

**A HDL FUNKCIÓ ÉS SZERKEZET VÁLTOZÁSAI
LIPIDCSÖKKENTŐ KEZELÉS ÉS EGYES GENETIKAI
TÉNYEZŐK HATÁSÁRA HYPERLIPIDAEMIÁS BETEGEKBEN**

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

DR. HARANGI MARIANN



DEBRECENI EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BELGYÓGYÁSZATI INTÉZET
ANYAGCSERE BETEGSÉGEK TANSZÉK
DEBRECEN, 2020

BEVEZETÉS

A lipidanyagcsere zavarainak jelentősége az érlelmeszesedés kialakulásában

A kardiovaszkuláris megbetegedések napjainkban is a legfontosabb halálokok között szerepelnek hazánkban és világszerte, egyaránt. A kórképek kialakulásának hátterében legtöbbször az érlelmeszesedés kialakulása áll, mely egy, az artériák falát érintő, évtizedekig tartó, komplex gyulladásos folyamat, melyben számos kóroki tényező játszik szerepet. Az érlelmeszesedés egyik legfontosabb kockázati tényezője a kóros lipidanyagcsere, melynek részeként az egyes lipoprotein komponensek mennyiségében és minőségében/funkciójában jelentős változások mutathatók ki. Az érlelmeszesedés szempontjából a legnagyobb súlyú lipid kockázati tényező a low-density lipoprotein koleszterin (LDL-C) széróm szintjének emelkedése, de az összkoleszterin szint, az apolipoprotein B (ApoB), a lipoprotein (a) (Lp(a)) és az ún. non-HDL koleszterin szintjének emelkedése szintén növeli a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásának esélyét. A high-density lipoprotein (HDL) részecske ezzel szemben védő hatású az érlelmeszesedés kialakulása szempontjából, és a HDL-koleszterin (HDL-C) alacsony szintje szintén hajlamosíthat szív- és érrendszeri betegségek kialakulására. Az egyes lipoprotein komponensek heterogének, mivel az ezeket alkotó lipoprotein részecskék méretükben, töltésükben, lipid- és fehérje összetételükben jelentős különbségeket mutathatnak. Az utóbbi évtizedek kutatási eredményei rávilágítottak arra, hogy az egyes lipoprotein komponensek minőségi változásai, melyek érinthetik a lipoprotein részecskék lipid és fehérje komponenseit, és a lipoproteinhez asszociált enzimek működését, legalább akkora jelentőséggel bírhatnak, mint a mennyiségi eltérések.

A HDL szint és funkció jelentősége az érlelmeszesedés kialakulásának gátlásában

Talán a HDL esetében a leginkább nyilvánvaló, hogy a megfelelő széróm szint nem jelent megfelelő funkciót is egyben. A HDL-lel kapcsolatos kutatások sokáig csak a HDL-C szintre fókuszáltak, és csak az utóbbi évtizedekben igazolódott a funkcionális eltérések jelentősége az érlelmeszesedés kialakulásában. A Framingham Heart Study bizonyította első alkalommal, hogy a HDL-C szint és a szív- és a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulása között negatív korreláció mutatható ki. Ezt később több tanulmány és metaanalízis is alátámasztotta. Mégis, a HDL-C szint emelését célzó kezelések alkalmazásával sokáig nem sikerült csökkenteni a kardiovaszkuláris események kialakulásának esélyét. Mindez arra utal, hogy a HDL-C mérése önmagában nem elegendő, és a HDL-C emelése sem jelent feltétlenül védelmet az érlelmeszesedés

és a kardiovaszkuláris események kialakulásával szemben. Ezért az utóbbi évtizedekben intenzív kutatások zajlottak a HDL funkciójának, összetételének és szerkezetének vizsgálata terén. Minél többet tudunk a HDL részecskét alkotó vagy annak felszínéhez kapcsolódó fehérje és nem fehérje természetű molekulákról, annál nyilvánvalóbbá válik, hogy a HDL kulcsszereplő az egyéb lipoproteinek metabolizmusa mellett a gyulladásos, véralvadási és autoimmun folyamatok szabályozásában is. Ennek köszönhető komplex gátló hatása magára az érlelmeszesedésre, mely szintén multifaktoriális: a gyulladás mellett oxidatív, infekatív és immunfolyamatok együttes hatásaként alakul ki.

