

**A Nociceptin/ orphanin FQ és a hőszokk protein 70 ischaemiás szív-és érrendszeri  
betegségekben**

Doktori tézis

**Dr. Krepuska Miklós**

Semmelweis Egyetem

Doktori Iskola, Klinikai Orvostudományok



Mentor:

Dr. Sótonyi Péter PhD

Opponensek:

Prof. Dr. Sándor József PhD

Dr. Rempert Ádám PhD

Szigorlati bizottság, elnök:

Prof. Dr. Füst Zsuzsanna PhD

Szigorlati bizottság, tagok:

Dr. Csapó Zsolt PhD

Dr. Szmola Richárd PhD

Budapest, 2013

## 1. BEVEZETÉS

Az atherosclerosis eredetű ischaemiás szív-és érrendszeri betegség (CVD) még mindig vezető halálok az Egyesült Államokban és Európában. CVD okozza majdnem az összes haláleset felét Európában és a becsült költségek több milliárd eurót tesz ki évente. Az atherosclerosis a fő oka a legtöbb kardiovaszkuláris betegségeknek, mint például a koszorúér-betegség (CAD), perifériás és carotis verőér betegség, aorta aneurizma és a cerebrovaszkuláris betegségek. Az érrendszeri és a malignus megbetegedések a fő halálokok a fejlett országokban. Ezen túlmenően, a WHO arra számít, hogy 15 éven belül a szív-és érrendszeri betegség világszerte a vezető halálok lesz a kockázati tényezők, mint a metabolikus szindróma növekvő gyakorisága miatt. Ezen tények hangsúlyozzák az intenzív kutatás és a megelőzés szükségességét a kardiovaszkuláris területen. A koncepciót, miszerint az atherosclerosis progressziójában akronikus gyulladásnak és az adaptív immunitásnak oki szerepe van, manapság széles körben elfogadott tény. Gyulladásos stressz tényezők önmagukban - például a dohányzás, hiperhomociszteinémia vagy a magas C-reaktív protein szint - nem mindig írják le a elmeszesedett érrendszer kiterjedését és a későbbi kardiovaszkuláris kockázatot perifériás artéria betegségben és CAD-ben. Az atherosclerosis kiterjedésének megbecslése az érrendszeri kalcifikáció mérése által nem elégséges a plakk vulnerabilitás és remodeling meghatározására.

A szélesebb körű klinikai vizsgálatokra, mint az új biomarkerek mérésére az artériás meszesedés és az atherosclerosis diagnosztikájában, ezért sürgősen szükség van, hogy segítsenek a rizikóbecslésben és a később nagy CVD komplikációk elkerülésében.

A Hsp 70 és nociceptin / orphanin FQ a gyulladásos folyamatok potenciális markerei.

Mivel az atherosclerosis egy krónikus gyulladásos betegség, ebben a dolgozatban javaslatot teszünk a nociceptin / orphanin FQ és hősokk fehérje 70 szerepére súlyos érrelmeszesedésben, valamint a N/ OFQ mint lehetséges marker szerepére akut koronária szindrómában (ACS).

## **Nociceptin/orphanin FQ**

Az opioid receptor-like (ORL1/NOP) receptor és endogén peptidje, a nociceptin / orphanin FQ (N / OFQ), kicsivel több, mint egy évtizeddel ezelőtt új távlatokat nyitott az idegrendszeri peptid-alapú jelátviteli útvonalak kutatásában. Mind a peptid és a receptora széles körben oszlik el a központi, valamint a perifériás idegrendszerben, és fontos szerepet játszhatnak számos biológiai funkciók a modulálásában, mint többek között a fájdalom-átvitel, szorongás, memória, táplálékfelvétel és lokomotoros aktivitás. Szabályozzák egyes perifériás rendszerek funkcióit is, mint például a légutak, a gyomor-és urogenitális rendszerek.

Az N / OFQ szerepét számos kísérleti tanulmány kimutatta a kardiovaszkuláris rendszerben. Az in vitro és in vivo eredmények alapján általánosan elfogadott, hogy az N / OFQ hypotensiot, bradycardiát és vasodilatációt indukál azáltal, hogy csökkenti a szimpatikus és a növeli a paraszimpatikus tónust a szív és az érrendszert beidegző neuronokon.

Kevés klinikai vizsgálat történt a nociceptin rendszerrel kapcsolatosan CVD-ben. Egy vizsgálatban emelkedett N / OFQ szinteket találtak akut stroke és tranzienis ischaemiás attack után. A kutatók felvetették, hogy emelkedett plazma N / OFQ szint következménye lenne a stroke-nak. Magas plazma N / OFQ szintet találtak akut instabil angina pectorisban, azonban nem láttak különbséget indukált miokardiális ischaemia során. Nincs bizonyíték a N / OFQ szerepére krónikus ischaemiás szív-és érrendszeri betegségeken, amelyekorkép általában magában foglalja a krónikus gyulladást és a visszatérő fájdalmat.

## **Hősokk protein 70**

A Hsp70 osztály a leginkább tanulmányozott altípus, és magában foglalja a folyamatosan termelődő Hsp-8at és az indukálható Hsp70-t, más néven HSPA1B-t (a Hsp70 a következőkben az indukálható formára vonatkozik). A Hsp70 hagyományosan intracelluláris citoprotektív chaperonnak minősül, és szintje többszörösére nő a stresszre adott válaszul. A Hsp70 kimutatása egészséges egyének perifériás véréből az első bizonyíték arra, hogy a Hsp70 kiválasztódhat az extracelluláris környezetbe nem csak a

stressz-válasz során, hanem fiziológiai körülmények között is. A Hsp70 van immun tulajdonságokkal egyaránt pro-és gyulladáscsökkentő hatása a fajok közti módon. A Hsp70 szerepe még tisztázásra szorul az atheroszklerózis patológiájában. Nem világos, hogy a diszregulált szolubilis Hsp70 szint valóban az oka vagy a következménye az érrelmeszesedésnek. Az atheroszklerózismértéke és a a kardiovaszkuláris rizikófaktorok (homocisztein, CRP, dohányzás, cukorbetegség) jelenléte magyarázhatja a a Hsp70 rendszer diszregulációját. További elemzésre van szükség annak érdekében, hogy feltárjuk a Hsp70"chaperokine" tulajdonságait az érrelmeszesedés etiológiájában. Mivel mind a Hsp70nek és a nociceptinnek megkülönböztetett hatása van az ér-endothel sejteken, atheroszklerotikus markerekként való tanulmányozásukkiemelt érdek.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

**Egy próba-kohorszvizsgálatban krónikus ischaemiás kardiovaszkuláris és akut koronária szindrómás betegekben kerestük a választ a következő kérdésekre:**

2.1. *A nociceptin/orphaninFQ szintek korrelálnak-e az iszkémiás szívbetegség súlyosságával?*

Kevés ismeretünk van a N / OFQ rendszer szerepéről az emberi szív-és érrendszerben. Ezért célul tűztük ki a N / OFQ szint és a súlyos ischaemiás szívelégtelenség összefüggésének vizsgálatát.

