

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A progranulin szint összefüggése a szénhidrát és lipidanyagcsere, valamint a gyulladásos folyamatok markereivel familiáris hiperkoleszterinémiás és diabeteses polineuropathiás betegekben

dr. Ruzsnavszkyné dr. Nádró Bíborka

Témavezető: Dr. Harangi Mariann



DEBRECENI EGYETEM

Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

**A progranulin szint összefüggése a szénhidrát és lipidanyagcsere,
valamint a gyulladásos folyamatok markereivel familiáris
hiperkoleszterinémiás és diabeteses polineuropathiás betegekben**

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

Írta: dr. Ruzsnavszkyné dr. Nádró Bíborka okleveles általános orvos

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

Témavezető: Dr. Harangi Mariann

Az értekezés bírálói:

Dr. Csajbók Éva PhD
Lajszné Dr. Tóth Beáta PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Márk László PhD
Prof. Dr. Oláh László, az MTA doktora
Dr. Csajbók Éva PhD
Lajszné Dr. Tóth Beáta PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet
A Épület Tanterme
2023. szeptember 28. 13 óra

Bevezetés

A kardiovaszkuláris megbetegedéseket (CVD) évtizedek óta vezető halálökként tartják számon hazánkban és a világ legtöbb fejlett országában. Bár a CVD hátterében álló érlelmeszesedés az életkor előrehaladtával csaknem az egész populációt érinti, bizonyos kórképek, közülük a familiáris hiperkoleszterinémia (FH) és a 2-es típusú diabetes mellitus (T2DM) esetén jelentősen nagyobb arányban és korábbi életkorban jelenik meg és vezet az ateroszklerotikus érszövődmények kialakulásához. A fokozott kardiovaszkuláris kockázata miatt ezekben a kórképekben fokozott jelentőséggel bírnak azon laboratóriumi markerek, melyek jelezhetik az érlelmeszesedés fokát, elősegíthetik a kiemelten nagy kockázatú betegcsoportok azonosítását, vagy segítséget nyújthatnak a gyógyszeres terápiára adott válasz mértékének előrejelzésében. E fehérjék felfedezése és szerepük megismerése emellett elősegítheti jövőbeni új gyógyszeres terápiás lehetőségek feltérképezését is. Bár az utóbbi évtizedekben intenzív kutatások zajlottak ilyen molekulák (főként fehérjék) azonosítása céljából, a mindennapi orvosi tevékenység során is alkalmazható biomarkerek száma és felhasználhatósága korlátozott.

A kiterjedt kutatások eredményeként ugyanakkor világossá vált, hogy az érlelmeszesedés kialakulása során a lipid- és szénhidrát anyagcsere zavara, a krónikus gyulladásos és immunfolyamatok, az oxidatív stressz, valamint az ezek következtében kialakuló endothel diszfunkció, érfali gyulladás, plakképződés, a plakk instabillá válása és a thrombusképződés folyamata egymással igen szorosan összefügg, és a szabályozási folyamatok gyakran komplex módon zajlanak, kölcsönösen befolyásolva az egyes komponensek súlyosbodását. E komplex szabályozási folyamat egyik újonnan felismert szereplője a progranulin (PGRN), melyet kezdetben növekedési faktorként azonosítottak, és főként a neurodegeneratív kórképek kialakulása kapcsán tanulmányoztak. Mára azonban világossá vált, hogy a PGRN-nak szerteágazó szerepe van a szervezet működésének számos területén, közöttük az endothel sejtek és az idegsejtek regenerációja során. A PGRN szerepéről azonban alig állt rendelkezésre adat a FH és a T2DM szövődményeként megjelenő diabeteses polyneuropathia esetén.

Irodalmi áttekintés

A progranulin (PGRN)

A PGRN, melyet proepithelin, granulin-epithelin precursor, és acrogranin néven is ismernek egy, a szervezet számos szövete és sejtje által expresszált növekedési faktorként azonosított fehérje. A kódolt PGRN egy 593 aminosavból felépülő, 68,5 kDa molekulasúlyú, ciszteinben gazdag fehérje, mely erősen glikozilált formában szekretálódik. A PGRN-t számos sejttípus képes expresszálni, köztük az epithel sejtek, makrofágok, T-sejtek, neutrofil granulociták, neuronok, adipociták, fibroblasztok és kondrociták. A központi idegrendszerben a neuronok, asztrocitómák, mikroglia és endothel sejtek is termelik különböző stresszor hatások, például hipoxia, csökkent glükóz koncentráció, acidózis vagy oxidatív stressz hatására. A teljes PGRN fehérje mellett a különböző proteázok által végzett enzimátikus hasítás hatására létrejött 6 KDa méretű peptidek, ún. granulinok (GRN A-G) is aktív szereppel bírnak, főként a gyulladásos és a neuroprotektív folyamatok szabályozásában vesznek részt. A szekretórikus leukocita proteáz inhibitor (SLPI) direkt kötődése a PGRN fehérjéhez ugyanakkor meggátolja az enzimátikus hasítást. A HDL fő apolipoproteinje, az apolipoprotein A1 (ApoA1) komplexet képezve a PGRN molekulával ugyancsak gátolja a granulinná történő konverziót. . A fehérje multifunkcionális jellege hamar világossá vált. Számos, a szervezet szempontjából kulcsfontosságú biológiai és patológiai folyamatban felvetődött a szabályozó szerepe, többek között a sejtnövekedés és sejtosztódás, a sejtmigráció, a sejthalál és a regeneráció, valamint az angiogenezis, a lizoszomális homeosztázis szabályozása, a fagocita stimuláció, az immunsejt aktiváció, citokin termelés, illetve az inzulin rezisztencia szabályozása kapcsán. Mindezek hatására felmerült a szerepe a tumorigenezis, az embriogenezis, a sebgyógyulás és az idegsejt regeneráció folyamatában. A PGRN-ra specifikus receptor létezése jelenleg nem bizonyított. A PGRN ugyanakkor számos sejtfelszíni receptorhoz kötődik, melyek közül a tumor nekrosis faktor receptor 1 és 2 (TNFR1 és TNFR2) a fehérje anti-inflammatorikus szerepéért, míg a sortilin a neuronális hatásokért felelhet. A PGRN affinitása a TNF2 receptorhoz nagyobb, mint a tumor nekrosis faktor- α (TNF α)-é, és egyforma affinitással kötődik a TNFR1-hez és TNFR2-höz.

A PGRN szerepe az érlelmeszesedés kialakulásában

A PGRN érlelmeszesedésben betöltött szabályozó szerepével kapcsolatban egyre több adat áll rendelkezésre. ApoE knockout egerekben az PGRN deléciója fokozta az érlelmeszesedés kialakulását. A PGRN humán artéria carotis mintákban expresszáldott, és anti-inflammatorikus hatást fejtett ki. A PGRN szérum szintje az artéria carotis ateroszklerózis független prediktorának bizonyult, valamint az akut ischaemiás stroke-on átesett betegek esetén

az össz mortalitás és a funkcionális kimenetel előre jelzőjeként azonosították. Policisztás orvária szindrómás betegekben a kardiovaszkuláris kockázat új biomarkereként írták le. A PGRN fokozott termelődését írták le az érfali habos sejtekben és az intima vaszkuláris simaizom sejtjeiben humán érlemezsedéses plakk szöveti vizsgálata során. Emellett PGRN -/- ApoE -/- knockout egerekben súlyosabb lefolyású érlemezsedés megjelenését igazolták a PGRN +/- ApoE -/- egerekhez viszonyítva. A PGRN csökkentette a monocita kemoattraktáns fehérje-1 indukálta monocita kemotaxis és a vaszkuláris simaizomsejtek interleukin-8 termelését. Ugyanakkor a PGRN hiánya érlemezsedés kialakulását indukálta egerekben a gyulladásos citokinek és adhéziós molekulák termelésének fokozását, valamint az endotheliális nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) aktivitás mérséklését keresztül. Emellett a PGRN hiánya fokozta a makrofágok koleszterin akkumulációját.

