

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A SZELEKTÍV LDL AFEREZIS NON-LIPID HATÁSAI
SÚLYOS HETEROZIGÓTA FAMILIÁRIS
HIPERKOLESZTERINÉMIÁS BETEGEK ESETÉN**

Varga Viktória Evelin

Témavezető: Dr. Harangi Mariann MD, PhD



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

**A SZELEKTÍV LDL AFEREZIS NON-LIPID HATÁSAI SÚLYOS
HETEROZIGÓTA FAMILIÁRIS HIPERKOLESZTERINÉMIA S
BETEGEK ESETÉN**

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

Írta: Varga Viktória Evelin, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája
(Az Anyagcsere Betegségek Kezelése és Kontrollja program)
keretében

Témavezető: Dr. Harangi Mariann, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Dr. Simonyi Gábor, PhD
Dr. Sándor János, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet A épület Könyvtár
2020. július 17. 10 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Barna István, PhD
Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Dr. Simonyi Gábor, PhD
Dr. Sándor János, PhD
Dr. Barna István, PhD
Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A Épület tanterme,
2020. július 17. (péntek) 11 óra

BEVEZETÉS

Minden új terápiás eljárás esetén elvárjuk, hogy a hatékonyság mellett biztonságosan alkalmazható és jól tolerálható legyen azoknál a betegeknél, akiknél alkalmazzuk. Bár az új gyógyszerek és terápiás beavatkozások bevezetését megelőzően hosszadalmas és szigorúan ellenőrzött vizsgálatok sorát végzik el, mégis gyakori, hogy a bevezetésüket követően a klinikai alkalmazás során olyan új hatásokat írnak le, melyek eredetileg nem szerepeltek az alkalmazási előiratban. E hatások lehetnek kedvezőtlenek, például a statinok adása során észlelt fokozott kockázat a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulása, de lehetnek kedvezőek is, melyek támogatják az adott szer vagy eljárás kedvező hatását az adott betegség lefolyása vagy szövődményeinek kialakulása szempontjából. Példa erre a statinok által kifejtett gyulladáscsökkentő vagy antioxidáns hatás, mely hozzájárul a statin kardiovaszkuláris kockázatsökkentő hatékonyságához.

Munkám során azt vizsgáltam, hogy egy ritka, örökletes kórkép kezelése során alkalmazott extrakorporális terápiás eljárás, a szelektív alacsony sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein, LDL) aferezis kezelés milyen további, az LDL részecskék eltávolításán túli hatást fejt ki a vizsgált betegek esetén. Ezek az adatok segíthetnek megérteni a kezelés során észlelt változásokat a betegek állapotában, de adalékkal szolgálhatnak a betegség patomechanizmusát illetően is, mely elősegítheti új terápiás lehetőségek kifejlesztését, ezáltal javíthatja az adott betegcsoport életminőségét és életkilátásait.

CÉLKITŰZÉSEK

Célul tűztük ki a szelektív LDL aferezis kezelés hatásának vizsgálatát súlyos heterozigóta familiáris hiperkoleszterinémias (HeFH) betegekben:

1. A szérum chemerin szintjére a betegeknél történt első LDL aferezis kezelés előtti és utáni értékek vizsgálatával, az LDL aferezis során használt adszorber oszlop chemerin megkötő kapacitásának meghatározásával, és egy beteg esetén az LDL aferezis kezelés hosszú távú hatásának megfigyelésével.
2. A szérum afamin szintjére a betegeknél történt első LDL aferezis kezelés előtti és utáni értékek vizsgálatával, az értékek egészséges kontroll populációval történő összevetésével, és az LDL aferezis során használt adszorber oszlop afamin megkötő kapacitásának meghatározásával.
3. A szérum α - és γ -tokoferol szintjére a betegeknél történt első LDL aferezis kezelés előtti és utáni értékek vizsgálatával, az értékek egészséges kontroll populációval történő összevetésével.
4. A szérum gélelektroforézissel meghatározott LDL és HDL szubfrakcióira.
5. A szérum további pro- és anti-atherogén hormonszerű peptidjeinek (adiponektin, leptin, vaspin, omentin-1, RBP4, PEDF, visfatin és obestatin) szintjére a betegeknél történt

első LDL aferezis kezelés előtti és utáni értékek
vizsgálatával.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Súlyos heterozigóta familiáris hiperkoleszterinémiás betegek kiválasztása

Vizsgálatainkba a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet A épületének Lipid szakrendelésén gondozott súlyos HeFH betegek kerültek bevonásra, akiknél a gyógyszeres lipidcsökkentő kezelés mellett is jelentősen célérték feletti low-density lipoprotein koleszterin (LDL-C) szintet észleltünk, ezért szelektív LDL aferezis kezelés (DALI) elkezdése vált indokolttá. A vérvételek mindegyike a betegek első DALI kezelése előtt és után történt, egy esetben végeztünk 12 hónapos követéses vizsgálatot a chemerin szintre gyakorolt tartós hatás vizsgálatára céljából.

Az afamin és E-vitamin szintek vizsgálatokor egészséges kontroll személyek is bevonásra kerültek a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet „A” épületének Ambulanciájáról. Vizsgálatunkban a beválasztás feltétele 21-70 év közötti életkor volt. A betegek a vizsgálat jellegéről és céljáról szóló részletes felvilágosítást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága hozzájárult a vizsgálatához. Kizárási kritériumként szerepelt az akut bakteriális vagy vírusfertőzés, az elmúlt három hónapban multivitamin készítmények szedése, az emelkedett májenzimokkal jellemzett, vagy az anamnézisben szereplő krónikus májbetegség és az alkohol- vagy drogfüggőség, az epekövesség, a közelmúltban zajlott miokardiális infarktusz, a kezeletlen endokrin betegségek, a terhesség és a szoptatás, a humán immundeficiencia-vírus pozitívitás, a súlyos

mentális retardáció (intelligencia-hányados: $IQ < 40$), és kizárásra kerültek az ismert daganatos vagy daganatellenes kemoterápiában részesülő betegek is.