2.2. *Milyen kapcsolatok vannak jelen a plazma N / OFQ szintek és a perifériás artériás betegség között?*

Miközben az endogén N / OFQ és más nociceptin receptor agonisták nitrogén-oxid által váltanak szisztémás hypotóniát, az N / OFQ szerepe a perifériás artériás betegség kialakulásában még feltáratlan. Célul tűztük ki, hogy leírjuk az összefüggést N / OFQ szintek és perifériás artériás betegség a betegcsoportban.

2.3. *Vannak-e a N / OFQ szintek és a klinikai jellemzők között összefüggések érrelmeszesedéses betegcsoportban?*

Megvizsgáltuk a korrelációkat a plazma N/ OFQ szint, a klinikai jellemzők és a laboratóriumi paraméterek között súlyos ischaemiás szívelégtelenségben és a perifériás artériás betegségben.

*2.4. Van-e összefüggés a N/ OFQ szintek és a klinikai eredmények között a ACS betegcsoportunkban?*

N/ OFQ egy lehetséges markere a betegség súlyosságának, mivel az ACS jellemezhető a fájdalom, a gyulladás, és a funkcióvesztés mértékével.

**A keresztmetszeti vizsgálatban atheroszklerotikus perifériás artéria szűkületes és a carotis stenosis betegek kerestük a választ az alábbi kérdésekre:**

*2.5. Van-e kapcsolat a stressz-reakció (a sHsp70 szintekkel jellemezve), valamint a kalcifikáció súlyossága között érlelmeszesedésben?*

Szérumban Hsp70 hozzájárulhat a súlyos atherosclerosisban megfigyelt érlelmeszesedés folyamatához. Célunk tűztük ki, hogy mérjük az érlelmeszesedés kiterjedésének mértékét betegcsoportunkban, mely adatokat korreláltatjuk a szérumban Hsp70 szintekkel.

*2.6. Vajon a sHsp70 szint korrelál-e más ismert kockázati tényezőkkel atherosclerosisban? Milyen biológiai összefüggéseket mutatnak a sHsp70 szintek carotis és alsó végtagi szűkületes szenvedő betegekben?*

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a tanulmányozott biomarker in vivo biológiai összefüggéseit az atheroszklerotikus érlelmeszesedésben. Célunk továbbá az volt, hogy azonosítsuk a biológiai korrelációkat az ismert kockázati tényezők és a Hsp70 szérumban szintek között betegcsoportunkban.

*2.7. A sHsp70 szintek korrelálnak-e az érlelmeszesedés gyulladásos markereivel?*

Szérumban Hsp70, mint a celluláris stressz markere, szerepet játszhat az atherosclerosisban megfigyelhető szisztémás gyulladásban, bár nincs adat a markerek közötti összefüggésre, mint például a CRP és a szérumban bilirubin és sHsp70 szinten. Célunk az volt, hogy leírjuk, hogy a sHsp70 összefügg-e a CRP és a bilirubin szintekkel súlyos atheroszklerotikus betegcsoportunkban.

### 3. MÓDSZEREK

#### **Nociceptin/orphanin FQ mérésekiszkémiás kardiovaszkuláris betegekben (1. és 2. beteg csoport)**

Kórházunkba felvett 22 krónikus stabil angina pectoris (SAP) és 12 beteg perifériás artériás érbeteg (PAD) vontunk be a vizsgálatba. Nociceptin szinteket mértünk - 7 betegnek volt stabil angina pectoris többszörös koszorúér szűkület miatt (SAP-többszörös), míg 5 betegnél degeneratív meszes aorta stenosis (AS) állt a tünetek hátterében. Tüneteik súlyossága szívsebészeti beavatkozást tett indokoltá minden esetben. 10 stabil anginás betegeknek csak egy koszorúere volt érintett (SAP-egyszeres), ezért perkután koszorúér-intervenciónak (PCI) estek alá. SAP-többszörös és SAP-AS betegeknél súlyos angina pectoris tünetei a Canadian Cardiovascular Society (CCS) III-IV. fokozatába estek, míg az SAP-egybetegek CCS II-III. fokozatú tüneteket mutattak. A betegeket arra kértük, hogy kerüljék a terhelést. Egyetlen beteg sem mutatott mellkasi fájdalmat vagy légszomjat a vérvétel előtti egy héten belül. Egy stabil angina pectoris betegünknek sem volt nyugalmi anginája. Kilenc PAD beteg intermittens klaudikáció (<100 m) és 3 beteg nyugalmi fájdalom és üszkösödés miatt került intézetünkbe, de egyiknél sem jelentkezett éjszakai fájdalom. A betegeket arra kértük, hogy kerüljenek mindennemű terhelést. Nyugalmi fájdalmas betegeink analgetikumokat (tramadol-hidroklorid) kaptak két hétig a vérvétel előtt. A fájdalomcsillapítók nem okoztak komplikációkat. Betegeink nem jeleztek klaudikációt illetve nyugalmi fájdalmat a vizsgálat előtti héten. 14 egészséges önkéntes vontunk be a kontroll csoportba.

Az ACS betegcsoportban összesen 59 alanyt vizsgáltunk. Közülük 28-an elektíven kerültek felvételre a Semmelweis Egyetem Kardiológiai Központjába. 17 esetben, akut koronária szindróma volt a felvétel oka, melyet azonnal követett a fizikai vizsgálat és a kórtörténet felvétele.