A familiáris hiperkoleszterinémia

A familiáris hiperkoleszterinémia (FH) autoszómális, domináns öröklődésű kórkép, melyet a már gyermekkorától megfigyelhető jelentősen emelkedett összkoleszterin és low-density lipoprotein koleszterin (LDL-C) szint jellemez, mely korai generalizált érlemezsedéshez, és az ennek talaján kialakuló súlyos szövődmények, köztük iszkémiás szívbetegség, iszkémiás agyi infarktus és alsóvégtagi artériás érszűkület kialakulásához vezet. A heterozigóta formák előfordulása gyakori, korábban 1:500 gyakoriságúnak tartották, újabban azonban az európai populációban a prevalenciát jelenleg kb. 1:300-ra becsülik, de a gyakoriság elérheti az 1:200-at is. Egy adatbányászati módszereket alkalmazó korábbi vizsgálat során az Észak-Kelet Magyarország lakosság körében végzett vizsgálat során a heterozigóta FH (HeFH) prevalenciája 1:340. A homozigóták pedig 1:1.000.000-hoz valószínűséggel fordulnak elő az átlagnépességben. A betegség fontos jellemzője az érlemezsedés korai megjelenése, mely progresszív esetekben homozigóta formában már gyermekkorban, heterozigóta formában pedig fiatal felnőttkorban kardiovaszkuláris betegségek manifesztációját okozza. A FH kezelésében az utóbbi évtized forradalmi változásokat hozott. Mind a heterozigóta, mind a homozigóta FH esetében új hatásmechanizmusú szerek kerültek klinikai forgalomba. A heterozigóta FH esetén a nagy intenzitású statin (rosuvastatin napi 20-40 mg vagy atorvastatin 40-80 mg) és napi 10 mg ezetimib kezelés mellé adott PCSK9 gátló monoklonális antitestek (evolocumab és alirocumab) és small interfering RNS (inclisiran) készítmények jelentős mértékben háttérbe szorították a korábban széles körben alkalmazott extrakorporális kezelés formát, a szelektív LDL aferezis kezelést.

Diabeteses polineuropathia

A 2-es típusú diabetes mellitus mikrovaszkuláris szövődményei közül a neuropathiás szövődmények igen gyakoriak, és a szervezet bármely részét érinthetik. A négy fő típusa a perifériás neuropathia, a proximális neuropathia, a fokális neuropathia és az autonóm neuropathia, melyek közül a perifériás forma a leggyakoribb. Ugyanakkor az autonóm neuropathia, és ezen belül a kardiális autonóm neuropathia kialakulása szintén jelentős mértékben befolyásolja a betegek életminőségét és életkilátásait.

A 2-es típusú diabeteses betegek neuropathiájának kialakulása komplex folyamat, melyben a magas vércukorszint okozta ozmotikus károsodás, a felgyorsult glikolízis, az alternatív anyagcsere útvonalak (poliol-útvonal, protein kináz-C (PKC)-útvonal és fokozott glikált végtermék (AGE)-útvonal és a hexózamin útvonal) aktivációja, a csökkent antioxidáns kapacitás, a reaktív oxigén szabadgyökök (például a szuperoxid ($\bullet\text{O}_2^-$) anion) termelés következtében kialakuló oxidatív stressz, a fokozott nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidáz aktivitással és poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációval járó mitokondriális oxidáció károsodása, az endotheliális diszfunkció, valamint a nukleáris faktor-kappa B (NF κ B) útvonal és a ciklooxygenáz-2 (COX-2) aktivációja által kiváltott lokális gyulladásos folyamatok kialakulása játszik kulcsszerepet. Ehhez járulnak hozzá a különböző növekedési faktorok és genetikai tényezők, melyek végül az idegrostok károsodásának kialakulásához vezetnek. A diabeteses neuropathia a 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegek mintegy 15%-ban kimutatható már a diagnózis felállításának pillanatában, és a 10 éves betegségtartam során a betegek kb. 50%-ban okoz panaszt. A diabeteses neuropathia incidenciája az életkor előrehaladtával jelentősen növekszik. Leggyakoribb tünetei a fokozatosan kialakuló bizsergés, tűszúrásszerű érzés, égő fájdalom az érintett ideg lefutása mentén zsibbadás, fokozódó érzéketlenség. A vibrációérzésről (mélyérzésről) a kalibrált hangvillával történő szűrővizsgálat ad felvilágosítást, mely a vastag mielinizált rostok működését jellemzi. A monofilamentum teszt pedig a felületes érzés és a vékony idegrostok vizsgálatára szolgál. A szenzoros működés vizsgálatára alkalmas a Neurométerrel (Neurometer®) történő eszközös vizsgálat, ami a vastag és vékony mielinizált, valamint a nem mielinizált vékony szenzoros rostok vizsgálatát teszi lehetővé. A módszer kvantitatív eredményt ad, így alkalmazása lehetővé teszi a kezelés hatékonyságának követését. A perifériás neuropathia gyakran társul, akár tünetmentes formában is kardiális autonóm neuropathiával, melynek vizsgálatára a Ewing-féle kardiális autonóm reflex tesztek a mai napig standard módszernek számítanak a klinikai gyakorlatban. Az öt reflexteszten belül két nagy csoportot különíthetünk el. A paraszimpatikus beidegzés működését a mélylégzéses vizsgálat,

a Valsalva-manőver és fekvésből hirtelen felálláskor szívfrekvenciaváltozás mérésével vizsgáljuk. A fekvésből való felálláskor és a kézizom-szorító vizsgálat (handgrip test) során a vérnyomásértékek változása elsősorban a szimpatikus idegrendszer működéséről nyújt számunkra információt.

A diabeteses neuropátia terápiájának legfontosabb elemei a glikémiás kontroll javítása, az életmód kezelés és a neuropathiás fájdalom csökkentése. Az életmód kezelésén belül különösen fontos elem a diéta, a rendszeres fizikai aktivitás, a lipidszintek és a vérnyomás megfelelő kontrollja. A betegség lefolyását befolyásoló szerek a kórkép pathomechanizmusát célozzák. Ide tartozik az alfa-liponsav és a benfotiamin, valamint az omega-3 zsírsavak és az aldóz reduktáz gátló szerek. A fájdalom csökkentésében a szerotonin és noradrenalin újrafelvételt gátló szerek (duloxetin, velsafin), a triciklikus antidepresszánsok (amitriptilin, nortriptilin, desipramin, imipramin), az antikonvulzív szerek (pregabalin, gabapentin), illetve ezek hatástalansága esetén az opioid analgetikumok alkalmazhatóak. A diabeteses neuropátia terápiájának legfontosabb elemei a glikémiás kontroll javítása, az életmód kezelés és a neuropathiás fájdalom csökkentése. Az életmód kezelésén belül különösen fontos elem a diéta, a rendszeres fizikai aktivitás, a lipidszintek és a vérnyomás megfelelő kontrollja. A betegség lefolyását befolyásoló szerek a kórkép pathomechanizmusát célozzák. Ide tartozik az alfa-liponsav és a benfotiamin, valamint az omega-3 zsírsavak és az aldóz reduktáz gátló szerek. A fájdalom csökkentésében a szerotonin és noradrenalin újrafelvételt gátló szerek (duloxetin, velsafin), a triciklikus antidepresszánsok (amitriptilin, nortriptilin, desipramin, imipramin), az antikonvulzív szerek (pregabalin, gabapentin), illetve ezek hatástalansága esetén az opioid analgetikumok alkalmazhatóak.

