

Aus der Klinik für Innere Medizin II,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Vascular adhesion protein 1 bei metabolischem Syndrom und
chronischen Lebererkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von
Marcel Julian Kraemer
Geboren am 30.12.1994 in Esslingen a.N., Deutschland

Tag der Promotion:

14. Dezember 2020

Dekan:

Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. Jochen G. Schneider

Prof. Dr. Martin Van der Laan

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | 5 |
| Deutscher Abstract | 5 |
| English Abstract | 7 |
| Einleitung | 8 |
| Allgemeines | 8 |
| Struktur und Genetik des VAP-1 | 8 |
| Freisetzung des VAP-1 | 9 |
| SSAO-Aktivität und deren physiologische Auswirkungen | 10 |
| Die verschiedenen VAP-1 Messverfahren..... | 10 |
| Gemeinsame Wirkweise der adhäsiven und enzymatischen VAP-1 Domäne..... | 11 |
| Pathophysiologische Rolle des VAP-1 bei einzelnen Erkrankungen..... | 12 |
| VAP-1 bei Diabetes mellitus | 12 |
| Obesity und VAP-1 | 13 |
| Chronische Lebererkrankungen und VAP-1..... | 13 |
| Zielsetzungen..... | 15 |
| Vergleich der Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung..... | 15 |
| Studienkollektiv 1 - Obesity..... | 15 |
| Studienkollektiv 2 - Hepatitis C | 15 |
| Methoden | 16 |
| Studienkollektiv 1 - Obesity: Aufbau der Studie..... | 16 |
| Studienkollektiv 2 - Hepatitis C: Aufbau der Studie | 17 |
| VAP-1 Konzentrationsbestimmung mittels ELISA | 19 |
| Prinzip | 19 |
| Vorgehensweise | 20 |
| SSAO-Aktivitätsmessung mittels fluorometrischer Detektion..... | 21 |
| Prinzip | 21 |
| Vorgehensweise | 22 |
| Statistik | 24 |

| | |
|---|-----------|
| Ergebnisse | 25 |
| Studienkollektiv 1 - Obesity | 25 |
| Studienkollektiv..... | 25 |
| VAP-1 Konzentration | 28 |
| SSAO-Aktivität..... | 28 |
| Studienkollektiv 2 - Hepatitis C..... | 30 |
| Aufbau des Studienkollektivs | 30 |
| Einteilung nach Elastographie-Ergebnissen..... | 30 |
| Einteilung nach Biopsie-Ergebnissen..... | 34 |
| VAP-1 Konzentration | 35 |
| Korrelationsanalysen | 37 |
| Regressionsanalysen | 37 |
| VAP-1 Grenzwerte für das Vorliegen einer Zirrhose | 40 |
| SSAO-Aktivität..... | 41 |
| Vergleich der Studienkollektive | 42 |
| Diskussion | 45 |
| Studienkollektiv 1 - Obesity | 45 |
| Validität des Studienkollektivs..... | 45 |
| VAP-1 Freisetzung..... | 46 |
| Gestörte Glukosetoleranz und VAP-1 im Plasma..... | 47 |
| Gewichtsreduktion und VAP-1 Veränderungen..... | 47 |
| Studienkollektiv 2 - Hepatitis C..... | 48 |
| Aufbau und Validität des Studienkollektivs..... | 48 |
| Vergleich zur NAFLD und anderen CLDs | 49 |
| VAP-1/ SSAO und seine pathophysiologischen Einflüsse..... | 50 |
| Zusammenschau der Studienkollektive | 51 |
| Beinflussende pathophysiologische Zustände | 51 |
| Vergleiche mit publizierten Daten | 52 |
| Zusammenfassung | 53 |
| Abkürzungen | 54 |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Literaturverzeichnis | 56 |
| Danksagung..... | 62 |
| Publikationen..... | 63 |
| Lebenslauf | 74 |

Zusammenfassung

Deutscher Abstract

Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) ist ein bifunktionelles Glykoprotein, das sowohl über seine enzymatische Aktivität als auch als Adhäsionsmolekül Einfluss auf die Leukozyten-Anlockung und -Transmigration nimmt. VAP-1 findet sich membrangebunden in Endothel- und Muskelzellen, in Adipozyten sowie im menschlichen Plasma. Die freisetzenden Zellen sowie die Freisetzungsmechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Verschiedene Erkrankungen, die mit einer chronischen Entzündungsreaktion einhergehen, wurden mit erhöhten VAP-1 Konzentrationen bzw. dessen vermehrter enzymatischer Aktivität assoziiert. So ist VAP-1 anscheinend in die Pathophysiologie der Arteriosklerose, des chronischen Nierenversagens, des Diabetes mellitus und chronischer Lebererkrankungen involviert.

Ziel meiner Doktorarbeit war es, Alterationen in VAP-1 Konzentration und enzymatischer Aktivität in zwei verschiedenen Patientenkohorten mit unterschiedlichen chronischen Erkrankungen zu untersuchen.

Das erste Studienkollektiv bestand aus 60 Patienten mit metabolischem Syndrom/Adipositas und hatte zum Ziel, die Beziehung zwischen der Fettmasse und der Plasma-VAP-1 Konzentration sowie seiner enzymatischen Aktivität zu untersuchen. Dabei bestimmte ich die VAP-1 Konzentration und die enzymatische Aktivität in dem Studienkollektiv, welches an einem 6-monatigen, medizinisch begleiteten Abnehmprogramm teilnahm. Der BMI reduzierte sich um durchschnittlich 12,3 %, das Gesamtkörperfett um 27,4 %, aber sowohl die VAP-1 Konzentration als auch die enzymatische Aktivität im Plasma blieben zu allen Zeitpunkten konstant. Die Reduktion des Fettgewebes wurde dementsprechend nicht von VAP-1 Veränderungen begleitet. Direkte Assoziationen zwischen VAP-1 und den Parametern BMI, Blutzucker sowie Fettgewebssmasse zeigten sich nicht.

Im zweiten Studienkollektiv habe ich die Plasma-VAP-1 Konzentration sowie die enzymatische Aktivität in einer Studienkohorte aus 322 Hepatitis C-Patienten bestimmt. Es sollte untersucht werden, ob VAP-1 sich als Fibrose-Biomarker bei Hepatitis C eignen könnte. Die VAP-1 Konzentration und die enzymatische Aktivität wurden mit den Fibrorestadien (elastographisch und bioptisch) sowie den klinischen, laborchemischen und elastographischen Daten verglichen. Es zeigten sich bei höhergradiger Fibrose deutlich erhöhte VAP-1 Konzentrationen im Plasma, und die enzymatische Aktivität stieg moderat an. Die VAP-1 Konzentration korrelierte deutlich mit den Elastographie-Werten und war ein unabhängiger Einflussfaktor der Lebersteifigkeit.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Adipozyten an der VAP-1 Freisetzung ins Plasma vermutlich keinen großen Anteil haben und weitere Quellen in Betracht gezogen

werden müssen. Außerdem zeigt die Arbeit nach aktuellem Wissensstand erstmals die Assoziation zwischen VAP-1 und einer zunehmenden Fibrose in einem Hepatitis C-Studienkollektiv. Als alleiniger Biomarker lieferte die VAP-1 Konzentration aber keine bessere Abschätzbarkeit des Fibrorestadiums als bisher etablierte Verfahren.

English abstract

Vascular adhesion protein 1 in metabolic syndrome and chronic liver diseases

Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) is a bifunctional glycoprotein which propagates leucocyte attraction and transmigration both, through its enzymatic activity and as an adhesion molecule. VAP-1 exists in a membrane-bound form in endothelial and muscle cells and in adipocytes as well as in a soluble form in human plasma. The releasing cells and mechanisms are still largely unknown. Different diseases which are accompanied with a chronic inflammatory reaction are associated with increased VAP-1 concentrations and its enzymatic activity. VAP-1 is likely involved in the pathophysiology of arteriosclerosis, chronic kidney injury, diabetes mellitus and chronic liver diseases.

The objective of my thesis was to investigate alterations of the VAP-1 concentration and activity in two study cohorts with different chronic diseases.

The first study collective consisted in 60 patients with metabolic syndrome/ obesity and aimed to investigate the association between the fat mass and the plasma VAP-1 concentration as well as the enzymatic activity. Therefore, I measured the VAP-1 concentration and enzymatic activity in the study collective undergoing a 6-month medical-supervised weight-loss program. The BMI decreased in average 12.3 %, the body fat 27.4 %, but both, the VAP-1 concentration and the enzymatic activity in the plasma remained constant in all time points. Accordingly, the reduction of the fat mass was not accompanied by VAP-1 alterations. There were no direct associations between VAP-1 and the parameters BMI, blood sugar and fat mass.

In the second study collective I measured the plasma VAP-1 concentration and enzymatic activity in a study cohort of 322 hepatitis C patients investigating if VAP-1 is a suitable biomarker of fibrosis in hepatitis C. The VAP-1 concentration and enzymatic activity were compared with the fibrosis stadium (elastographic and bioptic) and the clinical, laboratory and elastographic data. The study demonstrated clearly elevated VAP-1 concentrations in the plasma of high-grade fibrosis subjects while the enzymatic activity increased modestly with fibrosis stages. The VAP-1 concentration correlated plainly with the elastography and was an independent predictor of the liver stiffness.

In conclusion we can speculate that adipocytes don't play a major role in the VAP-1 release in the plasma and other releasing cells should be taken into consideration. Furthermore, this work shows to our knowledge for the first time an association between VAP-1 and progressive fibrosis in a pure Hepatitis C study collective. VAP-1 as a single biomarker didn't provide a better estimation of the fibrosis stadium than the already established methods.

Einleitung

Allgemeines

Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) ist ein Glykoprotein, das in chronische Entzündungsreaktionen und pathophysiologische Umbauvorgänge involviert ist, die mit einer Leukozyten-Infiltration einhergehen. Seine Wirkung erreicht es zum einen als Adhäsionsmolekül, indem es die Anlockung, Adhäsion und den Übertritt von Leukozyten in entzündetes Gewebe durch die Sekretion von Chemokinen und Interaktion mit Oberflächenproteinen unterstützt [1]. Zum anderen wirkt es über seine enzymatische Aktivität [2], die sich ebenfalls auf die Leukozytenadhäsion auswirkt. Diese enzymatische Aktivität wird auch Semicarbazide-sensitive amino oxydase (SSAO)-Aktivität genannt. SSAO bewirkt eine oxidative Desaminierung endogener und exogener Amine wie Benzylamin und Methylamin in Aldehyde. Dabei entstehen reaktivere Produkte. Diese begünstigen die Entstehung von Advanced Glycation End (AGE) Products. Diese AGEs und weitere Produkte wie Hydrogen-Peroxid und Ammonium wirken direkt zytotoxisch und erhöhen das oxidative Stressniveau des betroffenen Gewebes bzw. im Serum [3].

VAP-1 ließ sich sowohl als membrangebundenes Oberflächenmolekül als auch in gelöster Form im menschlichen Plasma nachweisen [4]. Es fand sich auf Endothelzellen, Muskelzellen, Adipozyten und hepatischen Sinusendothelzellen. Im physiologischen Zustand zeigten sich besonders auf der Endothelzellwand in Lymphknoten hohe Konzentrationen [5]. Bei vielen chronischen Entzündungserkrankungen fanden sich deutlich erhöhte Konzentrationen membrangebunden im betroffenen Gewebe und ebenfalls frei vorliegend im Plasma. Über erhöhte VAP-1 Konzentrationen bei chronischen Lebererkrankungen (CLD) auf hepatischen Sinusendothelzellen und im Plasma wurde schon mehrfach berichtet. Auch Atherosklerose bzw. koronare Herzkrankheit [6], Diabetes mellitus [7, 8] und chronisches Nierenversagen [9] gingen in mehreren Studien mit erhöhten Plasma- und Parenchymkonzentrationen einher. Die genaue pathophysiologische Rolle von VAP-1 bei den genannten Erkrankungen ist bisher allerdings noch nicht ausreichend aufgeklärt.

Struktur und Genetik des VAP-1

VAP-1 gehört zur Familie der copper-containing Amino Oxidasen (AOC) und wird in der Literatur auch als AOC3 bezeichnet. Es ist ein 180 kDa schweres homodimeres Molekül, bestehend aus 4 Domänen mit O- und N-Oligosaccharid-Ketten, die mit der adhäsiven Funktion in Verbindung gebracht werden. Zusätzlich besitzt es ein Topaquinoxin als Kofaktor. Das menschliche Gen für AOC3 ist auf Chromosom 17 lokalisiert [10] (17q21.31). Es ist die wichtigste Quelle für primäre Aminooxidasen im menschlichen Plasma, AOC1 und AOC2

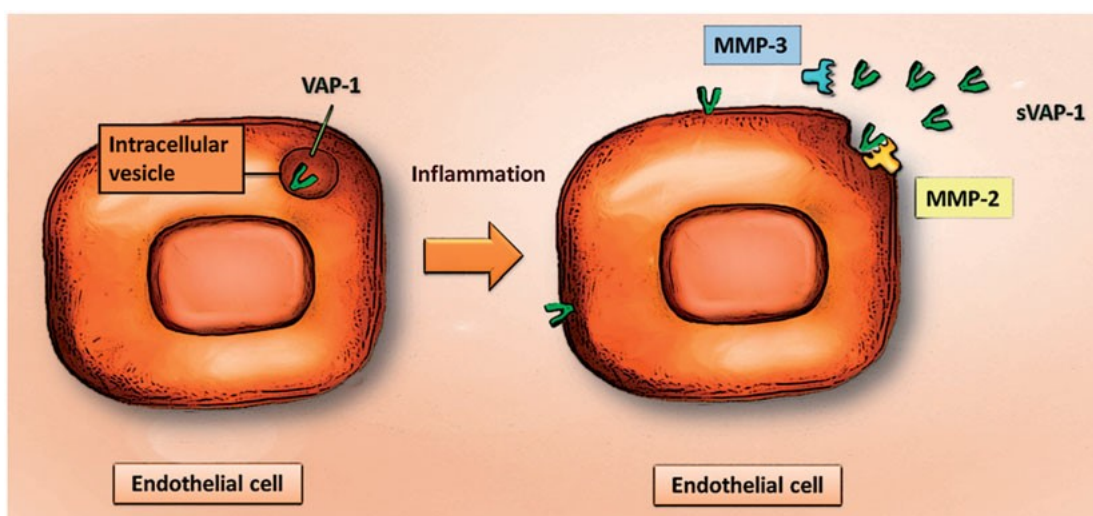
sowie Lysyl-Oxidasen machen nur einen kleineren Anteil aus, AOC2 ist eine Retina-spezifische Amino Oxidase [11-13].

Neben der Expression in Adipozyten und glatten Muskelzellen, ist es präsent in fenestrierten, kontinuierlichen und diskontinuierlichen Endothelzellen [5]. In der Embryonalzeit kommt es bereits in der 7. Schwangerschaftswoche zu einer Expression in Endothelzellen und Adipozyten [14]. Ex vivo zeigten sich Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interferon-gamma und Lipopolysaccharide (LPS) als Regulatoren der VAP-1 Expression [15]. In vitro wurde bisher in Adipozyten TNF als Regulator ausgemacht [16]. Mehr ist über die Regulation der Transkription in vivo bisher nicht bekannt.

Freisetzung des VAP-1

VAP-1 wird in intrazellulären Vesikeln gespeichert [17] und bei Vorliegen von inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 und IL-4 kommt es zu einer Translokation der VAP-1-Vesikel zur Zellwand [15]. Membrangebunden entfaltet es dann die im Folgenden beschriebenen Wirkungen.

Die Herkunft des frei im Plasma vorliegenden VAP-1 ist bisher nicht geklärt. Es wurde jedoch vermutet, dass durch einen Metalloproteinase-abhängigen Weg das membrangebundene VAP-1 freigesetzt wird (Graphik 1) [18]. Bei der Freisetzung aus Adipozyten könnte TNF-alpha eine Schlüsselrolle spielen. In Zellkulturen stimulierte TNF-alpha die VAP-1 Freisetzung aus Adipozyten [15]. Laut Abella et al. [18] könnten die bei Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesenen erhöhten TNF-alpha-Konzentrationen, die mit einer erhöhten Insulinresistenz einhergehen, die erhöhten VAP-1 Konzentrationen im Plasma durch eine vermehrte Freisetzung aus Adipozyten verursachen.



Graphik 1. Metalloproteinase (MMP)-abhängige Freisetzung des intravesikulär gespeicherten VAP-1 ins Plasma. Die Graphik stammt von Pannecoek et al., 2015 [19].

Als Hauptquelle der VAP-1 Freisetzung wurden in Mausexperimenten unter physiologischen Bedingungen Endothelzellen ausgemacht, Adipozyten trugen einen etwas kleineren Anteil bei. Bei Vorliegen eines Diabetes mellitus konnte dagegen gezeigt werden, dass VAP-1 vermehrt aus Adipozyten freigesetzt wird [20]. Da sich zeigte, dass die Konzentration von VAP-1 im Plasma in der Portalvene niedriger ist als in den Lebervenen, ist die Leber mutmaßlich ebenfalls ein wichtiger Freisetzungsort. insbesondere bei Vorliegen einer CLD. Die hepatischen Sternzellen und die hepatischen Endothelzellen könnten hier die Hauptfreisetzungsorte sein [21].

SSAO-Aktivität und deren physiologische Auswirkungen

Die enzymatische Aktivität wird auch Semicarbazide-sensitive amino oxydase (SSAO)-Aktivität genannt. VAP-1 mit seiner enzymatischen Aktivität ist neben den Monoaminoxidasen (MAO A und B) ein Teil der Aminooxidasen-Familie, im menschlichen Plasma macht VAP-1/ SSAO den größten Teil der Aminooxidasen-Aktivität aus [21].

Die ausgelösten oxidativen Desaminierungs-Reaktionen begünstigen in den VAP-1 reichen Zellen und im Plasma die Entstehung von Advanced Glykation End Products die am Crosslinking von Proteinen mitbeteiligt sind [22]. Ebenfalls entsteht Hydrogen-Peroxid (H_2O_2), das den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugerechnet wird und als Signalmolekül in Apoptosevorgängen und in der Atherogenese mitwirkt. Auch Ammonium ist ein entstehendes Nebenprodukt; es wirkt direkt zytotoxisch und unterstützt als zytotoxische Substanz u.a. bei Diabetes mellitus die vaskuläre Dysfunktion [3].

Die verschiedenen VAP-1 Messverfahren

In den letzten 50 Jahren wurden mehrere Messverfahren beschrieben, mit denen eine Quantifizierung des VAP-1 möglich ist. Die älteste beschriebene Verfahrensweise aus dem Jahr 1967 war eine photometrische Methode [23], die heutzutage aber als zu ungenau angesehen wird. 1969 wurde eine Methode beschrieben, welche die Aminooxidase-Aktivität mittels Radioaktivität nachwies [24]. Diese war zwar sehr präzise und quasi frei von Hintergrundsignalen der Samples, war allerdings recht teuer und hatte die typischen Nachteile radioaktiver Methoden, wie potentielle Gefährdung des Personals und Entstehung radioaktiven Abfalls.

Neuere Verfahren aus den letzten 20 Jahren sind ein zeitabhängiger Immunfluoreszenz-Assay [9] und eine Auftrennung durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) [25]. Die Chromatographie ist ebenfalls sehr sensitiv, benötigt aber viel Zeit.

Eine weitere etablierte Methode ist das ELISA-Verfahren [26], das auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurde. Dieses bereits häufig eingesetzte Verfahren zielt allein auf die

Bestimmung der VAP-1 Konzentration, nicht der Aktivität, in beliebigem Gewebe oder im Blutplasma.

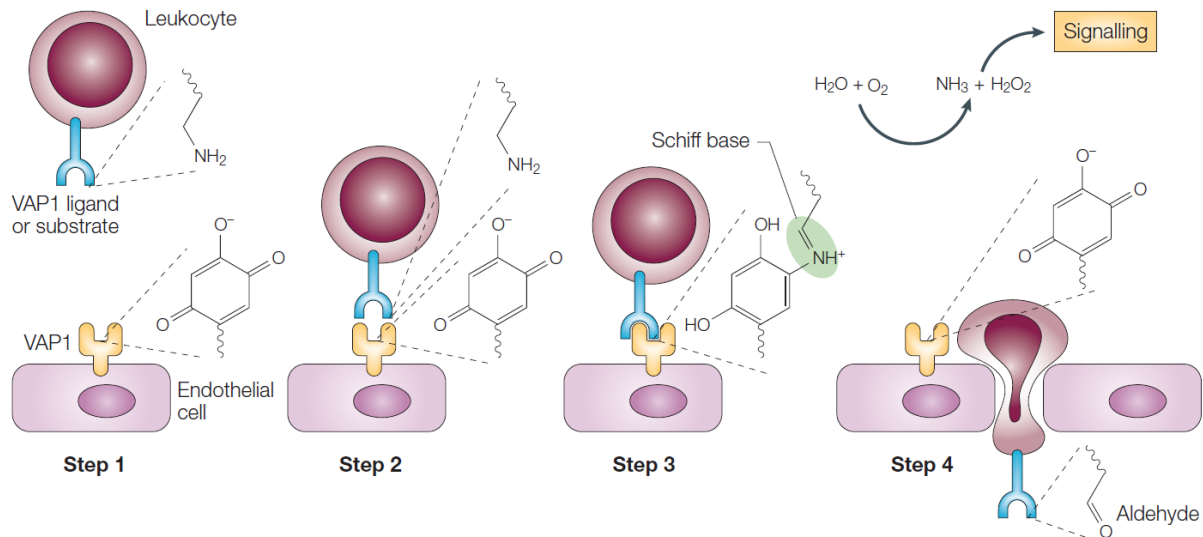
Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mittels einer Fluoreszenzmessung [6] die Amino-Oxidase-Aktivität (SSAO-Aktivität, enzymatische Aktivität des VAP-1) im Blutplasma bestimmt. Das Verfahren basiert auf einer Fluoreszenzmessung der umgesetzten Substratmenge in einem bestimmten Zeitraum nach Zugabe der entsprechenden Substrate. Für die genaue Vorgehensweise der beiden angewandten Methoden sei auf den Methodik-Teil verwiesen.

Gemeinsame Wirkweise der adhäsiven und enzymatischen VAP-1 Domäne

VAP-1 wirkt als Oberflächenmolekül an der Adhäsion diverser Leukozyten mit. Für die Transmigration sind sowohl die adhäsive Domäne als auch die enzymatische Aktivität wichtig. Die allgemeine Kaskade lautet wie folgt: Nach der Anlockung eines Leukozyten an hochendotheliale Venolen (HEV) wird die Adhäsion des Leukozyten an das Endothel durch die Ausschüttung von Chemokinen erreicht. Dieser transmigriert dann schließlich durch die Gefäßwand in Richtung des entzündlichen Prozesses und zuvor den dort ausgeschütteten chemotaktischen Botenstoffen [5]. In dieser komplexen Interaktionskaskade wirken VAP-1 und die entstehenden Produkte der enzymatischen Aktivität mit (siehe Abschnitt SSAO-Aktivität). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese die Adhäsion von CD8+ zytotoxischen T-Zellen und CD16-positiven Zellen sowie Monozyten und Granulozyten unterstützten [27]. Bei einer experimentellen Hemmung des VAP-1 durch einen VAP-1 Antikörper wurde die Zahl der transmigrierenden Leukozyten in Tiermodellen deutlich gesenkt [28], eine Hemmung der SSAO-Aktivität verminderte den Übertritt von Granulozyten [29].

Ein von Salmi und Jalkanen [30, 31] postuliertes Modell sieht wie folgt aus (Graphik 2): Ein im Plasma frei vorliegender Leukozyt präsentiert sich einer Endothelzelle mit membrangebundenem VAP-1, um in ein angrenzendes entzündetes Gewebe zu transmigrieren (Graphik 2- Step 1). Als mögliche Liganden des Leukozyten wurden Siglec-9 und Siglec-10 ausgemacht, die auf der Oberfläche verschiedener Leukozyten vorhanden sind [32]. VAP-1 bindet dann unabhängig von der enzymatischen Aktivität an ein Oberflächen-Epitop des Leukozyten (Graphik 2- Step 2). Im nächsten Schritt wird das Oberflächen-Epitop als Substrat für eine enzymatische Desaminierungs-Reaktion im katalytischen Zentrum des VAP-1 Moleküls verwendet. Es entsteht über den Zwischenschritt einer Schiff'schen Base, die die Bindung zwischen den beiden Zellen festigt, schließlich ein Aldehyd als Oberflächen-Molekül des Leukozyten (Graphik 2- Step 3). Bei dieser Reaktion werden Ammonium und Hydrogen-Peroxid frei, die als Signalmoleküle weitere Schritte induzieren können. In der Folge löst sich die Bindung zwischen dem Leukozyten und VAP-1 wieder, und der Leukozyt kann durch das Endothel transmigrieren (Graphik 2- Step 4). Zusammenfassend liegt also eine

komplexe Interaktion von VAP-1 als Adhäsionsprotein und als enzymatisch aktives Glykoprotein vor.



Graphik 2. Die Rolle des VAP-1 in der Interaktionskaskade eines Leukozyten mit der Endothelzellwand. Die Graphik stammt von Salmi et Jalkanen, 2005 [31].