Vérvétel és laboratóriumi paraméterek mérése

A vizsgálatba bevont betegektől és a kontrolloktól 12 óras éhezést követően vénás vérvétel történt. A betegektől közvetlenül a DALI kezelés végén is vénás vérmintát vettünk. A vérvételeket követően a szérum - centrifugálással történő - elválasztása történt. A friss szérum mintákból a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében standard laboratóriumi módszerekkel meghatározták a szénhidrát- és lipidanyagcserére jellemző paramétereket Cobas c501 típusú analizátorral (Roche Ltd, Mannheim, Németország). A szérum összcholeszterin és a triglicerid koncentráció meghatározása enzimatis, kolorimetriás módszerrel, a high-density lipoprotein koleszterin (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)) értékét immunoturbidimetriás módszerrel mérték (Tina-quant Apolipoprotein A-1 ver.2, Tina-quant Apolipoprotein B ver.2 és Tina-quant Lipoprotein(a) ver.2). A vizsgálatokat a gyártó által megadott útmutató szerint végezték. További laboratóriumi mérésekre a szérum mintákat $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on helyeztük el, és 2 hónapon belül felhasználtuk.

LDL-aferezis

A betegek szelektív LDL aferezis kezelése DALI módszerrel történt (Fresenius GmbH, Germany), mely során DALI 750 adszorbens oszlopokat alkalmaztunk. A kezelés során DALI alapozó oldatot (primer solution), antikoaguláns citrát dextróz oldatot (ACD-A), vérelvezető csöveket és 4008 ADS hemadszorpciós monitort (Fresenius HemoCare Adsorber Technology GmbH, St. Wendel, Germany) használtunk.

A kezelést megelőzően az adszorber oszlopokat 3×2000 ml primer oldattal mostuk át 400 ml/perc áramlási sebességgel. Az első 2 l oldat 20000 IU heparint tartalmazott. Feltöltés közben az adszorbenseket citráttal telítettük. A beteg ACD-A infúziót kapott a kezelés közben. Az ACD-A oldatot a kezelés indításakor 1:20 arányban adagoltuk, melyet 1500 ml kezelt vérmennyiség után 1:40 arányra csökkentettünk.

Az egyik könyökhajlat vénája szolgáltatta a vérnyerési, a másik a vér visszaadási lehetőséget. A kezeléseket során folyamatos vérnyomás-megfigyelés zajlott. Az összes kezelés előtt és után vénás vérvétel történt.

Szérum chemerin, visfatin, PEDF, adiponektin, omentin-1, vaspin, RBP4, leptin, obestatin és oxLDL szintek meghatározása

A szérum chemerin szint meghatározás kereskedelmi forgalomban kapható enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálati (ELISA) kittel (Human Chemerin Quantikine ELISA,

katalógusszám: DCHM00, R&D Systems, MN, USA) történt a gyártó használati útmutatásának megfelelően.

A szérum visfatin, PEDF, adiponektin, omentin-1, vaspin szintjét kereskedelmi forgalomban kapható szendvics ELISA kitek segítségével végeztük, az alkalmazási előiratban foglaltak szerint határoztuk meg (Biovendor GmbH, Germany).

A szérum RBP4 és a leptin szintet ugyancsak szendvics ELISA módszerrel, kereskedelmi forgalomban lévő kit segítségével határoztuk meg az alkalmazási előiratban foglaltak szerint (R&D Systems, MN, USA).

A szérum obestatin szintet enzim immunoassay (EIA) módszerrel határoztuk meg (Yanaihara Institute Inc., Shizuoka, Japán), valamint az oxLDL koncentrációt szintén ELISA módszerrel mértük az alkalmazási előiratban foglaltak szerint (MercoDIA AB, Svédország).

Szérum afamin szint meghatározása

A szérum afamin szint, valamint az oszlopról eluált frakciók afamin koncentrációjának meghatározása kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (Afamin Human ELISA, katalógusszám: RD194428100R, BioVendor, NC, USA) történt a gyártó használati útmutatásának megfelelően.

Plazma α - és γ - tokoferol szint meghatározása

Az α - és γ - tokoferol mennyiségi meghatározása plazma mintából gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS)

módszerrel történt, korábbi irodalom alapján, a mérés optimalizálásához szükséges módosításokkal.

A standard görbe elkészítéséhez a belső standard módszert alkalmaztam. Az α - és γ -tokoferol metanolos törzsoldataiból (α -tokoferol, 1,0 mg/ml metanolban, certified reference material, γ -tokoferol 1,0 mg/ml metanolban, certified reference material, Sigma-Aldrich St. Louis, MO USA) metanollal (Sigma-Aldrich St. Louis, MO USA) hígítási sort készítettem. A kalibrációs pontok a következők lettek: α -tokoferol: 3,13; 6,25; 12,5 és 25 $\mu\text{g/ml}$, γ -tokoferol: 0,063; 0,125; 0,25 és 0,5 $\mu\text{g/ml}$. A standard oldatokhoz belső standardként állandó mennyiségben (4 μg) adtam 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanolt (Sigma-Aldrich St. Louis, MO USA) metanolban oldva. A metanolt nitrogén áram alatt elpárologtattam, majd 130 μl Sylon™ HTP (HMDS+TMCS+Pyridine, 3:1:9, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) szililező oldat hozzáadása után 30 percig 60 °C-on derivatizáltam. Ezután a szililezőszert ismét nitrogén áram alatt elpárologtattam a standardokról, melyeket ezután 50 μl n-hexánban (Merck, Darmstadt, Germany) oldottam fel.