Az ALA számos klinikailag jelentős hatással rendelkezik. Részt vesz a glükóz és lipid anyagcsere, valamint a géntranszkripció szabályozásában. A GLUT4 transzporter aktivitásának fokozásán keresztül javítja a glükózfelvételt az izom- és zsírsejtekbe. Az ALA antioxidáns hatást fejt ki, mivel képes helyreállítani az intrinzik antioxidáns rendszert, ezen belül fokozza a glutation szintézisét. Emellett kelátot képezve hatékonyan képes a nehézfémek (vas, réz és cink) keringésből történő eltávolítására, melyek egyébként fokozzák az oxidatív stresszt. Sőt, egyéb antioxidánsokkal ellentétben az ALA mind a zsírdékony, mind a vízdékony komponensekkel képes reakcióba lépni. Az ALA, illetve annak redukált formája (dihidroliponsav – DHLA) képes a reaktív oxigén gyökök inaktivációjára. Az NFκB jelátviteli útvonal aktivációján keresztül pedig fokozza a nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) aktivitását, ugyanakkor gátolja a proinflammatorikus citokinek és adhézións molekulák termelődését.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a kezeletlen HeFH betegekben és az illesztett kontroll populációban

- a szérumban PGRN szint meghatározását,
- a PGRN szint összefüggésének vizsgálatát a szérumban lipid paraméterekkel,
- ezen belül a HDL és LDL szubfrakciók arányával,
- valamint a gyulladásos és endothel funkciós paraméterekkel.

Célul tűztük ki a perifériás polineuropathiás T2DM betegek kezelés előtt, valamint 3 hónapos napi 600 mg alfa-liponsav kezelését követően, illetve az illesztett kontroll populációban

- a szérumban PGRN szint meghatározását,
- a PGRN szint összefüggésének vizsgálatát a szérumban lipid paraméterekkel,
- az áramérzet küszöbértékének és a composite autonomic score (CAS) értékének változásával,
- valamint a gyulladásos és endothel funkciós paraméterekkel.

Betegek és módszerek

Vizsgálati populáció

HeFH betegek és kontroll csoport

Nyolcvanegy heterozigóta FH-s beteget és 33 kor- és nemhez illő egészséges kontroll alanyt vontunk be. A betegeket a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Klinika Lipid szakrendelőjében megjelentek közül választottuk ki. Minden FH-s beteg heterozigóta volt (HeFH) egy bizonyított LDL-receptor génmutációval szemben, vagy teljesítette a DLCN FH diagnosztikai kritériumait. A kontroll személyeket a klinikánk általános ambulanciájáról vontuk be. Az általános ambulanciánkra rutinszerűen beutalt betegek mintáit kontrollként használtuk. Csak olyan betegek mintáit választottuk kontrollként, akik nem szedtek gyógyszert, és akik korábban krónikus betegségben nem szenvedtek, és az elmúlt 3 hónapban nem kezelték őket akut betegséggel. Továbbá a controlokban a fizikális vizsgálat, az elektrokardiogram és a laboratóriumi vizsgálatok, beleértve a lipidparamétereket is, nem mutattak szignifikáns eltérést. Az 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegek nem vettek részt a vizsgálatban. Továbbá kizártuk az alkoholizmusban, ismert májbetegségekben, autoimmun és endokrin betegségben szenvedőket, valamint azokat, akik olyan neurológiai és hematológiai eltérésekkel rendelkeznek, amelyek perifériás polineuropátiával járhatnak. Várandós nőket és a rosszindulatú daganatos betegeket nem vontuk be a vizsgálatunkba. Minden résztvevőt tájékoztattunk a kutatásról és részvételi szándékukat illetően írásbeli beleegyezést adtak. A vizsgálati protokollt a helyi és regionális etikai bizottságok (DE RKEB/IKEB 4775-2017, időpont: 2020. április 3. és az ETT TUKEB 34952-1/2017/EKU, a beérkezés időpontja: 2017. június 30.) hagyták jóvá és a tanulmányt a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük el.

Diabetes mellitusban szenvedő, diabeteses neuropathiás betegek és kontroll csoport

Vizsgálatunkba 54 fő 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő, diabeteses neuropathiás beteget vontunk be (22 férfit és 32 nőt). Az átlag életkor $64,15 \pm 8,7$ év volt. Minden beteg 600 mg napi dózisban szedett Thiogammát® (alfa-liponsav) 6 hónapon keresztül. Minden beteg orális antidiabetikus (metformin, DDP4-gátló, szulfonilurea) kezelésben részesült, az inzulin terápiában részesülő betegek kizárásra kerültek. Az 1-es típusú diabeteses betegeket szintén kizártuk a vizsgálatból, valamint azokat is, akiknek az anamnézisében diabeteses nefropathia (eGFR <60 mL/min/1.73 m², perzisztáló albuminuria) vagy proliferatív retinopathia szerepelt. Továbbá kizártuk azokat a betegeket, akiknek ismert máj, endokrin vagy autoimmun betegségük volt vagy alkoholisták voltak. Kizártuk azokat hematológiai és neurológiai betegségekkel rendelkezőket, akiknek betegségük összefügghet perifériás neuropathia

kialakulásával. Nem vettük bele a vizsgálatba a dohányosokat, terheseket és a rosszindulatú daganatos betegségben szenvedőket sem. A súlyos pangásos szívelégtelenségben (NYHA: II–IV) szenvedőket, a miokardiális infarktuson átesett betegeket és a súlyos koronária betegségben szenvedőket is kizártuk. A betegek a DE Belgyógyászati Intézet Diabetológia szakrendeléséről kerültek kiválasztásra. A vizsgálatban minden résztvevő beteg írásbeli beleegyező nyilatkozatot írt alá. A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (DE RKEB/IKEB 4775-2017, időpont: 2020. április 3. és az ETT TUKEB 34952-1/2017/EKU, a beérkezés időpontja: 2017. június 30.).

Vérvétel és laboratóriumi paraméterek mérése

A vizsgálatba bevont betegektől és a kontrolloktól 12 órás éhezést követően vénás vérvétel történt. A szérum mintákat 10 perces 3500 g-n történő centrifugálással elválasztottuk 4 °C-on. A 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 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)) 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 °C-on helyezték el, és 2 hónapon belül felhasználtuk.

A progranulin és az aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) szérum szintek mérése

A szérum PGRN- és ADMA-koncentrációkat kereskedelmi forgalomban kapható kompetitív, enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálati (ELISA) kittel (BioVendor, Brno, Csehország és DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Németország) mértük 3,38–4,35 %-os intra-assay variabilitási koefficiens (CV)-kel és 6,36–7,99 %-os inter-assay CV-kel. PGRN intra-assay CV esetében 4,9–5,4 % és az inter-assay CV pedig 4,3–9,6 % volt. Az értékeket ng/ml-ben, illetve µmol/l-ben fejeztük ki.

A szérumban NO szint meghatározása

A NO szintjének meghatározását a Griess reakció (Green LC és mtsai, 1982) alapján határoztuk meg. A Griess reakció során a nitrit koncentrációt mérjük, ami jó mutatója az NO termelésnek. 300 µl deprotonizált plazmát azonos térfogatú Griess-reagenssel (a szulfanilamidot és az N- (1-naftil) etiléndiamin-dihidrokloridot 2,5% H₃PO₄-ben oldva, 0,5% és 0,05% oldatban feloldva, és közvetlenül felhasználás előtt 1:1 térfogatarányban összekeverve) 10 percig szobahőmérsékleten, sötétben. Az optikai denzitást spektrofotometriásan mértük 550 nm hullámhosszon. A nitrit koncentrációját nátriumnitrittel (10-100 µmol/l) határoztuk meg. Az értékeket µmol/l-ben fejeztük ki.

A TNFα szérumban szint mérése

A TNFα szérumban szintjét a kereskedelmi forgalomban lévő TNFα ELISA teszttel értékeltük (R&D Systems Europe Ltd., Abington, Anglia). A TNFα szintek mérését a gyártó ajánlásainak megfelelően végeztük. Az intra-assay CV-k 1,9–2,2%-os és az inter-assay CV-k 6,2 és 6,7% között mozognak. Az értékeket pg/ml-ben fejeztük ki.