Pathophysiologische Rolle des VAP-1 bei einzelnen Erkrankungen

VAP-1 bei Diabetes mellitus

In Studien der vergangenen Jahre fanden sich bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 erhöhte VAP-1 Konzentrationen im Blutplasma [7], und das kardiovaskuläre Risiko sowie die Gesamtsterblichkeit korrelierten mit der VAP-1 Konzentration [33]. Durch eine erhöhte enzymatische VAP-1 Aktivität wird mutmaßlich sowohl die Glukoseaufnahme in die Adipozyten und glatten Muskelzellen über die Translokation von GLUT-4-Transportern in die Zellmembran gefördert, als auch die Insulin-unabhängige Glukoseaufnahme [34]. Ebenso wird vermutet, dass VAP-1 die Lipolyse in den Adipozyten hemmt und dort Insulin-gleiche Effekte zeigt [29].

Übergewichtige Patienten, bei denen eine gestörte Glukosetoleranz vorlag, zeigten höhere SSAO-Aktivitäten als übergewichtige Patienten ohne gestörte Glukosetoleranz [35].

Obesity und VAP-1

VAP-1 soll membrangebunden in Adipozyten in erhöhten Konzentrationen vorliegen bei adipösen Patienten [36]. Mercier et al. nahmen an, dass VAP-1 an der Adipozyten-Differenzierung und der Vermehrung des Fettgewebes beteiligt sein könnte, insbesondere durch die enzymatische Aktivität und die Produktion von Hydrogen-Peroxid [37]. Ebenfalls wurde Adipositas mit einer zunehmenden Leukozyteninfiltration ins Fettgewebe und geringgradiger Inflammation in Verbindung gebracht [19].

Ob die SSAO-Aktivität bzw. die VAP-1 Konzentration bei übergewichtigen Patienten erhöht, erniedrigt oder unverändert ist, ist bisher aufgrund widersprüchlicher Publikationen umstritten. In einer Studie mit einem deutlich übergewichtigen Patientenkollektiv (durchschnittlicher BMI 42,9 kg/m²) zeigte sich eine deutlich erhöhte SSAO-Aktivität im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hierbei war die SSAO-Aktivität bei Patienten mit zusätzlicher gestörter Glukosetoleranz noch einmal höher [38].

In einer kürzlich publizierten Studie von Castera et al. [35] zeigten sich keine Unterschiede der membrangebundenen SSAO-Aktivität bei Adipozyten verschiedener Fettgewebstypen zwischen einem Kollektiv adipöser Patienten mit und einem ohne gestörter Glukosetoleranz. Die SSAO-Aktivität im Plasma war bei dem Patientenkollektiv mit gestörter Glukosetoleranz allerdings signifikant höher. Deshalb bezweifelten die Autoren eine direkte Freisetzung der membrangebundenen Form des VAP-1 ins Blutplasma aus Adipozyten beim Menschen, obwohl dies rein mengenmäßig aufgrund einer 250- bis 1000-fach höheren Konzentration in den Adipozyten denkbar wäre. Die Frage, ob die Adipozyten ein relevanter Freisetzungsort für das im Plasma befindliche VAP-1 sind, ist bisher aufgrund unterschiedlicher Studienergebnisse unbeantwortet.

In der ersten Studienkohorte dieser Arbeit wurden adipöse Patienten inkludiert, die an einem 6-monatigen medizinisch begleiteten Abnehmprogramm teilnahmen. Bei Ihnen wurde VAP-1 zu mehreren Zeitpunkten gemessen und mit den klinischen und laborchemischen Daten verglichen.

Chronische Lebererkrankungen und VAP-1

Chronische Lebererkrankungen (CLD) sind durch eine zunehmende Destruktion des Leberparenchyms gekennzeichnet. Es kommt zu einer verstärkten Fibrosierung und schließlich zur Zirrhose. Die häufigsten Ursachen sind die alkoholische Fettlebererkrankung, Virushepatitiden und mit aktuell zunehmender Inzidenz die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD). Hepatitis C als ein Vertreter der Virushepatitiden ist mit 185 Millionen Betroffenen weltweit eine der häufigsten Ursachen einer CLD, etwa 20 % der Infizierten entwickeln eine Leberzirrhose [39]. Auch wenn inzwischen eine erfolgreiche

medikamentöse Behandlung möglich ist, wird diese aufgrund der hohen Therapiekosten einem Großteil der weltweit Betroffenen in den nächsten Jahren noch nicht zugänglich sein.

Erhöhte VAP-1 Konzentrationen im Plasma zeigten sich bei der alkoholischen Leberkrankheit (ALD), der primär biliären Zirrhose (PBC), den viralen Hepatitiden, dem Budd-Chiari-Syndrom, der Portalvenenthrombose, der kryptogenen Zirrhose, der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NAFLD/ NASH), die alle über eine progrediente Fibrosierung schließlich zur Leberzirrhose führen können [21, 26, 40].

Die progrediente Fibrosierung bzw. die Destruktion des Leberparenchyms wird durch eine Infiltration des Parenchyms durch verschiedene Immunzellen und eine zunehmende Produktion und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen, insbesondere Kollagen, verursacht [41]. Als involvierte Immunzellen konnten u.a. CD4+- und CD8+-T-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden [42].

VAP-1 ließ sich in den pathophysiologisch veränderten Septen und Portalfeldern vermehrt nachweisen [43]. Es fand sich insbesondere auf hepatischen Sinusendothelzellen [5] und wirkte dort an der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten mit. In der richtungweisenden Studie von Kurkijarvi et al. [21] konnte gezeigt werden, dass bei CLD die Plasma VAP-1 Konzentration in der Vena hepatica signifikant höher als in der Vena portae war. Des Weiteren wurden erhöhte membrangebundene VAP-1 Konzentrationen in den hepatischen Sternzellen nachgewiesen. Bei Vorliegen einer CLD ist daher anzunehmen, dass die Leberzellen einen Großteil des Plasma-VAP-1 freisetzen. Die Folgen erhöhter SSAO-Aktivität verstärken mutmaßlich die Destruktion des Leberparenchyms.

Weston et Adams [44] vermuteten, dass auch die Einnahme von Methylaminen (über Ernährung und Zigarettenkonsum) über die Darmschleimhaut und der Transport über die Portalvene in die Leber eine besondere Rolle spielen könnten, da die Methylamine dann mit der enzymatisch aktiven Domäne des VAP-1 auf hepatischen Sinusendothelzellen interagierten. Die SSAO-Aktivität könne PI3-Kinase-abhängig NF-kappa B aktivieren und damit zu einer erhöhten Chemokin- und Adhäsionsmolekül-Expression führen [45]. Dies verstärke wiederum die Leukozyteninfiltration und könnte den Zusammenhang zwischen Zigarettenkonsum und einem schlechteren Outcome einer CLD erklären [46].

VAP-1 Inhibitoren sind aktuell für verschiedene Indikationen in Erforschung. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines VAP-1 Antikörpers u.a. die Infiltration von CD4+ [47] - und CD8+-Zellen [48] deutlich vermindert. Für die Behandlung der NASH läuft beispielsweise aktuell eine Phase II-Studie mit einem VAP-1 Inhibitor ¹.

In einer Publikation von Weston et al. [40] wurde für NAFLD und NASH-Patienten die VAP-1 Konzentration als möglicher Biomarker für die Leberzirrhose propagiert.

¹ BI 1467335. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03166735, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03166735>

In der zweiten Studienkohorte wurde ein größeres Studienkollektiv mit chronischer Hepatitis C-Infektion im Hinblick auf VAP-1 untersucht und mit laborchemischen, klinischen, elastographischen und bioptischen Daten verglichen.

Zielsetzungen

Das grundlegende Ziel meiner Arbeit war es die pathophysiologischen Einflüsse von VAP-1/SSAO und mögliche VAP-1 Messmethoden bei verschiedenen Krankheitsbildern genauer zu untersuchen und zu vergleichen. Die hierfür untersuchten Patienten-Samples stammten aus zwei separaten Studienkollektiven.

Vergleich der Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung

Der Einsatz zweier unterschiedlicher Messmethoden- der VAP-1 Konzentrationsbestimmung und der SSAO-Aktivitätsmessung - hatte das Ziel, die pathophysiologischen Einflüsse der SSAO-Aktivität getrennt von der VAP-1 Konzentration betrachten zu können, da VAP-1 sowohl über die adhäsive als auch die enzymatische Domäne Einfluss auf chronische Entzündungsreaktionen nehmen kann.

Studienkollektiv 1 - Obesity

Wir wollten untersuchen, ob eine Beziehung zwischen der Fettmasse und der Plasma VAP-1 Konzentration/ SSAO-Aktivität besteht. Aufgrund der möglichen Freisetzung von VAP-1 aus Adipozyten ins Plasma und der gegebenenfalls bestehenden Korrelation zwischen Fettmasse und Plasma VAP-1 wäre eine reduzierte VAP-1 Konzentration/ SSAO-Aktivität vorstellbar nach deutlicher Gewichtsreduktion. Diese Hypothese wollten wir testen.

Studienkollektiv 2 - Hepatitis C

Wir wollten der Frage nachgehen, wie sich die VAP-1 Konzentration und die SSAO-Aktivität bei progredienter Fibrosierung und Zirrhose im Rahmen einer chronischen Hepatitis C-Infektion verhalten. Des Weiteren war die Frage, ob sich VAP-1 als Fibrose-Biomarker bei Hepatitis C eignen könnte.

Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die mit einem ELISA-Verfahren bestimmte VAP-1 Konzentration und die enzymatische Aktivität (SSAO-Aktivität) des VAP-1 immer getrennt voneinander bestimmt und systematisch verglichen. Die Messungen stützten sich auf zwei große Studienkollektive, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

Studienkollektiv 1 - Obesity: Aufbau der Studie

Die verwendeten Plasma- und Serumproben stammten aus einer klinischen Studie des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter Leitung von Herrn Prof. Isermann.

Das Studienprogramm bestand aus einem ärztlich begleiteten telemedizinischen Abnehmprogramm über 6 Monate, bei dem die Teilnehmer sich deutlich mehr bewegten und ihre Kalorienzufuhr reduzierten. Der Name des Programms war „Active body control“ oder „ABC-Programm“. Das Abnehmprogramm wurde an der Universität Magdeburg zuvor schon mehrfach unter gleichen Bedingungen mit Erfolg durchgeführt [49, 50].

Das Studiendesign und die Vorgehensweise wurden durch die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg unter der Nummer 78/11 genehmigt (Antragssteller Dr. Biemann). Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

In der Interventionsgruppe befanden sich 33 bis zum Ende teilnehmende Patienten, in der Kontrollgruppe (keine signifikante Gewichtsabnahme, kein telemedizinisches Programm) 30 Teilnehmer. Die Kontrollgruppe nahm nach den 6 Monaten ebenfalls an dem ABC-Programm teil (Graphik 3), es handelte sich also um eine partielle Cross-over-Studie.

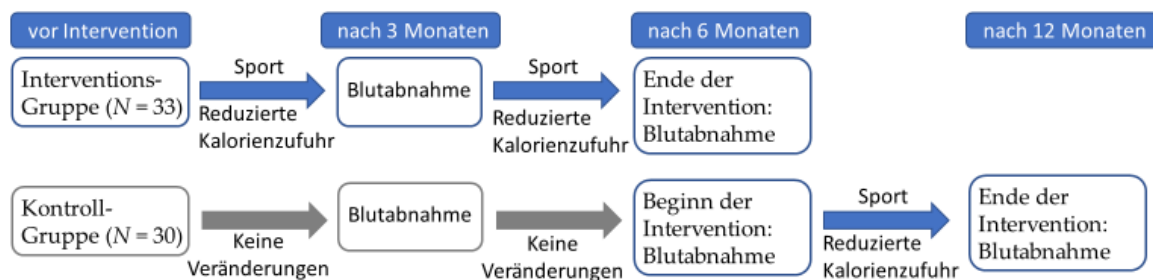
Insgesamt 7 Teilnehmer aus beiden Gruppen zusammen brachen das Programm ab bzw. wurden aufgrund einer Nichteinhaltung des Studienprotokolls exkludiert.

Alle Teilnehmer wurden randomisiert den beiden Gruppen zugeteilt. Alter, BMI, Körpergewicht, Blutdruck (RRsys und RRdys) und HbA1c unterschieden sich zu Beginn des Programms nicht signifikant voneinander. Die Teilnehmer waren alle männlich.

Sämtliche Teilnehmer wurden vor Beginn des Programms, nach 3 Monaten und zum Ende des Programms (nach 6 Monaten) körperlich untersucht, und es wurde jeweils Blut von allen abgenommen. Die Blutabnahme erfolgte morgens nüchtern unter standardisierten Bedingungen. Die Blutproben wurden daraufhin direkt eingefroren und bei -80° Celsius gelagert und ebenfalls gefroren verschickt. Auftau- und Einfrierzyklen wurden vermieden, um die Qualität der Blutproben nicht zu reduzieren. Nach dem Auftauen wurden die Proben sofort analysiert.

Die ursprüngliche Kontrollgruppe wurde nach 12 Monaten erneut untersucht, also nach der Teilnahme am Interventionsprogramm.

Bestimmt wurden neben der Bewegung und der Kalorienzufuhr im Rahmen des Programmes Alter, Gewicht, Größe, Blutdruck, Körperfettanteile, Muskelmasse, kleines Blutbild, Lebersyntheseparameter, Triglycerid- und Cholesterinwerte, Glukose- und Insulinstoffwechselfparameter, Nieren- und Schilddrüsenwerte und Entzündungsparameter (eine genaue Aufschlüsselung findet sich in Tabelle 3 - Ergebnisse).

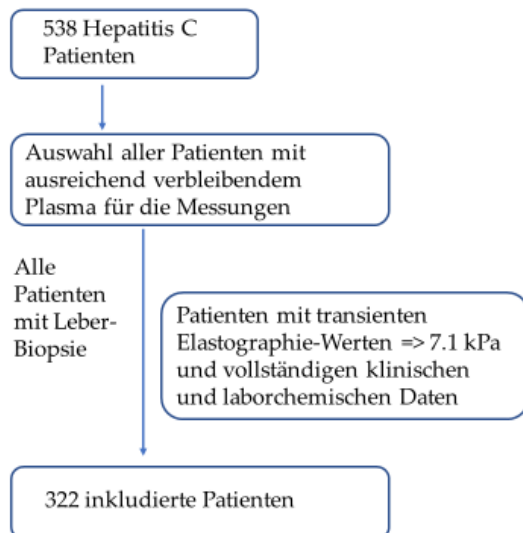


Graphik 3. Ablauf des ABC-Studienprogramms der Universität Magdeburg [50, 51]. Das Studienprogramm wurde beim Studienkollektiv 1 – Obesity mit dem Ziel einer Gewichtsreduktion angewandt.

Studienkollektiv 2 - Hepatitis C: Aufbau der Studie

Die verwendeten Plasmaproben stammten aus einem Patientenkollektiv der Medizinischen Klinik und Poliklinik I (Gastroenterologie) der Universität Bonn und der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Universität des Saarlandes unter Leitung von Herrn Prof. Lammert. Bei sämtlichen inkludierten Patienten lag eine chronische Lebererkrankung vor, alle Fibrosestadien waren vorhanden (F0- F4). Zwei Drittel der CLD hatten eine virale Genese.

Für diese Arbeit wurden aus dem Patientenkollektiv [52] insgesamt 322 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion ausgewählt. Auswahlkriterien (Graphik 4) waren in absteigender Reihenfolge das Vorhandensein ausreichender Plasmamengen und eine zuvor durchgeführte Leberbiopsie mit histologischer Beurteilung. Als weitere Kriterien folgten die möglichst ausgeglichene Verteilung über alle Fibrosegrade und daher der Einschluss von Patienten mit transienten Elastographie-Werten $\geq 7,1$ kPa sowie das Vorhandensein von möglichst vollständigen Untersuchungsdaten und Laborwerten.



Graphik 4. Auswahlkriterien der inkludierten Patienten des Studienkollektivs 2 - HCV. Patienten mit transienten Elastographie-Werten $< 7,1$ kPa stellten nach der Auswahl noch immer die Mehrheit dar (N = 153 von 322).

Das Studiendesign und die Vorgehensweise wurden durch die Ethikkommission der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Zustimmungsnummer 191/05 (Antragssteller Prof. Lammert) und der Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes unter der Zustimmungsnummer 271/11 genehmigt. Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

Alle Patienten wurden vor Aufnahme klinisch untersucht, und es wurde nüchtern unter standardisierten Bedingungen Blut abgenommen. Das Blut wurde direkt eingefroren, bei -80° Celsius gelagert und Auftau- und Einfrierzyklen vermieden. Nach dem Auftauen wurden die Proben sofort verwendet. Bestimmt wurden Lebersyntheseparameter, Transaminasen, Bilirubin und Thrombozyten im Zentrallabor der Universität Bonn. Die Berechnung des Forns- und des APRI-Index konnten bei 138 bzw. 144 Patienten durchgeführt werden, bei den übrigen fehlten Daten oder Laborwerte. Die beiden Indices dienen zur Identifizierung von Patienten mit signifikanter Fibrose bzw. Zirrhose. Der Forns-Index wird berechnet aus Thrombozytenzahl, gamma-Glutamyltransferase (gammaGT), Alter und Cholesterin [53], APRI bedeutet AST to Platelet Ratio [54].

Ebenfalls lag von allen Patienten eine transiente Elastographie-Messung vor. Die Messung erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit dem Fibroscan[®]-Gerät der Firma Echosens SA (Paris, Frankreich).

Bei 92 Patienten waren Ergebnisse einer Leberbiopsie vorhanden. Diese erfolgte nach der perkutanen Menghini-Methode [55] mit einer 1,8 mm-Nadel (Hepafix G15, B. Braun,

Melsungen, Deutschland), die Einteilung in die Fibrosestadien erfolgte nach Desmet et Scheuer [56] bei mindestens 15 vorliegenden Portalfeldern.

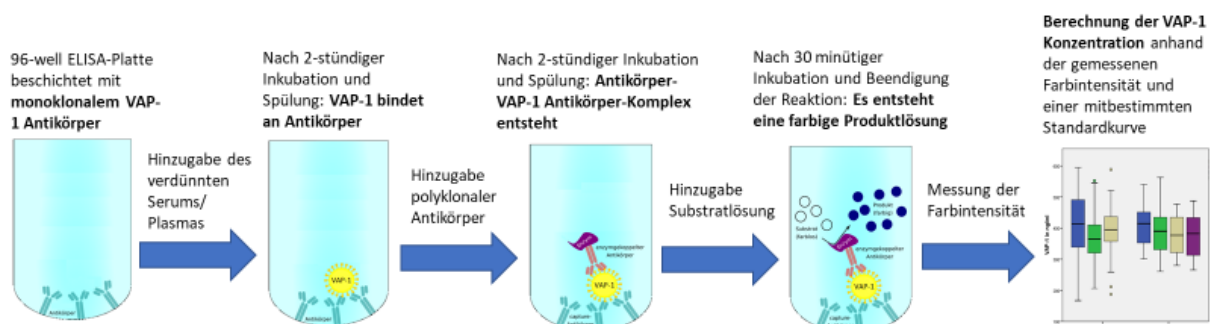
VAP-1 Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Die VAP-1 Konzentration wurde mittels des „Quantikine ELISA Human VAP-1“-Kits von R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA) bestimmt.

Prinzip

Die Bestimmung der VAP-1 Konzentration (in ng/ml Plasma oder Serum) erfolgte analog einem klassischen ELISA-Verfahren (Graphik 5) wie folgt:

Ein monoklonaler Antikörper wurde auf den vom Hersteller mitgelieferten 96-well-Platten in jedem Well aufgetragen und diente als Bindestelle für VAP-1 in dem verdünnt hinzugegebenen Serum/ Plasma bzw. der Lösung zur Erstellung der Standardkurve. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit, in der sich alles im Plasma oder Serum vorliegende VAP-1 an die immobilisierten Antikörper gebunden hatte, wurde die Platte mehrfach gründlich gespült. Zurück blieben die gebundenen VAP-1 Antikörper-Komplexe. Nun wurde ein enzymgebundener polyklonaler Antikörper hinzugegeben, der sich ebenfalls an das VAP-1 band. Nach einer weiteren Inkubationszeit und einem gründlichen Spülvorgang blieben nur die Antikörper-VAP-1 Antikörper-Komplexe zurück („Sandwich-Verfahren“). Nun wurde eine Substratlösung hinzugegeben, die mit dem enzymatischen Teil des zweiten Antikörpers eine Verbindung einging. Dabei löste sie einen Farbumschlag aus. Nach einer halbstündigen Inkubationszeit wurde eine Stopp-Lösung hinzugegeben und die Farbintensität dann photometrisch bestimmt. Aus der immer mitbestimmten Standardkurve mit bekannter Substratmenge konnte die VAP-1 Konzentration berechnet werden.



Graphik 5. ELISA-Verfahren zur VAP-1 Bestimmung. Das Verfahren beruhte auf dem „Sandwich-Verfahren“ und die Messung der Farbintensität erfolgte photometrisch. Teile der Graphik stammen von Wikimedia und wurden für die Verwendung abgeändert (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ELISA.svg>).

Vorgehensweise

Der Assay war laut dem Hersteller R&D Systems für die Bestimmung menschlichen VAP-1 aus Zellkultur-Überstand, Plasma und Serum geeignet. Die intra-Assay-Präzision zeigte laut Hersteller einen Variationskoeffizienten (CV %) von 2,1 % bzw. 1,5 % bzw. 2,4 % und die inter-Assay-Präzision einen CV % von 4,5 % bzw. 4,8 % bzw. 4,7 %.

Die vorliegenden Blutproben waren in Studienkollektiv 1 Serumproben, in Studienkollektiv 2 Plasma. Laut Herstellerangaben sind beide Blutprodukte gleichwertig und es gibt keine Konzentrationsunterschiede zwischen Serum und Plasma. Grund für den Wechsel war das Fehlen von Serum bei Studienkollektiv 2.

In den Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Standardkurve mit jeweils 8 verschiedenen Konzentrationen verwendet: In Studienkollektiv 1 begann die Standardkurve mit 50 ng/ml (Tabelle 1), in Studienkollektiv 2 mit 100ng/ml. Die Standardkurve wurde angepasst, um erhöhten VAP-1 Konzentrationen gerecht zu werden. Sie wurde jeweils anhand von Dreifachmessungen bestimmt, um Pipettier-Ungenauigkeiten zu minimieren.

Die Samples wurden in Studienkollektiv 1 jeweils dreifach bestimmt. In Studienkollektiv 2 wurden nur noch Einfachbestimmungen durchgeführt, da sich keine relevanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Dreifachbestimmungen zeigten. Die durchschnittliche Abweichung zwischen den einzelnen Dreifachbestimmungen der VAP-1 Konzentration betrug 0,72 % im gesamten Studienkollektiv 1. Damit lag sie deutlich unter der vom Hersteller angegebenen intra-assay-Präzision. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den Messungen des Studienkollektivs 2 auf Dreifachbestimmungen verzichtet.

Die Verdünnung erfolgte, wie vom Hersteller empfohlen, auf 1:10. Einzelne von uns durchgeführte Versuche mit einer höheren Verdünnung (1:20 und 1:30) zeigten Ungenauigkeiten bei Wiederholungsbestimmungen.

Die Farbintensität wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrektions-Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

Die Berechnung der Standardkurven erfolgte mit einer SPSS-Regressionsanalyse (SPSS 22.0, IBM, Armonk, USA) aus den Mittelwerten der jeweils 8 gemessenen Standardkurvenkonzentrationen.

Tabelle 1.

ELISA-Verfahren zur VAP-1 Konzentrationsbestimmung. Gegenüberstellung der Messcharakteristika in beiden Studienkollektiven.

| | Studienkollektiv 1 - Obesity | Studienkollektiv 2 - HCV |
|--------------------------------------|---|--|
| Verwendetes Material | Serum | Plasma |
| Verwendete Standardkurve | 50 ng/ml- 25 ng/ml- 12,5 ng/ml- 6,25 ng/ml- 3,125 ng/ml- 1,563 ng/ml 0,781 ng/ml- 0 ng/ml | 100 ng/ml- 50 ng/ml- 25 ng/ml- 12,5 ng/ml- 6,25 ng/ml- 3,125 ng/ml- 1,563 ng/ml- 0 ng/ml |
| Mehrfachbestimmung der Standardkurve | 3-fach | 3-fach |
| Lagerung | -80° Celsius | -80° Celsius |
| Mehrfachbestimmung der Samples | 3-fach | 1-fach |
| Verdünnung | 1:10 | 1:10 |
| Wellenlänge/ Korrektionswellenlänge | 450 nm/ 550 nm | 450 nm/ 550 nm |
| Verwendetes Messgerät | Tecan's Sunrise absorbance microplate reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) | Tecan's Sunrise absorbance microplate reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) |

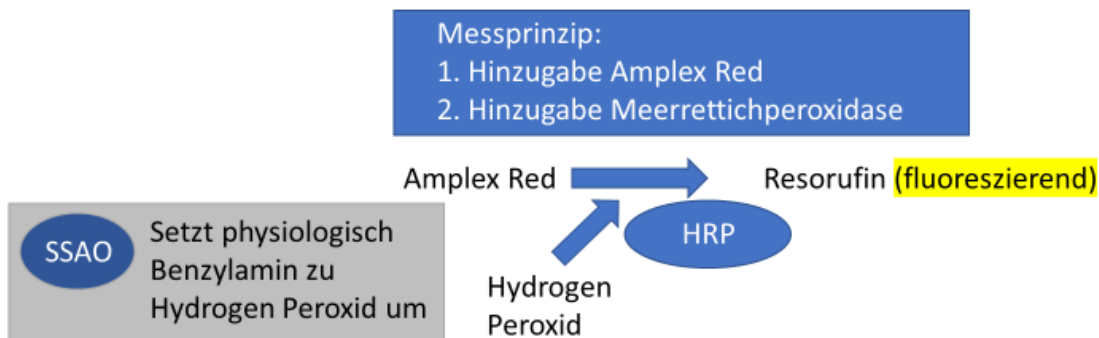
SSAO-Aktivitätsmessung mittels fluorometrischer Detektion

Die SSAO-Aktivitäts-Messungen (enzymatische Aktivität des VAP-1) wurden mit dem „Amplex Red Monoamine Oxidase Assay Kit“ (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) unter Anpassungen des Verfahrensablaufes durchgeführt.