Laboratóriumi eredmények enzim pozitívitás 10 esetben mutattak (1. betegcsoport: enzim pozitív akut koronária szindróma [EPACS], n = 10), a többi beteg az enzim-negatív akut koronária szindróma csoportosítottuk (2-es betegcsoport: ENACS, n = 7). Mind a 17 esetben sürgős coronarographiát egytapasztalt intervenciós kardiológus végezte intézetünkben, aki nem vett részt ebben a vizsgálatban. Coronarographia

szignifikáns szűkületet 15 betegnél mutatott, mely esetekben perkután koszorúér-beavatkozást (PCI) végeztünk azonnal.

A többi 11 beteg szintén a Kardiológiai Központban került bevonásra ismert nyugalmi fázisú ischaemiás szívbetegség (angina pectoris és a myocardialis infarctus anamnézis) miatti kontrollvizsgálat keretében. Kizárás kritériumai között voltak azanamnézisben szereplő máj- vagy veseelégtelenség, súlyos gyulladás vagy rosszindulatú betegség, thrombolyticus vagy immunszuppresszív terápia, és a felvétele előtt több mint 6 órával kezdődő mellkasi fájdalom. 31 egészséges önkéntes szolgált a vizsgálati kontroll csoportban, akik nem voltak tudatában, hogy bármilyen betegségük lenne és nem szedtek semmilyen gyógyszert [15 férfi, 16 nő, életkor 36.2 ( $\pm$  13.8), BMI 24.4 ( $\pm$  4.0)]. Minden résztvevő írásos beleegyezését adta a vizsgálatba. Minden beteget kezelt az American College of Cardiology és az American Heart Association iránymutatásokkal összhangban kezeltünk (3).

Írásos beleegyezését adták a résztvevők, és a jegyzőkönyvet jóváhagyta a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatásértékelési Bizottsága (205-1/2007). A kutatási protokoll a Helsinki Nyilatkozat elveivel összhangban történt.

### **A szolubilis Hsp70 szintek meghatározása a kalcifikált perifériás artériás betegségben szenvedő betegekben (3. betegcsoport)**

Ebben a keresztmetszeti vizsgálatban 180 egymást követő beteg toboroztunk a Semmelweis Egyetem Érsebészeti Klinikáján 2009. januárja és júniusa között. Az egymást követő bevonásra kerülő betegek anamnézisében vagy jelenlegi tüneteiként atherosclerosis eredetű krónikus alsó végtagi ischaemia vagy krónikus carotis stenosis szerepeltek. Egyidejűleg fennálló rosszindulatú daganat, májbetegség, végstádiumú vesebetegség (dialízis), vagy immunszuppresszió kizáró tényezőként szerepelt. A betegek felvételekor regisztráltuk a kórtörténetet, melyet részletes fizikális állapotfelmérés és rutin klinikai laboratóriumi vizsgálatok követtek. A szisztémás atherosclerosis és meszesedést ultrahanggal vizsgáltuk (carotis intima-media vastagság / IMT /, a meszesedés jelenléte a hasi aorta, carotis és femoralis bifurkációk, aorta és mitrális szívbillentyűk felett). Rögzítettük a gyulladás szabványos szérumbiomarkereinek szintjét, valamint a

cukorbetegség, a vesefunkció, a boka-kar index és az atherosclerosis hagyományos kockázati tényezők jelenlétét. Felvételnélk vérmintákat vettünk le a szérum Hsp70 szintekre még a műtétet vagy perkután transzluminális angioplasztikát (PTA) megelőzően. A tanulmányta Helsinkii Nyilatkozat szerint végeztük a Semmelweis Egyetem Érsebészeti Klinikáján. A vizsgálati protokollt jóváhagyta a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatásatikai Bizottsága. Minden beteg írásos beleegyezését adta a vizsgálatokhoz.

### **Klinikai adatok**

Minden betegnélrögztítettük a kórtörténetet és fizikális vizsgálatot végeztünk. Egy tanulmány kérdőívet használtunk a releváns demográfiai és klinikai adatok rögzítésére (kor, súly, magasság, a dohányzás, gyógyszerek és kíséő betegség). A tünetek gondos feltárását (terhelésre jelentkező légszomj, mellkasi fájdalom, sántítás vagy nyugalmi fájdalom)követte echokardiográfia és koronária / perifériás angiográfia. A krónikus alsó végtagi atherosclerosis klinikai súlyosságánakmegítélésére (I., II / a, II / b, III, IV.) Group II alatt elkülönítjük az "a" és "b" alcsoportot, 200 méteres sétatávolság alapján. Boka-kar index (ABI) Doppler ultrahangos mérését egyABI mérésben jártas orvos végezte. Az első vizsgálati csoportban, vérnyomást és pulzust is mértük a vérvétel napján. Egy tapasztalt kardiológus végezte a transthoracalis echokardiográfiát, más vizsgálati adatokra vakon. Az American Society of Echocardiography vezérfonala alapján teljes 2-dimenziós vizsgálatokat végeztünk, beleértve a Doppler képeket a standard nézetekben a Toshiba és a Philips Xario IE 33 ultrahangos rendszer többfázisú transzducerei segítségével (2.5-4.5MHz).

Az első betegcsoportban krónikus ischaemiás szívbeteget), echokardiográfiát is végeztünk a bal kamrai ejekciós frakció és az aortabillentyű szűkület mértékének megítélésé céljából. AS-ban a billentyű terület kisebb, mint 1,0 cm<sup>2</sup> tartottuk súlyosnak. EKG-t rögzítettünk minden esetben, hogy kizárjuk a szívritmuszavar és az akut miokardiális infarktus meglétét.

A második vizsgálati csoport betegeinél ultrahangvizsgálat történt az intenzív osztályos tartózkodás során és a kórházi elbocsátás előtt, az összes mérést ugyanaz az echokardiográfiban járatos kardiológus végezte.