Az oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein (oxLDL) szérumban szintjének mérése

Az oxLDL szérumban koncentrációját egy kereskedelmi szendvics ELISA kit (Mercodia AB, Svédország) alkalmazásával mértük. Szendvics technikán alapul, amelyben két monoklonális antitest irányul az oxidált apolipoprotein B molekula különálló antigén determinánsai ellen. Az oxLDL mérésére szolgáló intra- és inter-assay variabilitása 5,5–7,3 % és 4–6,2 %, szenzitivitása <1 mU/l volt.

A szolubilis intercelluláris adhéziós molekula-1 (sICAM-1), a szolubilis vaszkuláris adhéziós molekula-1 (sVCAM-1) és szolubilis CD40 ligand (sCD40L) szérumban szint mérése

A sICAM-1, sVCAM-1 és sCD40L szinteket kereskedelmi forgalomban lévő szendvics ELISA kitékkel (R&D Systems Europe Ltd., Abington, Anglia) mértük. A méréseket a gyártó utasításai szerint végeztük. Az intra-assay CV-k és inter-assay CV-k 3,7–5,2%, illetve 4,4–6,7% (ICAM-1), 2,3–3,6% és 5,5–7,8% (VCAM-1), 4,5–5,4% és 6,0–6,4% (sCD40L) voltak. Az értékeket ng/ml-ben adtuk meg.

A szérum mieloperoxidáz koncentráció mérése

Az mieloperoxidáz szérum koncentrációját egy kereskedelmi forgalomban kapható szendvics ELISA kittel (R&D Systems Europe Ltd., Abington, Anglia) mértük. A variációk intra- és inter-assay együtthatója 6,5-9,4% volt. Az ELISA vizsgálatot a gyártó utasításai szerint végeztük.

A PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitások meghatározása

A szérum PON1 arileszteráz aktivitást fenilacetát szubsztráttal (Sigma Aldrich, Magyarország) mértük, a fenilacetát hidrolízisét pedig szobahőmérsékleten 270 nm-en követtük. A szérum PON1 paraoxonáz aktivitást mikrotiter lemezen, kinetikus félautomatizált módszerrel határoztuk meg, szubsztrátként paraoxont (O,Odiethyl-O-p-nitrofenil-foszfát, Sigma-Aldrich, Magyarország) használva. A paraoxon hidrolízisét szobahőmérsékleten 405 nm-en vizsgáltuk.

A szérum LDL és HDL szubfrakciók meghatározása poliakrilamid gélelektroforézissel

Az LDL és HDL lipoprotein szubfrakciókat elektroforetikus módszerrel vizsgáltuk poliakrilamid gélen Lipoprint rendszerrel (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA). 25 µl szérumot adtunk a poliakrilamid gélcsövekhez, valamint 300, illetve 200 µl gél oldatot töltöttünk be egyenként, amely lipofil festékként szudán feketét tartalmaz. A csöveket szobahőmérsékleten 30 percig fotopolimerizáltuk, majd folyamatosan elektroforetizáltuk 3 mA/cső-vel. Minden elektroforézis kamra a gyártó által biztosított minőségellenőrzést foglalt magában (Lipasure Serum Lipoprotein Control, Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA). A fénytörési sávokat ArtixScan M1 digitális szkennelvel (Microtek International Inc., CA, USA) szkenneltük, és Lipoware szoftverrel elemeztük (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA).

Az LDL-szubfrakciós analízisben hét LDL-szubfrakciót vizsgáltunk. A nagy LDL (nagy LDL%) arányát az LDL1 és az LDL2 százalékanak összegeként határoztuk meg, míg a kis LDL (kis LDL%) arányát az LDL3-LDL7 összegeként határoztuk meg. Az LDL-szubfrakciók koleszterin koncentrációját úgy határoztuk meg, hogy a szubfrakciók görbéje (AUC) alatti relatív területet megszoroztuk a minta teljes koleszterinkoncentrációval. A számított teljes LDL-C, a Midbands C-A és az LDL-szubfrakciókra (LDL1-LDL7) vonatkozó koleszterin összegéből áll; és erősen korrelál a közvetlenül mért LDL-C-vel.

A HDL szubfrakciós analízisben tíz HDL szubfrakciót különböztettünk meg az LDL és az albumin csúcsok között, és három fő osztályba sorolták: nagy (HDL1-től HDL3-ig), közepes (HDL4-től HDL7-ig) és kis (HDL8-től HDL10-ig) HDL szubfrakciók. A HDL részzhalmazok

koleszterin koncentrációját Lipoware-rel számítottuk ki úgy, hogy a minták teljes HDL-C koncentrációját megszoroztuk a szubfrakciós sávok relatív AUC-jával.

A neuropathia vizsgálata a diabeteses betegeken

A perifériás neuropathiát minden betegnél részletesen kivizsgáltuk. A betegek kitöltötték a neuropathiás fájdalomra vonatkozó DN4 kérdőívet, minden betegnél végzetünk kvantitatív szenzoros vizsgálatot és megítéltük a vibrációérzést. A szenzomotoros polineuropathia diagnózisát szemész állította fel in vivo konfokális corneamikroszkópiát alkalmazva. Neurometer® (Neurotron Inc., Baltimore, Maryland, USA, 2002) alkalmazásával határoztuk meg a perifériás idegfunkciót az áramérzet-küszöbérték (CPT: current perception threshold) tesztelésével.

A Neurometer® egy transzkután elektromos stimulátor, amely CPT tesztelés során váltakozó áramú szinuszos ingereket hoz létre felszíni elektródások keresztül három különböző frekvencián: 5 Hz, 250 Hz és 2000 Hz. Értékeljük a kis nem mielinizált C-rostot, a kis mielinizált A β -rostot és a nagy mielinizált A β -rost funkciót. Az intenzitástartomány 0,01 és 9,99 milliamper között van (43). Az elektródákat a mutatóujj disztális phalanxára és a nagylábujj dorsalis oldalára helyeztük fel unilaterálisan. Az intenzitást addig növeltük, amíg a beteg fájdalommentes érzékelést nem tapasztalt. A Neurometer® a beteg reakciója alapján automatikusan beállította az adott betegnél az észlelési szintet. Ezek után minden betegnél 5-7 stimulust alkalmaztunk ezen a szinten felül vagy alul, a résztvevők pedig megmondták, hogy melyiket érezték erősebbnek. Miután elegendő helyes választ kaptunk meghatározható volt az adott betegnél az áramérzet küszöbértéke, melyet mA-ben adtunk meg.

Az autonóm funkciók értékelését a Ewing-féle standard kardiovaszkuláris reflex tesztekkel értékeltük, mely a mély belégzés és kilégzés során mért szívfrekvencia változást, a felálláskor észlelt szívfrekvencia változást (30/15 arány), a Valsava manőver során észlelt szívfrekvencia változást, a felálláskor észlelt és a tartós kézízfeszítés hatására kialakuló szisztolés és diasztolés vérnyomásváltozást tartalmazza. A composite autonomic score (CAS) az autonóm neuropathia súlyosságát adja meg a fenti öt reflex teszt értékelése alapján. Minden teszt esetén a normál: 0, a határérték: 1, a kóros: 2 pontot jelent. Így a CAS értéke 0 és 10 pont között mozog. A 0-1 érték a normális, a 2-3 érték enyhe, a 4-6 közötti mérsékelt, míg a 7-10 pont közötti súlyos autonóm működészavart jelez.

Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzéseket a Statistica 13.5.0.17 szoftver (TIBCO Software Inc. USA) és a GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Prism Software Inc., USA) alkalmazásával végeztünk. Statisztikai teljesítményelemzést végeztünk az SPH Analytics kalkulátorával (SPH Analytics LTD., Alpharetta, GA, USA), hogy megvizsgáljuk a szérum PGRN-koncentrációk különbségét az FH-s betegekben (1. csoport) és a kontroll egyéneknél (2. csoport). A statisztikai teljesítmény 0,8 (0,98) felett volt. A két kategorikus változó közötti kapcsolatot chi-négyzet próbával számítottuk ki. Az eloszlás normalitását a Kolmogorov–Smirnov teszttel vizsgáltuk. A csoportok közötti összehasonlítást a normál eloszlású változók esetén Student-féle páratlan 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 használtunk a kiválasztott változók közötti kapcsolat vizsgálatára. Többszörös regressziós elemzést végeztünk a PGRN-koncentráció legjobb prediktorának meghatározására. A $p \leq 0,05$ valószínűségi értékeket tekintettük statisztikai szempontból szignifikánsnak.