A plazmaminták előkészítéséhez 5 μl plazmához 100 μl 2,2,5,7,8-Pentamethyl- 6-chromanolt (4 $\mu\text{g/ml}$ metanolban oldva) belső standardot, 100 μl metanolt és 95 μl fiziológiás sóoldatot adtam. Ezt követően az extrakcióhoz 1 ml n-hexánt adtam a mintákhoz, amelyeket ezt követően alaposan vortexeltem, majd centrifugáltam. A felülúszót ezután 1,5 ml-es mintatartó üvegekbe pipettáztam át, majd a szerves oldószert nitrogén áram alatt elpárologtattam. Végül a

mintákat a standardoknál leírt módon derivatizáltam, és a mintaelőkészítés végén 50 µl n-hexánban oldottam fel.

A GC-MS mérések Finnigan Trace GC Ultra gázkromatográf-fal, illetve az ahhoz kapcsolt Polaris Q tömegspektrométerrel történtek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). A mintákat manuálisan injektáltam egy Agilent J&W oszlopra (DB-5MS UI; 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm), vivőgázként héliumot használva (áramlási sebesség: 1 ml/perc, állandó áramlási mód). Az injektálási térfogat 2 µl volt. Az injektálás splitless módban történt, az injektor hőmérséklete a mérés során végig 260 °C volt. A kolonna kezdeti hőmérséklete 150 °C volt 2 percig, majd 25 °C/perc felfűtési sebességgel 300 °C-ra emelkedett, melyet további 15 percig tartott. A teljes elemzési idő 23 perc volt. A tömegspektrométer szelektív ionkövetés (selective ion monitoring, SIM) módban működött. A választott ionok a következők voltak: α-tokoferol-TMS: 237.3 m/z, γ-tokoferol-TMS: 488.4 m/z, 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol-TMS: 292.3 m/z.

LDL- és HDL-koleszterin szubfrakciók vizsgálata

A különböző lipoprotein szubfrakciók elkülönítésére Lipoprint rendszert (Quantimetrix Corp., Redondo Beach, CA) használunk, amely egy csöves, nem-grádiens gélelektroforézis rendszer. A lipoprint használatával a lipoproteinek mérete alapján, 7 különböző LDL szubfrakció és 10 különböző HDL szubfrakció választható el. Az így elválasztott 7 LDL szubfrakció a nagy, kevésbé denz LDL-1 és LDL-2 valamint a kis denz LDL-3,-4,-5,-6 és -7. A HDL

szubfrakciós teszt esetén a nagy HDL szubfrakcióhoz tartozó HDL-1,-2,-3, a közepes szubfrakcióhoz tartozó HDL-4,-5,-6,-7 valamint a kis HDL szubfrakcióhoz tartozó HDL-8,-9,-10 különíthetőek el.

A Lipoprint alkalmazása során akrilamidot tartalmazó üvegcsövek felső részére 25 µl szérum mintát vittünk fel. A mintákban lévő különböző lipoproteineket 200 µl szudán fekete festéket tartalmazó folyékony gél használatával tettük láthatóvá. 30 perces fotopolimerizálást követően a csövek elektroforézis kádba kerültek, amelynek alsó és felső részét Tris és bórsavat tartalmazó puffer oldattal töltöttük fel, ezután a minták 3 mA/cső áramerősség és 500 V feszültség mellett az LDL szubfrakciós teszt esetében 60 percig, míg a HDL szubfrakciós teszt esetében 50 percig elektroforetizálódtak. Végül 30 perccel az elektroforézis után a lipoprotein szubfrakciókat tartalmazó csövek digitalizálását és a Lipoware szoftver (Quantimetrix Corp.) segítségével történő kiértékelését elvégeztük. Az átlagos LDL méretet (nm) a denzitogram alapján szintén a Lipoware szoftver számítja ki.

Fehérje frakció poszt LDL-aferezis elúciója DALI 750 adszorbens oszlopról, és chemerin szint meghatározás az eluátumból

Az aferezis kezelést követően a chemerin elúcióját az aferezis oszlopról Dihazi és munkatársai által leírt módszer alapján végeztem. A DALI750 adszorbens oszlopokat foszfát-pufferes sóoldattal (pH 7,4) mostam át. A fehérje elúciót három lépésben végeztem el, egymás után három különböző pH-jú 250 ml acetát

pufferrel a következő sorrendben: pH 5,0; pH 4,0; pH 3,0. Ezt követően határoztam meg a különböző pH-jú pufferekkel kapott eluátumok chemerin koncentrációját, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (Human Chemerin DuoSet ELISA, katalógusszám: DY2324, R&D Systems, MN, USA) a gyártó használati útmutatásának megfelelően.

Statisztikai elemzés

A vizsgálat statisztikai értékelését a STATISTICA version 8.0 szoftver segítségével végeztük (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA). Először normalitás próbát alkalmaztunk a Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével. Normál eloszlás esetén az adatokat átlag±szórás (SD) formájában ábráztuk, nem-normál eloszlású paraméterek esetén az adatokat medián, ill. alsó és felső kvartilis értékek formájában fejeztük ki. A betegek kezelés előtti és utáni eredményeit párosított t-próbával vizsgáltuk. A betegek kezelés előtti adatainak összehasonlítása a kontroll csoport értékeivel nem párosított t-teszt használatával történt. A szignifikancia határa ebben az esetben is $p < 0,05$ volt. Friedman-féle ANOVA és Kendall-féle rang-korrelációs összehasonlító tesztet alkalmaztunk a különböző pH-jú pufferekkel eluált chemerin koncentrációk összehasonlítására.