A HDL részecske egyik legismertebb szerepe az ún. reverz koleszterin transzportban való részvétele, melynek során a HDL részecske a perifériás sejtekből koleszterint juttat vissza a májba. A folyamat első lépéseként a vékonybél által termelt lipidszegény apolipoprotein A1 (ApoA1) a plazma membránból származó foszfolipidekkel és nem-észterifikált koleszterinnel diszkoid alakú naszcens pre-béta HDL1-et képez. A perifériás sejtekből (makrofágok, májsejtek, enterociták) az ApoA1 segítségével az ATP-kötő kazetta protein A1 (ABCA1) transzporterén keresztül a HDL részecske koleszterint vesz fel, mely nagyobb koleszterin tartalmú pre-béta HDL2-vé alakul. A főként ApoA1 által aktivált lecitin koleszterin aciltranszferáz (LCAT) enzim hatására koleszterin tartalma koleszterin-észterré alakul, és fokozatos gömb alakú HDL3-má alakul át, melyhez további apolipoproteinek és egyéb enzimfehérjék kapcsolódnak. Az LCAT hatására a méretben és koleszterin-észter tartalomban nagyobb HDL2a-vá alakul át. A HDL2a részecske a koleszterin-észter tartalmát a koleszterin-észter transzfer protein (CETP) segítségével egyéb lipoprotein, például VLDL részecskéikkel trigliceridre cseréli. A HDL további éréséhez hozzájárul még a foszfolipid transzfer fehérje (PLTP), mely egyéb lipoproteinekről foszfolipideket szállít a HDL-re, és a hepatikus lipáz (HL), mely triglicerid és a foszfolipidek hidrolíziséért felel. Mindezen folyamatok hatására kialakul a HDL2b, mely felvételre kerül a májba. Koleszterin tartalma részben újra felhasználásra kerül, részben epesavakká bomlik, és az epével kiválasztódik, és egy része a széklettel távozik, másik része a bélhámsejtek felszínén található Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) receptorokon keresztül visszaszívódik. A máj által fel nem vett, lipidmentes vagy lipidszegény ApoA1 egy része a vesében a proximális tubulusokban a cubulin és megalin receptorokon felvételre kerül és filtrálódik.

Az érlelmeszesedés kialakulása szempontjából az egyik leglényegesebb kezdeti lépés az LDL részecskék reaktív oxigén gyökök általi oxidációja, mivel az oxidált LDL

(oxLDL) az endothel sejtek aktivációját, azok felszínén adhéziós molekulák megjelenését, az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1), a vaszkuláris adhéziós molekula-1 (VCAM-1) és az E-szelektin expresszióját, valamint a makrofágok és leukocyták esetén a gyulladásos citokinek termelését váltja ki. Az érfali intimába jutva az oxLDL-t a makrofágok scavenger receptorai veszik fel, melynek hatására a makrofág habos sejté alakul át. Az LDL oxidációja valójában több párhuzamos oxidációs lépés együttesének hatására jön létre, de elsősorban az apolipoprotein B oxidatív károsodása figyelhető meg. Az oxidáció-specifikus epitópokat a C-reaktív fehérje felismeri, és a kötődést követően komplement aktivációt és a természetes immunválasz részeként IgM típusú antitestek termelődését váltja ki. Ezen anti-oxLDL antitestek megjelenésének jelentősége azonban nem minden tekintetben tisztázott. Az oxidációs folyamatok gátlása mindemellett kulcsfontosságú az érlemezés kialakulásának gátlásában.

A HDL részecske antioxidáns hatással rendelkezik, melyért elsősorban a HDL-hez kötött fehérjék: maga az ApoA1, valamint enzimek: a humán paraoxonáz-1 (PON1), a platelet activitin- (PAFAH) felelnek. A PON1 egy túlnyomóan HDL-hez kötött, kalcium függő észteráz, melyet főként a máj termel. A PON1-et a HDL szubfrakciókon belül főként a kicsi, denz HDL3 szubfrakció tartalmazza. Fiziológiás szubsztátja a mai napig nem tisztázott. Az aktivitás mérésére használt paraoxon organofoszfátról kapta ugyan a nevét, és az enzimaktivitás mérésére máig ez a leggyakrabban alkalmazott szubsztát, az enzim arileszteráz aktivitással és laktonáz aktivitással is rendelkezik. A legelterjedtebb nézet szerint az eredeti szerepe éppen a laktonáz aktivitás, mely bakteriális virulencia faktorok neutralizációjához szükséges, ezáltal a természetes immunitás részét képezi. A PON1 aktivitást egyes génpolimorfizmusok jelentősen befolyásolhatják. Ezek közül a legfontosabb a Gln₁₉₂->Arg (Q192R), melynek hatása szubsztátfüggő. A 192-es pozícióban a glutamin (Q alloenzim) gyorsabban hidrolizálja a diazoxont, a sarint és egyéb ideggázokat, míg az arginin jelenléte (R alloenzim) nagyobb affinitást mutat a paraoxon és a feniroxon iránt, ugyanakkor a fenilacetát mindkét alloenzim hasonló sebességgel bontja. Ezért a 192-es pozícióban a gluamin alacsony paraoxonáz aktivitást, míg az arginin magas, átlagosan nyolcszor nagyobb paraoxonáz aktivitást eredményez. A polimorfizmus szubsztátfüggő tulajdonsága teszi lehetővé a fenotípus meghatározást a paraoxonáz és arileszteráz aktivitásának hányadosát alkalmazva (kettős szubsztát módszer). A PON1 az oxidált foszfolipidek hidrolízisén keresztül képes gátolni az LDL részecske oxidációját, valamint fokozza a monociták és makrofágok szabadgyökök elleni védekezőképességét és elősegíti a makrofágok általi ABCA1-mediált reverz koleszterin transzportot. A PON1 emellett

csökkenti a monociták érfali kemotaxisát és gátolja a monocita-makrofág érést. A PON1 tehát számos ponton képes gátolni az érlelmeszesedés kialakulását. A PON1 aktivitás csökkent számos olyan körképben, melyben fokozott a kockázat az érlelmeszesedés kialakulására, például krónikus vesebetegségben és hyperlipidaemiában, 1-es és 2-es típusú diabetes mellitusban és elhízottakban. A csökkent PON1 aktivitás prospektív vizsgálatokban a kardiovaszkuláris megbetegedések egyértelmű kockázati tényezőjének bizonyult.