Prinzip

Das Prinzip beruht auf einer fluorometrischen Detektion von Resorufin: Die Familie der Amino-Oxidasen (Monoaminoxidasen, Semicarbazid-sensitive-Aminooxidasen) setzt mit unterschiedlich hoher Affinität die beiden Substanzen Tyramin und Benzylamin um. Hierbei entsteht das reaktionsfreudige freie Hydrogen-Peroxid. Das Messprinzip entsprach folgendem Ablauf (Graphik 6): In verdünnte Plasmaproben mit SSAO-Aktivität wurde Amplex Red (Dihydroxyphenoxazin, ThermoFisher) und Meerrettich-Peroxidase (HRP = horseradish

peroxidase) hinzugegeben. In den Plasmaproben lag aufgrund der SSAO-Aktivität freies Hydrogen-Peroxid vor. Die Meerrettich-Peroxidase wandelte nun mit Hydrogen-Peroxid als Kofaktor Amplex Red zu Resorufin um. Resorufin ist ein fluoreszierender Stoff, der fluorometrisch detektiert werden konnte.



Graphik 6. Messprinzip der SSAO-Aktivität. Resorufin wird photometrisch bestimmt.

Die enzymatische Aktivität des VAP-1 wird meist als SSAO-Aktivität abgekürzt. Dies steht für Semicarbazid-sensitive Amino-Oxidase. Die spezifische Semicarbazid-Sensitivität kann man sich zunutze machen, um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch andere Amino-Oxidasen auszuschließen. Die im menschlichen Serum auch vorhandene Monoaminoxidase-Aktivität und weitere enzymatische Vorgänge, die gegebenenfalls die Umsetzung von Tyramin oder Benzylamin beeinflussen könnten, wurden durch folgendes Prinzip in unseren Messungen ausgeschlossen: Jede Plasmaprobe wurde doppelt bestimmt, einmal nur mit dem Substrat Benzylamin (höhere Affinität für SSAO als für Monoaminoxidasen), einmal mit Benzylamin und dem SSAO-Hemmstoff Semicarbazid. Aus der Differenz konnte dann die spezifische SSAO-Aktivität berechnet werden.

Vorgehensweise

Die Messungen erfolgten auf schwarzen 96 well Microplates mit einer Verdünnung von 1:5 (Details in Tabelle 2). Nach Zugabe des SSAO-Hemmstoffs Semicarbazid wurde das verdünnte Plasma 30 Minuten bei 37 Grad inkubiert. Es wurden jeweils Zweifachbestimmungen mit und ohne Hemmstoff durchgeführt.

Nach der Inkubationszeit wurden das Amplex Red, die Meerrettich-Peroxidase und das Substrat Benzylamin hinzugegeben. Nach 30 Minuten erfolgte alle 5 Minuten eine Messung, bei Minute 60 wurden die Messungen beendet.

Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Korrektur-Wellenlänge von 590nm. Die pro Minute umgesetzte Substratmenge pro ml Plasma konnte aus der Differenz

der Zeitpunkte und der Fluoreszenzintensität mit und ohne den SSAO-Hemmstoff berechnet werden. Die Einheit war ng/ml Plasma/min.

Die Standardkurve wurde mit einer bekannten Menge Resorufin erstellt (Tabelle 2).

Die verwendete Menge von 2 µl Semicarbazid zeigte sich in durchgeführten Versuchen als geeignet, bei einer weiteren Steigerung veränderte sich die gemessene Aktivität nicht mehr.

Verwendet wurde ausschließlich Plasma, wie vom Hersteller empfohlen. Tests mit Serum zeigten leichte Schwankungen der Aktivität.

Die Verdünnung von 1:5 lieferte in den zu Beginn durchgeführten Tests stabilere Ergebnisse als niedrigere Verdünnungen (1:10 und 1:20) bei Wiederholungsmessungen.

Tabelle 2.

Messcharakteristika der SSAO-Aktivitätsmessung

| | Charakteristika |
|--|--|
| Verwendetes Material | Plasma |
| Verwendete Standardkurve mit Resorufin | 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, 0,1 µM, 0,05 µM, 0 µM |
| Mehrfachbestimmung der Standardkurve | 3-fach |
| Lagerung | -80° Celsius |
| Mehrfachbestimmung der Samples | 2-fach |
| Verdünnung | 1:5 |
| Wellenlänge/ Korrektionswellenlänge | 550 nm/ 590 nm |
| Verwendetes Messgerät | Tecan Reader M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) |
| Hemmstoff Messungen | 2 µl 1mM Semicarbazid-Hydrochlorid > 99 % (SigmaAldrich, St. Louis, Missouri, USA) |
| Messplatte | 96 well Microplates (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich) |

Statistik

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit SPSS (SPSS 22.0, IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Korrelationsanalysen erfolgten bei nicht normalverteilten Daten mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten. Zum Vergleich der Mediane zweier Gruppen wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt, für mehr als zwei Gruppen erfolgten Kruskal-Wallis-Tests. Der Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen erfolgte anhand von Varianzanalysen (ANOVA) und Bonferroni-Post-hoc-Tests. Lineare Regressionsanalysen wurden durchgeführt, um unabhängige Einflussvariablen zu bestimmen, Receiver-operating-curve (ROC) -Analysen erfolgten zur Bestimmung von Grenzwerten. Ergebnisse wurden jeweils als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war.

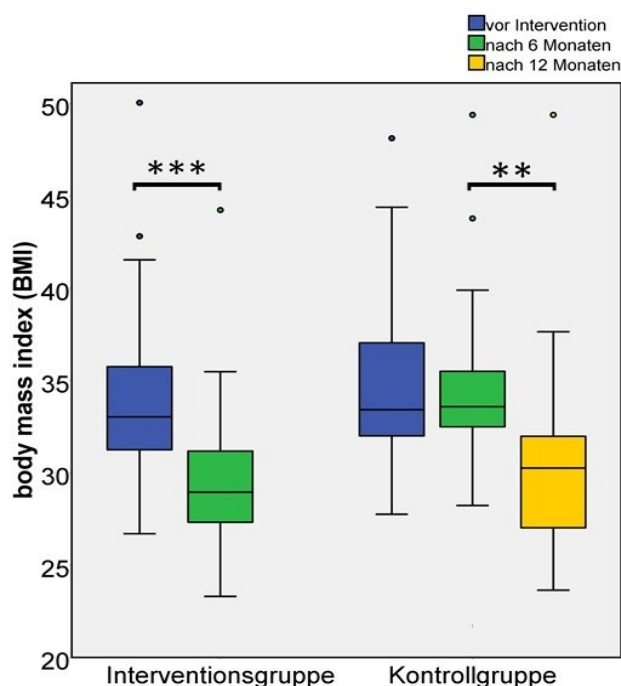
Ergebnisse

Studienkollektiv 1 - Obesity

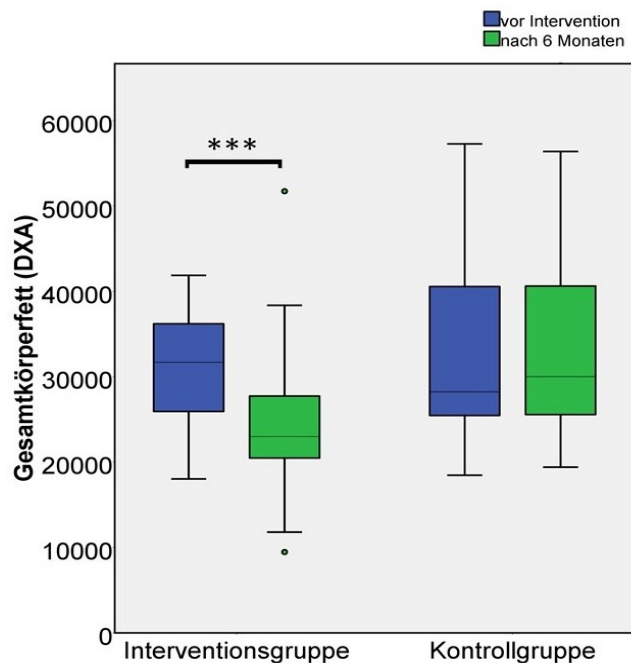
Studienkollektiv

Die Interventionsgruppe 1 bestand aus 33 Patienten, die Kontrollgruppe aus 30 Patienten. Die Intervention bestand aus einem täglichen Bewegungsprogramm und reduzierter Kalorienzufuhr, die Probanden wurden dabei telemedizinisch begleitet. Die Kontrollgruppe nahm im Anschluss als Interventionsgruppe 2 ebenfalls an dem Abnehmprogramm teil. Das Durchschnittsalter betrug in beiden Gruppen 48 Jahre, alle Teilnehmer waren männlich und bei allen wurde vor der Intervention ein metabolisches Syndrom diagnostiziert.

Die Teilnehmer der Interventionsgruppe 1 reduzierten ihren BMI um durchschnittlich 12,3 %, dabei reduzierte sich bei 76 % der Teilnehmer das Körpergewicht um mindestens 10 %. Die Interventionsgruppe 2 reduzierte den BMI um 9,8 %. In der Kontrollgruppe stieg der BMI um 0,48 % (Graphik 7). In der Interventionsgruppe wurden 29 von 33 Patienten vor Intervention in Adipositas Grad I eingestuft, nach Intervention hatten noch 12 Patienten Adipositas Grad I. Das Gewicht ging in der Interventionsgruppe um durchschnittlich 12,6 % zurück, das entspricht einer absoluten Gewichts-Reduktion von 13,2 kg. Insbesondere der Gesamtkörperfettanteil ging deutlich zurück, in den Interventionsgruppen durchschnittlich um 23,6 % ($p < 0,001$ ***), die Kontrollgruppe steigerte den Gesamtkörperfettanteil um 1,25 % (Graphik 8). Das viszerale Fettgewebe ging um 25,3 % zurück ($p < 0,001$ ***).



Graphik 7. BMI im Verlauf des Abnehmprogramms: Signifikante Reduktion des BMI in der Interventionsgruppe 1 (12.3 %, $p < 0.001$ ***). In der Kontrollgruppe Anstieg um 0,48 %. Die Interventionsgruppe 2 reduzierte bei der nachfolgenden Intervention ihren BMI ebenfalls signifikant (9.8 %, $p = 0.001$ **). Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.



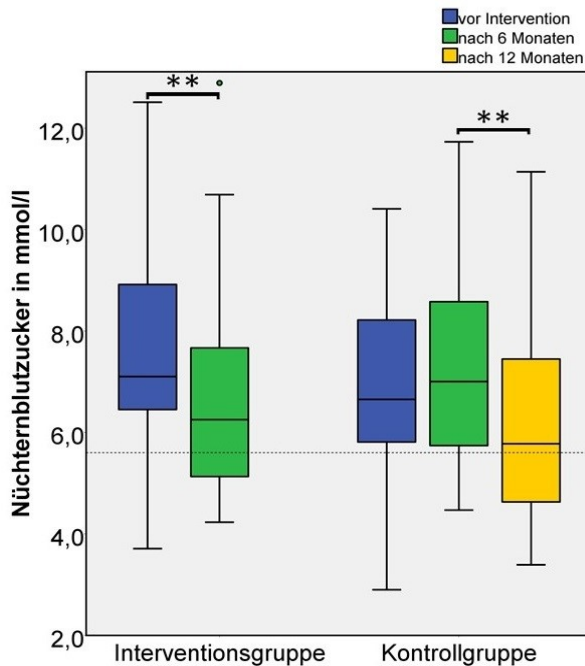
Graphik 8. Gesamtkörperfett im Verlauf des Abnehmprogramms: Signifikante Reduktion des Gesamtkörperfetts in der Interventionsgruppe 1 (27,4 %, $p < 0,001$ ***). In der Kontrollgruppe stieg es um 1,25 % an (nicht signifikant). Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Damit einhergehend sanken die Triglyceride, das Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Nüchtern-Blutzuckerspiegel und Blutzuckerspiegel im oralen Glukosetoleranz-Test, Nüchtern-Insulin, C-Peptid, HOMA, HbA1c, GPT und GOT sowie der systolische und diastolische Blutdruck signifikant ab im Verlauf der 6-monatigen Intervention (Tabelle 3). Das HDL-Cholesterin stieg signifikant an (Tabelle 3). Bei der Kontrollgruppe veränderten sich die zuvor genannten Parameter nicht signifikant (Tabelle 3). Der Nüchtern-Blutzuckerspiegel lag vor der Intervention mit 6,13 mmol/l im Median über dem Grenzwert der American Diabetes Association (ADA) [57] von 5,6 mmol/l zur Diagnose einer Impaired Fasting Glucose (IGF) und sank nach Intervention mit 5,53 mmol/l unter den Grenzwert (Graphik 9).

Tabelle 3.

Studienkollektiv 1 - Obesity: Laborchemische und klinische Werte der Kontroll- und Interventionsgruppe zu Beginn der Studie und nach 6 Monaten. Die Berechnung der Differenz zwischen den einzelnen Gruppen (p-Wert) wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

| | Interventionsgruppe | | | Kontrollgruppe | | |
|-----------------------------|---------------------|----------------|-----------|----------------|----------------|--------|
| | Baseline | Nach 6 Monaten | p | Baseline | Nach 6 Monaten | p |
| Alter | | 48 | | | 48 | |
| Triglyceride (mmol/l) | 2.06 | 1.37 | < 0,01 ** | 2.0 | 2.04 | > 0,05 |
| Gesamt-Cholesterin (mmol/l) | 6.16 | 5.69 | < 0,01 ** | 5.90 | 5.78 | > 0,05 |
| LDL-Cholesterin (mmol/l) | 3.74 | 3.35 | < 0,01 ** | 3.44 | 3.24 | > 0,05 |
| HDL-Cholesterin (mmol/l) | 1.20 | 1.41 | < 0,01 ** | 1.33 | 1.37 | > 0,05 |
| Nüchtern-Glukose (mmol/l) | 6.12 | 5.53 | < 0,01 ** | 5.95 | 5.93 | > 0,05 |
| Nüchtern-Insulin (pmol/l) | 88.0 | 47.0 | < 0,01 ** | 62.5 | 61.0 | > 0,05 |
| HbA1c (mmol/mol) | 37.0 | 35.0 | < 0,01 ** | 38.0 | 37.0 | > 0,05 |
| HbA1c (%) | 5.60 | 5.40 | < 0,01 ** | 5.60 | 5.60 | > 0,05 |
| HOMA | 3.15 | 1.71 | < 0,01 ** | 2.40 | 2.20 | > 0,05 |
| GPT ($\mu\text{mol/s-l}$) | 0.64 | 0.40 | < 0,01 ** | 0.74 | 0.69 | > 0,05 |
| GOT ($\mu\text{mol/s-l}$) | 0.48 | 0.41 | < 0,01 ** | 0.50 | 0.53 | > 0,05 |
| RRsys (mmHg) | 142 | 130 | < 0,01 ** | 140 | 140 | > 0,05 |
| RRdys (mmHg) | 90 | 82 | < 0,01 ** | 90 | 90 | > 0,05 |
| Gesamtkörper-Fett (kg) | 31.69 | 22.98 | < 0,01 ** | 28.23 | 30.02 | > 0,05 |
| Viszerales Fett (kg) | 17.91 | 13.38 | < 0,01 ** | 17.43 | 18.14 | > 0,05 |



Graphik 9. Nüchternblutzuckerspiegel im Verlauf des Abnehmprogramms: Signifikante Reduktion des Nüchternblutzuckerspiegels in beiden Interventionsgruppen. Die horizontale Linie stellt den Grenzwert von 5,6 mmol/L zur Diagnose der Impaired Fasting Glucose (IFG) der American Diabetes Association dar. Die Signifikanz wird angezeigt als ** $p < 0,01$.

VAP-1 Konzentration

Die VAP-1 Konzentration und die SSAO-Aktivität wurden zu Beginn der Intervention, nach drei Monaten und zum Ende der Intervention nach 6 Monaten bestimmt. In der Interventionsgruppe 2 wurden am Ende der Intervention die VAP-1 Konzentration und die SSAO-Aktivität bestimmt. Dabei zeigte die VAP-1 Konzentration keine signifikanten Unterschiede (Graphik 10) zwischen den einzelnen Zeitpunkten in der Interventionsgruppe 1 (vor Intervention: 419,4 ng/ml; nach drei Monaten 375,7 ng/ml; nach 6 Monaten 391,4 ng/ml), der Interventionsgruppe 2 (vor Intervention: 377,5 ng/ml; nach Intervention: 377,6 ng/ml) und der Kontrollgruppe (vor Intervention: 408,0 ng/ml; nach drei Monaten 393,7 ng/ml; nach 6 Monaten 377,5 ng/ml).

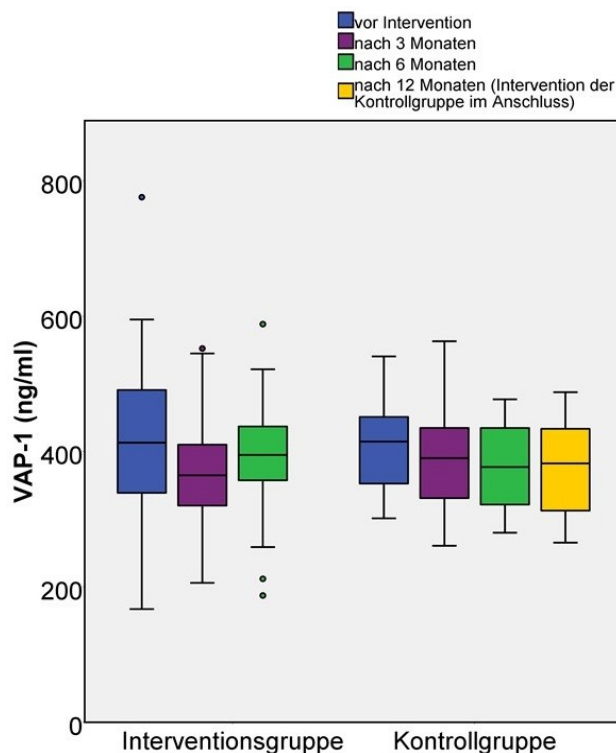
Die VAP-1 Konzentration zeigte des Weiteren zu keinem Zeitpunkt signifikante Korrelationen mit dem BMI, dem Fettgewebe gesamt (absolut und relativer Anteil am Körpergewicht), dem Rumpf-Fett (absolut und relativer Anteil am Körpergewicht) oder dem Körpergewicht. Die VAP-1 Konzentration korrelierte auch nicht mit den Leukozyten und dem CRP, sowie dem HbA1c, Nüchtern-Glucose, HOMA-Index und GPT bzw. GOT.

SSAO-Aktivität

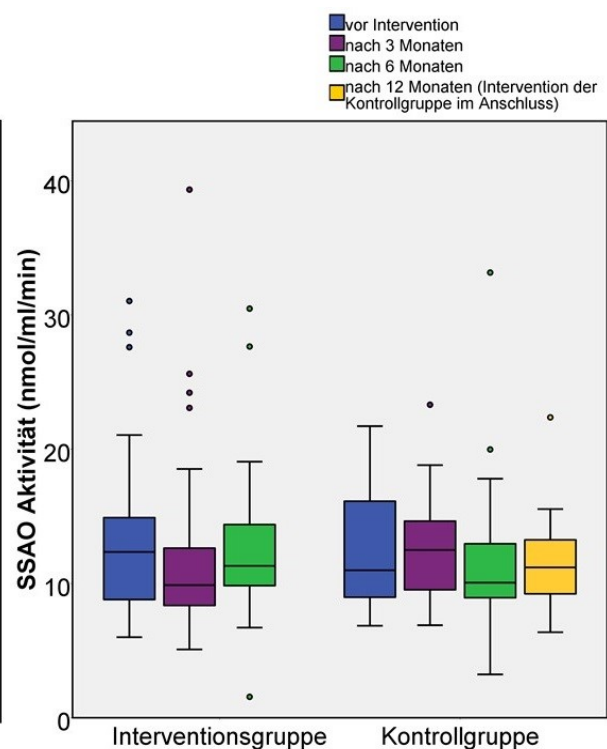
Gleiches galt für die SSAO-Aktivität (Graphik 11): Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Interventionsgruppe 1 (vor Intervention: 13,4 nmol/ml/min; nach drei Monaten 12,5 nmol/ml/min; nach 6 Monaten 12,6 nmol/ml/min), der Interventionsgruppe 2 (vor Intervention: 11,5 nmol/ml/min; nach Intervention: 11,5 nmol/ml/min) und der Kontrollgruppe (vor

Intervention: 12,4 nmol/ml/min; nach drei Monaten 12,3 nmol/ml/min; nach 6 Monaten 11,5 nmol/ml/min).

Ebenso wie die VAP-1 Konzentration zeigte die SSAO-Aktivität zu keinem Zeitpunkt signifikante Korrelationen mit dem BMI, dem Fettgewebe gesamt (absolut und relativer Anteil am Körpergewicht), dem Rumpf-Fett (absolut und relativer Anteil am Körpergewicht) oder dem Körpergewicht. Gleiches galt für Leukozyten und CRP, HbA1c, Nüchtern-Glukose und HOMA-Index sowie GPT und GOT.

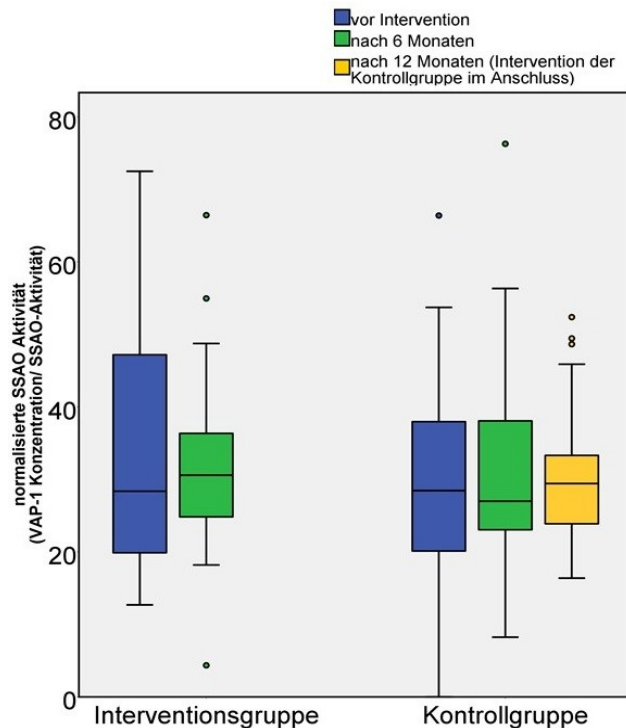


Graphik 10. VAP-1 Konzentration im Verlauf des Abnehmprogramms: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten ($p > 0,05$).



Graphik 11. SSAO-Aktivität im Verlauf des Abnehmprogramms: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten ($p > 0,05$).

Eine Normalisierung der Plasma SSAO-Aktivität in Bezug auf die VAP-1-Konzentration im Plasma (normalisierte SSAO-Aktivität: VAP-1 Konzentration/ SSAO-Aktivität) ergab ebenfalls keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der Intervention oder in der Kontrollgruppe (Graphik 12).



Graphik 12. Normalisierte SSAO-Aktivität im Verlauf des Abnehmprogramms. Berechnet aus der VAP-1 Konzentration und der SSAO-Aktivität. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten ($p > 0,05$).

Studienkollektiv 2 - Hepatitis C

Aufbau des Studienkollektivs

Von den 322 Patienten des Studienkollektivs waren 224 männlich und 98 weiblich (69,5 % vs. 30,5 %). Das Durchschnittsalter lag bei 49,7 Jahren (+/- 12,1 Jahre), der BMI bei 24,3. Bei 38 der 92 biopsierten Patienten wurde eine Leberzirrhose im histologischen Präparat festgestellt (41,3 %). Bei 35 der 38 histologisch als Zirrhose eingestuft Biopsien lagen die Werte der transienten Elastographie jenseits des festgelegten cut-offs von 12,5 kPa, ab dem man von einer manifesten Zirrhose ausgehen kann [58]. Von den 54 Patienten, bei denen sich histologisch keine Zirrhose zeigte, überschritten 9 den cut-off, die übrigen 45 lagen im Zielbereich. Somit stimmten Biopsie-Ergebnisse und die Einteilung anhand der transienten Elastographie bei 87 % der Patienten überein.