A harmadik csoportban, a mitrálismeszesedést definíció szerint az elülső és hátsó mitrális vitorlánás a mitralis körgyűrűnlévő echodenz (epicardialis denzitást elérő) struktúramegléte alapján határoztuk meg a parasternalis rövid és hosszú tengely és a csúcsi négy kamra nézetben. Aorta billentyű meszesedést állapítottunk meg, ha echodenzstruktúrát (epicardialis denzitást elérő)vettünk észre az aorta gyökere na parasternalis rövid és hosszú tengely és a csúcsi négy kamra nézetben. A Carotis IMT-t és az általános kalcifikáció pontszám perifériás részét egy tapasztalt radiológushatározta meg, aki nem ismerte a beteg kórtörténetét. Az IMT-t mindkét carotis communishátsó falán mértük három pont átlagaként a plakkmentes területen a Toshiba Aplio SSA-770 ultrahangos rendszer lineáris (7,5-11MHz) transzducerével. Ugyanezen A vizsgálat közben carotis stenosis meglétét is vizsgáltuk, a 70%-os vagy nagyobb szűkülethehatároztuk meg szignifikánsnak. Mindkét nyaki artériák mérése után, anagyobb szűkületű artériát százalékát határoztuk meg a maximális carotis szűkületként. A testtömeg indexet (BMI) mint súly (kg) / magasság<sup>2</sup>(méter) ként állapítottuk meg. Aszisztémás atherosclerosis mértékének felmérése céljából kalcifikációs pontszámot (CS) számoltunk az érrendszer hét részén: mindkét nyaki bifurkáció, a infrarenális aorta, a femoralis artériák és az aorta és mitralis billentyűkefelett B-módú ultrahanggal (lásd a technikai részletek fentebb a carotis IMT mérésnél). A meszesedéstegyest, míg a nem- meszesedés zérót kapott, így a kalcifikáció tartománya 0-7 között volt.

### **Nociceptin / orphanin FQ mérések**

Éhomi vérmintákat (3.0 ml) vettünk nociceptin / orphanin FQ szintek mérésére a a klinikai laborral együtt krónikus szív- vagy érbetegekből felvételük második napján a mütét vagy PCI előtt. Az N / OFQ mérések akut koronária szindrómában szenvedő betegnél két nappal coronarographia után vett vérekből történtek. A véreket antikoagulánsként kálium-EDTA-t tartalmazó Vacutainer csövekbe vettük le. 100 ul aprotinint adunk azonnal proteáz-inhibitorként a csövekhez (0,6 TIU / ml, Calbiochem). A plazmát centrifugálással elválasztottuk (Janetzky K70, 1600 gx 15 percig 4 °C hőmérsékleten), és a mintákat fagyasztva tartottuk -80 °C-on közvetlenül a vizsgálatokig. 1000 ul-re aliquotolt plazma mintákat összekevertük azonos térfogatú 1% v / v trifluor-ecetsavval (TFA I.), centrifugáltuk 1600 g-vel 20 percig 4 °C hőmérsékleten. A megsavanyított mintákat felvittük C18 Sep-Pack oszlopokra (ABL, E

JASCO Hungary Kft.), kétszer mostuk TFA I.-val, majd eluáltuk 60% acetonitril és 0,1%-os TFA oldatával. A mintákat fagyaszttva szárítottuk centrifugálással (SAVANT, USA). A feloldott eluátumot mértük radioimmunassay-vel. Nociceptin szinteket egy validált radioimmunoassay segítségével határoztuk meg (<sup>125</sup>I-nociceptin-kit, Phoenix Pharmaceuticals, Phoenix, CA, USA), melynek minimum érzékenysége 1 pg / ml volt, korábban leírt módszerek szerint. A vizsgálatot a betegcsoportokra vakon végeztük. Adatok kiértékelése RIA-Mat 280-tal történt (Byk-Sangtec, Dietzenbach, Németország). A szignifikancia szinteket Origin-programmal (alapja a Student-féle t-teszt) számoltuk. Az éhomi vérmintákat a standard klinikai laboratóriumi paraméterek és a troponin T-szintek mérésére is használtuk minden esetben, hogy kizárjuk az akut miokardiális ischaemiát, vese-és májelégtelenséget, vagy bármilyen gyulladásos folyamatokat. A laborvizsgálatok helyi és a Semmelweis Egyetem központi laboratóriumokban történtek (diagnosztikai műszerek: D-Cell 5D - Diagon Kft., Cobas Integra 400 - Roche, STA-Compact - Diagnostica Stago).

### **Hő sokk protein 70 mérések**

A szolubilis Hsp70 szinteket az R&D System (USA, Kat. sz. DY1663E) enzimkapcsolt immunszorbens assay (ELISA) kittel mértük. A Hsp70 család nomenklatúráját Tavaría és mtsai. javaslatai alapján használtunk. A 96-lyukú lemezeket egér anti-humán Hsp70 antitestekkel (100 ul, 2 ug / ml) vontunk be a karbonát-pufferben (pH = 9,5) egy éjszakán át 4 ° C-on. A lemezeket mostuk 0,1% Tween 20-at tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS), és a nem specifikus kötőhelyek blokkoltuk 2ul 0,5% Tween 20-at és a zselatint tartalmazó PBS-ben 1 órán át szobahőmérsékleten (RT). Mosás után 100 ul referencia-készítményt (rekombináns humán Hsp70, 0-10 ng / ml) vagy nem hígított szérum mintákat vittünk fel, és a lemezeket 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lemezeket ezt követően mostuk, és a Hsp70 kötődést biotinilált nyúl antihumán antitestekkel (100 ul, 0,5 ug / ml PBS-zselatinban) határoztuk meg. Az elegyet 1,5 órán át szobahőmérsékleten tartottuk, a lemezeket mostuk, majd streptavidin-törma-peroxidáz (1:200) PBS-zselatinban 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lemezeket ismét mostuk, és 100 ul o-feniléndiamin (Sigma, St. Louis, MO, USA) a citrát-puffert adtuk hozzájuk. Az optikai denzitást  $\lambda = 490$  nm-en (referencia a  $\lambda = 620$  nm) mértük. Az assay érzékelési

tartománya 0,05-10 ng / ml volt, az intra/ inter-assay variabilitás <10 / <16%. Éhgyomri szérum mintákat a standard klinikai laboratóriumi mérésekre is használtuk, a CRP és homocisztein szintek a Semmelweis Egyetem központi laboratóriumában (diagnosztikai műszerek: D-Cell 5D - Diagon Kft., Cobas Integra 400 - Roche, STA-Compact - Diagnostica Stago) kerültek mérésre. A glomeruláris filtrációs rátakiszámításához a Cockcroft-Gault képletet használtuk. Glomeruláris filtrációs ráta =  $[(140\text{-kor}] \times \text{testtömeg kg-ban}) \times \text{konstans} / (\text{szérum kreatinin (mol / L)})$ , ahol a konstans 1.23 volt a férfiak és a 1.04 a nők esetében.