A mieloperoxidáz (MPO) egy monociták és neutrofil sejtek által termelt hemfehérje, mely a sejtek azurofil granulumaiban tárolódik. A sejtek aktivációja során az enzim reaktív oxigén gyököket termel, melyek baktericid hatásuk mellett fehérje-, lipid- és DNS-károsító hatást fejtenek ki. A szabad gyökök a szervezetben részben endogén módon (enzimatis és nem enzimatis folyamatok révén), részben exogén úton, külső ágensek (pld. ionizáló sugárzás) hatására keletkeznek. Ide tartozik a szuperoxid anion ($O_2^{\bullet-}$) és a hidroxilgyök ($\bullet OH$). A szabadgyökök keletkezése fontos a kórokozók elleni védelemben és egyes jelátviteli folyamatokban. Az oxidatív és antioxidáns folyamatok egyensúlyának felbomlása, és a túlzott szabadgyökök termelés azonban káros lehet. A szabad gyökök szerepe az érlelmeszesedés kialakulásában kiemelt, mivel az LDL oxidatív károsodása az atherogenezis első lépéseinek egyike. Az LDL zsírsavtartalmának jelentős részét alkotják a többszörösen telített zsírsavak, például az arachidonsav és a linolénsav, melyek peroxidációra hajlamosak. A lipid peroxidációja során a lipidek szabadgyökök, pld. $\bullet OH$ hidrogén-elvonással lipid szabadgyökké alakulnak (iniciáció), melyek az oxigénnel reakcióba lépve lipid peroxigyökké alakulnak. Ez a szomszédos oldalláncról hidrogént von el, melynek során lipid-hidroperoxid képződik (propagáció). A láncreakciót az antioxidáns rendszer aktivációja zárja le (termináció). A lipid-hidroperoxid lebontása során számos káros végtermék, köztük malonaldehid (MDA), 4-hidroxi alkánok és 2-alkének keletkeznek, melyek melyek DNS fragmentációt, DNS keresztkötések és adduktok kialakulását okozhatják, ezáltal mutagének. A szabad gyökök okozta oxidatív károsodás elleni védelemben szerepet játszanak a lipoprotein részecskékhez kötött antioxidáns vitaminok és egyéb molekulák, például az alfa-tokoferol, a karotinoidok és az ubiquinol, valamint a glutation és redox rendszere, a szuperoxid dizmutáz és a kataláz. Az összefoglaló néven E vitaminnak nevezett tokoferolok és tokotrienolok a leghatékonyabb exogén antioxidáns molekulák közé sorolhatók. Az összesen nyolc lipofil molekula a metilációs mintázat alapján α , β , γ és δ elnevezést kapott. Az emberi szervezetben legnagyobb mennyiségben az α -tokoferol fordul elő, melynek fő forrását a növényi olajok jelentik. Számos biológiai folyamatban, többek között a lipid homeosztázisban,

a gyulladásos folyamatokban, a sejtproliferáció és apoptózis folyamatában bizonyították a jelentőségét, de a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában betöltött szerepe vitatott. Az E vitamin a szabad gyökök, valamint a lipid peroxidok redukcióján keresztül hozzájárulhat az oxidált LDL kialakulásának gátlásához, így anti-atherogén hatást fejt ki. Az E vitamin antioxidáns hatékonysága nem kétséges, ezért annak ellenére, hogy a klinikai vizsgálatok még nem támasztották alá megfelelő módon a hatékonyságát, az érlemezésedés gátlásában betöltött szerepe továbbra is kutatások tárgyát képezi.

A HDL-hez kötött enzimek közül a szabad gyökök fő forrását az MPO jelenti. MPO enzim baktériumölő hatása a veseszületett immunitás részét képezi, és gátolja az adaptív T sejt-mediált immunválaszt. Ugyanakkor az LDL oxidáció révén fokozza a habos sejtek képződését. Az MPO az ApoA1 oxidatív módosítására is képes, melynek következtében károsodik az ABCA1-mediált reverz koleszterin transzport, és csökken a HDL anti-inflammatorikus és anti-apoptotikus hatékonysága. Az MPO tehát proatherogén, emelkedett szintje és a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázata közötti összefüggés ismert. Igazolódott, hogy a PON1 és az MPO a HDL partikulum felszínén egymás közvetlen közelében helyezkedik el, hármas komplexet alkotva az ApoA1 fehérjével. A PON1 és az MPO egymás aktivitását kölcsönösen gátolja. A két enzim hányadosa a HDL funkció egyik markere és a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatának prediktora.