Einteilung nach Elastographie-Ergebnissen

Insgesamt zeigten sich bei 216 Patienten transiente Elastographie-Werte unter dem cut-off; 106 hatten Werte jenseits der 12,5 kPa. Anhand dieser Messwerte wurde das Patientenkollektiv in eine Gruppe mit mutmaßlich keiner Zirrhose (67,0 %; entspricht Fibrosegrad F0-F3) und mutmaßlicher Zirrhose (32,9 %; entspricht Fibrosegrad F4) eingeteilt und die laborchemischen Parameter sowie die Patientencharakteristika zwischen den beiden

Gruppen verglichen (eine genaue Aufschlüsselung findet sich in Tabelle 4). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich für Cholesterin, gamma-GT, GPT, GOT, Bilirubin, Thrombozyten, Albumin, Haptoglobin ($p < 0,001$ ***) und AT III ($p < 0,001$ ***). Auch der APRI- und der Forns-Index sowie das Alter, der BMI und das Gewicht unterschieden sich zwischen den Gruppen signifikant, ebenso die transienten Elastographie-Werte, die VAP-1 Konzentration sowie die SSAO-Aktivität. Bezüglich des Geschlechtes und der Größe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.

Charakteristika der Gesamtkohorte und Vergleich der Gruppe mit niedrigen und hohen transienten Elastographie-Werten. Bei der Gruppe mit transienten Elastographie-Werten $< 12,5$ kPa lag mutmaßlich keine Zirrhose vor, die Gruppe $\geq 12,5$ kPa zeigte transiente Elastographie-Werte jenseits des Zirrhose cut-offs. Die Anzahl der vorliegenden Werte (N), die Anzahl der zugehörigen Patienten (N), der Mittelwert und die Standardabweichung (SA) sind angegeben. Die Korrelationsanalysen geben jeweils den Spearman-Korrelationskoeffizienten an (p-Wert). Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

| | | Alle Patienten N=322 | Transiente Elastographie $<$ 12,5 kPa N=216 | Transiente Elastographie \geq 12,5 kPa N=106 | p |
|-----------------------------------|-----|------------------------------|--|---|---------------|
| Geschlecht | | 98 weiblich, 224 männlich | 70 weiblich, 146 männlich | 28 weiblich, 78 männlich | 0,273 |
| | N | Mittelwert +/- SA | Mittelwert +/- SA | Mittelwert +/- SA | |
| Alter (Jahre) | 322 | 49.71 +/- 12.10 | 48.22 +/- 12.14 | 52.74 +/- 11.48 | 0,001 ** |
| BMI (kg/m ²) | 302 | 24.35 +/- 4.61 | 24.19 +/- 3.97 | 24.72 +/- 5.85 | 0,0172* |
| Transiente Elastographie (kPa) | 322 | 14.18 +/- 14.38 | 6.51 +/- 2.13 | 29.81 +/- 15.97 | $< 0,001$ *** |
| VAP-1 Konzentration (ng/ml) | 322 | 517.01 +/- 201.70 | 445.38 +/- 135.63 | 662.96 +/- 233.77 | $< 0,001$ *** |
| SSAO-Aktivität (ng/ml/min) | 317 | 28.75 +/- 13.88 | 25.73 +/- 10.58 | 34.86 +/- 17.37 | $< 0,001$ *** |
| APRI-Index | 144 | 0.54 +/- 0.77 | 0.26 +/- 0.17 | 1.05 +/- 1.13 | $< 0,001$ *** |
| Forns-Index | 138 | 8.59 +/- 2.21 | 7.53 +/- 1.41 | 10.34 +/- 2.18 | $< 0,001$ *** |
| Thrombozyten (1000/ μ l) | 308 | 190.90 +/- 85.85 | 217.95 +/- 82.30 | 134.65 +/- 62.92 | $< 0,001$ *** |

| | | | | | |
|---------------------|-----|-------------------|------------------|-------------------|-------------|
| Cholesterin (mg/dl) | 223 | 164.35 +/- 45.76 | 169.77 +/- 46.32 | 153.86 +/- 43.03 | 0,014 * |
| Gamma-GT (U/l) | 258 | 107.20 +/- 125.49 | 68.35 +/- 66.66 | 182.24 +/- 171.03 | < 0,001 *** |
| GPT (U/l) | 257 | 88.15 +/- 111.38 | 71.12 +/- 48.56 | 122.00 +/- 175.80 | < 0,001 *** |
| GOT (U/l) | 254 | 65.49 +/- 67.27 | 45.57 +/- 22.75 | 103.06 +/- 99.97 | < 0,001 *** |
| Bilirubin (mg/dl) | 255 | 0.84 +/- 0.69 | 0.67 +/- 0.38 | 1.16 +/- 0.98 | < 0,001 *** |

Die Einteilung in milde, moderate und schwere Fibrose anhand der transienten Elastographie ergab ein ähnliches Bild (Tabelle 5). Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten aller Gruppen zeigten sich bei der transienten Elastographie, der VAP-1 Konzentration, dem APRI sowie dem Forns-Index, gammaGT, GOT und GPT. Die SSAO-Aktivität unterschied sich ausschließlich zwischen milder und schwerer Fibrose signifikant, Bilirubin und Thrombozytenzahl dagegen unterschieden sich signifikant zwischen milder und schwerer sowie moderater und schwerer Fibrose.

Tabelle 5.

Charakteristika der Studienkohorte bei einer Einteilung in milde, moderate und schwere Fibrose. Die Einteilung beruhte auf der transienten Elastographie (siehe Methodik-Teil). Gegeben sind der Mittelwert und die p-Werte zur Differenzierung zwischen den drei Fibrosegraden. Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA und dem Bonferroni post-hoc Test durchgeführt. Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

| | Milde Fibrose | Moderate Fibrose | Schwere Fibrose | milde vs. moderate Fibrose | Milde vs. schwere Fibrose | Moderate vs. schwere Fibrose |
|-----------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| | Mittelwert | | | p | | |
| Geschlecht (1 = m; 2 = w) | 1.34 | 1.28 | 1.26 | 1.00 | 0.515 | 1.00 |
| Alter (Jahren) | 46.90 | 50.92 | 52.74 | 0.113 | < 0.001 *** | 0.574 |
| BMI (kg/m ²) | 23.76 | 25.06 | 24.72 | 1.00 | 0.33 | 1.00 |
| Transiente Elastographie (kPa) | 5.26 | 9.05 | 29.81 | < 0.001 *** | < 0.001 *** | < 0.001 *** |
| VAP-1 Konz. (ng/ml) | 421.01 | 495.15 | 662.96 | 0.002 ** | < 0.001 *** | < 0.001 *** |
| SSAO-Aktivität (ng/ml/min) | 24.49 | 28.18 | 34.86 | 0.148 | < 0.001 *** | 0.312 |
| APRI-Index | 0.21 | 0.33 | 1.05 | 0.013 * | < 0.001 *** | < 0.001 *** |
| Forns-Index | 7.17 | 8.15 | 10.34 | 0.017 * | < 0.001 *** | < 0.001 *** |
| Thrombozyten (1000/ μ l) | 226.19 | 201.70 | 134.65 | 0.154 | < 0.001 *** | < 0.001 *** |
| Cholesterin (mg/dl) | 171.07 | 167.26 | 153.86 | 1.00 | 0.111 | 0.301 |
| Gamma-GT (U/l) | 57.12 | 90.61 | 182.24 | < 0.001 *** | < 0.001 *** | < 0.001 *** |
| GPT (U/l) | 61.36 | 90.66 | 122.00 | 0.003 ** | < 0.001 *** | 1.00 |
| GOT (U/l) | 40.13 | 56.25 | 103.06 | < 0.001 *** | < 0.001 *** | < 0.001 *** |
| Bilirubin (mg/dl) | 0.67 | 0.68 | 1.16 | 1.00 | < 0.001 *** | < 0.001 *** |

Einteilung nach Biopsie-Ergebnissen

Die Patienten mit einer histologisch bestätigten Zirrhose zeigten im Vergleich zu den Patienten in den Fibrosestadien F0 bis F3 (Einteilung nach Biopsie-Ergebnissen) typische laborchemische Veränderungen (Tabelle 6). So waren Bilirubin, gGT, GOT, der BMI, APRI und Forns-Index signifikant erhöht. Albumin, Cholesterin, Thrombozyten zeigten erniedrigte Werte. Es präsentierte sich somit das klassische klinisch-laborchemische Bild einer Leberzirrhose bei den histologisch untersuchten Patienten.

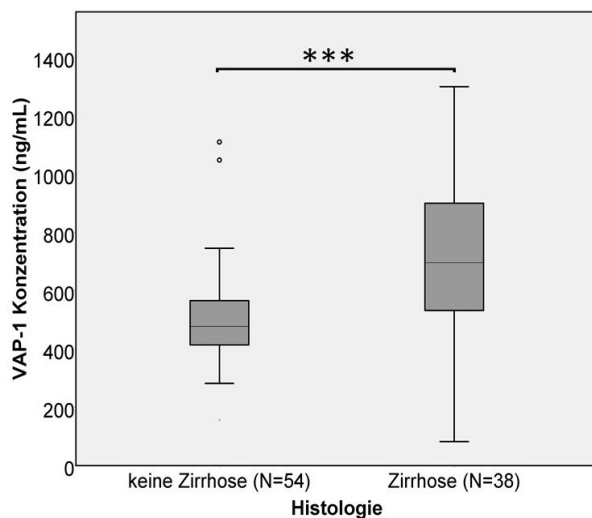
Tabelle 6.

Gegenüberstellung der histologischen Fibrosestadien F0 bis F3 vs. Zirrhose. Die Anzahl der Patienten (N), der Mittelwert und der p-Wert (Spearman-Korrelationskoeffizient) sind angegeben. Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

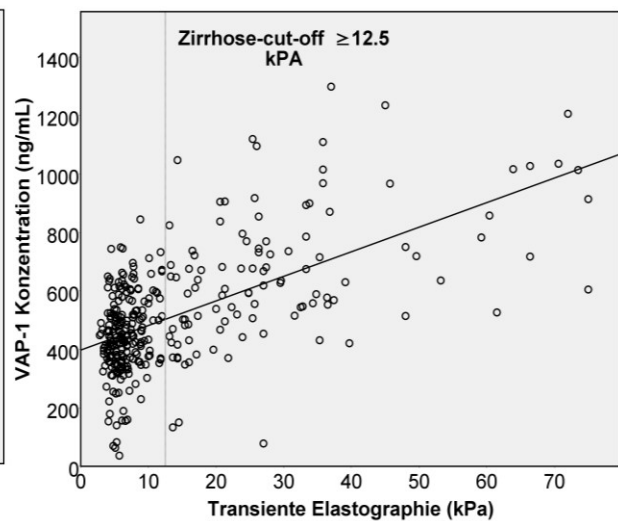
| | F0 - F3 N = 54 | F4 = Zirrhose N = 38 | Differenz |
|--------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------|
| | Mittelwert | Mittelwert | p |
| BMI (kg/m ²) | 23,96 | 24,83 | 0,043 * |
| Transiente Elastographie (kPa) | 6,35 | 29,80 | < 0,001 *** |
| VAP-1 Konzentration (ng/ml) | 477,55 | 696,07 | < 0,001 *** |
| SSAO-Aktivität (ng/ml/min) | 26,94 | 27,58 | 0,133 |
| APRI-Index | 0,26 | 0,61 | < 0,001 *** |
| Forns-Index | 7,51 | 10,73 | < 0,001 *** |
| Thrombozyten (1000/ μ l) | 216,0 | 121,0 | < 0,001 *** |
| Cholesterin (mg/dl) | 202,0 | 150,5 | < 0,001 *** |
| Gamma-GT (U/l) | 43,0 | 137,0 | < 0,001 *** |
| GPT (U/l) | 65,0 | 77,0 | 0,282 |
| GOT (U/l) | 50,0 | 82,5 | < 0,001 *** |
| Bilirubin (mg/dl) | 0,60 | 1,06 | < 0,001 *** |
| Albumin (mg/dl) | 45,60 | 37,5 | < 0,001 *** |

VAP-1 Konzentration

Die VAP-1 Konzentration zeigte sich deutlich erhöht bei transienten Elastographie-Ergebnissen jenseits des cut-offs von 12,5 kPa (Graphik 13). Bei der vergleichenden Betrachtung der VAP-1 Konzentration und der transienten Elastographie (Graphik 14) zeigte sich ein linearer Trend zwischen den beiden Parametern, und es ergab sich eine signifikante Korrelation ($r = 0.528$; $p < 0,001$ ***).

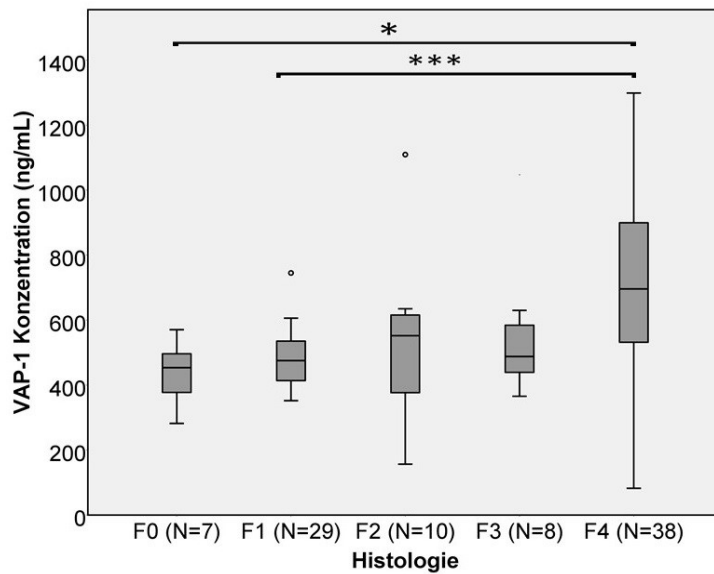


Graphik 13. VAP-1 Konzentration bei bioptisch ausgeschlossener und bestätigter Zirrhose: Bioptisch keine Zirrhose: Mittelwert 445,3 ng/ml, bioptisch bestätigte Zirrhose: 662,9 ng/ml. Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$ ***. Die Signifikanz wird angezeigt als *** $p < 0,001$.



Graphik 14. VAP-1 Konzentration und transiente Elastographie-Werte aller 322 Patienten: Der cut-off für das Vorliegen einer Zirrhose wurde bei 12,5 kPa gesetzt. Die Linie zeigt den Trend höherer VAP-1 Konzentrationen bei höheren transienten Elastographie-Werten an ($N = 322$).

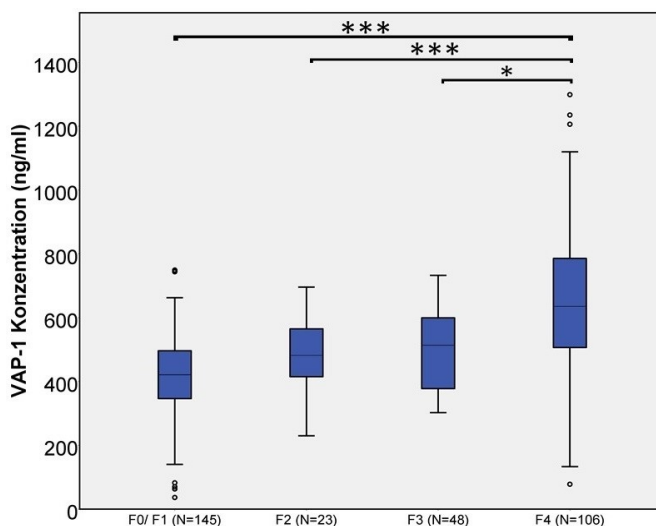
Die VAP-1 Konzentration in den verschiedenen bioptischen Fibrosegraden ist in Graphik 15 zu sehen. Hier ist eine signifikante Unterscheidung zwischen den Schweregraden (F0 bis F4) nicht möglich mit Ausnahme von F0 vs. F4 und F1 vs. F4. Die Anzahl an inkludierten Patienten variiert allerdings deutlich zwischen den einzelnen Gruppen und ist insgesamt gering.



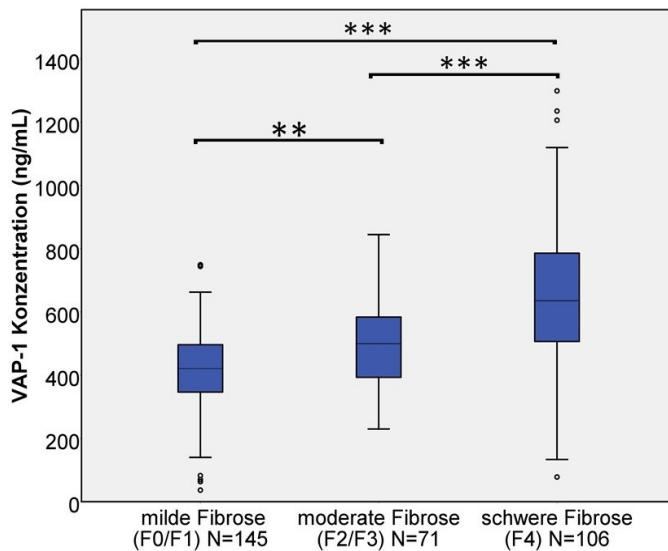
Graphik 15. VAP-1 Konzentration in den Fibrosegraden F0 bis F4: Die Einteilung basiert auf den Biopsieergebnissen. Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Eine Einteilung des Patientenkollektivs anhand der transienten Elastographie und ein Vergleich mit der VAP-1 Konzentration sind in Graphik 16 und 17 dargestellt. Bei der gängigen Einteilung des Fibrose-Schweregrade nach Castera et al [58] in vier Schweregrade war eine signifikante Unterscheidung anhand der VAP-1 Konzentration nicht zwischen allen Schweregraden möglich (Graphik 16). F4 unterschied sich jedoch deutlich von F0/ F1, F2 und F3 (Graphik 16). Hier sei aber auch auf die sehr unterschiedliche Anzahl an inkludierten Patienten hingewiesen, die Einfluss auf die statistische Berechnung hat.

In Graphik 17 erfolgte die Einteilung in leichte, moderate und schwere Fibrose (Zusammenfassung der ursprünglichen Fibrosegrade F2 und F3 nach Castera et al. zu moderater Fibrose, siehe Methodik-Teil). Hier unterschied sich die VAP-1 Konzentration jeweils signifikant zwischen leichter und moderater, moderater und schwerer, sowie leichter und schwerer Fibrose.



Graphik 16. VAP-1 Konzentration in den verschiedenen Fibroestadien: Die Einteilung basiert auf den Grenzwerten der transienten-Elastographie nach Castera et al.- Kruskal-Wallis-test: F0/ F1 vs. F2 ($p = 0,073$), F0/ F1 vs. F3 ($p = 0,097$), F0/ F1 vs. F4 ($p < 0,001$ ***), F2 vs. F3 ($p = 1,0$), F2 vs. F4 ($p < 0,001$ ***), F3 vs. F4 ($p < 0,031$ *). Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.



Graphik 17. VAP-1 Konzentration bei milder, moderater und schwerer Fibrose. Die Einteilung beruht auf der transienten Elastographie. Kruskal-Wallis-Test: milde Fibrose vs. moderate Fibrose ($p = 0,002$ **), milde Fibrose vs. schwere Fibrose ($p < 0,001$ ***), moderate Fibrose vs. schwere Fibrose ($p < 0,001$ ***). Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Korrelationsanalysen

Die in der klinischen Routine gängigen Parameter der Leberzellschädigung GOT, GPT und gamma-GT und Albumin als Parameter der Leber-Synthesefunktion korrelieren signifikant mit der VAP-1 Konzentration. Gleiches galt für Bilirubin, Thrombozyten und Cholesterin (Tabelle 7).

Regressionsanalysen

Um den Zusammenhang zwischen erhöhten VAP-1 Konzentrationen und erhöhten transienten Elastographie-Werten genauer zu untersuchen, wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. In das Modell wurden alle mit der transienten Elastographie signifikant korrelierenden Faktoren aufgenommen (Tabelle 5 und 7). Die VAP-1 Konzentration zeigte sich in der Regressionsanalyse nach gamma-GT als zweitstärkster Einflussfaktor auf die transienten Elastographie-Werte ($\beta = 0,197$, T score = 2,451, Signifikanz $p = 0,016$ *).

Tabelle 7.

Korrelationsanalysen mit der VAP-1 Konzentration, der SSAO-Aktivität und Gegenüberstellung mit der Studie von Weston et al., 2015. Angegeben ist für diese Studie der Spearman-Korrelationskoeffizient und die Signifikanz. Bei Weston et al. wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Die Daten von Weston et al. wurden aus der aufgeführten Publikation [40] entnommen und hier vergleichend dargestellt.

| | VAP-1 Konzentration | | SSAO-Aktivität | | VAP-1 Konzentration bei NAFLD [40] (Weston et al., 2015) | |
|------------------------------|---------------------|-------------|----------------|-------------|--|-------------|
| | r | p | r | p | r | p |
| Fibrosestadium | 0,513 | < 0,001 *** | 0,233 | 0,026 * | 0,39 | < 0,001 *** |
| Alter (Jahren) | 0,294 | < 0,001 *** | 0,114 | 0,043 * | 0,27 | 0,002 ** |
| Thrombozyten (1000/ μ l) | -0,357 | < 0,001 *** | -0,241 | < 0,001 *** | -0,27 | 0,002 ** |
| Albumin (mg/dl) | -0,460 | < 0,001 *** | -0,261 | < 0,001 *** | -0,24 | 0,006 ** |
| GOT/GPT | 0,636 | < 0,001 *** | 0,530 | 0,002 ** | 0,32 | < 0,001 *** |
| GOT (U/l) | 0,460 | < 0,001 *** | 0,279 | < 0,001 *** | 0,15 | 0,1 |
| GPT (U/l) | 0,255 | < 0,001 *** | 0,209 | < 0,001 *** | -0,075 | 0,4 |
| gamma-GT (U/l) | 0,327 | < 0,001 *** | 0,156 | 0,013 * | 0,056 | 0,5 |
| Bilirubin (mg/dl) | 0,158 | 0,011 * | 0,128 | 0,042 * | 0,061 | 0,5 |
| Cholesterin (mg/dl) | -0,171 | 0,01 * | -0,143 | 0,035 * | -0,033 | 0,7 |

Neben den zuvor genannten laborchemischen Standardparametern und den Patientencharakteristika lagen aus einer anderen Studie am gleichen Patientenkollektiv (Krawczyk et al. [52]) ebenfalls von allen Patienten die GDF15, HGF und PLGF-Werte vor, die sich als gut geeignete Parameter für die Prädiktion des Fibrosestadiums und der transienten Elastographie zeigten. Sie wurden in einer zweiten Regressionsanalyse ebenfalls aufgenommen. Auch hier verblieb die VAP-1 Konzentration als zweitstärkster Einflussfaktor nach gamma-GT (Tabelle 8).

Bei einem schrittweisen Ausschluss der Einflussvariablen verblieb im ersten Modell ausschließlich gamma-GT als stärkster Einflussfaktor, im zweiten Modell gamma-GT (beta = 0,537; t-score = 8,79; Signifikanz $p < 0,001$ ***) und die VAP-1 Konzentration (beta = 0,417; t-score = 6,83; Signifikanz $p < 0,001$ ***)).

Tabelle 8.

Lineare Regressionsanalyse für unabhängige Prädiktoren der transienten Elastographie. Alle mit der transienten Elastographie korrelierenden Variablen wurden eingeschlossen. Die Regressionskoeffizienten, beta-Koeffizienten, Standard-Fehler und die Kolinearitäts-Statistiken (Toleranz sowie variance inflation factor (VIF)) wurden jeweils bestimmt. Statistisches Outcome: $R = 0.855$, $R^2 = 0.730$, Signifikanz < 0.001 ***. Die Signifikanz ist angegeben als * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, und *** $p < 0.001$.