EREDMÉNYEK

Szelektív LDL aferezis kezelés hatása szérum chemerin szintekre

A szérum chemerin szintek az összes betegben szignifikánsan csökkentek első aferezis kezelést követően, átlagosan 27,26%-kal (átlagosan 82,34 ng/ml-ről 59,09 ng/ml-re). Hogy a kezelés során történő hígítás hatását kizárjuk, a szérum chemerin/kreatinin arányt is kiszámoltam, amely 16,65%-os szignifikáns csökkenést mutatott az első kezeléseket után.

Az LDL aferezis szérum chemerin szintekre kifejtett hosszú távú hatásának vizsgálatához 10 kezelésem keresztül vizsgáltuk az egyik beteg kezelés előtti szérum chemerin szintjeit. Azt találtuk, hogy a chemerin szint csökkenő tendenciát mutat a 12 hónapos követés során. A beteg az ötödik kezelés után a kezeléseket 3 hónapos felfüggesztését kérte (családi okok miatt). Ez idő alatt a keringésben lévő chemerin szint jelentősen növekedett, elérve az első kezelés előtti kiindulási szintjét. Majd az LDL aferezis kezelés folytatásával a szérum chemerin koncentrációk elkezdtek csökkenni, jelezve a folytonos kezeléseket fontosságát a szérum chemerin szint állandó csökkenésének megtartásához.

Ahhoz, hogy bebizonyítsuk, hogy a chemerin fizikailag kötődik az adszorber oszlophoz, a kezelést követően fehérje frakciókat eluáltunk az aferezis oszlopról három különböző pH-jú acetát puffer oldattal.

Az eluátumok mindegyikében sikerült chemerint kimutatni. Szignifikánsan több fehérje eluálódott a magasabb pH-jú puffer oldatokkal ($p < 0,01$).

Egyes kiválasztott betegek esetén Lipoprint módszert alkalmazva LDL és HDL szubfrakciós vizsgálatokat végeztünk az LDL aferezis kezelése előtt és után. A kezelés után mind az LDL, mind a HDL esetében kedvező mennyiségi és minőségi változásokat figyelhettünk meg. Ezek közül a változások közül a legjelentősebb az, hogy az LDL aferezis jelentősen csökkentette a kis denz LDL szubfrakciókat.

Szelektív LDL aferezis hatása szérum afamin és plazma E-vitamin szintekre

Az első kezelés mindössze átlagosan 9,4%-al csökkentette a szérum afamin koncentrációkat. Ezzel párhuzamosan a HDL és ApoA1 szintek 10,5 és 14,1%-kal csökkentek. Következésképpen az afamin/HDL és afamin/ApoA1 arányok nem változtak szignifikánsan. A kiindulási afamin szint szignifikánsan magasabb volt a HeFH-s betegekben a kontrollokhöz képest. Azt találtuk, hogy az α - és γ -tokoferol szintek jelentősen csökkentek (34,1 és 32,9%-kal) a betegekben az LDL aferezis kezelés hatására, míg az α -tokoferol/összkoleszterin és γ -tokoferol/összkoleszterin arány szignifikánsan emelkedett (41,4 és 40,3%-kal). A kiindulási α - és γ -tokoferol szintek szignifikánsan magasabbak voltak a betegekben az egészséges kontrollokhöz viszonyítva. Ezzel ellentétben az α -tokoferol/összkoleszterin és γ -tokoferol/összkoleszterin arányok a kezelés előtt a kontrollokhöz hasonlóak voltak a betegeknek.

A kiindulási oxidált LDL szint szignifikánsan magasabb volt a betegekben a kontrollokhöz képest. Továbbá a kezelés során

az oxidált LDL szint szignifikánsan csökkent (-57,4%) a betegeknel. A kis HDL részecskék aránya szignifikánsan csökkent, míg a nagy HDL részecskék aránya némileg nőtt, ezzel az aferezis kezelést követően egy eltolódást eredményezve a nagyobb méretű HDL szubfrakciók irányába. A kiindulási kis HDL részecske arány szignifikánsan magasabb, míg a kiindulási nagy HDL részecske arány szignifikánsan alacsonyabb volt az HeFH betegekben az egészséges kontrollokhoz képest.

A szelektív LDL aferezis hatása további pro- és anti-atherogén hormonszerű peptidek szintjére

A szelektív LDL aferezis hatása a vizsgált pro- és anti-atherogén hormonszerű peptidek szintjére változó mértékű, de számos peptid, például az omentin-1 (-75,32%) és a vaspin (-58,53%) esetén igen kifejezett. Minden vizsgált peptid szintje csökkenést mutat, de az alacsony betegszám és a jelentős mértékű szórás miatt csak a visfatin, PEDF, omentin-1 és vaspin esetén bizonyult szignifikáns mértékűnek.

AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A szelektív LDL aferezis kezelés súlyos heterozigóta familiáris hiperkoleszterinemiás betegekben szignifikánsan csökkenti a szérumban a chemerin szintjét az első kezelés során. A csökkenésért a chemerin kikötődése az LDL aferezis során használt adszorber oszlophoz a felelős. Egy beteg esetét vizsgálva az LDL aferezis kezelés hosszútávon is hatékonyan csökkenti a chemerin szérumban szintjét.
2. A szérumban az afamin szintje mérsékelten csökken az első szelektív LDL aferezis kezelés hatására. A betegek kiindulási afamin szintje szignifikánsan magasabb a kontrollokhoz képest. Az LDL aferezis során használt adszorber oszlop kimutatható mennyiségben nem képes megkötni az afamint.
3. A szérumban az α - és γ -tokoferol szintje jelentősen csökken az első LDL aferezis kezelés során, ezzel szemben az α -tokoferol/összkoleszterin és a γ -tokoferol/összkoleszterin arány szignifikánsan emelkedik a kezelés hatására. A kiindulási α - és γ -tokoferol szintek szignifikánsan magasabbak a betegekben, ugyanakkor az α -tokoferol/összkoleszterin és a γ -tokoferol/összkoleszterin arány hasonló a betegekben és kontrollokban a kezelés előtt.
4. Az LDL aferezis kezelés jelentősen csökkenti a kisebb és sűrűbb LDL szubfrakciók szintjét Lipoprint módszerrel vizsgálva. A kisebb HDL partikulumok aránya szignifikánsan csökken, míg a nagy HDL partikulumoké kissé nő, így a HDL

szubfrakciók aránya a nagyobb méretű részecskék irányába tolódik el.

