati Intézet Anyagcsere Betegségek Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette a tanszéken folyó tudományos munkában való részvételemet. Köszönöm Prof. Dr. Papp Máriának, a DE KK Gasztroenterológiai Klinika igazgatójának, hogy támogatta az Anyagcsere Betegségek Tanszéken folyó tudományos munkában való részvételemet.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Harangi Mariann egyetemi tanárnak, aki támogatta és irányította a tudományos és laboratóriumi munkámat, segítséget nyújtott a vizsgálatok megtervezésében és a felmerülő kérdések megvitatásában.

Köszönöm Dr. Seres Ildikó Tanárnőnek, Dr. Katkó Mónikának, Dr. Lőrincz Hajnalkának és Dr. Szentpéteri Anitának a laboratóriumi munkámban nyújtott segítséget.

Köszönetemet szeretném kifejezni a DE ÁOK Belgyógyászati Intézet Anyagcsere Betegségek Tanszék Kutatólaboratórium dolgozóinak és tudományos közleményeim társszerzőinek, akik segítettek és támogatták tudományos munkámat.

Hálával tartozom a családomnak és barátaimnak a támogatásukért. Köszönöm szüleimnek, testvéremnek a türelmet, hogy végig kísérték ezen az úton. Köszönöm gyermekemnek és páromnak, hogy szeretetükkel támogattak a munkám során.

Vizsgálatainkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA K142273) támogatta.

Készült a TKP2021-EGA-18 számú projekt támogatásával, mely az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/526/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Séber-Juhász Lilla

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Juhász, L.**, Lőrincz, H., Szentpéteri, A., Tóth, N., Varga, É., Paragh, G., Harangi, M.: Decreased Serum Stromal Cell-Derived Factor-1 in Patients with Familial Hypercholesterolemia and Its Strong Correlation with Lipoprotein Subfractions.
Int. J. Mol. Sci. 24 (20), 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242015308>
IF: 5.6 (2022)
2. **Juhász, L.**, Lőrincz, H., Szentpéteri, A., Nádró, B., Varga, É., Paragh, G., Harangi, M.: Sphingosine 1-Phosphate and Apolipoprotein M Levels and Their Correlations with Inflammatory Biomarkers in Patients with Untreated Familial Hypercholesterolemia.
Int. J. Mol. Sci. 23, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232214065>
IF: 5.6

További közlemények

3. Németh, Á., Daróczy, B., **Juhász, L.**, Fülöp, P., Harangi, M., Paragh, G.: Assessment of associations between serum lipoprotein (a) levels and atherosclerotic vascular diseases in Hungarian patients with familial hypercholesterolemia using data mining and machine learning.
Front. Genet. 13, 1-10, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2022.849197>
IF: 3.7
4. Nádró, B., Lőrincz, H., **Juhász, L.**, Szentpéteri, A., Sztanek, F., Varga, É., Páll, D., Paragh, G., Harangi, M.: Determination of Serum Progranulin in Patients with Untreated Familial Hypercholesterolemia.
Biomedicines. 10 (4), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10040771>
IF: 4.7





5. Madar, L., **Juhász, L.**, Szűcs, Z., Kerkovits, L., Harangi, M., Balogh, I.: Establishing the Mutational Spectrum of Hungarian Patients with Familial Hypercholesterolemia.
Genes. 13 (1), 1-13, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/genes13010153>
IF: 3.5
6. Németh, Á., Harangi, M., Daróczy, B., **Juhász, L.**, Paragh, G., Fülöp, P.: Identifying Patients with Familial Chylomicronemia Syndrome Using FCS Score-Based Data Mining Methods.
J Clin Med. 11, 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm11154311>
IF: 3.9
7. Harangi, M., Zsíros, N., **Juhász, L.**, Nádró, B., Paragh, G.: A lipoprotein(a) jelentősége az ateroszklerózis progressziójában.
Metabolizmus. 29 (2), 68-74, 2021.
8. **Juhász, L.**, Balogh, I., Madar, L., Kovács, B., Harangi, M.: A Rare Double Heterozygous Mutation in Low-Density Lipoprotein Receptor and Apolipoprotein B-100 Genes in a Severely Affected Familial Hypercholesterolaemia Patient.
Cureus. 12 (12), 1-5, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.12184>
9. **Juhász, L.**, Nádró, B., Zsíros, N., Paragh, G., Harangi, M.: Kardiovaszkuláris kockázati tényezők előfordulási gyakorisága újonnan diagnosztizált familiáris hypercholesterinaemiás betegeinknél.
Metabolizmus. 18 (3), 174-180, 2020.
10. Nádró, B., **Juhász, L.**, Szentpéteri, A., Páll, D., Paragh, G., Harangi, M.: Az apolipoprotein M és a szfingozin-1-foszfát tengely jelentősége az érlelmeszesedés kialakulásának gátlásában.
Orvosi Hetilap. 159 (5), 168-175, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.30980>
IF: 0.564
11. Varga, V. E., Lőrincz, H., Szentpéteri, A., **Juhász, L.**, Seres, I., Paragh, G. J., Balla, J., Paragh, G., Harangi, M.: Changes in serum afamin and vitamin E levels after selective LDL apheresis.
J. Clin. Apheresis. 33 (5), 569-575, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jca.21636>
IF: 3.088
12. Harangi, M., **Juhász, L.**, Paragh, G.: A dyslipidaemia kezelésének új lehetőségei.
Háziorv. Továbbk. Szle. 22 (9), 643-647, 2017.
13. Harangi, M., **Juhász, L.**, Nádró, B., Paragh, G.: Az LDL aferezis helye a lipidcsökkentésben a PCSK9 gátlók bevezetését követően.
Metabolizmus. 15 (2), 79-84, 2017.





14. Harangi, M., **Juhász, L.**, Nádró, B., Balla, J., Paragh, G.: LDL apheresis or PCSK9 inhibition?
Sometimes we have to combine them.
Vessel Plus. 1, 91-95, 2017.
15. Zsíros, N., **Juhász, L.**, Paragh, G., Harangi, M.: Statin okozta mellékhatások kockázati tényezői
hyperlipidaemiás betegeinkben.
Metabolizmus. 12 (3), 178-182, 2014.
16. Harangi, M., Zsíros, N., **Juhász, L.**, Paragh, G.: Statin okozta mellékhatások: tények és gének.
Orv. Hetil. 154 (3), 83-92, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2013.29530>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30,652

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,2**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2023.11.28.