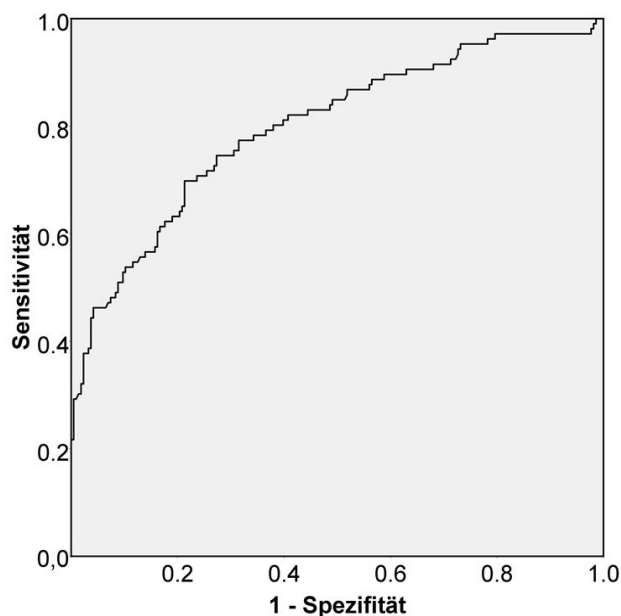
| | Regressionskoeffizient B | Standard-Fehler | Beta | T score | Signifikanz | Toleranz | VIF |
|----------------|--------------------------|-----------------|--------|---------|-------------|----------|--------|
| Konstante | -7.096 | 11.249 | | -0.631 | 0.530 | | |
| VAP-1 Konz. | 0.012 | 0.006 | 0.185 | 2.218 | 0.029 * | 0.414 | 2.414 |
| SSAO-Aktivität | 0.057 | 0.081 | 0.051 | 0.698 | 0.487 | 0.542 | 1.844 |
| Alter | 0.080 | 0.125 | 0.066 | 0.637 | 0.526 | 0.270 | 3.697 |
| Gewicht | 0.062 | 0.056 | 0.065 | 1.103 | 0.273 | 0.822 | 1.217 |
| APRI-Index | 1.362 | 2.529 | 0.084 | 0.539 | 0.591 | 0.118 | 8.465 |
| Forns-Index | -0.689 | 1.176 | -0.104 | -0.586 | 0.559 | 0.091 | 10.932 |
| gamma-GT | 0.047 | 0.008 | 0.474 | 6.091 | < 0.001 *** | 0.473 | 2.115 |
| GPT | 0.001 | 0.026 | 0.006 | 0.058 | 0.954 | 0.256 | 3.905 |
| GOT | 0.009 | 0.059 | 0.029 | 0.148 | 0.882 | 0.075 | 13.335 |
| Bilirubin | -0.117 | 1.221 | -0.007 | -0.096 | 0.924 | 0.621 | 1.611 |
| Cholesterol | 0.008 | 0.018 | 0.027 | 0.432 | 0.667 | 0.743 | 1.345 |
| Thrombozyten | -0.028 | 0.023 | -0.147 | -1.222 | 0.225 | 0.198 | 5.048 |
| Endoglin | 0.270 | 0.110 | 0.181 | 2.467 | 0.015 * | 0.536 | 1.867 |
| HsTnT | -0.039 | 0.043 | -0.058 | -0.924 | 0.358 | 0.741 | 1.350 |
| sFlt1 | -0.017 | 0.060 | -0.026 | -0.275 | 0.784 | 0.308 | 3.243 |
| PLGF | 0.185 | 0.149 | 0.126 | 1.241 | 0.218 | 0.279 | 3.586 |
| GDF15 | 0.000 | 0.001 | 0.040 | 0.313 | 0.755 | 0.174 | 5.747 |
| HGF | 0.001 | 0.001 | 0.140 | 1.454 | 0.149 | 0.308 | 3.251 |

| | | | | | | | |
|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|
| proBNP | -0.001 | 0.000 | -0.204 | -1.873 | 0.064 | 0.243 | 4.118 |
|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|

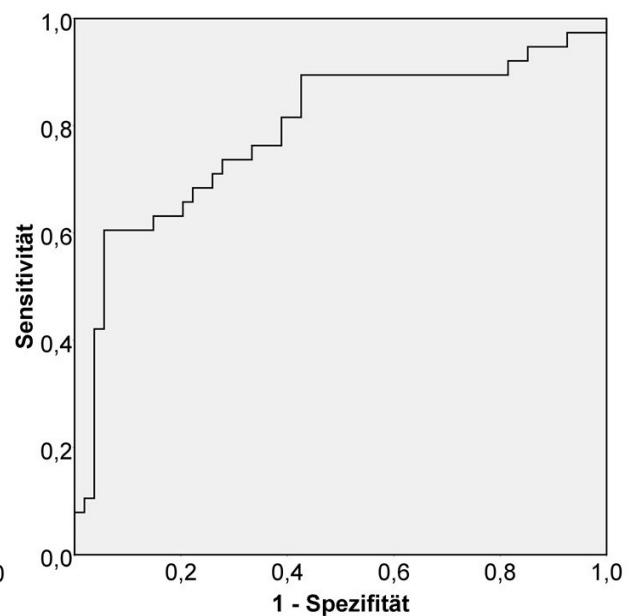
VAP-1 Grenzwerte für das Vorliegen einer Zirrhose

Die Abschätzung, ab wann die Erhöhung der VAP-1 Konzentration auf das Vorliegen einer Zirrhose hindeutet, wurde in den durchgeführten receiver operating characteristics (ROC) curve-Analysen analysiert. Damit wird versucht, einen bestimmten VAP-1 Grenzwert für das Vorliegen einer Zirrhose zu etablieren. Ab einem cut-off Wert von 514 ng/ml VAP-1 kann man in unserer Studienkohorte von einem transienten Elastographie-Wert größer als 12,5 kPa (mutmaßliches Vorliegen einer Leberzirrhose) ausgehen. Die ROC-Kurve hatte eine Sensitivität von 74,5 % und eine Spezifität von 72,7 % (Graphik 18).

Werden statt der transienten Elastographie die Biopsieergebnisse für eine ROC-Analyse verwendet, so ist es möglich, ab einem Grenzwert von 541 ng/ml VAP-1 von einer bioptisch gesicherten Zirrhose mit einer Sensitivität von 73,7 % und einer Spezifität von 72,2 % auszugehen (Graphik 19).



Graphik 18. Receiver operating curve-Analyse: zur Voraussage eines transienten Elastographie-Wertes $\geq 12,5$ kPa mit der VAP-1 Konzentration. Fläche unter der Kurve (AUROC): 0,799 (Konfidenzintervall: 0,74 - 0,85).

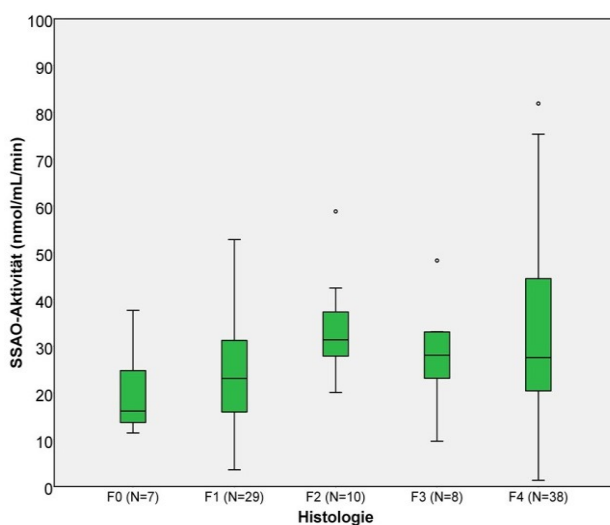


Graphik 19. Receiver operating curve-Analyse: zur Voraussage einer histologisch bestätigten Zirrhose. Fläche unter der Kurve (AUROC): 0,791 (Konfidenzintervall: 0,69 - 0,89).

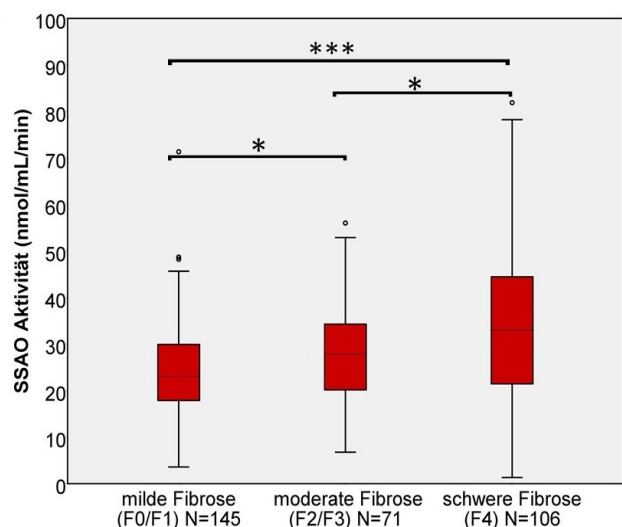
SSAO-Aktivität

Die SSAO-Aktivität korrelierte deutlich mit der VAP-1 Konzentration (Graphik 24: $r = 0,535$; $p < 0,001$) und mit der transienten Elastographie ($r = 0,347$; $p < 0,001$ ***). Allerdings zeigte sich eine schwächere Erhöhung der SSAO-Aktivität bei Vorliegen höherer Fibrosestadien und bei Vorliegen einer Zirrhose als bei der VAP-1 Konzentration. Die Korrelationsanalysen zwischen der SSAO-Aktivität und den Parametern der Leberzellschädigung, der Leber-Syntheseparameter sowie Cholesterin waren allesamt signifikant, zeigten aber geringere Korrelationskoeffizienten als mit der VAP-1 Konzentration (Tabelle 7). Bei einer Einteilung in die bioptischen Stadien F0 bis F4 (analog zu Graphik 16 für die VAP-1 Konzentration) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Graphik 20), wobei hier allerdings auf die z.T. geringe Anzahl an eingeschlossenen Patienten in den einzelnen Fibrosestadien verwiesen sei.

Folgt man der Einteilung in milde, moderate und schwere Fibrose anhand der transienten Elastographie (analog zu Graphik 17 für die VAP-1 Konzentration) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen allen drei Schweregraden (Graphik 21), allerdings deutlich weniger ausgeprägt, als dies bei der VAP-1 Konzentration der Fall war.



Graphik 19. SSAO-Aktivität in den Fibrosegraden F0 bis F4: Die Einteilung basiert auf den Biopsieergebnissen. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.



Graphik 20. SSAO-Aktivität bei milder, moderater und schwerer Fibrose. Die Einteilung beruht auf der transienten Elastographie. Kruskal-Wallis-Test: milde Fibrose vs. moderate Fibrose ($p = 0,023$ *), milde Fibrose vs. schwere Fibrose ($p < 0,001$ ***), moderate Fibrose vs. schwere Fibrose ($p < 0,028$ *). Die Signifikanz wird angezeigt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Die Parameter GOT, GPT gamma-GT und Albumin sowie Bilirubin, Thrombozyten und Cholesterin korrelierten wie auch die VAP-1 Konzentration signifikant mit der SSAO-Aktivität, allerdings mit deutlich geringeren Korrelationskoeffizienten als die VAP-1 Konzentration (Gegenüberstellung in Tabelle 7).

Bei den durchgeführten linearen Regressionsanalysen verblieb die SSAO-Aktivität nicht unter den relevanten Einflussfaktoren, sondern wurde bei allen Modellen mit einer Signifikanz von $p > 0,05$ ausgeschlossen ($p = 0,487$, vgl. Tabelle 6).

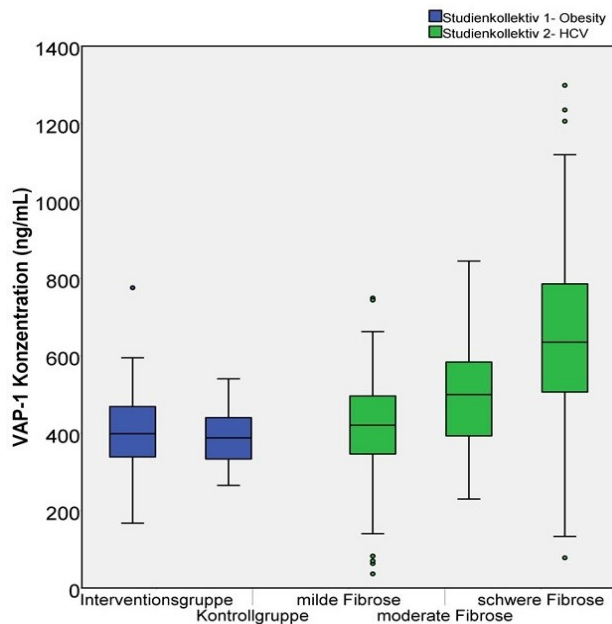
Ebenfalls lieferten Versuche, ROC-Analysen durchzuführen und analog zu oben beschriebenen ROC-Analysen mit der VAP-1 Konzentration einen cut-off-Wert zu ermitteln, keine Ergebnisse mit einer ausreichenden Spezifität und Sensitivität.

Die normalisierte Plasma SSAO-Aktivität (VAP-1 Konzentration/ SSAO-Aktivität) verhielt sich konstant bei zunehmender Fibrosierung. Sie unterschied sich bei moderater und schwerer Fibrose nicht signifikant von milder Fibrose ($p > 0,05$).

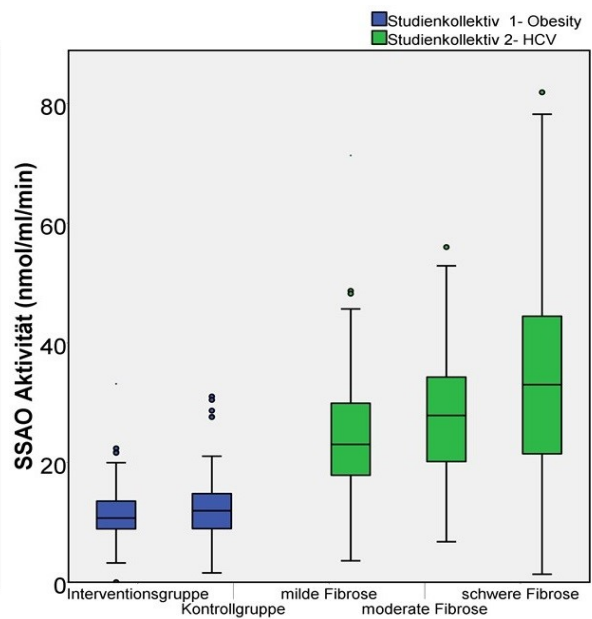
Vergleich der Studienkollektive

Der Mittelwert der VAP-1 Konzentration im Studienkollektiv 1 - Obesity lag bei 395,15 (Standardabweichung $\pm 87,0$) ng/ml, während er im Studienkollektiv 2 - HCV bei 517,01 ($\pm 201,70$) ng/ml lag. Auch die 90. Perzentile war deutlich anders: Im Studienkollektiv 1 lag sie bei 494,85 ng/ml, im Studienkollektiv 2 dagegen bei 749,91 ng/ml. Schlüsselte man Studienkollektiv 2 nach verschiedenen Fibrosestadien auf und vergleicht die VAP-1 Konzentration mit Studienkollektiv 1, so fällt auf, dass sich insbesondere die höheren Fibrosestadien deutlich von den Ergebnissen bei adipösen Patienten unterscheiden (Graphik 22). Das Stadium milde Fibrose hatte eine durchschnittliche VAP-1 Konzentration von 421,01 ($\pm 134,38$) ng/mL.

Die SSAO-Aktivität zeigte einen Mittelwert von 12,20 ($\pm 5,34$) nmol/ml/min in Studienkollektiv 1 und 28,75 ($\pm 13,88$) nmol/ml/min in Studienkollektiv 2. Die 90. Perzentile lag bei 18,78 nmol/ml/min in Studienkollektiv 1 und in Studienkollektiv 2 bei 35,85 nmol/ml/min. Bei einer Betrachtung der einzelnen Fibrosestadien im Vergleich zu Studienkollektiv 1 zeigen sich deutlich höhere SSAO-Aktivitätswerte in allen Fibrosestadien (Graphik 23). Das Stadium milde Fibrose zeigte eine durchschnittliche SSAO-Aktivität von 24,50 ($\pm 10,28$) nmol/ml/min.

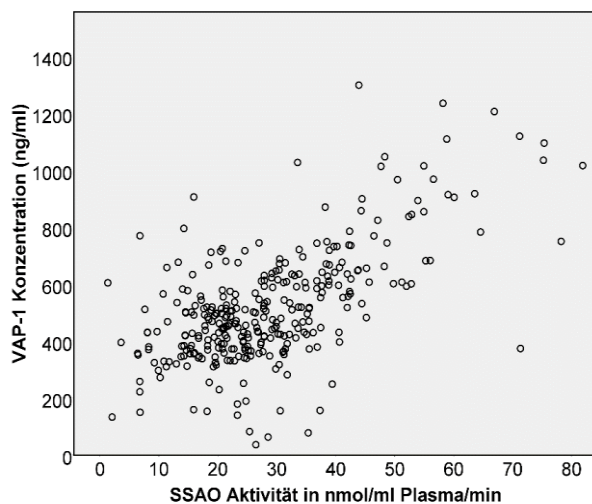


Graphik 21. Zusammenschau der VAP-1 Konzentration in beiden Studienkollektiven: Dargestellt ist die VAP-1 Konzentration in Studienkollektiv 1 und 2.

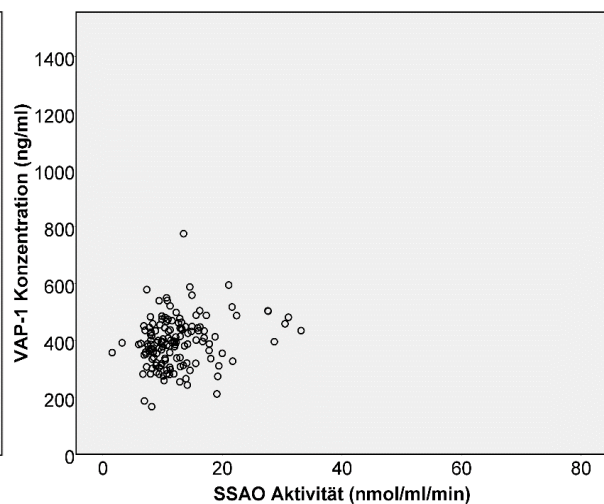


Graphik 22. Zusammenschau der SSAO-Aktivität in beiden Studienkollektiven: Dargestellt ist die SSAO-Aktivität in Studienkollektiv 1 und 2.

Die gemessene VAP-1 Konzentration und SSAO-Aktivität korrelierten miteinander. Im Studienkollektiv 2 - Hepatitis C lag der Korrelationskoeffizient bei $r = 0,625$ bei insgesamt 322 Patienten (Graphik 24). Im Studienkollektiv 1 waren 63 Patienten inkludiert, die allerdings mehrfach gemessen wurden. Insgesamt 143 Messungen lagen vor. Hier lag der Korrelationskoeffizient nur bei $r = 0,222$ (Graphik 25).



Graphik 23. Studienkollektiv 2 - Hepatitis C: Auftragung der VAP-1 Konzentration gegen die SSAO-Aktivität.



Graphik 24. Studienkollektiv 1 - Obesity: Auftragung der VAP-1 Konzentration gegen die SSAO-Aktivität.

Zusammenfassend zeigten sich also Unterschiede sowohl bei der VAP-1 Konzentration als auch der SSAO-Aktivität zwischen den beiden Studienkollektiven. Bei der SSAO-Aktivität waren diese deutlich stärker ausgeprägt. Gleichzeitig zeigte sich im Studienkollektiv 1 eine deutlich schwächere Korrelation zwischen VAP-1 Konzentration und SSAO-Aktivität. Der direkte Vergleich der beiden Kollektive ist aufgrund der unterschiedlichen Herkunft und Rekrutierung der Patienten und wegen der verschiedenen Präanalytik nicht zulässig. Daher wurden nur indirekte Schlüsse in Bezug auf die Situation innerhalb der Kohorten gezogen.

Diskussion

Studienkollektiv 1 - Obesity

Validität des Studienkollektivs

Die deutliche Abnahme des BMI und des Gesamtkörper-Fettanteils in den beiden Interventionsgruppen zeigten, dass das Vorgehen des kombinierten Abnehmprogramms erfolgreich war. Das erfolgreiche Konzept der Studiendurchführung mit dem Ziel, Körpergewicht zu reduzieren und die Glukosetoleranz positiv zu beeinflussen, wurde zuvor auch schon mehrfach publiziert [49-51]. Wie zu erwarten, ging die Gewichtsabnahme mit einer Verbesserung der Cholesterin- und Triglycerid-Werte einher, und die Transaminasen sanken signifikant ab - mutmaßlich kam es daher zu einer Verbesserung einer bestehenden Leberverfettung. Ebenso zeigte sich eine verminderte gestörte Glukosetoleranz.

Es kann also festgehalten werden, dass sich sämtliche laborchemischen Parameter verbesserten, und das Studienkollektiv folglich als valides Kollektiv für deutlichen Gewichtsverlust angesehen werden konnte. Es eignete sich daher gut, um die Veränderung von VAP-1/ SSAO bei alleiniger Gewichtsabnahme zu untersuchen. Außerdem wurde aufgrund des Studiendesigns nicht wie bei Weiss et al. [38] ein Patienten-Kollektiv mit Adipositas mit einer nicht-adipösen Vergleichsgruppe verglichen, was durch interindividuelle Unterschiede insbesondere bei kleineren Studienkollektiven zu Verfälschungen führen kann, da die Patienten in den beiden Vergleichsgruppen nie perfekt gematcht werden können. Diese interindividuellen Einflüsse traten bei unserem Studiendesign nicht auf: hier wurden dieselben Patienten in einem adipösen Zustand mit einem nicht mehr adipösen Zustand verglichen. Das Selektionsbias wurde durch den Aufbau als Interventionsstudie also reduziert.

Ziel dieser ersten Studienkohorte war es, die VAP-1 Konzentration und die SSAO-Aktivität im Verlauf der Reduktion des Körperfetts zu beobachten. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass Adipozyten ein Ort der VAP-1 Freisetzung sein könnten [18]. Es wurde berichtet, dass VAP-1 die Lipolyse in Adipozyten hemmen und dort insulinogene Effekte haben könnte [29], sowie die Glukose-Aufnahme in die Fettzellen beeinflusse. Diese Beobachtungen legen nahe, dass VAP-1 im Energiestoffwechsel eine bedeutende Funktion einnehmen könne. Darüber hinaus soll es die Atherosklerose-Entstehung beeinflussen [59] und ist mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und Gesamtmortalität vergesellschaftet [33].

Eine Veränderung der VAP-1 Konzentration und der SSAO-Aktivität konnte in unserem Kollektiv nicht nachgewiesen werden. Konzentration und Aktivität wurden auch durch die Gewichtsabnahme nicht modifiziert. Diese Befunde deuten an, dass weder die Plasma VAP-1

Konzentration noch die SSAO-Aktivität im Kontext Adipositas als Indikator für die Fettmasse dienlich ist. Man kann auch spekulieren, dass die Adipozyten nicht als Quelle für die Plasma VAP-1 Konzentration angenommen werden sollten, denn sonst würde man niedrigere Werte nach Abnahme erwarten. Das schließt aber parakrine Effekte nicht aus, die wir aus unserer Erhebung nicht ableiten konnten.

VAP-1 Freisetzung

Ebenfalls war es ein Ziel gewesen zu beobachten, ob übergewichtige Patienten mit einem diagnostizierten metabolischen Syndrom von einer Gewichtsabnahme im Sinne einer reduzierten VAP-1 Konzentration und enzymatischen Aktivität profitieren. Dies erschien insbesondere interessant im Hinblick darauf, dass erhöhte Plasma VAP-1 Konzentrationen mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität [33] und einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert wurden [60].

Die VAP-1 Konzentration blieb in der Mitte der Intervention und bis zum Ende auf dem gleichen Niveau wie zu Beginn. Ein leichter Trend zu etwas niedrigeren Werten war in beiden Interventionsgruppen zum Ende der Intervention zu beobachten. Da allerdings die Kontrollgruppe zum Zeitpunkt nach 3 Monaten den niedrigsten Wert insgesamt aufwies, ist davon auszugehen, dass dies auf leichte physiologische Schwankungen zurückzuführen war. Das gleiche Muster zeigte sich bei der SSAO-Aktivität.

Es lässt sich also sagen, dass eine Körpergewichtsreduktion mit deutlicher Reduktion des Gesamtkörperfettgewebes und insbesondere des viszeralen Fettgewebes in unserem Kollektiv keinen Einfluss auf die VAP-1 Konzentration im Blutplasma und die zugehörige SSAO-Aktivität hatte. Übergewichtige profitierten also von der Gewichtsabnahme nicht in Bezug auf VAP-1 Konzentration und SSAO-Aktivität.

Verbindet man dieses Ergebnis mit der Hypothese, dass bei einer Freisetzung des VAP-1 aus der membrangebundenen Form der Adipozyten ins Plasma die freigesetzte Menge mit der Masse an Adipozyten bzw. Fettgewebe korreliert, so lässt sich vermuten, dass die Adipozyten keinen relevanten Anteil an der Freisetzung des VAP-1 haben. Diese Vermutung steht mindestens teilweise im Einklang mit den kürzlich publizierten Daten von Carpene et al. [35], die ebenfalls eine Freisetzung aus anderen Zelltypen als Hauptquelle vermuten ließen. Carpene et al. zeigten in einem adipösen Studienkollektiv, dass keine Unterschiede zwischen der membrangebundenen SSAO-Aktivität in Adipozyten besteht bei Vorliegen einer gestörten Glukosetoleranz im Vergleich zu einer normalen Glukosestoffwechsel-Situation. Allerdings zeigte die publizierte Studie eine höhere SSAO-Aktivität im Plasma bei Vorliegen einer gestörten Glukosetoleranz im Vergleich zu Gesunden.

Es gibt auch die Hypothese, dass VAP-1 bei übergewichtigen Patienten vermehrt in der membrangebundenen Form bleibt [6] und die SSAO-Aktivität die Adipozyten-Differenzierung

unterstützt [37], wobei die Plasmawerte bei diesen Patienten erniedrigt seien [6]. Auch dies ließ sich mit den Ergebnissen unserer Studie nicht stützen, da die Plasma VAP-1 Konzentration bei nicht mehr adipösen Patienten vergleichbar der bei adipösen Patienten war. Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit einer aktuellen Publikation von Gurecka et al. [61] über kardiometabolische Risikofaktoren, die 2206 gesunde normgewichtige und adipöse Probanden inkludierte. Dabei zeigte sich in diesem großen Studienkollektiv zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied der Plasma VAP-1 Konzentration.