Egy másik enzim, a mátrix metalloproteáz-9 (MMP-9) is képes komplexet képezni a HDL részecskével, különösen a HDL2-vel, a HDL funkciójának károsodását idézve elő. A MMP-9 a cink-függő endopeptidázok közé tartozik. A metalloproteázok az extracelluláris mátrix lebontásán keresztül hozzájárulnak a plakk stabilitásának csökkentéséhez, ezáltal annak megrepedéséhez, így a kardiovaszkuláris események kialakulásához. A metalloproteáz szöveti gátlók (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) a metalloproteázokhoz kapcsolódva azok aktivitását képesek szabályozni. Kardiovaszkuláris betegségekben emelkedett TIMP-1 szinteket találtak korábbi vizsgálatok. Az irodalmi adatok alapján a magas TIMP-1 a fokozott MMP aktivitásra adott kompenzatorikus válasz részeként alakulhat ki.

A HDL emellett képes gátolni az endothel sejtek felszínén az adhéziós molekulák, köztük a VCAM-1 és az ICAM-1 expresszióját és az érfa makrofágok kemotaktikus faktor-1 termelését, ezáltal csökkenti a neutrofil granulocyták érfa bejutását. Fokozza az endothel sejtek nitrogén-monoxid (NO) termelését a NO szintetáz (NOS) aktivitás emelésén keresztül.

A HDL az egyéb lipoprotein frakciókhoz hasonlóan igen heterogén. A HDL részecskék méretük, sűrűségük, összetételük és töltésük alapján szubfrakciókra oszthatóak. A Lipoprint módszer egy csöves gélelektroforézis, mellyel méretük alapján összesen tíz szubfrakció különíthető el három alcsoportba: nagy, közepes és kis HDL szubfrakcióra osztva. Mivel a szubfrakciók eltérő fehérje és lipidösszetételük miatt eltérő funkcióval rendelkeznek, a mennyiségükben és arányukban bekövetkező változások azonos HDL-C szint mellett is klinikai szempontból jelentős változások kialakulásához vezethetnek. A HDL3-hoz például számos antioxidáns hatású, enzimatis és nem enzimatis molekula kötődik. Az előbbire példa a már bemutatott PON1, utóbbira az E vitaminok (tokoferolok), melyek szabadgyök kötő képességüknel fogva gátolják az LDL oxidatív módosulását. A tokoferolok kötése képes afamin szintén a HDL3 szubfrakción található meg. A HDL szubfrakciók meghatározásának jelentősége a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában és kezelésében a mai napig kevés vizsgált és igen vitatott terület. Mivel a korábbi vizsgálatok során eltérő számú és jellegű betegpopulációkon, eltérő módszerekkel végeztek HDL szubfrakció meghatározásokat, a kapott eredmények nehezen összevethetőek. Mégis, elfogadott az a nézet, mely szerint a nagyobb méretű HDL szubfrakciók jelentenek nagyobb védelmet az érlemezsedés kialakulásával szemben.

Hormonhatású bioaktív fehérjék hatása a HDL és a HDL szubfrakciók szintjére

Az utóbbi néhány évtized kutatásai alapján egyértelművé vált, hogy a zsírszövet nem csupán az energia raktározására szolgál, hanem a gyulladásos, immun- és anyagcsere folyamatokban is aktívan rész vesz bioaktív molekulák termelésének egész során keresztül, melyeket adipokineknek nevezünk. A HDL metabolizmust és funkciót befolyásolhatják a zsírszövet által termelt adipokinek is. Ezek közül korábban a leptin, adiponektin és rezisztin, nemrégiben a chemerin HDL funkcióra és szerkezetre gyakorolt hatása igazolódott. A chemerin főként a májban és a fehér zsírszövetben termelődik, helyben szabályozza a zsírszöveti érést, az adipociták működését, az immunsejtek aktivációját és vándorlását, és a kerigésbe jutva szisztémás hatást is kifejt. Munkacsoportunk igazolta, hogy metabolikusan egészséges, elhízott betegekben a chemerin szintje szoros pozitív korrelációt mutat kis és közepes HDL szubfrakciókkal, míg szignifikáns negatív korrelációt találtunk a nagy HDL szubfrakciókkal és a HDL-C szintekkel, mely felveti a chemerin HDL anyagcseréjében játszott szerepét. A chemerin szint lipidanyagcserével való összefüggését azóta más munkacsoportok is igazolták. Emellett a szérumban chemerin szintje összefügg a koszorúér betegség előfordulási gyakoriságával, és az koszorúér meszesedés súlyosságával.