## **STATISZTIKA**

### **Statisztikai analízis - N / OFQ tanulmány**

A plazma N / OFQ szinteket a csoportok között Brown-Forsythe ANOVA módszerrel és Games-Howell post hoc teszttel hasonlítottuk össze. A bináris beteg jellemző változók (0 és 1 kódként) és a plazma N / OFQ szintek összefüggéseit logit modellel vizsgáltuk. Faktor analízis alkalmaztunk a binárisváltozók osztályozására együtt a plazma N / OFQ szintekkel annak érdekében, hogy felfedjük a rejtett mögöttes tényezőket. A folyamatos beteg jellemző változók és a N / OFQ szintek közti kapcsolatok feltárására lineáris és nemlineáris regressziós technikákat használtunk.

### **Statisztikai analízis - Hsp70 tanulmány**

Nem-paraméteres próbákat használtunk a csoport közötti összehasonlításra, folyamatos változók két csoportja közötti összehasonlításra a Mann-Whitney-féle U tesztet alkalmaztuk. Spearman rank korrelációs együtthatót számítottunk a sHsp70 és egyéb tényezők közti összefüggések becslésére. A sHsp70 szintek és a kalcifikációs score (CS) közti korrelációk becsléséhez használt mintaszámot power-analízissel számítottuk ( $p = 0.62$ ). Többszörös logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk a változók, mint a perifériás artériás betegség kategorikus előrejelzői és súlyosság összefüggéseinek becslésére. Az adatokat a szövegben mediánként tüntettük fel az interkvartilis tartománnyal (IQR). Az analíziseket a STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), a Prism 5.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), és az

SPSS for Windows 15.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL) statisztikai szoftver termékekkel végeztük. A statisztikai analízisek két-oldalúak és  $p < 0.05$ -t tekintettük szignifikánsnak.

#### 4. EREDMÉNYEK

##### **A plazma nociceptin / orphanin FQ szint és a krónikus ischaemiás cardiovascularis betegségek közti összefüggések**

A betegek tüneteinek súlyossága sebészeti vagy intervenciós kezelést tett szükségessé minden esetben. A LVEF helyzeti középértéke (mediánja) a stabil angina csoportban 50 (43-56) volt. Az artériás középnyomás / pulzus az SAP és a PAD csoportokban 90 (82-100) Hgmm / 69 (64-72) ütés / perc és 96 (88-105) Hgmm / 85 (78-91) ütés / perc voltak, egyenként. A lipid-profil eredményei mérsékelten emelkedett triglicerid és a koleszterin szinteket mutattak. A kreatinin minták mediánja és interkvartilis tartományai a következők voltak: 109 (81-178)  $\mu\text{mol/l}$  az SAP-egyszeres, 98 (90-117)  $\mu\text{mol/l}$  az SAP-többszörös, 89 (79-99)  $\mu\text{mol/l}$  az SAP-AS és a 71 (65-93)  $\mu\text{mol/l}$  a PAD betegcsoportokban.

N / OFQ szint nem normális (ferde) eloszlást mutatott különböző ferdeséggel a kontroll és a betegcsoportok között. A következő medián (IQR) plazma N / OFQ szintet találtuk az egyes csoportokban: SAP-egyszeres: 7.49 (7.23-8.12) pg/ ml, SAP-többszörös 6.88 (6.27-7.46) pg/ ml, SAP-AS: 7.05 (5.75-7.54) pg/ ml, PAD: 6.99 (6.16-7.05) pg/ ml és egészséges kontroll csoport: 9.50 (8.43-10.88) pg/ ml. Asúlyosabb CCS score szerint csoportosítva, SAP-többszörös/ SAP-AS csoportok együttes plazma N/ OFQ szintje 6.96 (6.27-7.38) pg/ ml volt. Medián-központos Fligner-Killeen medián-teszt bizonyította ( $F=5.18$ ,  $df_1=3$ ,  $df_2=42$ ,  $p=0.004$ ), hogy az adatok megsértették az egyenlő variancia feltételezését. Ezért a Brown-Forsythe ANOVA-t alkalmaztunk, amely szignifikáns fő hatást,  $F(3,23.9)=20.41$ ,  $p<0.001$  mutatott. A post hoc többszörös összehasonlítás során szignifikáns különbséget mutattunk kizárólag SAP-egyszeres és SAP-többszörös / SAP-AS betegcsoportban ( $p=0.04$ ). Nociceptin / orphanin FQ szintek nem különböztek egymástól az SAP-többszörös és az SAP-AS csoportban ( $p=n.s.$ ). SAP-egyszeres és az SAP-többszörös csoportok tendenciájukban igen, de nem tértek el szignifikánsan egymástól ( $p=0.079$ ). SAP-többszörös és SAP-AS beteg csoportok N/

OFQ szintjei szignifikánsan alacsonyabbak, mint az egészséges kontroll csoporté ( $p=0.001$  és  $0.008$ -kal). Ez a különbség az SAP-egyszeres szemben az egészséges kontroll csoportokra is igaz ( $p = 0.014$ ). Nociceptin / orphanin FQ plazmaszintek jelentős különbséget mutattak a perifériás érbeteg és a kontrollcsoport között ( $p = 0.001$ )

Megvizsgáltuk az összefüggést a plazma N / OFQ szintek, a klinikai jellemzők és laboratóriumi értékek között SAP és a perifériás artériás érbetegségben. A N / OFQ szint kovarianciát mutattak a kreatinin szintekkel ( $r = 0.38$ ,  $p = 0.04$ ) és a lineáris regresszió az N/ OFQ szintek varianciájának 14%-át magyarázza a betegcsoportokban.