Gestörte Glukosetoleranz und VAP-1 im Plasma

Diabetes mellitus wurde mit erhöhten Plasma VAP-1 Konzentrationen und erhöhter SSAO-Aktivität im Plasma assoziiert. Auch bei Patienten, bei denen nur ein Prädiabetes (gestörte Glukosetoleranz) diagnostiziert wurde, wurde eine erhöhte SSAO-Aktivität im Plasma gezeigt [35]. In Mausexperimenten konnte bei Vorliegen eines Diabetes mellitus eine Freisetzung des VAP-1 aus Adipozyten- und Endothelzellen gezeigt werden, bei gesunden Mäusen nur aus Endothelzellen [20]. In unserer Studie lag bei vielen Patienten vor Intervention eine gestörte Glukosetoleranz vor, nach Intervention fiel die Glukose unter den entsprechenden Referenzwert. Wenn man annimmt, dass VAP-1 im Menschen ebenfalls zu einem relevanten Anteil aus Adipozyten freigesetzt wird, zu erhöhten Plasma VAP-1 Konzentrationen und erhöhter SSAO-Aktivität führt, könnte man den Schluss ziehen, dass die gestörte Glukosetoleranz hier nicht so schwerwiegend war, dass sich signifikante Auswirkungen auf das Plasma VAP-1 zeigen. Gegebenenfalls werden diese Auswirkungen nur bei einem manifesten Diabetes mellitus sichtbar, und bei einem Prädiabetes sind sie womöglich nicht ausreichend, um sie zu erfassen. Eine andere Erklärung könnte sein, dass sich die Beobachtungen aus den Mausexperimenten nicht auf den Menschen übertragen lassen, und Adipozyten bei einer gestörten Glukosetoleranz oder Diabetes mellitus nicht zu einem relevanten Anteil VAP-1 ins Plasma freisetzen. Die normalisierte SSAO-Aktivität (SSAO-Aktivität pro ng VAP-1) veränderte sich im Verlauf der Intervention wie auch die absolute SSAO-Aktivität nicht. Es lag nach Intervention also auch kein enzymatisch aktiveres VAP-1 vor. Idealerweise hätte die hier präsentierte Studie natürlich auch eine Messung des VAP-1/SSAO innerhalb der Adipozyten einschließen sollen. Diese in vitro Untersuchungen lagen aber jenseits des festgelegten Studienziels.

Gewichtsreduktion und VAP-1 Veränderungen

Bei Adipositas Grad I zeigten sich im Vergleich zu normalem Übergewicht (BMI 25- 30) keine Unterschiede in der VAP-1 Konzentration und der SSAO-Aktivität. In der bisher publizierten Literatur findet sich das Studienkonzept einer Interventionsstudie in der Beobachtung des

VAP-1/ SSAO bisher nicht, sondern es wurde immer nur ein adipöses Kollektiv mit einer Kontrollgruppe verglichen. Beim Vergleich der einzelnen Patienten mit und ohne Adipositas ließ sich ebenfalls kein signifikanter VAP-1 Konzentrationsunterschied nachweisen.

Vermutlich lassen sich diese Beobachtungen allerdings nicht für Adipositas verallgemeinern. Vielmehr muss zwischen den verschiedenen Adipositas-Graden unterschieden werden. Ein Patient mit einer Adipositas Grad III, wie in der zuvor beschriebenen Studie [38], weist eine ganz andere Stoffwechselsituation auf als ein Patient dieses Studienkollektivs mit einem Durchschnitts-BMI von 33,0 kg/m². So ist auch denkbar, dass die Einflussfaktoren der VAP-1 Freisetzung in unterschiedlichem Ausmaß vorliegen. Es stellt sich auch die Frage, inwiefern die verschiedenen Fettgewebstypen sich in Bezug auf VAP-1 unterscheiden, insbesondere, da vor allem das viszerale Fettgewebe mit einer deutlichen Risikoerhöhung für die Entstehung und Progression eines Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert wird.

Studienkollektiv 2 - Hepatitis C

Aufbau und Validität des Studienkollektivs

Etwas weniger als 30 % der inkludierten Patienten wurden auch biopsiert. Dies galt bis vor einigen Jahren als beste Methode für die Schweregrad-Einteilung eines Leberschadens [62]. So empfahlen die Guidelines der *American Association of the Study of Liver Diseases (AASLD)* aus dem Jahr 2009 die Leberbiopsie zum Staging und Management einer HCV-Erkrankung [63].

In den letzten Jahren änderten sich die europäischen und amerikanischen Leitlinien für Hepatitis C insofern, dass nicht-invasive Verfahren nun zur Abschätzung des Leberschadens als erste Wahl gelten. Die *European Association of the Study of the Liver (EASL)* empfahl 2018 die transiente Elastographie oder laborchemische Indices wie APRI oder FIB-4 (letztere in Entwicklungs- und Schwellenländern sowie bei fehlender Spezialisierung der Klinik) als erste Wahl zur Abschätzung eines Leberschadens vor Therapiebeginn [64]. Es wurde allerdings von der *EASL* auch auf eine relativ schlechte Aussagekraft der Elastographie bei mittelgradiger Fibrosierung hingewiesen [65].

Die vorhandenen Biopsie- und Elastographie-Ergebnisse und die laborchemischen Messungen präsentierten sich in diesem Studienkollektiv als kohärent. Da alle drei Methoden laut Leitlinien als gut geeignet zur Abschätzung eines Leberschadens gelten, sollten die hier präsentierten Daten eine valide Basis bilden, um Aussagen über Fibrose und Zirrhose bei HCV treffen zu können.

Vergleich zur NAFLD und anderen CLDs

Chronische Lebererkrankungen, die mit einer Inflammation des Parenchyms einhergehen und zu dessen fibrotischem Umbau führen, wurden von Kurkijavi et al. [21, 26] mit erhöhten Plasma VAP-1 Konzentrationen assoziiert. Das bisher größte und am detailliertesten untersuchte Studienkollektiv bestand aus NAFLD-Patienten und wurde von Weston et al. publiziert [40]. Wie in unserer Studie wurden signifikante Korrelationen mit den Parametern der Leberzell-Schädigung sowie der Leber-Synthesefunktion und dem Fibrosestadium gefunden (Tabelle 7, vergleichend dargestellt zu unseren Korrelationsanalysen). Des Weiteren konnten von Weston et al. signifikant erhöhte VAP-1 Konzentrationen nachgewiesen werden beim Vorliegen einer NAFLD im Vergleich zu einem Patientenkollektiv mit metabolischem Syndrom, bei Vorliegen einer Leberfibrose im Vergleich zu keiner Fibrose, bei NASH im Vergleich zu einfacher Steatose und zwischen den Fibrosestadien F0 und jeweils F2, F3 und F4 (F0-F2 $p=0,0069$; F0-F3 $p=0,0033$; F0-F4 $p=0,0006$; jeweils Mann-Whitney-U-Test) [40].

Laut Kurkijavi et al. [21, 26] unterscheiden sich die Level der Plasma VAP-1 Konzentration zwischen den einzelnen chronischen Lebererkrankungen, die zu Fibrose und Zirrhose führen können. Die angenommene Pathophysiologie im Leberparenchym sei allerdings mutmaßlich ähnlich [44]: VAP-1 soll auf sinusoidalen Endothelzellen und Gefäßendothel vorkommen und eine T-Zell-Adhäsion und -Transmigration verursachen [66], [67] sowie an der CD16+ Rekrutierung mitwirken [68]. Diese Mechanismen und die im Einzelnen involvierten Zellen variieren zwischen den verschiedenen CLDs [44], münden aber alle in eine zunehmende Einwanderung von Immunzellen ins Leberparenchym. Die dort ausgelöste und von VAP-1 unterstützte chronische Entzündungsreaktion führt zur Fibrosierung und später Zirrhose.

Beim Vergleich unserer Daten mit den Ergebnissen von Weston et al. zeigten sich bei den HCV-Patienten stärkere Korrelationen der VAP-1 Konzentration mit den Parametern der Leberzellschädigung und Lebersynthese sowie mit den Fibrosestadien. Die signifikante Unterscheidung des Fibrose-Schweregrades anhand der VAP-1 Konzentration war in unserer Studie besser möglich. VAP-1 unterschied sich bei milder, moderater und schwerer Fibrose in HCV-Patienten signifikant. In der NAFLD-Studie von Weston et al. ließ sich nur keine Fibrose von Fibrose und Steatose von NASH unterscheiden. Dass sich in unserer Studie signifikante VAP-1 Konzentrationsunterschiede auch bei einer detaillierteren Einteilung des Fibrose-Schweregrades zeigen ließen, und die Korrelationsanalysen auf einen engeren Zusammenhang hinwiesen, könnte an dem größeren Patientenkollektiv gelegen haben oder mit VAP-1 Unterschieden zwischen den einzelnen CLD erklärt werden.

Es wäre vorstellbar, dass sich das VAP-1 Pattern bei NAFLD von dem anderer CLDs unterscheidet, da NAFLD mit einer erhöhten Insulinresistenz vergesellschaftet ist [69]. Eine erhöhte Insulinresistenz wiederum geht mit erhöhten VAP-1 Konzentrationen einher [22], und dies beeinflusst die Expression und Translokation von GLUT-Transportern [34]. Karim et al.

zeigten, dass die Expression von diversen GLUT-Transportern bei CLDs verändert ist aufgrund der SSAO-Aktivität [34]. VAP-1/SSAO könnte daher in NAFLD einen größeren pathophysiologischen Einfluss haben als in anderen CLDs.

Allerdings könnte man dann annehmen, dass in NAFLD eine engere Assoziation zwischen VAP-1 und dem Fibrose-Schweregrad besteht als in anderen CLDs. Unsere hier präsentierten Daten zeigten aber zwischen Hepatitis C und VAP-1 eine engere Assoziation, als Weston et al. zwischen NAFLD und VAP-1 gezeigt haben. Da wir jedoch nicht die Pathophysiologie selbst untersucht haben, sondern nur Rückschlüsse aufgrund der VAP-1 Konzentration gezogen haben, ist dies eine Spekulation. Zudem ist auch der Vergleich der Magnitude der Korrelation zwischen unterschiedlichen Studien nicht unproblematisch, da in den verschiedenen Studien unterschiedliche Messverfahren eingesetzt wurden. Ausserdem ist auch die Präanalytik nicht gleich. Um den Sachverhalt besser zu untersuchen, müssen in zukünftigen Studien direkte Vergleiche angestellt werden.

VAP-1/ SSAO und seine pathophysiologischen Einflüsse

VAP-1 verblieb in unseren Regressionsanalysen als zweitstärkster Einflussfaktor auf die Fibroestadien nach gamma-GT. Dies galt auch bei Einschluss der Serummarker PLGF, HGF und GDF-15, die sich zuvor in Kombination als gute Marker für die Lebersteifigkeit und die Fibroestadien zeigten [52]. Gamma-GT gilt als sensitiver biochemischer Marker für Leberzellschaden.

HGF bewirkt in hepatischen Sternzellen eine verminderte Produktion von extrazellulärer Matrix [70], es wirkt als antifibrotischer Einflussfaktor [71]. PLGF dagegen ist ein Zytokin, das sich vermehrt bei Zirrhose findet [72], GDF-15 liegt vermehrt vor bei einem Leberzellschaden und ebenfalls im ggf. folgenden Heilungsprozess [73]. PLGF, HGF und GDF-15 erzielten nur zusammen als Dreifachpanel eine gute prädiktive Aussagekraft in Bezug auf das Vorliegen einer Zirrhose. Da sich VAP-1 in der Regressionsanalyse als gewichtigster Einflussfaktor präsentierte, wäre es als zusätzlich sinnvoll in dem Modell vorstellbar gewesen. Eine Kombination dieser drei Serummarker mit der VAP-1 Konzentration ermöglichte allerdings keine bessere Abschätzung der Fibroestadien gegenüber dem bereits publizierten Panel [52]. Der Verbleib als zweitstärkste Einflussvariable deutet aber auf eine relevante Rolle bei der Fibrose-Progression hin.

Die durchgeführte ROC-Analyse zur Abschätzung, ob eine Leberzirrhose vorliegen könnte, lieferte eine akzeptable Sensitivität und Spezifität. Bei Fehlen anderer nicht-invasiver Verfahren wäre diese als durchaus klinisch interessant einzustufen. Allerdings konnten Castera et al. [58] in ihrer Hepatitis C-Studie mithilfe der transienten Elastographie deutlich besser abschätzen, ob eine Zirrhose vorliegt (AUROC= 0,95; Sensitivität 0,87; Spezifität 0,91, im Vergleich zur Histologie), und auch gute Grenzwerte für die Fibroestadien F1-F3 festlegen.

Auch der APRI-Index, der aus klinisch routinemäßig erhobenen Daten berechnet werden kann, konnte bei Castera et al. eine vergleichbar gute Voraussage einer Zirrhose ermöglichen (AUROC= 0,83) wie VAP-1 in unserer Studie [58].

Auch im Gesamt-Studienkollektiv dieser Studie (899 Patienten mit verschiedenen CLDs, siehe Methodik) zeigte die transiente Elastographie eine bessere Voraussagekraft in Bezug auf das Vorliegen einer Zirrhose (Sensitivität 0,88; Spezifität 0,90) als die VAP-1 Konzentration [52].

Die VAP-1 Konzentration könnte sich in Kombination mit anderen laborchemischen Markern als gut geeignet erweisen, eine Voraussage über das Vorliegen einer Zirrhose treffen zu können. Die signifikant ansteigenden VAP-1 Konzentrationen bei moderater und schwerer Fibrose im Vergleich zu keiner und leichter Fibrose deuten darauf hin, dass sich die VAP-1 Konzentration auch eignen könnte, um eine zunehmende Fibrosierung bei Hepatitis C festzustellen. Als alleiniger Biomarker bringt sie allerdings keinen Mehrgewinn im Vergleich zu den bereits etablierten Verfahren.

Die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und zunehmender oxidativer Stress (vermehrt ROS) schädigen das Leberparenchym und wirken in der Pathophysiologie der Leberfibrose mit [74]. SSAO produziert ROS und beeinflusst eine vermehrte Bildung von extrazellulären Matrixproteinen [3]. Daher wäre die SSAO-Aktivität auch als pathophysiologischer Einflussfaktor bei der zunehmenden Fibrosierung des Leberparenchyms vorstellbar. Die SSAO-Aktivität zeigte sich aber in unserer Studie in den Regressionsanalysen nicht als relevanter Einflussfaktor, sie wurde in den Modellen frühzeitig ausgeschlossen. Auch zeigte sich kein deutlicher SSAO-Anstieg bei moderater und schwerer Fibrose bzw. Zirrhose. Die normalisierte SSAO-Aktivität (SSAO-Aktivität pro ng VAP-1) blieb bei zunehmender Fibrosierung konstant, was darauf hindeutet, dass das Glykoprotein VAP-1 nicht enzymatisch aktiver wird bei schwergradiger Fibrosierung, sondern sich nur die im Plasma oder Parenchym befindliche Konzentration verändert und damit die absolute SSAO-Aktivität pro ml Plasma ansteigt.

Zusammenschau der Studienkollektive

Beinflussende pathophysiologische Zustände

Die Verteilung der gemessenen Werte variierte deutlich zwischen den beiden Studienkollektiven. Das Obesity-Patientenkollektiv war in sich deutlich homogener mit nur vereinzelt signifikant höheren Werten. Dies war so zu erwarten gewesen, da Patienten mit chronischen Erkrankungen nicht in die Studie inkludiert wurden. Damit wurden automatisch Erkrankungen, die laut Literatur mit erhöhten VAP-1 Konzentrationen assoziiert wurden, ausgeschlossen, soweit sie diagnostiziert waren. Hierzu gehören u.a. Diabetes mellitus Typ 1

und 2 [75], chronische Lebererkrankungen [21], Herzinsuffizienz [76], koronare Herzkrankheit [6] und chronisches Nierenversagen [9]. Es lagen bei diesen Patienten also neben Adipositas als möglichem Einflussfaktor keine Ursachen vor, die nach aktuellem Wissensstand veränderte Plasma VAP-1 Konzentrationen oder SSAO-Aktivitäten erklären würden. Bei den Hepatitis C-Patienten gab es dagegen aufgrund der verschiedenen inkludierten Fibrosestadien große Unterschiede.

Vergleiche mit publizierten Daten

Vergleiche mit publizierten Daten zu VAP-1 oder SSAO-Aktivitäts-Durchschnittswerten in der Allgemeinbevölkerung sind aufgrund verschiedener verwendeter Messmethoden, die unterschiedliche durchschnittliche VAP-1 Konzentrationen bzw. SSAO-Aktivitäten liefern und aufgrund der unterschiedlichen Präanalytik problematisch. Die Vergleiche sind daher nur eingeschränkt beurteilbar. Beispielsweise wurden von Tufvesson et al. [24] in einer gesunden Vergleichsgruppe eine SSAO-Aktivität von durchschnittlich 471 (+/- 112) mU/l gemessen mittels eines Radioaktivitätsverfahren, die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) von Van Dijk [25] lieferte dagegen eine durchschnittliche SSAO-Aktivität von 352 (+/- 102) mU/l. Mit unserer SSAO-Aktivitätsmessung ließen sich diese Daten auch aufgrund verschiedener Einheiten nicht direkt vergleichen.

Kurkijärvi et al. [26] verwendeten ebenfalls ein ELISA-Verfahren, allerdings mit Reagenzien eines anderen Herstellers und anderen Abläufen. Hier lag der Mittelwert der VAP-1 Konzentration in der gesunden Vergleichsgruppe bei 88,6 (+/- 20,0) ng/ml und damit deutlich unter den VAP-1 Konzentrationen unserer Studienkollektive. In dem bereits erwähnten sehr großen Studienkollektiv von Gurecka et al. [61] wurde das ELISA-Verfahren analog wie auch in unseren Experimenten durchgeführt. Es zeigte sich in der normalgewichtigen Gruppe ein VAP-1 Mittelwert von 386 (+/- 180) ng/ml und in der adipösen Gruppe (n=270) von 390 (+/- 178) ng/ml.

Es ist auffällig, dass Gurecka et al. in der adipösen Gruppe sehr ähnliche VAP-1 Konzentrationen bei gleicher Methodik gemessen haben wie wir in unserem adipösen Studienkollektiv. Weder zwischen unserer nicht-adipösen im Vergleich zur adipösen Gruppe, noch zwischen der normgewichtigen und der adipösen Gruppe von Gurecka et al. zeigten sich signifikante Unterschiede, alle Gruppen zeigten vergleichbare VAP-1 Konzentrationen. Dies stützt die zuvor geäußerte Vermutung, dass Adipositas Grad I nicht mit erhöhten VAP-1 Konzentrationen einhergeht. Auch könnte spekuliert werden, dass die VAP-1 Konzentration bei gleicher Methodik durchaus stabil ist und Vergleiche erfolgen können. Allerdings müssen mehr Publikationen mit gleicher Methodik vorliegen, um diese Vermutung zu festigen.

Bei milder Fibrose waren die VAP-1 Konzentrationen vergleichbar mit denjenigen bei Adipositas und Übergewicht aus Studienkollektiv 1 (und damit auch vergleichbar zu dem

normgewichtigen Studienkollektiv von Gurecka et al.). Bei nicht legitimer Vergleichbarkeit der beiden Studienkollektive haben wir keine Signifikanztestung durchgeführt. Dennoch hat es den Anschein, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen milder Fibrose und dem adipösen Studienkollektiv gibt. Es war allerdings ein leichter Trend zu höheren VAP-1 Konzentrationen bei milder Fibrose sichtbar. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte man vermuten, dass das Plasma VAP-1 bei einer chronischen Hepatitis C-Erkrankung erst bei mittelgradiger Fibrose ansteigt. Dies ist allerdings spekulativ und muss in Zukunft durch die Mitbestimmung einer ausreichend großen gesunden Vergleichsgruppe bestätigt werden.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die VAP-1 Konzentration ein besserer Biomarker ist als die SSAO-Aktivität. Dies gilt sowohl in Zusammenschau beider Studienkohorten als auch konkret im Studienkollektiv 2 – Hepatitis C. Hier konnte aufgezeigt werden, dass die VAP-1 Konzentration als Biomarker für fibrotische Umbauvorgänge deutlich besser geeignet ist als die SSAO-Aktivität. Dies zeigte sich im Rahmen meiner Arbeit für Hepatitis C-Patienten, könnte aber auch für andere CLDs gelten. Daher erscheint die bisher übliche Praxis die VAP-1 Konzentration bei CLDs mithilfe des ELISA-Verfahrens zu quantifizieren, als sinnvoll. Sie sollte so fortgesetzt werden, um mehr über die Pathophysiologie des VAP-1 und die Eigenschaften als Biomarker für die progrediente Fibrose und die Zirrhose herauszufinden.

Abkürzungen

| Abkürzung | Bedeutung |
|-------------------------------|---|
| AASLD | American Association of the Study of Liver Diseases |
| ADA | American Diabetes Association |
| AGE | Advanced Glykation End |
| ALD | Alkoholische Leberkrankheit |
| ANOVA | Analysis of variance |
| AOC | Copper-containing Amino Oxidasen |
| APRI-Index | Aspartate aminotransferase to platelet ratio index |
| BMI | Body mass index |
| CLD | Chronische Lebererkrankungen |
| EASL | European Association of the Study of the Liver |
| F1 | Fibrosegrad 1 |
| FIB-4-Index | Fibrosis-4-Index |
| gammaGT | Gamma-Glutamyltransferase |
| GOT | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| GPT | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |
| GDF-15 | Growth/ differentiation factor 15 |
| HGF | Hepatocyte growth factor |
| HDL | High-density Lipoprotein |
| HEV | Hochendotheliale Venolen |
| HPLC | Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie |
| HOMA-Index | Homeostasis Model Assessment-Index |
| HRP | Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase |
| H ₂ O ₂ | Hydrogen-Peroxid |
| IGF | Impaired Fasting Glucose |
| IL | Interleukin |
| IQR | Interquartilsabstand |
| LDL | Low-density Lipoprotein |
| MMP | Metalloproteinase |
| MAO | Monoaminoxidase |
| NAFLD | Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung |
| NASH | Nicht-alkoholische Steatohepatitis |
| PLGF | Placental growth factor |
| PBC | Primär biliäre Zirrhose |

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| ROC | Receiver-operating-curve |
| RRsys und RRdys | Blutdruck systolisch und diastolisch |
| SSAO | Semicarbazide-sensitive amino oxydase |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| VAP-1 | Vascular adhesion protein 1 |

Literaturverzeichnis

1. Arvilommi AM, Salmi M, Kalimo K, et al. (1996) Lymphocyte binding to vascular endothelium in inflamed skin revisited: a central role for vascular adhesion protein-1 (VAP-1). *Eur J Immunol* 26:825-33
2. Tohka S, Laukkanen M, Jalkanen S, et al. (2001) Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) functions as a molecular brake during granulocyte rolling and mediates recruitment in vivo. *Faseb j* 15:373-82
3. Smith DJ, Vainio PJ (2007) Targeting vascular adhesion protein-1 to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1110:382-8
4. Stolen CM, Madanat R, Marti L, et al. (2004) Semicarbazide sensitive amine oxidase overexpression has dual consequences: insulin mimicry and diabetes-like complications. *Faseb j* 18:702-4
5. Salmi M, Kalimo K, Jalkanen S (1993) Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. *J Exp Med* 178:2255-60
6. Aalto K, Maksimow M, Juonala M, et al. (2012) Soluble vascular adhesion protein-1 correlates with cardiovascular risk factors and early atherosclerotic manifestations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:523-32
7. Boomsma F, van den Meiracker AH, Winkel S, et al. (1999) Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in type I (insulin-dependent), in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis. *Diabetologia* 42:233-7
8. Obata T (2006) Diabetes and semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity: a review. *Life Sci* 79:417-22
9. Lin MS, Li HY, Wei JN, et al. (2008) Serum vascular adhesion protein-1 is higher in subjects with early stages of chronic kidney disease. *Clin Biochem* 41:1362-7
10. Bono P, Salmi M, Smith DJ, et al. (1998) Isolation, structural characterization, and chromosomal mapping of the mouse vascular adhesion protein-1 gene and promoter. *J Immunol* 161:2953-60
11. Jalkanen S, Salmi M (2001) Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *EMBO J* 20:3893-901
12. Jakobsson E, Nilsson J, Ogg D, et al. (2005) Structure of human semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:1550-62
13. Salmi M, Jalkanen S (1992) A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science* 257:1407-9