A lipidcsökkentő kezelések jelentősége

A szervezet koleszterin ellátottságát alapvetően két folyamat határozza meg: a sejtekben, főként a májban történő *de novo* koleszterin szintézis, valamint a táplálékból és a tápcsatornába jutott epéből történő koleszterin felszívódása a vékonybél felső szakaszán. A két folyamat egyensúlyát számos tényező, köztük genetikai eltérések, napszaki ritmus, testsúly, az elfogyasztott táplálék, a fizikai aktivitás, és természetesen a lipidcsökkentő kezelés befolyásolhatja. A szérum koleszterinszint csökkentése az életmód terápia hatástalansága esetén gyógyszeres koleszterincsökkentő kezeléssel érhető el. Ennek alapját a nemzetközi és hazai ajánlások alapján a statinok képezik, melyek nem kellő hatékonysága vagy intoleranciája esetén ezetimib, fibrát, omega-3 zsírsav készítmények, illetve proprotein konvertáz-szubtilizin/kexin-9 (PCSK9) gátló szerek alkalmazhatóak. Amennyiben a gyógyszeres kezeléssel sem érhetők el a javasolt lipid célértékek, extrakorporális eljárások: súlyos hipertrigliceridémiában a plazmaferezis, súlyos heterozigóta vagy homozigóta FH esetén a szelektív LDL aferezis kezelés nyújthat megoldást.

Statinok

A statinok a mai napig a lipidcsökkentő gyógyszeres kezelés legfontosabb eszközei. Ez főként a lipidcsökkentő hatékonyságuknak, másrészt a nem-lipid hatások okozta járulékos (például gyulladást és oxidatív stresszt csökkentő, az immunrendszer és a véralvadási kaskád működését befolyásoló) hatásaiknak köszönhető. Primer és szekunder prevenciós tanulmányok egész sora igazolja kedvező hatásukat betegek százazezrei esetén. A statinok a májsejtekben a koleszterin szintézis kulcsenzimét, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A reduktazt gátolva egyrészt az LDL prekursorának, a very-low-density lipoproteinnek (VLDL) a szintézisét gátolják, másrészt növelik az LDL receptor expressziót a májsejtek felszínén. Bár gyakran homogén csoportként tekintünk rájuk, számos szempontból, például lipidcsökkentő hatékonyságuk és nem-lipid hatásaik tekintetében is különbözőek. Az LDL-C csökkentő hatásukat tekintve leghatékonyabb a rosuvastatin és az atorvastatin, melyet a simvastatin követ. Az összes statin készítmény rendelkezik trigliceridszint csökkentő hatással is, HDL-C emelő hatásuk azonban nem kifejezett. A statinok a koleszterin szintézisének csökkentése mellett a mevalonát útvonal gátlásán keresztül számos olyan egyéb metabolit keletkezését módosítják, melyek jelentős biológia szereppel rendelkeznek. Mindez magyarázhatja a statinok kedvező hatását az érelmeszesedés mellett az egyéb gyulladásos folyamatokra, a daganatok kialakulására és áttét képződésére, valamint az idegrendszer és az immunrendszer működésére. Egyes statin készítmények, például az

atorvastatin és annak metabolitjai direkt antioxidáns hatással is rendelkeznek. Bár e nem-lipid, másnéven pleiotróp hatások létét manapság nem vitatják, ezek klinikai jelentőségéről megoszlanak a vélemények.

Ezetimib

A NPC1L1 kulcsszerepet játszik a koleszterin és néhány zsírolédékony vitamin anyagcseréjében. Az extracelluláris N-terminális doménje képes a koleszterin megkötésére. A NPC1L1 csaknem kizárólag a jejunum proximális szakaszának hámsejtjeiben termelődik. Simvastatinnal kombinálva az ezetimib 44-57%-os, míg atorvastatinnal kombinálva még jelentősebb, akár 50-60%-os LDL-C csökkenést eredményez. Statin intolerancia esetén az ezetimib monoterápiában is alkalmazható, 18-20%-os LDL-C csökkentő hatékonysággal. Az ezetimib a statinokhoz hasonlóan rendelkezik nem-lipid hatásokkal, egyebek között anti-oxidáns, anti-inflammatorikus és simaizomsejt proliferációt gátló hatásáról is beszámoltak.

Szelektív LDL aferezis kezelés

A szelektív LDL aferezis egy extrakorporális eljárás, amely szignifikánsan csökkenti az ApoB tartalmú lipoprotein részecskécsket, vagyis az LDL-koleszterin, az Lp(a) és a VLDL (very low density lipoprotein) szintet. Jelenleg homozigóta familiáris hypercholesterinaemiás (FH) és olyan heterozigóta FH betegek kezelésére alkalmazzák, akik nem reagálnak megfelelően a maximálisan tolerálható gyógyszeres lipidsökkentő terápiára vagy statin intoleránsak. A szelektív eljárások a technikai megoldástól függetlenül az LDL-C szintek körülbelül átlagosan 60%-os csökkenését eredményezik. A LDL hemoperfúziós módszert (direct adsorption of lipoproteins – DALI, Fresenius, Germany) lényege, hogy a perifériás vénás teljes vért egy speciális adszorber oszlopon pumpálják át, amely apró, negatív töltésű polianionokat tartalmazó poliakrilát gyöngyökből álló mátrixból áll. A polianionok kölcsönhatásba lépnek az LDL és a Lp(a) ApoB molekuláris részének pozitív töltésű kationos csoportjaival, melyek a gyöngyökon kikötődnek. A kezelés során, az adszorberen átjutott, az ApoB tartalmú lipoproteinekben szegény vér visszakerül a betegbe, így sem az alakos elemek, sem a plazma komponensek pótlására nincs szükség. A DALI rendszer előnyei a jó szelektivitás, nagy hatékonyság, jó tolerálhatóság és egyszerű technológia.