5. Az egyéb vizsgált hormonhatású peptidek (adiponektin, leptin, vaspin, omentin, RBP4, PEDF, visfatin és obestatin) szérumszintje is csökken a kezelés hatására, de a változás csak a visfatin, PEDF, omentin-1 és vaspin szintek esetén szignifikáns mértékű.

MEGBESZÉLÉS

Az előzetes adatokkal megegyezően a szelektív LDL aferezis kezelés jelentősen csökkentette az LDL-C és Lp(a) szinteket FH betegekben. Ismert, hogy az LDL aferezis egyéb, az érlemeszesedés ellen védő pleiotróp hatásokkal is rendelkezik azáltal, hogy csökkenti számos proinflammatorikus peptid plazma koncentrációját, beleértve citokineket, kemokineket, adhéziós faktorokat és a C-reaktív proteint is. Habár ezeknek a folyamatoknak a mechanizmusa még nem ismert, felmerül a felülethez történő direkt kötődés, gén transzkripción és transláción keresztül történő indirekt változások szerepe is. Dihazi és munkatársai LDL aferezis előtti és utáni szérum mintákat hasonlított össze proteomikai vizsgálattal. Több, mint 70 funkcionális peptid szignifikáns csökkenését írták le, beleértve olyan fehérjéket, amelyek a véralvadási rendszer részei, valamint olyanokat, melyek adhéziós, reológiai és gyulladásozó szereppel bírnak. Arra a következtetésre jutottak, hogy kezelés közben erős kölcsönhatás van az oszlop és egyes szérumfehérjék között, míg mások különféle molekulák módosult génexpresszióját írták le az aferezis kezelést követően.

A chemerin egy, a fehér zsírszövet által termelt proinflammatorikus, ezáltal pro-atherogénnek tartott szérum fehérje. Legjobb tudomásunk szerint az LDL aferezis hatását szérum chemerin szintekre korábban nem vizsgálták. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a szérum chemerin szint a szelektív LDL aferezis után jelentősen csökkent az HeFH-s betegekben. Szintén bemutattuk - habár csak egy beteg esetén -, hogy a folyamatos kezelés szükséges

ahhoz, hogy a szérum chemerin szint tartósan alacsonyabb maradjon. Az LDL-C szint csökkentésén túl a keringésben lévő chemerin koncentráció csökkentése az LDL aferezis kezelés további hasznos hatása lehet a chemerin feltételezett proinflammatorikus és pro-atherogén tulajdonságai miatt. Mivel jelenleg az LDL aferezis a súlyos hiperlipidémiáknak nem széles körben alkalmazott kezelése, vizsgálatainkat limitált betegszámon végeztük. Természetesen indokolt a jövőben nagyobb betegpopulációkon további vizsgálatok elvégzése, hogy alátámasszuk az LDL aferezis a chemerin szintre kifejtett rövid- és hosszú távú hatásait.

LDL aferezis kezelés után szignifikáns mennyiségű chemerint tudunk eluálni az aferezis oszlopról. Mindez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a chemerin fizikailag kötődhet az aferezis oszlophoz, habár a kötődés pontos mechanizmusa nem ismert. Az irodalomban ugyan nincs információ a chemerin töltéséről, de feltételezhetjük, hogy hasonlóan az ApoB100 tartalmú, pozitívan töltött lipoprotein részecskékhez, a chemerin is direkt módon kötődhet az oszlophoz. Másfelől az is lehetséges, hogy a chemerin a pozitív töltéssel rendelkező lipoprotein részecskékhez kapcsolódik, és ezáltal indirekt módon kötődik az adszorber oszlophoz. A kötődés pontos mechanizmusának feltárására további vizsgálatok szükségesek.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az LDL aferezis kezelés a kicsi, denz, különösen pro-atherogén LDL szubfrakció lecsökkenésével jár, és a szubfrakciós mintázatot egy sokkal kevésbé atherogén irányba változtatja meg. Vizsgálatunkban azt találtuk,

hogy az LDL szubfrakciók mind mennyiségben, mind arányaiban kedvezően változtak az aferezis kezelést követően, elérve a kicsi, denz, erősen atherogén LDL szubfrakciók erőteljes csökkenését. A kis, denz LDL szubfrakciók fokozottan érzékenyek az oxidatív módosításokra, ezért kulcsfontosságúak az ateroszklerózis folyamatának elindításában és progressziójában. Így ezeknek a szubfrakcióknak a csökkentése a magas kockázatú betegcsoportokban kiemelt fontosságú lehet. A fenti eredmények alapján az aferezis kezelés lipid szubfrakciókra kifejtett hatása hozzájárulhat a chemerin szint jótékony csökkenéséhez.

Az oxidatív folyamatok kiemelt szerepet játszanak az érlelmeszesedés kialakulásában, ugyanis az LDL oxidatív módosulása révén jelentős szerepük van az érfali habos sejtek, majd a plakk kialakulásában. Továbbá a HDL részecskék oxidatív módosulása csökkenti a HDL érlelmeszesedéssel szembeni védő hatását. Ezért az antioxidáns hatásúnak tartott vitaminok, például az E-vitamin szerepét évtizedek óta intenzíven tanulmányozzák. Az E-vitaminként ismert tokoferolok a lipoproteinek egyik legfontosabb antioxidánsának számítanak.