Lineáris kapcsolat volt kimutatható az SAP-egyszeres csoportban is, érdekes módon, a betegek plazma nociceptin szintje és az artériás pulzus között is ( $r= - 0.72$ ,  $p = 0.04$ ), minél magasabb a N / OFQ szintje, annál alacsonyabb a pulzus. Szignifikáns nemlineáris (másodrendű polinom) regresszió írja le az összefüggést az urea és N / OFQ szintek ( $R^2=0.91$ ,  $p=0.03$ ), valamint N / OFQ és vérnyomás ( $R^2=0.77$ ,  $p=0.02$ ) között a SAP-egyszeres betegcsoportban.

Feltáró faktoranalízist alkalmaztunk varimax rotációval, hogy feltárjuk a következő szimultán mért változók közötti rejtett struktúrát: N/ OFQ, életkor, WBC, THR, Hb, koleszterin-, triglicerid-, glükóz szintek, az EGFR, kreatinin, szisztolés vérnyomás és a diasztolés vérnyomás. Négy tényezőt találtunk, amelyek együttesen a variancia 72%-áért felelősek. N / OFQ szint önálló tényezőnek bizonyult, amely megmagyarázza 31.9%-át a teljes varianciának, 0.92 faktorsúllyal. A második faktor a teljes variancia 17.4%-át adja, és a koleszterin-, triglicerid-és a glükóz szintekből áll, 0.85, 0.87, és 0.71, faktorsúlyokkal. A harmadik tényezőként az EGFR és a kreatinin van jelen 0.85 és -0.83 súlyokkal, és a teljes variancia 13,4%-ért felelős. Végül a negyedik tényező a fehérvérsejt számhoz kapcsolódik, a faktorsúly -0.76, és további 9.2%-át magyarázza a varianciának.

**A plazma nociceptin / orphanin FQ kapcsolata az akut koronária szindróma tüneteivel**

A plazma N / OFQ szintek mediánjai (IQR) az alábbiak: 6.86 (6.24-7.32) pg/ml a az enzim pozitív akut koronária szindrómás csoportban, 6.97 (6.87-7.01) pg/ml enzim negatív ACS-ban és 7.58 (7.23-8.20) pg/ml az ischaemiás szívbetegekben. 8.86 (7.27-9.83) pg/ml N / OFQ szintet mértünk a kontroll csoportban. Nem talált szignifikáns különbséget férfiak és nők között. A plazma N / OFQ szintek a kontroll csoportban sokkal szélesebb interkvartilis tartományt mutattak, mint a másik három csoportban. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy az egészséges embereket plazma N/ OFQ szintjeik szerint be lehet-e sorolni. Köszönhetően a látszólagos heteroszkedaszticitásnak Brown-Forsythe ANOVA-út végeztünk. A N / OFQ fő hatása jelentős volt,  $F(3,50.8)=21.6$ ,  $p<0.000$ . A post hoc vizsgálatok során kiderült, hogy N / OFQ szignifikánsan alacsonyabb volt valamennyi kardiovaszkuláris betegben összehasonlítva a kontroll csoporttal (EPACS  $p < 0.000$ , ENACS  $p < 0.000$ , IHD  $p = 0.05$ ). Egyidejűleg az ischaemiás szívbetegek plazma N/ OFQ szintjei szignifikánsan magasabbak voltak, mint az enzim pozitív akut koronária szindrómás ( $p = 0.009$ ), és enzim negatív akut koronária szindrómás ( $p = 0.012$ ) betegekben.

A beteg jellemzők statisztikai elemzése során azt találtuk, hogy az életkor szignifikánsan magasabb volt az enzim pozitív ACS csoportban, mint az enzim negatív ACS-oknál ( $p = 0.02$ ). Az életkorban lévő különbség ellenére, és annak tudatában, hogy az összes beteg csoport életkorai magasabbak voltak, mint az egészséges kontroll csoporté, az életkor nem bizonyult kovariánsnak, így nem volt arra szükség, hogy ellenőrizzük e változóhoz N/ OFQ ANOVA során. Laboratóriumi eredmények azt mutatták, hogy a CK szignifikánsan magasabb volt az enzim pozitív ACS csoportban, mint az enzim negatív ACS és az ischaemiás szívbeteg csoportokban (mindkettő  $p = 0.04$ ). A felvételi glükóz szintek szignifikánsan magasabbak voltak az enzim pozitív akut koronária szindrómásoknál, mint a másik két csoportban (ENACS  $p = 0.03$  és OHD  $p = 0.04$ ). A különbségek az LDH-ban az EPACS és ENACS csoportok között ugyancsak szignifikánsak voltak ( $p = 0.05$ ). Echokardiográfia két nappal a felvétel után készült, mely azt mutatta, hogy az ejekciós frakció szignifikánsan alacsonyabb volt a EPACS, mint a ENACS ( $p = 0.016$ ) csoportban. Más, betegre jellemző változó nem mutatott szignifikáns különbséget.

Erős lineáris kapcsolat volt kimutatható az enzim pozitív csoportban a plazma N / OFQ és fehérvérsejt (WBC) szintek és a vérlemezke (PLT) számok között ( $r=0.93$ ,  $p=0.0001$  for WBC, and  $0.69$  with  $p=0.03$  for PLT).

További jelentős korrelációt vettünk észre az enzim pozitív ACS csoportba N / OFQ szintje és a kreatin-kináz (CK), valamint a plazma koleszterin szintek között (korrelációs együtthatók és p értékek  $0.73$  és  $p = 0.02$  a CK, és  $-0,66$  és  $p = 0.05$  koleszterin esetében). Jelentős nemlineáris (power) regresszió volt kimutatható a N/ OFQ és glutamát oxálacetát transzamináz (GOT) szintek közt az EPACS csoportban ( $R^2=0.49$ ,  $p=0.03$ ).A N/ OFQ egy majdnem szignifikáns nemlineáris (másodfokú) kapcsolatot mutatott a C-reaktív proteinnel (CRP) ( $R^2=0.629$ ,  $p=0.07$ ).A N / OFQ szintek mérése alapján a betegcsoportokban két bináris változót, a fájdalmat és necroenzim kiáramlást lehetett megjósolni logisztikus regressziót használva. Alacsony N/ OFQ szintekfájdalmat( $\chi^2=27.5$ ,  $df=1$ ,  $p<0.000$ ) és necroenzyme effluxot( $\chi^2=7.8$ ,  $df=1$ ,  $p=0.005$ ) jósoltak.