A lipidanyagcserét és a lipidsökkentő kezelés hatékonyságát befolyásoló genetikai tényezők jelentősége

Apolipoprotein E polimorfizmus

A humán ApoE egy 35 kDa méretű glikoprotein, melynek génje a 19-es kromoszómán található. A gyakori génpolimorfizmus alapján három különböző allél: az $\epsilon 2$, az $\epsilon 3$ és az $\epsilon 4$ különböztethető meg, melyek az E2, E3 és E4 típusú fehérjéket kódolják. Ennek következtében három homozigóta (E2/2, E3/3 és E4/4), valamint három heterozigóta (E2/3, E2/4 és E3/4) fenotípus fordulhat elő az átlag populációban. A három allél által kódolt fehérje számos tulajdonságát tekintve eltér egymástól, ezek közül a leglényegesebb az LDL receptorához történő különböző affinitásuk. Korábbi vizsgálatok alapján a plazma koleszterin szint nagyjából 60%-át genetikai tényezők határozzák meg, ezen belül körülbelül 14%-ért felelős az ApoE polimorfizmus. Számos vizsgálat igazolta, hogy az ApoE polimorfizmus jelentős hatást gyakorol az LDL-C és az ApoB szintjére is. A vad típusnak tartott E3/3 fenotípushoz képest az $\epsilon 4$ hordozók kb. 5-7%-kal magasabb, míg az $\epsilon 2$ hordozók ugyanennyivel alacsonyabb LDL-C szinttel rendelkeznek. Számos korábbi vizsgálat igazolta, hogy az ApoE genetikai variációi befolyásolják a statin kezelés hatékonyságát. Egyetlen korábbi vizsgálat során értékelték a statin mellett alkalmazott ezetimib lipidcsökkentő hatékonyság és az ApoE polimorfizmus kapcsolatát, melynek során az ezetimib kezelés szignifikáns hatást fejtett ki minden vizsgált lipid paraméterre, függetlenül az ApoE genotípustól. Az ezetimib monoterápia és az ApoE genotípus kapcsolatát azonban korábban nem vizsgálták.

Niemann –Pick C1-Like 1 polimorfizmus

Hasonlóan számos egyéb transzporter fehérjéhez, a NPC1L1 működését is jelentősen befolyásolhatják genetikai tényezők, ezen belül a funkciómódosulással járó mutációk és polimorfizmusok. A NPC1L1 gén funkcióvesztő mutációi alacsonyabb szérumszintű LDL-C szinttel és jelentősen csökkent kardiovaszkuláris kockázattal járnak. Emellett a NPC1L1 génje esetén jelentős számban írtak le egy nukleotid eltérést okozó polimorfizmusokat, melyek hatást gyakorolnak a szterolok, így a koleszterin felszívódás mértékére, mely ennek hatására módosítja a szérumszintű LDL-C koncentrációját is. Korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy a c.-133A>G polimorfizmus szignifikáns mértékben befolyásolja a NPC1L1 promóter aktivitását, ugyanakkor ennek gyakorlati jelentősége a lipidcsökkentő kezelés során nem volt tisztázott.

CÉLKITŰZÉSEK

Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiában szenvedő betegekben:

1. A PON1 aktivitás és az artéria carotis intima média vastagság összefüggésének vizsgálatát.
2. A PON1, a MPO és az MMP-9 enzimek működése közötti összefüggések vizsgálatát vaszkuláris megbetegedésben szenvedő és nem szenvedő, lipidcsökkentő kezelésben nem részesülő betegekben.
3. A PON1, a MPO és ismert vaszkuláris biomarkerek közötti összefüggések vizsgálatát vaszkuláris megbetegedésben szenvedő és nem szenvedő, lipidcsökkentő kezelésben nem részesülő betegekben.
4. A PON1, a MPO és a HDL szubfrakciók közötti összefüggések vizsgálatát vaszkuláris megbetegedésben szenvedő és nem szenvedő, lipidcsökkentő kezelésben nem részesülő betegekben.
5. Az atorvastatin kezelés hatásának vizsgálatát a PON1 aktivitásra és a Comet assay-vel detektált oxidatív DNS-károsodásra.
6. Az atorvastatin kezelés hatásának vizsgálatát a HDL szubfrakciókra és a HDL-hez kötött enzimek (PON1, CETP és LCAT) aktivitására, ill. szintjére.
7. Az ApoE génpolimorfizmus ezetimib monoterápia hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálatát statin intoleráns betegekben.
8. A NPC1L1 gén c.-133A>G promóter polimorfizmusának ezetimib monoterápia hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálatát statin intoleráns betegekben.
Súlyos familiáris hypercholesterinaemiában szenvedő betegekben:
9. A szelektív LDL aferezis kezelés hatásnak vizsgálatát a szérum chemerin szintekre.
10. A szelektív LDL aferezis kezelés hatásnak vizsgálatát a szérum afamin és E vitamin szintekre.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegek kiválasztása

Az 55 év alatti carotis szűkületheben szenvedő betegek és kontrollok beválasztása

A betegek a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikájának Neuroszonológiai Laboratóriumából kerültek bevonásra. Olyan 55 év alatti betegeket választottunk be, akiknek legalább 30%-os arteria carotis interna szűkülete vagy elzáródása volt a bevonáskor. Korban és nemben illesztett kontroll csoportként olyan betegeket vontunk be, akiknél az ultrahang vizsgálat során arteria carotis plakk vagy szűkület nem igazolódott. Kizártuk a fertőzőes, malignus vagy autoimmun betegségben szenvedő betegeket, valamint azokat, akiknél a bevonást megelőző hat hónaban stroke zajlott vagy műtét történt. A betegek tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte.