14. Salmi M, Jalkanen S (2006) Developmental regulation of the adhesive and enzymatic activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in humans. *Blood* 108:1555-61
15. Arvilommi AM, Salmi M, Jalkanen S (1997) Organ-selective regulation of vascular adhesion protein-1 expression in man. *Eur J Immunol* 27:1794-800
16. Mercier N, Moldes M, El Hadri K, et al. (2003) Regulation of semicarbazide-sensitive amine oxidase expression by tumor necrosis factor-alpha in adipocytes: functional consequences on glucose transport. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1197-208
17. Jaakkola K, Nikula T, Holopainen R, et al. (2000) In vivo detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. *Am J Pathol* 157:463-71
18. Abella A, Garcia-Vicente S, Viguerie N, et al. (2004) Adipocytes release a soluble form of VAP-1/SSAO by a metalloprotease-dependent process and in a regulated manner. *Diabetologia* 47:429-38
19. Pannecoeck R, Serruys D, Benmeridja L, et al. (2015) Vascular adhesion protein-1: Role in human pathology and application as a biomarker. *Crit Rev Clin Lab Sci* 52:284-300
20. Stolen CM, Yegutkin GG, Kurkijarvi R, et al. (2004) Origins of serum semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Circ Res* 95:50-7
21. Kurkijarvi R, Yegutkin GG, Gunson BK, et al. (2000) Circulating soluble vascular adhesion protein 1 accounts for the increased serum monoamine oxidase activity in chronic liver disease. *Gastroenterology* 119:1096-103
22. Boomsma F, Bhaggoe UM, van der Houwen AM, et al. (2003) Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase in human (patho)physiology. *Biochim Biophys Acta* 1647:48-54
23. McEwen CM, Jr., Castell DO (1967) Abnormalities of serum monoamine oxidase in chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 70:36-47
24. Tufvesson G (1969) Determination of monoamine oxidase activity in human blood serum with 14C-benzylamine and 14C-tyramine as substrates. *Scand J Clin Lab Invest* 23:71-7
25. van Dijk J, Boomsma F, Alberts G, et al. (1995) Determination of semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 663:43-50
26. Kurkijarvi R, Adams DH, Leino R, et al. (1998) Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J Immunol* 161:1549-57
27. Salmi M, Tohka S, Berg EL, et al. (1997) Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) mediates lymphocyte subtype-specific, selectin-independent recognition of vascular endothelium in human lymph nodes. *J Exp Med* 186:589-600

28. Koskinen K, Vainio PJ, Smith DJ, et al. (2004) Granulocyte transmigration through the endothelium is regulated by the oxidase activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1). *Blood* 103:3388-95
29. Schilter HC, Collison A, Russo RC, et al. (2015) Effects of an anti-inflammatory VAP-1/SSAO inhibitor, PXS-4728A, on pulmonary neutrophil migration. *Respir Res* 16:42
30. Salmi M, Jalkanen S (2017) Vascular Adhesion Protein-1: A Cell Surface Amine Oxidase in Translation. *Antioxid Redox Signal*
31. Salmi M, Jalkanen S (2005) Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* 5:760-71
32. Kivi E, Elima K, Aalto K, et al. (2009) Human Siglec-10 can bind to vascular adhesion protein-1 and serves as its substrate. *Blood* 114:5385-92
33. Li HY, Jiang YD, Chang TJ, et al. (2011) Serum vascular adhesion protein-1 predicts 10-year cardiovascular and cancer mortality in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 60:993-9
34. Karim S, Liaskou E, Fear J, et al. (2014) Dysregulated hepatic expression of glucose transporters in chronic disease: contribution of semicarbazide-sensitive amine oxidase to hepatic glucose uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:G1180-90
35. Carpene C, Les F, Hasnaoui M, et al. (2016) Anatomical distribution of primary amine oxidase activity in four adipose depots and plasma of severely obese women with or without a dysmetabolic profile. *J Physiol Biochem* 73:475-86
36. Bour S, Caspar-Bauguil S, Iffiu-Soltesz Z, et al. (2009) Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 deficiency reduces leukocyte infiltration into adipose tissue and favors fat deposition. *Am J Pathol* 174:1075-83
37. Mercier N, Moldes M, El Hadri K, et al. (2001) Semicarbazide-sensitive amine oxidase activation promotes adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem J* 358:335-42
38. Weiss HG, Klocker J, Labeck B, et al. (2003) Plasma amine oxidase: a postulated cardiovascular risk factor in nondiabetic obese patients. *Metabolism* 52:688-92
39. Kohli A, Shaffer A, Sherman A, et al. (2014) Treatment of hepatitis C: a systematic review. *JAMA* 312:631-40
40. Weston CJ, Shepherd EL, Claridge LC, et al. (2015) Vascular adhesion protein-1 promotes liver inflammation and drives hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 125:501-20
41. Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209-18
42. Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, et al. (1990) Comparisons of peripheral blood and hepatic lymphocyte subpopulations and interferon production in chronic viral hepatitis. *J Clin Lab Immunol* 33:1-6

43. Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L, et al. (1995) Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 108:231-41
44. Weston CJ, Adams DH (2011) Hepatic consequences of vascular adhesion protein-1 expression. *J Neural Transm (Vienna)* 118:1055-64
45. Lalor PF, Sun PJ, Weston CJ, et al. (2007) Activation of vascular adhesion protein-1 on liver endothelium results in an NF-kappaB-dependent increase in lymphocyte adhesion. *Hepatology* 45:465-74
46. Altamirano J, Bataller R (2010) Cigarette smoking and chronic liver diseases. *Gut* 59:1159-62
47. Bonder CS, Norman MU, Swain MG, et al. (2005) Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* 23:153-63
48. Marttila-Ichihara F, Castermans K, Auvinen K, et al. (2010) Small-molecule inhibitors of vascular adhesion protein-1 reduce the accumulation of myeloid cells into tumors and attenuate tumor growth in mice. *J Immunol* 184:3164-73
49. Luley C, Blaik A, Reschke K, et al. (2011) Weight loss in obese patients with type 2 diabetes: effects of telemonitoring plus a diet combination - the Active Body Control (ABC) Program. *Diabetes Res Clin Pract* 91:286-92
50. Luley C, Blaik A, Gotz A, et al. (2014) Weight loss by telemonitoring of nutrition and physical activity in patients with metabolic syndrome for 1 year. *J Am Coll Nutr* 33:363-74
51. Biemann R, Penner M, Borucki K, et al. (2016) Serum bile acids and GLP-1 decrease following telemetric induced weight loss: results of a randomized controlled trial. *Sci Rep* 6:30173
52. Krawczyk M, Zimmermann S, Hess G, et al. (2017) Panel of three novel serum markers predicts liver stiffness and fibrosis stages in patients with chronic liver disease. *PLoS One* 12:e0173506
53. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, et al. (2002) Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 36:986-92
54. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. (2003) A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38:518-26
55. Menghini G (1958) One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology* 35:190-9
56. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, et al. (1994) Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19:1513-20
57. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, et al. (2003) Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26:3160-7

58. Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al. (2005) Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 128:343-50
59. Li HY, Wei JN, Lin MS, et al. (2009) Serum vascular adhesion protein-1 is increased in acute and chronic hyperglycemia. *Clin Chim Acta* 404:149-53
60. Li YI, Hung JS, Yu TY, et al. (2014) Serum vascular adhesion protein-1 predicts all-cause mortality and cancer-related mortality in subjects with colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 428:51-6
61. Gurecka R, Koborova I, Csongova M, et al. (2016) Correlation among soluble receptors for advanced glycation end-products, soluble vascular adhesion protein-1/semicarbazide-sensitive amine oxidase (sVAP-1) and cardiometabolic risk markers in apparently healthy adolescents: a cross-sectional study. *Glycoconj J* 33:599-606
62. Bedossa P, Carrat F (2009) Liver biopsy: the best, not the gold standard. *J Hepatol* 50:1-3
63. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, et al. (2009) Liver biopsy. *Hepatology* 49:1017-44
64. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L (2018) EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J Hepatol* 69:461-511
65. (2015) EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of Hepatology* 63:237-64
66. McNab G, Reeves JL, Salmi M, et al. (1996) Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium. *Gastroenterology* 110:522-8
67. Lalor PF, Shields P, Grant A, et al. (2002) Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 80:52-64
68. Aspinall AI, Curbishley SM, Lalor PF, et al. (2010) CX(3)CR1 and vascular adhesion protein-1-dependent recruitment of CD16(+) monocytes across human liver sinusoidal endothelium. *Hepatology* 51:2030-9
69. Kitade H, Chen G, Ni Y, et al. (2017) Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients* 9
70. Kwiecinski M, Noetel A, Elfimova N, et al. (2011) Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS One* 6:e24568
71. Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, et al. (1997) Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* 26:81-9

- 72.** Van Steenkiste C, Ribera J, Geerts A, et al. (2011) Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology* 53:1629-40
- 73.** Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, et al. (2000) Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol* 20:3742-51
- 74.** Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HAM, et al. (2018) Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 175:71-102
- 75.** Boomsma F, Pedersen-Bjergaard U, Agerholm-Larsen B, et al. (2005) Association between plasma activities of semicarbazide-sensitive amine oxidase and angiotensin-converting enzyme in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 48:1002-7
- 76.** Boomsma F, van Veldhuisen DJ, de Kam PJ, et al. (1997) Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 33:387-91
- 77.** Kraemer M, Krawczyk M, Noor F, et al. (2019) Increased Circulating VAP-1 Levels Are Associated with Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Infection. *J Clin Med* 8

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jochen Schneider bedanken, der mich von der konkreten Planung der Experimente bis hin zu den Publikationen immer äußerst tatkräftig unterstützt hat.

Aus meiner Arbeitsgruppe geht mein besonderer Dank an Iris Adrian für all die Unterstützung bei den Experimenten und als erste Ansprechpartnerin für Probleme aller Art. Allen Mitgliedern der AG Schneider und der AG Lammert danke ich für ihre Hilfe. Vielen Dank an Prof. Dr. med. Frank Lammert und Dr. med. Marcin Krawczyk für das Überlassen der Studienkollektive und die gute Zusammenarbeit. Ebenfalls gilt mein Dank Dr. troph. Ronald Biemann und Prof. Dr. med. Berend Isermann von der Universität Magdeburg für die großzügige Bereitstellung eines Patientenkollektivs. Dr. Fozia Noor danke ich für die konstruktive Kritik und die zahlreichen Überarbeitungen bei der Entstehung des Papers.

Meiner Familie gilt der abschließende Dank für all die Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Doktorarbeit. Muito obrigado pelo apoio, querida. Danke für die Motivation und das anhaltende Interesse, wie es weitergeht.

Publikationen

- Erstautor einer internationalen Publikation im Journal of Clinical Medicine (Impact factor: 5,688 ²):
Kraemer, M., Krawczyk, M., Noor, F., Grünhage, F., Lammert, F., Schneider, JG., *Increased Circulating VAP-1 Levels Are Associated with Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Infection*. J Clin Med, 2019. 8(1). doi: 10.3390/jcm8010103 [77]
(abgedruckt auf den folgenden Seiten)
- Poster-Präsentation beim Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) 2017:
Increased VAP-1 concentration and activity are associated with liver fibrosis in chronic Hepatitis C.
- Poster-Präsentation bei der Jahrestagung der gastroenterologischen Arbeitsgemeinschaft Rheinland-Pfalz /Saar (GARPS) 2017:
Increased VAP-1 concentration is associated with liver fibrosis in chronic Hepatitis C.
- Poster-Präsentation beim Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Diabetologie (DDG) 2018 und Abstract-Publikation:
Kraemer, M., Biemann, R., Isermann B., Lammert, F., Schneider, J., *Plasma VAP-1 concentration and activity during lifestyle-induced body weight reduction*. Diabetologie und Stoffwechsel 2018; 13(S 01): S26, DOI: 10.1055/s-0038-1641833 (abgedruckt auf der folgenden Seite)

² Impact factor 2018 nach Web of Science

Plasma VAP-1 concentration and activity during lifestyle-induced body weight reduction.

Kraemer, M., Biemann, R., Isermann B., Lammert, F., Schneider, J.

Diabetologie und Stoffwechsel 2018; 13(S 01): S26

Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) is a 170 kDa glycoprotein with amine oxidase activity (SSAO-activity). Endothelial cells and adipocytes were suggested to release a soluble VAP-1 into the bloodstream. Previous data showed an association between the plasma VAP-1 with chronic liver diseases and HbA1c-values in T2DM. VAP-1-mediated generation of oxidative stress was suggested to promote cardiovascular mortality.

To estimate the role of adipocytes in VAP-1 release, we assessed VAP-1 concentration and SSAO-activity in 60 overweight patients with diagnosed metabolic syndrome during a 6-month lifestyle induced weight loss program.


The participants reduced their BMI about 12,8% (IQR 8,3%-17,1%) and the body fat mass about 23,6%. ALAT, total cholesterol, serum triglycerides, LDL, fasting blood glucose, fasting insulin, HbA1c and HOMA-index lowered significantly. However, neither the VAP-1 concentration nor the SSAO-activity changed significantly in the weight loss or control group.

We expected reduced plasma VAP-1 concentrations because the body fat mass decreased. In contrast to our expectation, VAP-1 concentration and SSAO activity remained constant. Hence, we speculate that adipocytes do not represent the main source of soluble VAP-1 in non-diabetic subjects. This assumption is in line with a recent publication (Carpene et al, 2016) concerning the missing coherence between VAP-1 concentration in adipocytes and plasma arguing against a direct release mechanism.

We conclude that plasma VAP-1 is not directly released from adipose tissue. A more complex release mechanism involving also endothelial cells and releasing factors is likely, hence soluble VAP-1 does not seem to represent a suitable biomarker for metabolic diseases.

Article

Increased Circulating VAP-1 Levels Are Associated with Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Infection

Marcel Kraemer ¹, Marcin Krawczyk ^{1,2} , Fozia Noor ³, Frank Grünhage ^{1,4}, Frank Lammert ¹ and Jochen G. Schneider ^{1,3,5,*}

¹ Department of Internal Medicine II, Saarland University Medical Center, 66421 Homburg, Germany; marcel.kraemer@mail.de (M.K.); marcin.krawczyk@uks.eu (M.K.); frank.gruenhage@kkh-ne.de (F.G.); frank.lammert@uks.eu (F.L.)

² Laboratory of Metabolic Liver Diseases, Centre for Preclinical Research, Department of General, Transplant and Liver Surgery, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

³ Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg, L-4367 Belvaux, Luxembourg; fozia.noor@uni.lu

⁴ Department of Gastroenterology and Oncology, Rhein-Kreis-Neuss Hospital, 41515 Grevenbroich, Germany

⁵ Centre Hospitalier Emile Mayrisch, L-4240 Esch-sur-Alzette, Luxembourg

* Correspondence: jg.schneider@outlook.com; Fax: +352-46664436154

Received: 25 November 2018; Accepted: 9 January 2019; Published: 17 January 2019



Abstract: Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) is a multifunction protein. While membrane-bound VAP-1 is an adhesion protein, soluble VAP-1 catalyzes the deamination of primary amines through its semicarbazide-sensitive amino oxidase (SSAO) activity. VAP-1 supports the transmigration of leukocytes and increases oxidative stress. In chronic liver diseases, it plays a role in leukocyte infiltration and fibrogenesis. Here, we measured VAP-1 plasma concentration and its SSAO activity in 322 patients with chronic hepatitis C infection and evaluated the association of VAP-1 with fibrosis stages. VAP-1 concentration strongly correlated with liver stiffness and was the second strongest influencing variable after gamma-glutamyltransferase (GGT) for liver stiffness in regression analysis. The VAP-1 concentration increased with advancing fibrosis stages and the highest concentrations were found in patients with cirrhosis. According to the receiver operating characteristic (ROC) analysis, a VAP-1 cut-off value of 541 ng/mL predicted histologically confirmed cirrhosis (sensitivity 74%; specificity 72%). SSAO activity correlated only moderately with liver stiffness, showing a relatively small increase in advanced fibrosis. To our knowledge, this is the first study on VAP-1 in chronic hepatitis C infection showing its association with progressive fibrosis. In conclusion, VAP-1 plasma concentration, rather than its SSAO activity, may represent a non-invasive biomarker for monitoring fibrogenesis in patients with chronic hepatitis C infection.

Keywords: VAP-1; vascular adhesion protein 1; SSAO activity; semicarbazide-sensitive amino oxidase; chronic liver diseases; fibrosis; liver stiffness; Fibroscan; HCV

1. Introduction

Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) is a 170 kDa sialoglycoprotein. It exists in soluble and membrane-bound forms [1]. VAP-1 has an enzymatic domain that is responsible for its primary amine oxidase activity, also referred to as the semicarbazide-sensitive amino oxidase (SSAO) activity [2]. It is involved in the conversion of exogenous and endogenous amines, for example benzylamine and methylamine, into aldehydes by oxidative deamination, thereby releasing cytotoxic products such as hydrogen peroxide and ammonia. These cytotoxic products lead to increased oxidative stress and the formation of advanced glycation endproducts [3]. On the other hand, VAP-1 non-enzymatically triggers inflammation via an adhesion domain by attracting and supporting the adhesion and transmigration

of leukocytes from vessels into the inflamed sites [4,5]. VAP-1 is stored in intracellular vesicles and is present on the membranes of the endothelial cells, muscle cells, adipocytes and hepatic sinusoidal endothelium. Under physiological conditions, the highest amount of membrane-bound VAP-1 exists on the endothelial cells of the lymph nodes [6]. In the soluble form, VAP-1 is present in the human blood [1].

VAP-1 concentration and, partly its SSAO activity, are modified in various pathological conditions, such as atherosclerosis [7], chronic kidney injury [8] and diabetes mellitus [9]. In chronic diseases with leukocyte infiltration, a considerable amount of VAP-1 is detectable on the endothelial cell surface of the affected tissue. In chronic liver diseases (CLDs), for example, VAP-1 is present on the hepatic sinusoidal endothelium and hepatic stellate cells [5,10,11].

The serum VAP-1 concentration differs between various CLDs, for example, patients with alcoholic liver diseases (ALDs) have higher VAP-1 concentrations when compared to those with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis [6]. Moreover, significantly increased VAP-1 concentrations were detected in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients in comparison to a matched metabolic syndrome group [5]. Notably, VAP-1 concentration allowed distinction between non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and simple steatosis. Like other CLDs, chronic hepatitis C (HCV) infection also results in fibrosis that may lead to the cirrhosis of the liver. According to the World Health Organization (WHO), there are an estimated 71 million chronic HCV infected people in the world [12]. Despite the availability of novel direct acting antiviral therapies, HCV infection is still the most common cause of cirrhosis worldwide [12].

Here, we studied the concentration and the activity of plasma VAP-1 in patients with chronic HCV infection. We investigated the levels of VAP-1 and SSAO activity in different fibrosis stages, which were assessed by transient elastography (Fibroscan®) as liver stiffness and liver biopsy in some cases. We aimed to discern diagnostic patterns and to estimate the informative value of measuring VAP-1 concentration and activity as markers for fibrosis severity.

2. Experimental Section

This study was conducted on a subgroup of a study cohort consisting of 899 patients with different CLDs [13]. From this cohort, we selected 538 subjects suffering from chronic HCV infection. Depending on the availability of frozen blood samples and clinical parameters, 322 patients were considered eligible for our study (Supplemental Figure S1). All patients gave written informed consent. The study was approved by the local ethical committee (approval number of Ärztekammer des Saarlandes, Germany: 271/11).

The liver stiffness of all 322 patients was measured by transient elastography (Fibroscan®, Echosens SA, Paris, France) [13] as a non-invasive measurement of liver stiffness. We divided the patients according to the fibrosis stages using the cut-off values from Castera et al. [14]; no/mild fibrosis corresponds with stage F0/F1 (≤ 7.0 kPa), moderate fibrosis with F2/F3 (7.1–12.4 kPa), and severe fibrosis with F4 (≥ 12.5 kPa). A liver biopsy using the Menghini technique [15] with a 1.8-mm needle was carried out in 92 patients. The staging was performed according to the classification of Desmet et al. [16]. Overall, 38 cases were diagnosed with liver cirrhosis (fibrosis stage F4) according to the biopsy results.

The AST to platelet ratio index (APRI) and Forns index for the assessment of liver fibrosis in chronic HCV patients could only be determined in 144 and 138 patients respectively, due to missing laboratory values for other patients.

Plasma concentration of VAP-1 was determined using an enzyme-linked immunoassay (ELISA) from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). According to the manufacturer, the intra-assay variation was 2.1%/1.5%/2.4%, while the inter-assay variation was 4.5%/4.8%/4.7% in three independent experiments.

We measured the SSAO activity using an Amplex® Red Monoamine Oxidase assay kit from Invitrogen™ Molecular Probes™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). SSAO activity was

determined by a fluorometric detection of hydrogen peroxide produced by different amino oxidases, including the semicarbazide-sensitive amino oxidase (SSAO, the enzymatic domain of VAP-1) after adding benzylamine as a substrate. Each sample was measured with and without the specific SSAO inhibitor semicarbazide and the specific activity was calculated by subtraction.

Statistical analysis was performed with SPSS 22.0 (IBM, Armonk, NY, USA). According to the Kolmogorov–Smirnov test, the VAP-1 concentration and its activity were not normally distributed. Hence, after log transformation, we used Mann–Whitney U test for the comparison of medians or ANOVA followed by Bonferroni post hoc test for multiple comparisons. Nonparametric Spearman correlation coefficient was used for non-normal data. Linear regression analysis was used to test for independent associations and clusters were compared with the Kruskal–Wallis test. For the determination of cut-off values and the calculation of the associated sensitivity and specificity, we used receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. We use boxplots to present the results, and the dots represent the outliers. Results were considered significant at $p < 0.05$. The effect size is given by the beta values.

3. Results

Table 1 summarizes the baseline patient characteristics. The study cohort involved 322 patients (98 women and 224 men). The mean age was 49.7 (± 12.1) years and the mean body mass index (BMI) was 24.3 (± 4.6) kg/m². The liver stiffness values were not consistent with biopsy results in three patients with liver biopsy-confirmed cirrhosis. Moreover, nine patients were above the general liver stiffness cut-off value for cirrhosis (12.5 kPa), but were classified with stage F0–F3 fibrosis on the basis of the biopsy results. However, in 87% of the cases, liver stiffness and biopsy results were concordant. Overall, 106 patients had values higher than the cut-off for cirrhosis, whereas 216 patients had liver stiffness values less than 12.5 kPa.

Table 1. Characteristics of the study cohort. The classification between no/mild, moderate and severe fibrosis is based on liver stiffness as assessed by transient elastography (Fibroscan®). No/mild fibrosis ≤ 7.1 kPa; moderate fibrosis 7.1–12.4 kPa; severe fibrosis ≥ 12.5 kPa. The N, the average and the p values for the differentiation between the fibrosis stages are given. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test. Significance is given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

| | N | Average | | | p Value | | |
|--|-----|------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | No/Mild Fibrosis | Moderate Fibrosis | Severe Fibrosis | No/Mild vs. Moderate Fibrosis | No/Mild vs. Severe Fibrosis | Moderate vs. Severe Fibrosis |
| Sex (1 = male, 2 = female) | 322 | 1.34 | 1.28 | 1.26 | 1.00 | 0.515 | 1.00 |
| Age (years) | 322 | 46.90 | 50.92 | 52.74 | 0.113 | <0.001 *** | 0.574 |
| Body mass index (BMI) in kg/m ² | 302 | 23.76 | 25.06 | 24.72 | 1.00 | 0.33 | 1.00 |
| Liver stiffness (kPa) | 322 | 5.26 | 9.05 | 29.81 | <0.001 *** | <0.001 *** | <0.001 *** |
| Plasma VAP-1 (vascular adhesion protein-1) concentration in ng/mL | 322 | 421.01 | 495.15 | 662.96 | 0.002 ** | <0.001 *** | <0.001 *** |
| SSAO (semicarbazide-sensitive amino oxidase) activity in ng/mL/min | 317 | 24.49 | 28.18 | 34.86 | 0.148 | <0.001 *** | 0.312 |
| APRI (AST to platelet ratio index) | 144 | 0.21 | 0.33 | 1.05 | 0.013 * | <0.001 *** | <0.001 *** |
| Forns index | 138 | 7.17 | 8.15 | 10.34 | 0.017 * | <0.001 *** | <0.001 *** |
| Platelet count (1000/ μ L) | 308 | 226.19 | 201.70 | 134.65 | 0.154 | <0.001 *** | <0.001 *** |
| Cholesterol (mg/dL) | 223 | 171.07 | 167.26 | 153.86 | 1.00 | 0.111 | 0.301 |
| GGT (gamma-glutamyltransferase) in U/I | 258 | 57.12 | 90.61 | 182.24 | <0.001 *** | <0.001 *** | <0.001 *** |
| GPT (glutamate pyruvate transaminase) in U/I | 257 | 61.36 | 90.66 | 122.00 | 0.003 ** | <0.001 *** | 1.00 |
| GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) in U/I | 254 | 40.13 | 56.25 | 103.06 | <0.001 *** | <0.001 *** | <0.001 *** |
| Bilirubin (mg/dL) | 255 | 0.67 | 0.68 | 1.16 | 1.00 | <0.001 *** | <0.001 *** |

The patients with liver stiffness of ≥ 12.5 kPa, presumably having cirrhosis, had significantly higher plasma VAP-1 concentrations as compared to the patients with liver stiffness values less than 12.4 kPa and without cirrhosis (no/mild and moderate fibrosis). Similarly, the SSAO activity in these patients was significantly higher in comparison to patients with no/mild fibrosis (Table 1). The glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and gamma-glutamyltransferase (GGT) activities, as well as bilirubin and thrombocytes, also differed significantly between patients with or without severe fibrosis/cirrhosis. The APRI and Forns index significantly increased with liver stiffness (Table 1).