A feltáró faktoranalízis 25 változót sorolt be együtt plazma N/ OFQ szintekkel, ahol három tényező magyarázza közel azonos arányban a teljes varianciát. A faktorok magyarázzák a betegség hátterét és felelősek a megfigyelt változók közötti kovariációkért. Az első látens tényező  $r = 0.92$  korrelációt mutat a N/ OFQ szintekkel, más változók ebben csoportban az INR, a vérlemezke-szám, a TG,a SGOTés SGPT szintek. A második tényező tagjai az életkor, a szívfrekvencia, a CRP, a Hb, koleszterin, HDL, GGT, a kreatinin és az urea szintek. A harmadik tényező a következő beteg jellemző változókat foglalja magában: szisztolés vérnyomás, a szérum CK, LDH, HBDH, EF, LDL, felvételi glükóz és az ALP szintek.

### **A szolubilis hősokkfehérje 70és a vascularis meszesedés kapcsolata**

A betegek átlagéletkora 64 év volt a 180 betegbőlálló vizsgálati populációban, 56 (31.1%) nő volt, 98 (54.4%) aktív dohányos volt és 55 (30.6%) dohányzott korábban, csak 27 (15%) beteg volt nem dohányzó. Harminchét (20.6%) beteg esetében láttunk

egyedülszignifikáns carotis stenosis, 91 (50,6%) a résztvevők közül csak alsó végtagi artériás betegségben, míg 52 (28.9%) mindkét betegségben szenvedett.

A tünetek súlyossága betegeinknél műtétet vagy PTA-t tett szükségessé: 30 (81%) carotisbetegnél, 80 (88%) PAD betegnél és 50 (96%) betegnél, akik mindkét betegségben szenvedtek. Akrónikus alsó végtagi artériás atheroscleroticus betegség Fontaine osztályozása (I-IV) szerint 129 beteg (71.7%) tartozott Fontaine II/b-IV csoportokba. A medián értéke a boka-kar indexnél 0.50 (0.26-0.76), az átlagos IMT-nél 0.83 mm (0.70-0.97), és a két oldal között mért súlyosabb IMT 1.00 mm (0.80-1.30) volt. A lipidprofil eredményei mérsékelten emelkedett triglicerid, koleszterin és alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) szinteket mutattak. Arteriosclerosis kiterjedésének jellemzőjeként mért átlagos kalcifikációs pontszám (CS) 5 (4-6) volt, ez megfelelt a súlyos szisztémás artériás érmezsesedésnek kohorszunkban.

Megvizsgáltuk a kapcsolatot a szérumban Hsp70 szintek és a meszesedés pontszámok, a klinikai jellemzők és laboratóriumi paraméterek között az ér-betegekben. A klinikai adatok és más laboratóriumi paraméterek elemzése szignifikáns összefüggést mutatott a szérumban hősokk protein 70 szintek és az életkor, valamint a szérumban bilirubin szintek között. Nem volt szignifikáns korreláció a sHsp70 koncentrációk és a májkárosodás egyéb markerei között [aszpartát-aminotranszferáz (AST), alanin aminotranszferáz (ALT),  $\gamma$ GT]. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a szérumban Hsp70 szintek és a klinikai jellemzők mint a nem, BMI, a magas vérnyomás, a cukorbetegség, ischaemiás szívbetegség megléte, átlagos IMT, boka-kar index között sem. Fontos, hogy a CRP, triglicerid, koleszterin, a szérumban kreatinin, és urea-szintekkel valamint az EGFR-rel sem volt megfigyelhető összefüggés. Nem találtunk korrelációt sHsp70 szinteket és bármely, a vérvételidején használt gyógyszerek közt sem (az adatokat nem tüntettük fel). Nem találtunk szignifikáns különbségeket a három betegcsoportban kor, nem, BMI, cukorbetegség, dohányzás, vagy meszesedés pontszámok ( $p = n.s.$  mindre) tekintetében sem.

A Hsp70 szintek ( $p = 0.993$ ), illetve a meszesedés pontszámok ( $p = 0.909$ ) vizsgálata sem eredményezett különbséget a diabéteszes és nem diabéteszes betegek között. A magasabb kalcifikációs pontszámú betegek szolubilis hősokk fehérje szintje (Mann-Whitney-próba,  $p < 0.02$ ) magasabb értéket mutatott. Egy egyváltozós elemzésben azon



betegek, ahol a sHsp70 szint a 75. percentilis (0.7296 ng / ml) felett volt, csaknem 2.2-szeres kockázattal tartoztak a súlyosabban kalcifikált érbeteg csoportba (CS 6-7). Logisztikus regressziós analízist végeztünk a sHsp70 szintek és az artériás meszesedés kiterjedése kapcsolatának felderítésére. Megvizsgáltuk három modell az esélyhányadosra gyakorolt lehetséges hatását (1. modell: életkor, nem, az EGFR szintek; modell 2: modell 1 + dohányzás (években); modell 3: modell 2 + CRP szintek; modell 4: modell 3 + homocisztein). A jelentős befolyásoló tényezőkre való korreláció utána keringő Hsp70 és az artériás meszesedés kapcsolata továbbra is szignifikáns maradt. A2-es típusú diabetes mellitus, a kor, a nemtől és az EGFR szintén nem befolyásolta a magasabb sHsp70 szintek és a kiterjedtebb érmeszesedés kapcsolatának jelentős kockázatát (OR = 2.136 (1.077-4.237) p = 0.03)

## **5. KÖVETKEZTETÉSEK**

### **Nociceptin / orphanin FQ szintek korreláltak az ischaemiás szívelégtelenség súlyosságával:**

Ez az első humán próba tanulmány ahol plazma nociceptin / orphanin FQ szinteket mértünk krónikus szív-és érrendszeri betegségben. Eredményeink arra utalnak, hogy a krónikus angina pectoris jelenléte alacsonyabb keringő nociceptin / orphanin FQ szintekhez kapcsolódik súlyos atherosclerosisos betegekben. Súlyosabb ischaemiás szívelégtelenségű állapotokhoz alacsonyabb plazma N/ OFQ szintek társulnak.