Túlsúlyos és elhízott, lipidcsökkentővel nem kezelt betegek kiválasztása

Százhatvanhét túlsúlyos, felnőtt, kaukázusi, Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiás beteget vontunk be a vizsgálatba a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Lipid Szakrendelésének betegei közül. A túlsúlyos betegeket a BMI alapján definiáltuk ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$). Minden beteg esetében végeztünk fizikális vizsgálatot és készült carotis ultrahang. Kiegészítő képalkotó vizsgálat a beteg panaszai alapján, illetve a normálistól eltérő fizikális, illetve elektrokardiográfia (EKG) vizsgálat esetén történt (alsóvégtagi artériás Doppler ultrahang, szívultrahang vagy komputer tomográfia). Minden betegnél felmértük a magasvérnyomás, a 2-es típusú cukorbetegség és a dohányzás fennállását. Magasvérnyomást a vérnyomáscsökkentő gyógyszerek szedése, $\geq 140 \text{ Hgmm}$ szisztolés vagy ≥ 90 feletti diasztolés vérnyomás esetén diagnosztizáltunk. 2-es típusú cukorbetegséget a rendszeres vércukorszint-csökkentő gyógyszer szedése, illetve inzulin rendszeres alkalmazása vagy $\geq 7 \text{ mmol/L}$ éhomi vércukor-szint esetén állapítottunk meg. A dohányzást korábbi (az elmúlt 10 évben legalább fél évig tartó) vagy jelenlegi rendszeres dohányzás alapján határoztuk meg. A betegeket két, nemben illesztett alcsoportra osztottuk a meglévő, illetve jelen nem lévő vaszkuláris szövődmények alapján (vaszkuláris szövődménnyel rendelkező [VSZ] és vaszkuláris szövődménnyel nem rendelkező betegek [NVSZ]). A vaszkuláris szövődményeket ismert iszkémiás szívbetegség (miokardiális infarktus vagy koronária szklerózis), iszkémiás cerebrovaszkuláris betegség (iszkémiás agyi infarktus, tranzienis iszkémiás attack vagy az arteria carotis sztenóza/elzáródása), illetve perifériás artériás betegség esetén diagnosztizáltuk. A vaszkuláris szövődményeket a beteg kórelőzménye

vagy a képkotó eljárások eredményei alapján határoztuk meg. Kizárásra kerültek azok a betegek, akik a bevonás előtt legalább 6 héttel vagy a bevonáskor lipidcsökkentő gyógyszert szedtek, autoimmun betegségben, krónikus gyulladásos kórképben, aktív máj vagy endokrin betegségben, 1-es típusú cukorbetegségben, tumoros alapbetegségben vagy végstádiumú vesebetegségben szenvedtek. Minden beteg a vizsgálatba való bevonás időpontjában a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott beegyező nyilatkozatot írt alá.

Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiás betegek és a kontroll csoport kiválasztása

A vizsgálatba 21-70 év közötti, korábban nem kezelt Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiás beteg került bevonásra (szérum triglicerid szint $<2,2$ mmol/l, LDL-C $>4,2$ mmol/l). Kizártuk a máj-, endokrin- és vesebetegségben szenvedő betegeket (szérum kreatinin szint >130 μ mol/l), valamint kirárási kritérium volt az alkoholizmus, a gyógyszerfüggőség, az epekövesség, a malignus alapbetegség, a terhesség vagy szoptatás, az antikoaguláns vagy lipidcsökkentő kezelés és a dohányzás. Valamennyien a National Cholesterol Education Program (NCEP) step 1 diétáját követték. A vizsgálat ideje alatt a betegek fizikai aktivitása lényegesen nem változott. A bakteriális vagy vírusos fertőzésre utaló laboratóriumi paraméterek normál tartományban voltak. A kontroll csoportot a klinika járóbeteg szakrendelésén megjelenő, rutin belgyógyászati fizikális vizsgálat, laboratóriumi vizsgálatok és EKG alapján egészségesnek bizonyult, nem dohányzó, gyógyszeres kezelésben nem részesülő egyének alkották. A betegek és controlok felvilágosítást követően beegyező nyilatkozatot írtak alá a vizsgálatba történő bevonásukhoz. A vizsgálat a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottságának szabályzata szerint és annak engedélyével történt.