Eredmények

A lipidszintek, gyulladásos és oxidatív paraméterek, valamint a PGRN szintek a HeFH betegek és a 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 ApoA1 szintjében nem volt szignifikáns eltérés. Bár szignifikánsan magasabb volt a PON1 arilesteráz aktivitás a HeFH betegekben a kontrollokhoz viszonyítva, a PON1 paraoxonáz és sóstimulált paraoxonáz aktivitásban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A szérumszintű mieloperoxidáz, oxLDL, sICAM-1 és TNF α szintje szignifikánsan magasabb volt az HeFH csoportban a kontrollokhoz képest, a hsCRP, sVCAM-1, sCD40L és ADMA szérumszintje nem különbözött szignifikánsan a két csoportban. A szérumszintű PGRN szintje nem különbözött szignifikáns mértékben a HeFH betegek és a kontrollok között.

Az LDL és HDL szubfrakciók szintje és aránya a HeFH betegek és a kontroll csoport esetén

A VLDL aránya és szintje, valamint az IDL szint szignifikánsan magasabb volt a HeFH betegek esetén a kontroll csoporthoz viszonyítva. A HeFH csoportban magasabb volt a kicsi sűrű LDL szubfrakció aránya és alacsonyabb az átlagos LDL részecske méret a kontroll populációhoz képest. A HeFH betegek esetén emellett alacsonyabb volt a nagy és közepes HDL szubfrakció szintje és aránya, míg a kicsi HDL szubfrakció nagyobb mennyiségben és arányban volt jelen a betegek szérumában, mint a kontrollok esetén.

A szérumszintű PGRN szintek különböző vaszkuláris szövődmények korábbi megjelenése esetén, illetve annak hiányában a HeFH betegekben

Kissé, de nem szignifikáns mértékben nagyobb szérumszintű PGRN szintet találtunk azon HeFH betegekben, akiknek a kórelőzményében AMI szerepet (n = 5, átlag életkor az első AMI bekövetkeztékor: $53,8 \pm 5,9$ év) azokhoz képest, akiknél a kórelőzményben nem szerepel (n = 75) (43,07 vs. 37,46 ng/mL, p = 0,06). Nem találtunk különbséget a szérumszintű PGRN szintek tekintetében a bármely vaszkuláris eseményen átesett és át nem esett, a stroke-on átesett és át nem esett és az artéria carotis szűkülettel rendelkező és nem rendelkező HeFH betegek esetén.

A szérumszintű PGRN szint összefüggései a lipidszintekkel, a lipid szubfrakciókkal és az oxidatív és gyulladásos paraméterekkel a vizsgált csoportokban

Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az életkor ($r = 0,21$; $p = 0,03$), a VLDL szubfrakció aránya ($r = 0,24$; $p = 0,02$) és a szérumszint, míg a VLDL és PGRN szint korrelációja a szignifikancia határán volt ($r = 0,19$; $p = 0,057$). Szignifikáns negatív korrelációt találtunk az IDL arány ($r = -0,24$; $p = 0,01$), az átlagos LDL részecske méret ($r = -0,32$; $p < 0,001$) és a PGRN szintek között a teljes vizsgált populációban.

A szérumszintje pozitívan korrelált a PGRN szinttel a HeFH és a teljes vizsgálati populációban, de a kontroll csoportban nem. Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a HDL-C és a PGRN szérumszintje között a teljes vizsgálati populációban, de a HeFH és a kontroll csoportban külön-külön nem. Szignifikáns negatív korrelációt észleltünk a nagy HDL szubfrakció aránya és a szérumszintje között minden vizsgálati populációban, míg a kicsi HDL aránya és a PGRN szérumszintje között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk minden vizsgált populációban. A szérumszintje között szignifikáns pozitív korreláció került leírásra minden vizsgált betegcsoportban. A szérumsVCAM-1 szignifikánsan, pozitívan korrelált a PGRN szintjével a HeFH betegekben és a teljes vizsgálati populációban, de a kontroll csoportban nem.

A progranulin, lipid paraméterek, gyulladásos és endotel funkciós markerek a neuropathiás diabeteses betegek esetén az ALA kezelés előtt és után, illetve a kontroll csoportban

Nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és a kontrollok között sem a kezelés előtt, sem a kezelés utáni értékeket tekintve az életkor, a testtömeg index, a derékkörfogat, a szérumszint, kreatinin, húgysav, HbA1c, ICAM-1, PGRN, és oxLDL, valamint az egyéb vizsgált lipid paraméterek kapcsán. A 6 hónapos ALA kezelés szignifikáns csökkenést eredményezett a szérumszintjében, és szignifikáns mértékben csökkentette az áramérzet-küszöbértéket, valamint az autonóm idegrendszer károsodását jellemző CAS értékét. Ezen vizsgált paraméterek mindegyike szignifikánsan magasabb volt a betegek esetén az ALA kezelés előtt a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A szérumszintje diabeteses betegekben a 6 hónapos ALA kezelés előtt és után, valamint az egészséges kontroll csoportban

A kezelés hatására a szérumszint szignifikánsan nőtt ($33,3 \pm 7,2$ vs. $36,2 \pm 7,9$ ng/mL; $p < 0,05$). A kezelés előtti és utáni PGRN szérumszint a diabeteses neuropathiás betegekben nem különbözött szignifikáns mértékben a kontroll populációhoz viszonyítva. A kezelés előtti szérumszint pozitív korrelációt mutatott a szérumszint, oxLDL és TNF- α

szintekkel, míg nem találtunk szignifikáns korrelációt a kezelés előtti PGRN és sVCAM-1 szérumszintje között.

A 6 hónapos ALA kezelést követően szérumszint PGRN pozitív korrelációt mutatott a szérumszint sICAM-1, sVCAM-1 és TNF- α szintekkel, míg nem találtunk szignifikáns korrelációt a kezelés előtti PGRN és az oxLDL szérumszintje között.

Az áramérzet küszöbérték változása negatívan korrelált a diabeteses neuropathiás betegek ALA kezelés előtti szérumszint PGRN szintjével.

A többszörös regressziós analízis alapján a diabeteses neuropathiás betegek esetén a szérumszint PGRN független prediktora a szérumszint sICAM-1 szintje volt mind a kezelés előtt ($\beta = 0,439$; $p < 0,001$), mind a 6 hónapos ALA kezelést követően ($\beta = 0,488$; $p < 0,001$). A modell a szérumszint sICAM-1, sVCAM-1, oxLDL, és TNF α szinteket tartalmazta.

Az új eredmények összefoglalása

A kezeletlen HeFH betegek vizsgálata során:

1. A betegek szérumszint PGRN szintje nem különbözött szignifikáns mértékben a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Jelzetten, de nem szignifikáns mértékben nagyobb szérumszint PGRN szintet találtunk azon HeFH betegekben, akiknek a kórelőzményében AMI szerepelt azokhoz képest, akiknél a kórelőzményben nem szerepel.
2. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a VLDL szubfrakció aránya és a szérumszint PGRN szint között, míg szignifikáns negatív korrelációt találtunk az IDL arány, az átlagos LDL részecske méret és a PGRN szintek között a teljes vizsgált populációban.
3. A szérumszint triglicerid szintje pozitívan korrelált a PGRN szinttel a HeFH betegekben és a teljes vizsgálati populációban. Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a HDL-C és a PGRN szérumszintje között a teljes vizsgálati populációban. Szignifikáns negatív korrelációt észleltünk a nagy HDL szubfrakció aránya és a szérumszint PGRN szintje között, míg a kicsi HDL aránya és a PGRN szérumszintje között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk minden vizsgált populációban.
4. A szérumszint TNF α és PGRN szintje között szignifikáns pozitív korreláció került leírásra minden vizsgált betegcsoportban. A szérumszint sVCAM-1 szignifikánsan, pozitívan korrelált a PGRN szintjével a HeFH betegekben és a teljes vizsgálati populációban.
5. A lépésenként végzett többszörös regressziós analízis a szérumszint PGRN szint legjobb prediktora a sVCAM-1, a lgTNF α és a kicsi HDL szubfrakció aránya volt.