### **A perifériás artériás betegség alacsonyabb N/ OFQ szintekhez csatolt:**

Perifériás artériás betegségben szenvedő csoportunkban alacsonyabb nociceptin/ orphanin FQ szinteket találtunk, mint egészségesekben.

### **N / OFQ szintek és a klinikai paraméterek a krónikus szív-és érrendszeri betegekben:**

Mi nem találtunk összefüggést az alanyokban az életkor / nem és a N/ OFQ szintek tekintetében, mely összhangban van a szakirodalomban korábbi eredményeivel.

Ebben a vizsgálatban a N/ OFQ önálló jelentős tényezőnek bizonyult, mely a laboratóriumi paraméterek teljes varianciájának közel egyharmadát felelt a teljes betegcsoportban. Ez az eredmény is hangsúlyozhatja a nociceptin / orphanin FQ független szerepét ischaemiás cardiovascularis betegségek szabályozásában. Azonban ezek az eredmények még további tisztázásra várnak.

### **N / OFQ szintek összefüggnek a klinikaimarkerek súlyosságával akut koronária szindrómában:**

Alacsonyabb plazma nociceptin/ orphanin FQ szinteket találtunk akut koronária szindrómában szenvedő betegekben coronarographia után, mint egészséges önkénteseknél. Eredményeink azt mutatják, hogy az ACS csatlakozik a legalacsonyabb N / OFQ szintekhez a három vizsgált betegcsoport közül. ACS-ben találtunk összefüggést a N/ OFQ és a GOT szintek között is. Ez azt sugallja, hogy az N / OFQ szint a plazmában nem csak a fájdalom aktuális szintjétől, hanem az ischaemiás sérülés meglététől is függ. Találtunk szignifikáns összefüggéseket a N/ OFQ szintek és fehérvérsejtszám között is, amely újabb bizonyíték arra, hogy a N / OFQ szabályozásában az idegrendszerrel az immunsejtek mellett is részt vesznek. Az erős korreláció a fehérvérsejt, a thrombocytaszám és nociceptin szintek között arra utal, hogy a plazma nociceptin szintek WBC és vérlemezke eredetűek lehetnek az akut coronaria szindrómában.

### **Emelkedett sHsp70 szintekkel súlyosabb érrelmeszesedés jár:**

Eredményeink azt mutatják, hogy a meszes plakkok magasabb száma szorosan összefügg az emelkedett Hsp70 szintekkel. Ezt az összefüggést a zavaró kockázati tényezőktől, mint a kor, a nem, a dohányzási szokások, az EGFR, CRP és homocisztein értékektől függetlenül bizonyítottuk.

### **A szérumban Hsp70 és homocisztein szintek szignifikánsan összefüggnek:**

Szignifikáns korrelációt figyeltünk meg a szérumban Hsp70 és homocisztein szintek között. A betegpopuláció részletes jellemzése lehetővé tette számunkra, hogy meghatározzuk a sHsp70 szintek és az életkor közötti lényeges összefüggéseket is.

**Hsp70 szintek pozitívan korrelálnak a szérumbilirubin szintekkel, de nem kapcsolódnak a CRP szintekhez betegcsoportunkban:**

A gyulladáshoz kapcsolódó markerek, mint a bilirubin is szorosan kapcsolódnak a keringő Hsp70-hez. Azonban nem találtunk összefüggést a szolubilis Hsp70 és az akutfázis C-reaktív protein szintek között. Ezek az eredmények a sHsp70 független, gyulladáscsökkentő szerepére utalhatnak súlyos érrelmeszesedésben, amit még kell erősíteni későbbi tanulmányok során.

## 6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### 6.1. A tézishez csatlakozó publikációk

Krepuska M, Sótonyi P, Csobay-Novák C, Szeberin Z, Hartyánszky I, Zima E, Szilágyi N, Horkay F, Merkely B, Acsády G, Tekes K. (2011) Plasma nociceptin/orphanin FQ levels are lower in patients with chronic ischemic cardiovascular diseases-A pilot study., *Regulatory Peptides*;169(1-3):1-5 **IF: 2.473**

Krepuska M, Szeberin Z, Sótonyi P, Sarkadi H, Fehérvári M, Apor A, Rimely E, Prohászka Z, Acsády G. (2011) Serum level of soluble Hsp70 is associated with vascular calcification.*Cell Stress Chaperones*;16(3):257-65.

**IF: 3.162**

Csobay-Novák C, Sótonyi P, Krepuska M, Zima E, Szilágyi N, Tóth S, Szeberin Z, Acsády G, Merkely B, Tekes K. (2012) Decreased plasma nociceptin/orphanin FQ levels after acute coronary syndromes.*Acta Physiologica Hungarica*;99(2):99-110.

**IF: 1.226**

### 6.2. Más publikációk

Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Bíró G, Sótonyi P, Széplaki G, Szabolcs Z, Prohászka Z, Kalabay L, Acsády G. (2011) Fetuin-A serum levels in patients with aortic aneurysms of Marfan syndrome and atherosclerosis.*Eur J Clin Invest*;41(2):176-82. **IF: 2.736**

Szeberin Z, Firneisz G, Bíró G, Szabó GV, Sótonyi P, Windisch M, Krepuska M, Sípos F, Mihály E, Acsády G. (2009) [Surgical treatment of acute type-B aortic dissection associated with cocaine use]. *Orv Hetil.*;150(3):129-31. Hungarian.

Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Széplaki G, Prohászka Z, Kalabay L, Acsády G. (2011) Serum Fetuin-A Levels Inversely Correlate with the Severity of Arterial Calcification in Patients with Chronic Lower Extremity Atherosclerosis without Renal Disease *Int Angiol.*;30(5):474-50. **IF: 0.993**

Sótonyi P, Csobay-Novák Cs, Balázs Gy, Krepuska M, Acsády Gy. (2010) A bal arteria carotis communis és subclavia okklúziója *Vascularis Neurológia* 2: pp. 52-55.