Az afamin egyike az E-vitamin szállításban szerepet játszó szérum fehérjéknek, így szintje lényeges lehet az E-vitamin szérumszintjének fenntartásában. Emellett az afamin részt vesz a sejtek apoptózisának és oxidatív folyamatainak szabályozásában. Szérum szintje markere pl. a 2-es típusú diabetesnek és a terhesség alatt észlelt metabolikus változásoknak. Emellett az afaminhoz kötődnek egyes ún. Wnt fehérjék, melyek fontos szerepet játszanak

az őssejt regeneráció, a csontképződés, immunszabályozás és a daganatképződés folyamatának szabályozásában. Az FH-ra a fokozott oxidatív stressz és felgyorsult érlelmeszedés mellett jellemző a csontképződés minőségi zavara is, elsősorban a csontsűrűség csökkenése, így ebben a betegségben az afamin szint vizsgálata különösen fontos lehet. Az LDL aferezis kezelés hatását szérumban afamin szintekre eddig még nem vizsgálták. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy FH betegekben a szérumban afamin szint lecsökkent az LDL aferezist követően, de csökkenés mértéke csupán átlagosan 9,4% volt. Ezzel párhuzamosan a HDL-C és ApoA1 szint szintén csökkent 10,5 és 14,1%-kal. Mindez utalhatna arra, hogy az afamin csökkenése a HDL és ApoA1 szint csökkenéséből adódik. Valójában az afamin mindössze 13%-a keringő HDL-hez kötött formában, így ez önmagában nem magyarázza az afamin szint csökkenését. Ugyanakkor korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy az afamin döntően a kicsi, denz HDL részecskékhez asszociálva kering. Így a saját vizsgálatunk által is igazolt eltolódás a nagyobb HDL szubfrakciók irányába hozzájárulhat az afamin szint csökkenéséhez a kezelés során. Az oszlopról a kezelés végén leoldott eluátumban nem sikerült afamint kimutatni, melyből arra következtethetünk, hogy az aferezishez használt oszlop valószínűleg közvetett módon távolítja el a lipoproteinhez kötött afamint, és direkt kikötődés az oszlop felületén nem jön létre.

Az afaminról leírták, hogy *in vitro* és *in vivo* kötődik az E-vitaminhoz több kötőhelyen keresztül. Különösen nagy affinitással kötődik az α - és γ -tokoferolhoz, amelyek a legfontosabb E-vitamin

formák. Ezért feltételeztük, hogy a korábbi vizsgálatokban leírt szelektív LDL aferezist követő α - és γ -tokoferol csökkenést az afamin szint csökkenés okozhatja. Összhangban az eddigi eredményekkel azt találtuk, hogy az α - és γ -tokoferol szint jelentősen csökkent az FH-s betegekben az LDL aferezis kezelést követően. Az α -tokoferol/összcholeszterin és γ -tokoferol/összcholeszterin arány szignifikánsan emelkedett, mivel a koleszterinszint csökkenése kifejezettebb volt, mint a tokoferol szinteké. Az α - és γ -tokoferol szint csökkenésének mértéke szignifikánsan kifejezettebb volt az afamin szint csökkenéshez képest. Érdekes módon az FH-s betegek α - és γ -tokoferol szintjének csökkenése legjobban az LDL-C szint csökkenésével korrelált, és nem az afamin szint csökkenésével. Ezen eredmények alapján az afamin szintje nem meghatározó tényező az α - és γ -tokoferol szérumszintjeinek alakulásában. Az afamin aránylag szerény, míg az oxidált LDL markáns csökkenése közvetett bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az afamin nem kötődik az oxidatív módon módosult LDL részecskékhez. A betegek magasabb α - és γ -tokoferol szintje az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva egybevégtelenül korábbi vizsgálatok eredményeivel, amelyek magasabb E-vitamin szinteket írtak le hiperlipidémia esetén. Ezzel ellentétben egy másik tanulmány megállapította, hogy az FH betegek abszolút α -tokoferol szintje hasonló volt az egészséges kontrollokéhoz, míg az α -tokoferol/összcholeszterin arány jelentősen alacsonyabb volt FH-s betegekben. A genetikai heterogenitás és az eltérő lipidcsökkentő gyógyszeres kezelés magyarázhatja az egyes vizsgálatok közötti különbségeket. Az E-vitamin magas zsírolékonysága miatt a

tokoferol szint összkoleszterin szinthez viszonyított aránya a szérumban antioxidáns potenciáljának jobb indikátora lehet, mint a teljes tokoferol szint. Az aferezis utáni emelkedett α -tokoferol/összkoleszterin és γ -tokoferol/összkoleszterin arány jelezheti a szérumban antioxidáns potenciáljának emelkedését FH-s betegekben.

FH-s betegek esetében szignifikáns csökkenést találtunk az oxidált LDL szintben az LDL aferezis kezelést követően, ami az aferezis oxidatív folyamatokra kifejtett kedvező hatását jelzi. Ezen megfigyelésünk egybevág a korábbi irodalmi adatokkal. Vizsgálatunkban a betegek oxidált LDL szintje a kezelést követően még a kontrollokénál is alacsonyabb volt. LDL aferezis kezelés során az oxidált LDL szint kifejezett csökkenése, valamint az α - és γ -tokoferol/összkoleszterin arány emelkedése alapján arra következtethetünk, hogy az oxidált LDL nem csupán afaminban szegény, de kevés α - és γ -tokoferolt is tartalmaz FH betegekben. Ez azt sugallja, hogy az FH betegekben a magasabb α - és γ -tokoferol szint ellenére az oxidált LDL szubfrakciókban az α - és γ -tokoferol funkcionális hiánya alakulhat ki.