A diabeteses neuropathiás betegek vizsgálata során:

6. A 6 hónapos ALA kezelés hatására a szérumszint PGRN szint szignifikánsan nőtt.

7. A kezelés előtti szérumban PGRN szint pozitív korrelációt mutatott a szérumban sICAM-1, oxLDL és TNF- α szintekkel.
8. A 6 hónapos ALA kezelést követően szérumban PGRN szint pozitív korrelációt mutatott a szérumban sICAM-1, sVCAM-1 és TNF- α szintekkel.
9. Az áramérzet küszöbérték változása negatívan korrelált a diabeteses neuropathiás betegek ALA kezelés előtti szérumban PGRN szintjével.
10. A többszörös regressziós analízis alapján a diabeteses neuropathiás betegek esetén a szérumban PGRN független prediktora a szérumban sICAM-1 szintje volt mind a kezelés előtt, mind a 6 hónapos ALA kezelést követően.

Megbeszélés

Kutatócsoportunk először írta le a PGRN szint összefüggését kezeletlen FH-s betegek mintáiban a lipid paraméterekkel és az érlemezés oxidatív és gyulladásos markereivel. A PGRN gyulladásos folyamatok fontos modulátoraként került a figyelem előterébe, közvetlenül kötődik a TNF α receptorához, illetve gátolja a TNF α jelátvitelét. A PGRN gátolja a p38 és a c-Jun N-terminal kináz (JNK) TNF α által indukált foszforilációját és csökkenti a NF κ B nukleáris transzlokációját. A gyulladás döntő szerepet játszik az érlemezés pathomechanizmusában, hozzájárul minden egyes szakaszához, a plakk megjelenésétől az érésen át egészen a ruptúráig. Humán endothel sejtekben a PGRN gátolja az ateroszklerózis folyamatát az Akt-eNOS útvonal aktiválásával és az NF κ B útvonal csendesítésével, a sVCAM-1, sICAM-1 és a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) csökkent expresszióját eredményezve. Továbbá a PGRN gén törlése fokozta az ateroszklerózist ApoE hiányos egerekben a gyulladásos folyamatok indukálásán keresztül, ami túlzott koleszterin felhalmozódást eredményez a makrofágokban és módosítja a HDL-hez kötött fehérjék aktivitását és mennyiségét. Mindezek a PGRN anti-atherogén hatását demonstrálják. Vizsgálatunk során szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a TNF α , sVCAM-1 és PGRN szintek között HeFH betegekben és a teljes vizsgált populációban, mely jelezheti, hogy a vaszkuláris gyulladás összefügg a fokozott érlemezéssel a HeFH betegekben, és ez indukálja a PGRN expresszióját a HeFH esetén, amely elnyomja a TNF α és sICAM-1 által mediált gyulladásos folyamatokat. A HDL-C szintjét számos kutató vizsgálta FH betegekben, de kevés adat érhető el a HDL szubfrakciók koncentrációját, eloszlását, funkcióját illetően ebben a speciális betegcsoportban. Az LDL-C-n túl a magas HDL-C szint az egyik fő markere a hosszabb kardiovaszkuláris betegség mentes túlélésnek HeFH betegekben. Ezzel szemben a legtöbb korábbi tanulmány nem talált különbséget a HDL-C szintjében HeFH és nem FH betegek mintái között. Továbbá a fokozott koleszterilészter transzfer protein aktivitás az HeFH betegekben trigliceridben gazdag HDL részecskék kialakulásához vezet, melyek az apolipoprotein E (ApoE) receptor útvonalon katabolizálódnak, kisebb HDL részecske méretet eredményezve. A kis pre- β HDL részecskék emelkedett koncentrációját és a nagy HDL2 részecskék alacsonyabb szintjét szintén leírták már korábban. Saját eredményeink összhangban vannak az irodalmi adatokkal. A HDL-C koncentrációja hasonló volt a HeFH betegek és a kontrollok között, azonban a nagy HDL szubfrakció koncentrációja és aránya szignifikánsan alacsonyabb, és a kis HDL szubfrakció koncentrációja és aránya szignifikánsan magasabb volt a HeFH betegekben a kontroll csoporthoz képest. A HDL funkciók, beleértve a HDL-asszociált enzimeket is, gyakran károsodottak HeFH betegekben. A HDL-asszociált PON1 hidrolizálja a reaktív oxigéngyököket, ezáltal csökkent

endogén oxidatív stresszt eredményez és megelőzi az érlemezsedés kialakulását. Néhány korábbi tanulmányban csökkent PON1 arilészteráz aktivitást figyeltek meg FH betegekben. Ezzel szemben mi nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a PON1 paraoxonáz, só stimulált paraoxonáz vagy arilészteráz aktivitásban a HeFH betegek és a kontrollok között. Ugyanakkor az emelkedett szérum oxLDL és MPO szint igazolja az emelkedett oxidatív stresszt a HeFH betegpopulációnkon, amely egybevág néhány másik kutatócsoport megfigyeléseivel. Szignifikáns negatív korrelációt írtak le a HDL-C és a PGRN szintje között szívinfartusos betegekben. Saját HeFH betegekben és az egész vizsgált beteganyagon a PGRN pozitívan korrelál a trigliceriddel és negatív korrelációt találunk a HDL-C és a PGRN között a teljes vizsgált csoportban, de a HeFH betegekben nem. Szignifikáns negatív korreláció igazolódott a nagy HDL szubfrakció aránya és a PGRN között, és szignifikáns pozitív korrelációt észleltünk a kis HDL arány és a PGRN között minden vizsgált betegnél, illetve minden vizsgált csoportban is külön-külön. Ezek a korrelációk a PGRN és a HDL szubfrakciók között új adatok. Továbbá, többszörös regressziós analízis alapján a PGRN-t legjobban a kis HDL szubfrakció jelezte előre, amely utalhat a PGRN feltételezett szerepére a HDL metabolizmusban.

Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy az aszimptomatikus FH betegek 90 %-ának volt atheroszklerotikus plakkja carotis ultrahangon, ismert atheroszklerotikus betegség nélkül. A PGRN expresszálódik a humán atheroszklerotikus lézió. Továbbá a PGRN szint szignifikánsan magasabb a miokardiális infarktuson átesett beteg mintáiban a kontroll mintákhoz képest. Ezért mi szintén magasabb PGRN szérum koncentrációt vártunk a HeFH betegekben a normál koleszterinszinttel rendelkező kontroll populációhoz képest, de nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Összehasonlítottuk a HeFH betegcsoportban azokat a betegeket, akiknek szerepelt AMI az anamnézisében azokkal, akiknek nem estek át korábban AMI-n. Habár a szérum PGRN szint magasabb volt az AMI-n átesett HeFH betegekben, de a különbség nem volt szignifikáns, valószínűleg az igen jelentős egyének közti variabilitás miatt. Továbbá a PGRN magasabb lehet az infarktus akut vagy szubakut fázisában a krónikus fázishoz képest. A PGRN szint kinetikájának követéséhez további, hosszabb távú vizsgálatok szükségesek nagyobb infarktuson átesett populáción. Az atheroszklerotikus betegek klinikai eseményei után tekintélyes reziduális kockázat marad meg, valószínűleg a krónikusan zajló gyulladásos folyamatok miatt. A HeFH betegekben alkalmazott lipidcsökkentő terápia szintén modulálja az atheroszklerózis gyulladásos folyamatait, egyrészt indirekt módon az LDL-koleszterin csökkentésével, másrészt direkt módon a gyulladásos folyamatok jelátvitelének befolyásolásán keresztül.