A comparison of VAP-1 concentrations and liver stiffness measurements (Figure 1A) shows a strong linear correlation ($r = 0.528$ Spearman, $p < 0.0001$). Likewise, we compared VAP-1 concentrations in patients classified in different fibrosis stages according to the biopsy results (Figure 1B). Here, the VAP-1 concentration did not differ between the individual fibrosis stages. We attribute this, at least in part, to the low number of biopsies in the individual groups (F0: $N = 7$, F2: $N = 10$, F3: $N = 8$). Nevertheless, severe fibrosis, stage F4 indicating cirrhosis, showed highly significant difference from mild (F1) fibrosis with $p < 0.001$ and significant difference from patients without fibrosis (F0) with a $p = 0.012$.

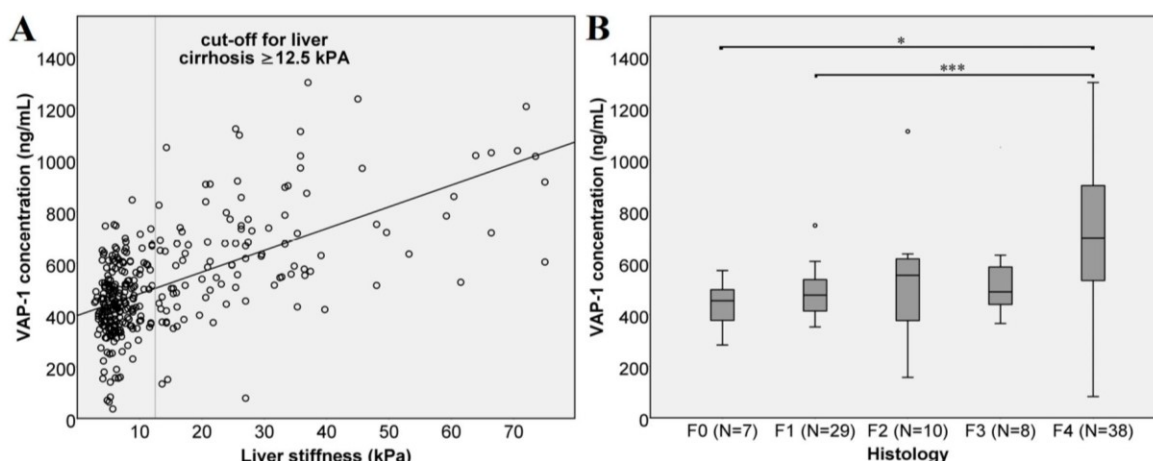


Figure 1. Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) concentration and liver fibrosis. (A) VAP-1 concentration and liver stiffness of all 322 patients. The cut-off value for liver cirrhosis was set at ≥ 12.5 kPa. The line shows the trend of the VAP-1 concentration with increasing liver stiffness as assessed by transient elastography; (B) VAP-1 concentration in different fibrosis stages as assessed by biopsy-based histology. According to the Kruskal–Wallis test, there were no significant differences ($p > 0.05$) between different biopsy-based fibrosis stages (F0 vs. F1, F2 or F3; F1 vs. F2 or F3 and F2 vs. F3). There were significant differences between F0 vs. F4 ($p = 0.012$) and highly significant between F1 vs. F4 ($p < 0.001$). Significance is shown as * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$.

The VAP-1 concentration also significantly correlated with glutamate pyruvate transaminase (GPT), GOT, GOT/GPT ratio, GGT, cholesterol, bilirubin, albumin, platelets and age (Table 2). The SSAO activity showed a lower but significant, correlation with these parameters.

Based on these results, we performed a linear regression analysis to test for independent predictors for liver stiffness or fibrosis severity. Here, we included all the parameters which correlated with VAP-1 concentration and SSAO activity in the regression analysis: These were namely; GOT, GPT, GGT, cholesterol, bilirubin, platelets, age, weight, soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt1), high-sensitivity troponin T (hsTnT), endoglin, pro brain natriuretic peptide (proBNP), APRI and Forns index. In this analysis, VAP-1 concentration was the second strongest variable associated with liver stiffness after GGT (VAP-1: beta = 0.197, T score = 2.451, significance $p = 0.016$). When including the recently identified surrogate markers [17], the growth/differentiation factor 15 (GDF15), hepatocyte growth factor (HGF) and placental growth factor (PLGF); in the model, VAP-1 was still the second strongest

influencing variable (VAP-1: beta 0.185, T score = 2.218, $p = 0.029$, Table 3). The influence of SSAO activity was less pronounced and was excluded in a stepwise procedure.

Table 2. Correlation analysis of VAP-1 concentration and semicarbazide-sensitive amino oxidase (SSAO) activity with standard laboratory parameters. Spearman correlating coefficients (r) and p values are shown. Significance is given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

| | VAP-1 Concentration | | SSAO Activity | |
|-----------------|---------------------|------------|---------------|------------|
| | r | p Value | r | p Value |
| Fibrosis stage | 0.513 | <0.001 *** | 0.233 | 0.026 * |
| Age | 0.294 | <0.001 *** | 0.114 | 0.043 * |
| Platelets | -0.357 | <0.001 *** | -0.241 | <0.001 *** |
| Albumin | -0.460 | <0.001 *** | -0.261 | <0.001 *** |
| GOT/GPT | 0.636 | <0.001 *** | 0.530 | 0.002 ** |
| GOT | 0.460 | <0.001 *** | 0.279 | <0.001 *** |
| GPT | 0.255 | <0.001 *** | 0.209 | <0.001 *** |
| GGT | 0.327 | <0.001 *** | 0.156 | 0.013 * |
| Bilirubin | 0.158 | 0.011 * | 0.128 | 0.042 * |
| Cholesterol | -0.171 | 0.010 * | -0.143 | 0.035 * |
| Liver stiffness | 0.528 | <0.001 *** | 0.347 | <0.001 *** |
| APRI | 0.474 | <0.001 *** | 0.211 | 0.011 * |
| Forns index | 0.493 | <0.001 *** | 0.201 | 0.019 * |
| SSAO activity | 0.535 | <0.001 *** | | |

Table 3. Linear regression analysis for independent predictors of liver stiffness. All variables correlating with liver stiffness are included in the model. We determined the regression coefficients with standard error, the beta coefficient and the statistics for co-linearity (tolerance and variance inflation factor (VIF)). Statistical outcome: $R = 0.855$, $R^2 = 0.730$, significance < 0.001 ***. Gamma-glutamyltransferase (GGT) was the strongest significant influencing variable for liver stiffness followed by VAP-1. Significance is given as * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$.

| | Coefficient of Regression B | Standard Error | Beta | T Score | Significance | Tolerance | Variance Inflation Factor (VIF) |
|--------------------------------------|-----------------------------|----------------|--------|---------|--------------|-----------|---------------------------------|
| Constant | -7.096 | 11.249 | | -0.631 | 0.530 | | |
| VAP-1 conc. | 0.012 | 0.006 | 0.185 | 2.218 | 0.029 * | 0.414 | 2.414 |
| SSAO activity | 0.057 | 0.081 | 0.051 | 0.698 | 0.487 | 0.542 | 1.844 |
| Age | 0.080 | 0.125 | 0.066 | 0.637 | 0.526 | 0.270 | 3.697 |
| Weight | 0.062 | 0.056 | 0.065 | 1.103 | 0.273 | 0.822 | 1.217 |
| APRI | 1.362 | 2.529 | 0.084 | 0.539 | 0.591 | 0.118 | 8.465 |
| Forns index | -0.689 | 1.176 | -0.104 | -0.586 | 0.559 | 0.091 | 10.932 |
| GGT | 0.047 | 0.008 | 0.474 | 6.091 | 0.000 *** | 0.473 | 2.115 |
| GPT | 0.001 | 0.026 | 0.006 | 0.058 | 0.954 | 0.256 | 3.905 |
| GOT | 0.009 | 0.059 | 0.029 | 0.148 | 0.882 | 0.075 | 13.335 |
| Bilirubin | -0.117 | 1.221 | -0.007 | -0.096 | 0.924 | 0.621 | 1.611 |
| Cholesterol | 0.008 | 0.018 | 0.027 | 0.432 | 0.667 | 0.743 | 1.345 |
| Thrombocytes | -0.028 | 0.023 | -0.147 | -1.222 | 0.225 | 0.198 | 5.048 |
| Endoglin | 0.270 | 0.110 | 0.181 | 2.467 | 0.015 * | 0.536 | 1.867 |
| HsTnT | | | | | | | |
| (high-sensitivity troponin T) | -0.039 | 0.043 | -0.058 | -0.924 | 0.358 | 0.741 | 1.350 |
| sFlt1 | | | | | | | |
| (soluble fms-like tyrosine kinase-1) | -0.017 | 0.060 | -0.026 | -0.275 | 0.784 | 0.308 | 3.243 |
| PLGF | | | | | | | |
| (placental growth factor) | 0.185 | 0.149 | 0.126 | 1.241 | 0.218 | 0.279 | 3.586 |
| GDF15 | | | | | | | |
| (growth/differentiation factor 15) | 0.000 | 0.001 | 0.040 | 0.313 | 0.755 | 0.174 | 5.747 |
| HGF | | | | | | | |
| (hepatocyte growth factor) | 0.001 | 0.001 | 0.140 | 1.454 | 0.149 | 0.308 | 3.251 |
| proBNP | | | | | | | |
| (pro brain natriuretic peptid) | -0.001 | 0.000 | -0.204 | -1.873 | 0.064 * | 0.243 | 4.118 |

We performed a ROC curve analysis to assess the cut-off value for VAP-1 in all 322 patients. The analysis demonstrated that a cut-off of 541 ng/mL of VAP-1 predicted histologically confirmed cirrhosis (in 92 patients) with a sensitivity of 74% and a specificity of 72% (Figure 2A). As for liver

stiffness, a cut-off value ≥ 12.5 kPa predicted cirrhosis with a sensitivity of 75% and a specificity of 73% (Figure 2B).

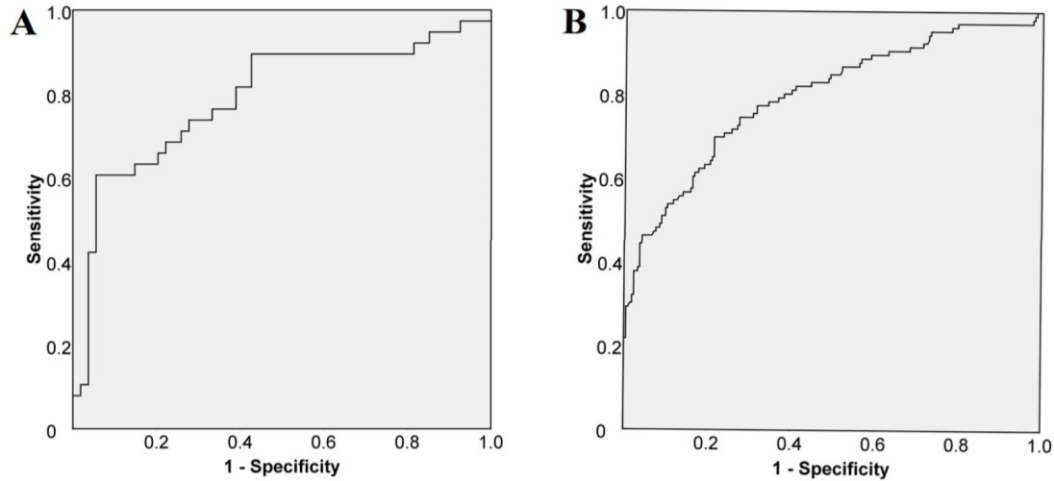


Figure 2. Receiver operating curve (A) to predict histologically confirmed cirrhosis ($N = 92$): sensitivity 74%; specificity 72%; area under the curve (AUC) 0.791, and (B) to predict liver stiffness cut-off for cirrhosis ($N = 322$): sensitivity 75%; specificity 73%; AUC 0.799.

The biopsy results indicated significantly higher VAP-1 concentrations in patients with cirrhosis ($N = 92$, no cirrhosis vs. cirrhosis with a $p < 0.0001$, Supplemental Figure S2). The classification of the patients in mild (45%), moderate (22%) and severe fibrosis (33%) based on liver stiffness showed that the VAP-1 concentration increased with fibrosis severity (Figure 3A). Both mild fibrosis in comparison to moderate fibrosis and moderate fibrosis in comparison to severe fibrosis or cirrhosis was differentiated according to the VAP-1 concentration ($p = 0.003$ and $p < 0.001$ respectively).

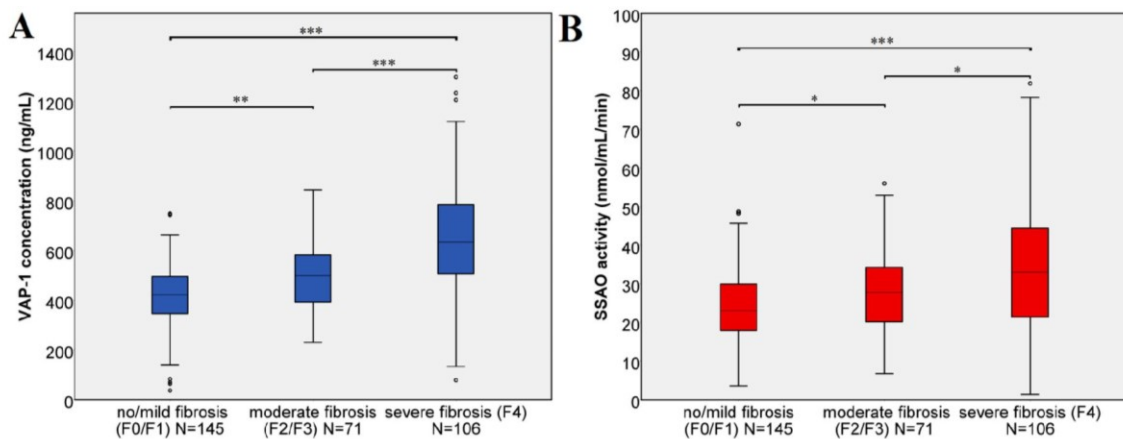


Figure 3. VAP-1 concentration and SSAO activity in mild, moderate and severe fibrosis. The classification is based on the liver stiffness. (A) VAP-1 concentration. According to Kruskal–Wallis test, there were significant differences between no/mild fibrosis vs. moderate fibrosis ($p = 0.002$ **), no/mild fibrosis vs. severe fibrosis ($p < 0.001$ ***), moderate fibrosis vs. severe fibrosis ($p < 0.001$ ***). (B) SSAO activity. According to Kruskal–Wallis test, there were significant differences between no/mild fibrosis vs. moderate fibrosis ($p = 0.023$ *), no/mild fibrosis vs. severe fibrosis ($p < 0.001$ ***), moderate fibrosis vs. severe fibrosis ($p = 0.028$ *).

In addition to its concentration, we measured the SSAO activity of VAP-1 in all patients. Although we observed a strong correlation with the VAP-1 concentration (Table 2) the SSAO activity of VAP-1 correlated only moderately with liver, APRI and Forns-index (Table 2). The SSAO activity of VAP-1

significantly increased in advanced fibrosis stage (F4) in comparison to no/mild fibrosis with a $p < 0.001$ as shown in Figure 3B. Significant differences were also observed between no/mild and moderate fibrosis ($p = 0.023$), as well as between moderate and severe fibrosis ($p = 0.028$).

In the investigated cohort, eight patients suffered from hepatocellular carcinoma (HCC). The VAP-1 concentration in these patients was higher than the VAP-1 concentration in patients with liver cirrhosis but without HCC, albeit this difference was not significant ($p > 0.05$).

4. Discussion

Varying concentrations of VAP-1 have been associated with CLDs indicating its possible role in the pathophysiology of these diseases. In a recent study, VAP-1 concentration was significantly higher in patients with NAFLD and NASH as compared to the patients with metabolic syndrome [5]. Based on these observations and others [18], VAP-1 was suggested as a potential therapeutic target in NAFLD, and possibly in other CLDs.

In our study on 322 chronic HCV infection patients, we show that the VAP-1 concentration, as well as the SSAO activity, were significantly elevated in patients with moderate or severe fibrosis especially in the presence of cirrhosis. Fibrosis stages were determined from the liver stiffness as measured by transient elastography.

A direct comparison of the VAP-1 values with the previously reported changes in NAFLD [5] is not appropriate, yet our study indicates a stronger correlation of the VAP-1 concentration with GOT, GPT, GGT, bilirubin, cholesterol, platelets and albumin as parameters of liver injury and liver function. Furthermore, in our study, the VAP-1 concentration showed higher correlation coefficients for the fibrosis stage in chronic hepatitis C infection than those reported for NAFLD and NASH. Notably, our cohort included proportionally many more cirrhosis patients. The strong association between VAP-1 concentration and other laboratory parameters is likely due to our larger study cohort, which included patients in different fibrosis stages. The previous study on NAFLD and NASH patients reported increased VAP-1 concentration in fibrosis stage $F \geq 2$ in comparison to F0/F1, whereas our study shows a stronger correlation with progressive fibrosis. The VAP-1 concentration significantly increased from mild to moderate and severe fibrosis. As the plasma VAP-1 concentration in CLDs is higher in hepatic veins than in portal veins, and furthermore, the membrane-bound VAP-1 concentration is elevated in hepatic stellate cells in increasing fibrosis [10], we assume that the affected liver parenchyma is the main source of the elevated plasma VAP-1 in chronic hepatitis C infection as well.

According to previous studies, VAP-1 supports leukocyte transmigration in the inflamed tissue and the deleterious effects of its SSAO activity lead to enhanced production of extracellular matrix proteins and increased oxidative stress. This process contributes to progressive fibrosis that ultimately leads to cirrhosis. Experimental studies showed a reduction of inflammation and fibrosis in VAP-1 deficient mice or in the presence of an SSAO inhibitor. We evaluated the SSAO activity in our cohort to assess its correlation with progressive fibrosis. However, in our study, the increase in SSAO activity was only moderate as compared to the increase in VAP-1 concentration. The SSAO activity correlated less with the markers of liver damage and did not allow an estimation of the progression of fibrosis. However, the difference between no/mild fibrosis vs. severe fibrosis/cirrhosis was highly significant. Possibly, the SSAO activity may no longer play a significant role when moderate and advanced fibrosis stages are reached.

In multivariate analysis, VAP-1 was an independent predictor of fibrosis stages and was the second strongest predicting variable after GGT. Our group has previously shown the predictive value of three serum markers, namely PLGF, HGF and GDF-15, for liver stiffness and fibrosis stages. Even when these parameters were included into the regression analysis, VAP-1 remained the second strongest independent predictor of fibrosis suggesting its major role in the disease progression.

The significantly increased VAP-1 levels in the presence of cirrhosis allowed us to define a cut-off value for cirrhosis. For cirrhosis, we calculated a cut-off of 541 ng/mL of VAP-1 based on the biopsy results of 92 patients and a cut-off from the liver stiffness of more than 12.5 kPa in all 322 patients.

These showed nearly the same predictive value. Furthermore, the non-invasive classification of the fibrosis progression into mild, moderate and severe fibrosis demonstrated that the VAP-1 concentration is also clearly elevated with moderate fibrosis. Presumably, VAP-1 levels continuously increase with sustained injury to the liver parenchyma. Thus, VAP-1 concentration may represent a non-invasive biomarker for progressive fibrosis and cirrhosis. Of note, in our study, we not only had liver stiffness measurements for all chronic HCV infection patients, but we also had liver biopsy results in more than a quarter of the cases. Additionally, we compared VAP-1 concentration and SSAO activity in all patients. On the other hand, we cannot exclude a selection bias, as not all participants of the original cohort with other CLDs could be included in our study. However, VAP-1 concentration differs between individual CLDs, thus further disease-specific studies are necessary. In future studies, more HCC patients should also be included to assess an increase of VAP-1 concentrations in patients who develop liver cancer.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first study on VAP-1 in chronic hepatitis C infection showing a direct association between VAP-1 plasma concentration and fibrosis severity. VAP-1 concentration increased with the severity of fibrosis and was significantly elevated in patients with cirrhosis. Although the SSAO activity of VAP-1 increased, the differences among the individual stages of fibrosis severity were only partly significant. Therefore, we conclude that VAP-1 concentration, rather than its SSAO activity, may represent a tool for monitoring fibrogenesis in the follow-up of patients with CLDs.

Supplementary Materials: The supplementary materials are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/1/103/s1>.

Author Contributions: Conceptualization: M.K. (Marcel Kraemer), M.K. (Marcin Krawczyk), J.G.S.; Methodology: M.K. (Marcel Kraemer), J.G.S.; Software: M.K. (Marcel Kraemer), J.G.S.; Validation: F.N., J.G.S.; Formal Analysis: M.K. (Marcel Kraemer), M.K. (Marcin Krawczyk), J.G.S.; Investigation: M.K. (Marcel Kraemer); Resources: F.G., F.L., J.G.S.; Data Curation: M.K. (Marcel Kraemer); Writing—Original Draft Preparation: M.K. (Marcel Kraemer), F.N., J.G.S.; Writing—Review and Editing: M.K. (Marcel Kraemer), F.N., M.K. (Marcin Krawczyk), F.L.; Visualization: M.K. (Marcel Kraemer), F.N.; Supervision: F.L., J.G.S.; Project Administration: J.G.S.; Funding Acquisition: F.G., F.L., J.G.S.

Funding: This research was funded by Fonds Nationale de la Recherche de Luxembourg (FNR), Core grant Itgb3VasIn. and Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Germany, LiSyM project 031L0051 to F.L.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Salmi, M.; Kalimo, K.; Jalkanen, S. Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. *J. Exp. Med.* **1993**, *178*, 2255–2260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Salmi, M.; Jalkanen, S. VAP-1: An adhesin and an enzyme. *Trends Immunol.* **2001**, *22*, 211–216. [[CrossRef](#)]
3. Smith, D.J.; Vainio, P.J. Targeting Vascular Adhesion Protein-1 to Treat Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1110*, 382–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lalor, P.F.; Sun, P.J.; Weston, C.J.; Martin-Santos, A.; Wakelam, M.J.; Adams, D.H. Activation of vascular adhesion protein-1 on liver endothelium results in an NF-kappaB-dependent increase in lymphocyte adhesion. *Hepatology* **2007**, *45*, 465–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Weston, C.J.; Shepherd, E.L.; Claridge, L.C.; Rantakari, P.; Curbishley, S.M.; Tomlinson, J.W.; Hubscher, S.G.; Reynolds, G.M.; Aalto, K.; Anstee, Q.M.; et al. Vascular adhesion protein-1 promotes liver inflammation and drives hepatic fibrosis. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 501–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kurkijärvi, R.; Adams, D.H.; Leino, R.; Möttönen, T.; Jalkanen, S.; Salmi, M. Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): Increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 1549–1557. [[PubMed](#)]

7. Aalto, K.; Maksimow, M.; Juonala, M.; Viikari, J.; Jula, A.; Kähönen, M.; Jalkanen, S.; Raitakari, O.T.; Salmi, M. Soluble vascular adhesion protein-1 correlates with cardiovascular risk factors and early atherosclerotic manifestations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 523–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lin, M.S.; Li, H.Y.; Wei, J.N.; Lin, C.H.; Smith, D.J.; Vainio, J.; Shih, S.R.; Chen, Y.H.; Lin, L.C.; Kao, H.L.; et al. Serum vascular adhesion protein-1 is higher in subjects with early stages of chronic kidney disease. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 1362–1367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Boomsma, F.; Van den Meiracker, A.H.; Winkel, S.; Aanstoot, H.J.; Batstra, M.R.; Man, A.J.; Bruining, G.J. Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in type I (insulin-dependent), in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis. *Diabetologia* **1999**, *42*, 233–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. McNab, G.; Reeves, J.L.; Salmi, M.; Hubscher, S.; Jalkanen, S.; Adams, D.H. Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium. *Gastroenterology* **1996**, *110*, 522–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kurkijärvi, R.; Yegutkin, G.G.; Gunson, B.K.; Jalkanen, S.; Salmi, M.; Adams, D.H. Circulating soluble vascular adhesion protein 1 accounts for the increased serum monoamine oxidase activity in chronic liver disease. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 1096–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. World Health Organization. *Global Hepatitis Report 2017*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017.
13. Krawczyk, M.; Grünhage, F.; Zimmer, V.; Lammert, F. Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: Non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 299–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Castéra, L.; Vergniol, J.; Foucher, J.; Le Bail, B.; Chanteloup, E.; Haaser, M.; Darriet, M.; Couzigou, P.; De Lédinghen, V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **2005**, *128*, 343–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Menghini, G. One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology* **1958**, *35*, 190–199. [[PubMed](#)]
16. Desmet, V.J.; Gerber, M.; Hoofnagle, J.H.; Manns, M.; Scheuer, P.J. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* **1994**, *19*, 1513–1520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Krawczyk, M.; Zimmermann, S.; Hess, G.; Holz, R.; Dauer, M.; Raedle, J.; Lammert, F.; Grünhage, F. Panel of three novel serum markers predicts liver stiffness and fibrosis stages in patients with chronic liver disease. *PLoS ONE* **2017**, *16*, e0173506.
18. Lalor, P.F.; Tuncer, C.; Weston, C.; Martin-Santos, A.; Smith, D.J.; Adams, D.H. Vascular adhesion protein-1 as a potential therapeutic target in liver disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1110*, 485–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.