LDL aferezis során eltolódást tapasztaltunk a nagyobb HDL-szubfrakciók irányába. A HDL szubfrakciók aferezis során jelentkező változásait kevesen vizsgálták, és előzőleg különböző módszereket alkalmaztak a mérésekre, ezért ezeket az eredményeket nehéz összehasonlítani. Egy korábbi tanulmányban azt írták le, hogy az LDL aferezis csökkenti a pre- β 1-HDL szintjét familiáris hiperkoleszterinémiában, ami a koleszterin efflux kapacitás átmeneti

kimerülését okozhatja. A megfigyelés hosszú távú klinikai jelentősége nem tisztázott. Vizsgálatunkban FH-s betegekben a kis HDL részecskék aferezis előtti aránya szignifikánsan magasabb volt, míg a kiindulási nagy HDL részecskék aránya szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az egészséges kontrollokéhoz képest. Ezt az eltolódást a kisméretű HDL részecskék irányába az aferezis kezelés részben korigálta, rámutatva arra, hogy az aferezis kedvező hatással lehet a gél-elektroforézissel mért HDL szubfrakciók megoszlására.

Vizsgálatainkat illetően korlátozó tényező lehet a bevont egyének viszonylag kis száma, mely csökkentti tanulmányunk statisztikai erejét. Ugyanakkor eredményeink hangsúlyozzák az aferezis kezelés non-lipid hatásainak potenciális jelentőségét. Továbbá a vizsgálatba bevont FH betegek kombinált statin és ezetimib kezelésben részesültek, amely befolyásolhatja az α - és γ -tokoferol szinteket. Meg kell azonban jegyezni, hogy az orális lipid csökkentő kezelések felfüggesztése ezekben a súlyos esetekben nem elfogadható.

A szelektív LDL aferezis kezelés chemerin és afamin szintekre gyakorolt hatását látva egyéb biológiailag aktív, hormonhatású fehérjék vizsgálatát is elvégeztük. A vizsgált peptidok között az érlemeszesedés szempontjából védő és kedvezőtlen hatásúak egyaránt szerepeltek. A várakozásnak megfelelően minden vizsgált peptid szérum szintje csökkent az LDL aferezist követően, de a csökkenés mértékében észlelt különbségek igen szembetűnőek. A csökkenés a pro-atherogén visfatin és PEDF, illetve az anti-

atherogén omentin-1 és vaspin esetén bizonyult szignifikáns mértékűnek. Mivel ezek a fehérjék egymásra is szabályozó hatást fejtenek ki, egyfajta hálózatot képezve a szabályozási folyamatokban, a jövőben indokolt lenne komplex formában történő vizsgálatuk. Eredményeink arra utalnak, hogy ez a szelektívnek gondolt extrakorporális eljárás sokkal jelentősebb és változatosabb hatást fejthet ki a betegekben, mint azt korábban feltételeztük. Az LDL aferezis kezelés lipidszintek csökkentése mellett módosítja az zsírszöveti, gasztrointesztinális és hepatikus eredetű bioaktív fehérjék arányát, mely további metabolikus módosulások kialakulásához vezethet.

ÖSSZEFOGLALÁS

A familiáris hiperkoleszterinémia (FH) egy veleszületett genetikai kórkép, mely jelentősen emelkedett szérumszintű low-density lipoprotein (LDL)-koleszterin (LDL-C) szinttel jár. A szelektív LDL aferezis egy extrakorporális lipidcsökkentő eljárás, mely jelentősen csökkenti az LDL-C szintjét. A lipidcsökkentésen túl az LDL aferezis egyéb kedvező, például anti-atherogén, antitrombotikus és anti-inflammatorikus hatásokkal is rendelkezik. Csökkenti emellett számos hormonhatású pro-és anti-inflammatorikus peptid és citokin szintjét. Eddig csak néhányan vizsgálták az LDL aferezis adipokin szintekre kifejtett hatását. A chemerin egy adipokin, mely az adipogenezist, a lipid- és glükóz anyagcserét szabályozza. Bár a zsírszövet és az emésztőrendszer által termelt hormonszerű peptidok szerepe egyre nyilvánvalóbb, számos adat, köztük a chemerin szintek változása sem ismert az LDL aferezis kezelés hatására. Az E-vitamin egy antioxidáns, melynek kedvező hatását feltételezik az érlemezés megelőzésében és kezelésében. A leginkább ismert formái az α - és γ -tokoferol. A humán afamin egy szérumszintű glikoprotein, melyet az E-vitamin specifikus kötő fehérjeként ismerünk, így az E-vitamin testnedvekben történő szállításáért felelhet. Az afamint főként a máj termeli, majd a keringésben részben az apolipoprotein A1 (ApoA1)-t hordozó high-density lipoprotein (HDL) szubfrakciókhoz kötött. Az LDL aferezis hatására bekövetkező afamin szint változását eddig nem vizsgálták.

Hormonhatású peptidek (chemerin, leptin, adiponektin, visfatin, PEDF, omentin-1, obestatin, vaspin, RBP4), az afamin és az oxidált LDL szérumszintjét vizsgáltuk ELISA módszerrel hat súlyos heterozigóta FH betegben közvetlenül életük első szelektív LDL aferezis (DALI) kezelése előtt és után. Az afamin és E-vitamin szinteket nembn és korban illesztett kontrollokban is lemértük. Vizsgáltuk emellett a lipidszintek, az LDL és HDL szubfrakciók, valamint az α - és γ -tokoferol szintjének változását a kezelés hatására. Az LDL és HDL szubfrakciókat gélelektroforézissel (Lipoprint) vizsgáltuk. A szérumszinteket α - és γ -tokoferol szinteket gázkromatográfiatömegspektrométerrel detektáltuk. A DALI oszlophoz kötött chemerint eluáltuk és szintjét meghatároztuk.