A $\text{TNF}\alpha$ jelentős szerepet játszik a vaszkuláris endothelsejtek gyulladásos válaszában a sejtadhéziós molekulák indukciójával, beleértve a VCAM-1-t és ICAM-1 termelődését, melyek elősegítik a neutrofilek kitapadását az endothel sejtekhez. Ebből kifolyólag a PGRN-nak kettős hatása van, egyrészt a neutrofil toborzás elfojtásával gátolja a neutrofilek kemotaxisát, mivel csökkenti a $\text{TNF}\alpha$ által indukált ICAM-1 expressziót, másrészt enyhíti az endothel gyulladást. Korábbi tanulmányban leírták, hogy a magasabb PGRN szint összefügg a T2DM betegek mikrovaszkuláris szövödményeinek kialakulásával, ideértve a diabéteszes nephropathiát, neuropathiát és retinopathiát. Ezidáig nem voltak adatok az ALA hatásáról a PGRN szintjére T2DM betegekben. Munkánk során elsőként vizsgáltuk az ALA kezelés hatását a diabéteszes neuropathiás betegek PGRN szintjére. Eredményeink azt mutatják, hogy az ALA kezelésnek előnyös hatása van a szenzoros tünetekre és a neuropathiás deficitre diabéteszes betegekben. Az endothelium képes szabályozni az érfali gyulladásos folyamatokat biológiailag aktív ágensek kibocsátásával. Diabéteszes neuropathiában az alternatív metabolikus útvonalak aktiválódása szorosan összefügg a sejten belüli hiperglikémia indukált oxidatív stresszel és az endothelsejtek nem képesek kompenzálni a megnövekedett oxidatív stresszt az NO termelésével, amely megnövekedett oxLDL-hez vezet.

Más kutatók azt közölték, hogy az oxLDL indukált NF κ B aktiváció mérsékli a sejtadhéziós molekulák (pl. ICAM-1, VCAM-1) expresszióját és az endothelsejtek gyulladást idézi elő. Ezek a folyamatok vezetnek a vasa vasorum funkcionális változásához diabéteszes neuropathiában, ezek okozzák a neuronális ischémiát és a direkt axonális károsodást. Leírták, hogy a PGRN enyhítheti az ischaemiás-reperfúziós neuronális károsodást egerekben a neutrofil toborzás gátlásával, mely a NF κ B út vonal és MMP9 csökkent aktivációját eredményezi. Vizsgálataink során szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a PGRN és a $\text{TNF}\alpha$ szint között diabéteszes neuropathiás betegekben. Ahogy korábban említettük, a PGRN közvetlenül kötődik a TNFR-hoz in vitro, ezért azt feltételezzük, hogy a PGRN szint kompenzatórikus emelkedése a $\text{TNF}\alpha$ által indukált NF κ B aktiváció eredményeként következik be, amely összefügg a neuronális gyulladással és az oxidatív stresszel diabéteszes neuropathiában. Jelen tanulmányban pozitív korrelációt találtunk a PGRN és sICAM-1 szintek között, valamint a PGRN és az oxLDL szintek között. Ezen korrelációk azt mutatják, hogy a PGRN fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban a $\text{TNF}\alpha$ indukált NF κ B és mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalak aktiválásának gátlásával, a TNFR kompetitív antagonistájaként. Továbbá a gyulladáscsökkentő hatás miatt a PGRN hasznos marker lehet az oxidatív stressz szintjének mérésére diabéteszes neuropathiában. Azt feltételezzük, hogy a PGRN szintjének emelkedése kompenzatórikus választ jelenthet diabéteszes neuropathiában a

kemokinek és az intercelluláris adhéziós molekulák (pl. sICAM-1, sVCAM-1) NF κ B által közvetített expressziójának csökkentésére, és védi az endothel sejteket az atheroszklerosishoz társuló gyulladástól. Habár a korreláció nem volt szignifikáns, de pozitív korrelációt láttunk a PGRN és az LDL-C szint között, és szignifikáns negatív korreláció igazolódott a PGRN és a HDL-C között, melyek alátámasztják a fent említett megállapításokat.

A non-HDL-koleszterin szint, ami magába foglalja az összes atherogénnek tartott lipoprotein részecskét (LDL, VLDL, VLDL-maradék, lipoprotein(a)) pozitívan korrelál a PGRN szinttel. Úgy gondoljuk, hogy a PGRN-szintek változásai szorosan összefügghetnek az endothel diszfunkcióval és a diabéteszes neuropathiához társuló lipidanyagcsere eltérésekkel. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a PGRN-t megvédi a hozzá kötődő fehérjék a lebomlástól, például a SLPI és ApoA1, mely a HDL részecske fő apolipoproteinje. Más kutatók azt állapították meg, hogy a HDL makrofágokra kifejtett gyulladáscsökkentő hatását a PGRN hasításának és granulintermelésének csökkenése okozhatja. Jelen tanulmányban a PGRN és a HDL-C szintek közötti szignifikáns pozitív korreláció tehát alátámasztja a HDL protektív szerepét a PGRN hasításában.

Következtetéseink igazolásához azonban további vizsgálatok szükségesek. Vizsgálatunk néhány korlátját mindenképpen érdemes megemlíteni. A vizsgált populáció viszonylag kis mérete és a férfiak alacsony száma a mintában csökkentheti az elemzés erejét; azonban a gyulladásos markerek, a CPT és a PGRN szintek közötti szignifikáns korrelációk rávilágítanak a PGRN és a neuronális regenerációs folyamatok közötti összefüggésre. Ezért ebben a betegpopulációban nagyobb, hosszú távú követéssel járó vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy feltárjuk a PGRN cukorbetegség által kiváltott oxidatív stressz neuronális helyreállító mechanizmusában játszott szerepét.

Összefoglalás

A progranulin (PGRN) egy olyan növekedési faktor, melyet számtalan szövet és sejttípus képes expresszáni, köztük az epithel, a myeloid és limfoid sejtvonalak, a neuronok és a mikroglia. A PGRN a korábbi vizsgálatok alapján direkt módon képes kötődni a tumor nekrosis faktor receptorhoz (TNFR), gátolva ezzel a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF α)-mediálta gyulladásos folyamatokat és anti-atherogén hatást fejt ki. Korábban a PGRN szérumszintjét heterozigóta familiáris hiperkoleszterinémias (HeFH) betegeknél nem vizsgálták. A PGRN emellett mérsékli az ischaemia-reperfúzió indukálta idegsérülést egerekben a neutrofil sejtek sejtfalba történő bevándorlásának gátlásán keresztül. Az antioxidáns hatású alfa-liponsav (ALA) alkalmazása diabeteses neuropathiában az idegvezetés javulását és a neuropathiás fájdalom mérséklését eredményezi, azonban a PGRN szintekre kifejtett hatását korábban nem tanulmányozták. Ezért célul tűztük ki a szérumszintjének meghatározását kezeletlen HeFH-s betegeknél. Emellett vizsgáltuk a gyulladásos és endothel diszfunkciós markerek, köztük a TNF α , szolubilis intercelluláris adhéziónak molekulá-1 (sICAM-1) és a szolubilis vaszkuláris adhéziónak molekulá-1 (sVCAM-1), valamint a PGRN szintje közötti összefüggéseket a HeFH-s betegeknél, valamint 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő, perifériás neuropathiás betegeknél 6 hónapos ALA kezelést követően. Továbbá vizsgálni terveztük a PGRN szérumszintjének és a perifériás szenzoros neuropathia súlyosságának változása közötti összefüggést.