Az első LDL aferezis kezelést követően szignifikánsan csökkent a szérumszintje chemerin és oxidált LDL szintje (27,26%-kal, ill. 57,4%-kal). Hogy igazoljuk a chemerin DALI oszlophoz kötődését, a fehérjét különböző pH-jú acetát puffer oldatokkal eluáltuk. Az eluátumok mindegyikében sikerült chemerint kimutatni. Szignifikánsan több fehérje eluálódott a magasabb pH-jú puffer oldatokkal ($p < 0,01$).

Az első kezelés átlagosan csupán 9,4%-kal csökkentette a szérumszintjét afamin szintjét. Ezzel párhuzamosan 10,5%-kal, ill. 14,1%-kal csökkent a HDL és az ApoA1 szintje. A kiindulási afamin szint szignifikánsan magasabb volt a betegekben a kontrollokhoz képest. Míg az α - és γ -tokoferol szintek jelentősen csökkentek, az α -tokoferol/összcholeszterin és a γ -tokoferol/összcholeszterin arányok szignifikánsan emelkedtek a kezelés hatására. A kiindulási α - és γ -

tokoferol szintek szignifikánsan magasabbak voltak a betegekben, ugyanakkor az α - tokoferol/összkoleszterin és a γ - tokoferol/összkoleszterin arányok hasonlóak voltak a betegekben és kontrollokban a kezelés előtt. Az egyéb vizsgált hormonhatású peptidek szérumszintje is csökkent a kezelés hatására, de a változás csak a visfatin, PEDF, omentin-1 és vaspin szintek esetén volt szignifikáns mértékű. Az LDL aferezis kezelés jelentősen csökkentette a kisebb és sűrűbb LDL szubfrakciók szintjét. A kisebb HDL partikulumok aránya jelentősen csökkent, míg a nagy HDL partikulumoké kissé nőtt, így a HDL szubfrakciók aránya a nagyobb méretű részecskék irányába tolódott el.

Igazoltuk az LDL aferezis kezelés jelentős hatását számos keringő hormonhatású peptid, köztük a chemerin szérumszintjére. Demonstráltuk, hogy a chemerin csökkenés hátterében annak a kezelés során a DALI oszlophoz történő kikötődése áll. Eredményeink arra utalnak, hogy az α - és γ -tokoferol a keringésben elsősorban a lipoproteinekhez és kevésbé egyéb hordozó fehérjékhez, például az afaminhoz kötődik, amelynek szintje alig csökken az aferezis kezelés során. Az LDL aferezis ezen további, nem lipid hatásai hozzájárulhatnak a kardiovaszkuláris kockázat csökkentéséhez FH betegekben.

Vizsgálatainkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA 115723) támogatta. Készült a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 „A magyar gazdaság versenyképességének növelése a lakosság egészségi állapotát javító népegészségügyi intervenciók célcsoportjainak és tartalmának azonosítása révén” című projekt támogatásával.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/324/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Varga Viktória Evelin
Neptun kód: O750P3
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 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
- Varga, V. E.**, Lőrincz, H., Zsiros, N., Fülöp, P., Seres, I., Paragh, G., Balla, J., Harangi, M.: Impact of selective LDL apheresis on serum chemerin levels in patients with hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* 15 (182), 1-7, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-016-0353-x>
IF: 2.073

További közlemények

- Szentpéteri, A., Lőrincz, H., Somodi, S., **Varga, V. E.**, Paragh, G. J., Seres, I., Paragh, G., Harangi, M.: Serum obestatin level strongly correlates with lipoprotein subfractions in non-diabetic obese patients. *Lipids Health Dis.* 17 (1), 1-27, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0691-y>
IF: 2.651
- Zádori, D., Szpisjak, L., Madar, L., **Varga, V. E.**, Csányi, B., Bencsik, K., Balogh, I., **Harangi, M.**, Kereszty, É., Vécsei, L., Klivényi, P.: Different phenotypes in identical twins with cerebrotendinous xanthomatosis: case series. *Neuro. Sci.* 38 (3), 481-483, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-016-2776-6>
IF: 2.285





5. Szentpéteri, A., Zsíros, N., **Varga, V. E.**, Lőrincz, H., Katkó, M., Seres, I., Fülöp, P., Paragh, G., Harangi, M.: Paraoxonase-1 and myeloperoxidase correlate with vascular biomarkers in overweight patients with newly diagnosed untreated hyperlipidaemia. *VASA-J. Vasc. Dis.* 46 (5), 370-376, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000643>
IF: 1.21
6. Szilasi, M. E., Pák, K., Kardos, L., **Varga, V. E.**, Seres, I., Mikáczó, A., Fodor, A., Szilasi, M., Tajti, G., Papp, C., Gesztelyi, R., Zsuga, J.: The alteration of irisin - brain-derived neurotrophic factor axis parallels severity of distress disorder in bronchial asthma patients. *Front. Neurosci.* 11, 1-12, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2017.00653>
IF: 3.877
7. Zsíros, N., Koncsos, P., Lőrincz, H., Seres, I., Katkó, M., Szentpéteri, A., **Varga, V. E.**, Fülöp, P., Paragh, G., Harangi, M.: Paraoxonase-1 arylesterase activity is an independent predictor of myeloperoxidase levels in overweight patients with or without cardiovascular complications. *Clin. Biochem.* 49 (12), 862-867, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.03.011>.
IF: 2.434
8. **Varga, V. E.**, Katkó, M., Harangi, J., Balogh, I., Kapás, I., Madar, L., Seres, I., Molnár, M. J., Paragh, G., Kovács, G. G., Harangi, M.: Egy ritka, veleszületett neurodegeneratív betegség: a cerebrotendinosus xanthomatosis laboratóriumi diagnosztikája. *Orv. Hetil.* 155 (21), 811-816, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29887>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,618

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,161

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

Debrecen, 2019.09.24.