Ezért 81 kezeletlen HeFH-s beteget és 32 egészséges kontroll személyt vontunk be. A HeFH-t a Dutch Lipid Clinic Network kritériumrendszer alapján diagnosztizáltuk. A szérumszintjének PGRN, sICAM-1, sVCAM-1, oxidált LDL (oxLDL) és TNF α koncentrációkat enzim-kapcsolt immunoszorbens assay segítségével határoztuk meg. A lipoprotein szubfrakciók azonosítását Lipoprint gélelektroforézissel végeztük. Emellett egy prospektív vizsgálat keretében 54 fő 2-es típusú diabeteses, perifériás neuropathiás beteget kezeltünk napi 600 mg ALA adásával 6 hónapon keresztül. Az áramérzet-küszöbérték (CPT) meghatározását alkalmaztuk a szenzoros neuropathia súlyosságának értékelésére. Továbbá 24 fő diabeteses, nem neuropathiás beteget is bevontunk a vizsgálatba.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a PGRN szérumszintjében a HeFH-s betegek és a kontrollok között. Szignifikáns pozitív korreláció igazolódott a triglicerid, TNF α , sVCAM-1 és a kis HDL szubfrakció aránya, valamint a PGRN szérumszintje között, míg szignifikáns negatív korrelációt találtunk a nagy HDL szubfrakció aránya és a PGRN szérumszintje között a teljes vizsgálati populációban és a HeFH-s betegek esetén. A PGRN szérumszintjének legjobb prediktora a sVCAM-1, a logTNF α és a kis HDL szubfrakció aránya volt. A 6 hónapos

ALA kezelést követően a perifériás neuropathiás diabeteses betegek PGRN szintje szignifikánsan emelkedett, emellett szignifikánsan javult a CPT értékük. Emellett szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a $\text{TNF}\alpha$, a sICAM-1, és a PGRN szérumszintek között mind az ALA kezelés előtt, mind a kezelést követően. Szignifikáns negatív korreláció igazolódott a CPT értékek javulásának mértéke és a szérumszintje között. Továbbá, a PGRN szint legjobb prediktora a diabeteses neuropathiás betegek esetén a sICAM szintje volt.

A HDL szubfrakciók, gyulladásos markerek és a PGRN szintek közötti szoros összefüggések arra utalnak, hogy a PGRN anti-atherogén hatást fejt ki a HeFH-s betegek esetén részben a HDL összetételének módosításán, részben a gyulladásos folyamatok mérséklésén keresztül, ugyanakkor nem befolyásolja érdemben az oxidatív stressz mértékét. Emellett a PGRN szintjének változása az ALA kezelés következtében kedvező hatást fejthet ki az endothel funkcióra és a neuronális gyulladásra perifériás neuropathiában szenvedő diabeteses betegek esetén. További vizsgálatok szükségesek a PGRN szerepének tisztázására a HeFH-s betegek érlelmeszesedéses folyamatainak szabályozásában és a jelentőségének feltárására a neuronális repair folyamatokban diabeteses perifériás neuropathiás betegek esetén. A PGRN szerepének jobb megértése az athero-inflammációs és neuronális repair folyamatokban befolyásolhatja a terápiás stratégiánkat a familiáris hiperkoleszterinémiás és a diabeteses perifériás neuropathiás betegeink esetén.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof Dr. Balla Józsefnek, a DE KK Belgyógyászati Intézet igazgatójának és Prof. Dr. Paragh Györgynek, a DE KK Belgyógyászati Intézet Anyagcsere Betegségek Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette a Tanszéken folyó tudományos munkában való részvételemet. Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Harangi Mariann egyetemi tanárnak, aki támogatta és irányította laboratóriumi és tudományos munkámat, segítségemre volt a kísérletek megtervezésében és a felmerülő kérdések megvitatásában.

Köszönöm Prof. Dr. Páll Dénesnek és Dr. Sztanek Ferencnek, hogy kutatásaimat szakmai tanácsokkal támogatta.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Katkó Mónikának, Dr. Lőrincz Hajnalkának és Dr. Szentpéteri Anitának a laboratóriumi munkámban, valamint Molnárné Molnár Ágnes diabetológia szakasszisztensnek a neuropátiás vizsgálatok, valamint Eszenyiné Éva vérmintavételek során nyújtott segítségéért.

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

Hálával tartozom családomnak és barátaimnak. Köszönöm szüleimnek a türelmet, hogy végig kísérték ezen az úton is. Köszönöm gyermekemnek és férjemnek, hogy velem voltak, szeretetükkel támogattak munkáim során.

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” és a GINOP-2.3.2-15-2016-00062 “Életminőség fejlesztése Kelet-Magyarországon: Táplálkozás-, teljesítménybiológiai és biotechnológiai experimentális kutatások és eszközfejlesztések a humán megbetegedések megelőzésére és kezelésére” című projektek támogatásával.



Nyilvántartási szám: DEENK/30/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nádró Báborka

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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: 4.757 (2021)
2. **Nádró, B.**, Lőrincz, H., Molnár, Á., Szentpéteri, A., Zöld, E., Seres, I., Páll, D., Paragh, G., Kempler, P., Harangi, M., Sztanek, F.: Effects of alpha-lipoic acid treatment on serum progranulin levels and inflammatory markers in diabetic neuropathy.
J. Int. Med. Res. 49 (5), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/03000605211012213>
IF: 1.573

További közlemények

3. Kovács, B., Németh, Á., Daróczy, B., Karányi, Z., Maroda, L., Diószegi, Á., **Nádró, B.**, Szabó, T., Harangi, M., Páll, D.: Determining the prevalence of childhood hypertension and its concomitant metabolic abnormalities using data mining methods in the Northeastern region of Hungary.
Front. Cardiovasc. Med. 9, 1-10, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2022.1081986>
IF: 5.846 (2021)
4. 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: 6.208 (2021)





5. Zsíros, N., **Nádró, B.**, Harangi, M.: A lipoprotein(a) jelentősége a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásában.
Gyógysz. Továbbk. 15 (1), 24-27, 2021.
6. Harangi, M., Zsíros, N., Juhász, L., **Nádró, B.**, Paragh, G.: A lipoprotein(a) jelentősége az ateroszklerózis progressziójában.
Metabolizmus. 29 (2), 68-74, 2021.
7. **Nádró, B.**, Diószegi, Á., Kovács, B., Paragh, G., Páll, D., Harangi, M.: A magasvérnyomás-betegség előfordulása és kezelése frissen diagnosztizált familiáris hypercholesterinaemiás betegekben.
Hyperton. nephrol. 25 (1), 7-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.33668/hn.25.001>
8. Harangi, M., **Nádró, B.**, Paragh, G.: A lipidanyagcsere veleszületett zavarai.
Metabolizmus. 18 (1), 3-9, 2020.
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. Harangi, M., **Nádró, B.**, Zsíros, N.: PCSK9-gátlók: új lehetőségek a lipidcsökkentő kezelésben.
Gyógyszerész Továbbk. 14 (5), 154-157, 2020.
11. **Nádró, B.**, Sztanek, F., Lőrincz, H., Páll, D., Paragh, G., Harangi, M.: A szénhidrát-anyagcsere és a gyulladásos folyamatok jellemzésére szolgáló új marker, a szérumproganulin diagnosztikai és prognosztikai szerepéről.
Orv. Hetil. 160 (25), 973-979, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2019.31356>
IF: 0.497
12. **Nádró, B.**, Zsíros, N., Paragh, G., Harangi, M.: Kardiovaszkuláris kockázati tényezők posztmenopauzában.
Metabolizmus. 17 (2), 105-110, 2019.
13. **Nádró, B.**, Juhász, L., Szentpéteri, A., Páll, D., Paragh, G., Harangi, M.: Az apolipoprotein M és a szfingozin-1-foszfát tengely jelentősége az érelmeszesedés kialakulásának gátlásában.
Orvosi Hetilap. 159 (5), 168-175, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.30980>
IF: 0.564
14. 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.





15. Harangi, M., Szentpéteri, A., **Nádró, B.**, Lőrincz, H., Seres, I., Páll, D., Paragh, G.: HDL subfraction distribution and HDL function in untreated dyslipidemic patients.
VP. 1, 166-173, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.20517/2574-1209.2017.27>
16. 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.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,445

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,33

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, 2023.01.31.