Statin intoleráns betegek kiválasztása

Vizsgálatunkba 101 (69 nő és 32 férfi) statin intoleráns, Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiás beteg került bevonásra a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Lipid Szakrendelésének beteganyagából. 42 esetben statin indukálta miopátia (mialgia kreatinin-kináz emelkedéssel vagy anélkül), 28 esetben statin indukálta májenzim emelkedés (hepatopátia), 15 esetben statin indukálta súlyos gyomor-bélrendszeri tünet igazolódott. 16 beteg esetében egynél több tünet jelentkezett: 2 beteg esetében miopátia, hepatopátia és gyomor-bélrendszeri tünetek is, 7 betegnél miopátia és hepatopátia, 5 beteg esetében miopátia és gyomor-bélrendszeri tünetek, másik 2 betegnél hepatopátia és gyomor-bélrendszeri tünetek igazolódtak. Azok a betegek, akik rendszeres alkohol-

, illetve drogfogyasztók, malignus alapteregségben szenvedtek, kizárásra kerültek. Kizártuk továbbá a terhesekeket, szoptató anyákat, antikoaguláns vagy lipidcsökkentő kezelésben részesülő betegekeket. A betegek 6 hétig az Országos Koleszterin Oktatási Program által meghatározott étrend alapján étkeztek, majd ezt követően 12 hónapon keresztül naponta 10 mg ezetimibet (Ezetrolt) szedtek. Minden beteg a kutatás természetéről és céljáról való részletes felvilágosítás után írásban beleegyezését adta a vizsgálatba, melyet a Debreceni Egyetem Etikái Bizottsága és az Országos Gyógyszerészeti Intézet jóváhagyott. A vizsgálatot regisztrálta az Európai Klinikai Vizsgálatok Adatbázisa (EudraCT number 2009–017732–40). A testtömeg index (body mass index, BMI) értéket az SI mértékegységrendszernek megfelelően a testsúly és a testmagasság négyzetének hányadosaként állapítottuk meg (kg/m^2).

A súlyos heterozigóta familiáris hiperkoleszterinémias betegek kiválasztása

Vizsgálatainkba a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet A épületének Lipid szakrendelésén gondozott súlyos HeFH betegek kerültek bevonásra, akiknél a gyógyszeres lipidcsökkentő kezelés mellett is jelentősen célérték feletti LDL-C szintet észleltünk, ezért a szelektív LDL aferezis kezelés (DALI) elkezdése vált indokolttá. A vérvételek mindegyike a betegek első DALI kezelése előtt és után történt, egy esetben végeztünk 12 hónapos követéses vizsgálatot a chemerin szintre gyakorolt tartós hatás vizsgálata céljából. Az afamin és E vitamin szintek vizsgálatakor egészséges kontroll személyek is bevonásra kerültek a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet „A” épületének Ambulanciájáról. Vizsgálatunkban a beválasztás feltétele 21-70 év közötti életkor volt. A betegek a vizsgálat jellegéről és céljáról szóló részletes felvilágosítást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A Debreceni Egyetem Etikái Bizottsága hozzájárult a vizsgálatához. Kizárási kritériumként szerepelt az akut bakteriális vagy vírusfertőzés, az elmúlt három hónapban multivitamin készítmények szedése, az emelkedett májenzimekkel jellemzett vagy az anamnézisben szereplő krónikus májbetegség és az alkohol- vagy drogfüggőség, az epekövesség, a közelmúltban zajlott miokardiális infarktus, a kezeletlen endokrin betegségek, a terhesség és a szoptatás, a súlyos mentális retardáció (intelligencia-hányados: $\text{IQ} < 40$), és kizárásra kerültek az ismert daganatos vagy daganatellenes kemoterápiában részesülő betegek.

Vérvétel és laboratóriumi paraméterek mérése

Vérvétel az 55 év alatti arteria carotis szűkületben szenvedő betegek esetén

A betegéknél 12 óras éhezékes periódust követően, reggel 7:30 és 8:00 között 10 ml vénás vér levétele történt.

Túlsúlyos és elhízott, lipidcsökkentővel nem kezelt betegek esetében a vérvétel és a laboratóriumi paraméterek mérése

A vénás vér levétele reggel 08:00 és 10:00 között, 12 órás éhezést követően történt. A szérum azonnal feldolgozásra került.

Statin intoleráns betegek esetében a vérvétel és a laboratóriumi paraméterek mérése

A betegek bevonásakor, illetve 3, 6 és 12 hónapos ezetimib kezelés után, 12 órás éhezést követően reggel 07:30 és 08:00 óra között 10 ml vénás vér levétele történt.

A lipidparaméterek meghatározása

A lipid értékek meghatározása a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében friss szérumból történt. A szérum koleszterin és triglicerid szintek meghatározását részben Boehringer-Mannheim enzim kittel, részben enzimátikus, kolorimtriás módszerrel (GPO-PAP, Modular P-800 Analyzer; Roche/Hitachi, Basel, Switzerland) végezték. Az LDL-C szintet kezdetben a Friedewald-formula alapján kalkulálták, később a HDL-C és LDL-C értékek meghatározása homogén, enzimátikus, kolorimtriás próbával (Roche HDL-C plus 3rd generation, Roche LDL-C plus 2nd generation, Basel, Switzerland) végezték. Az apolipoprotein szintek meghatározása részben immun-nefelometriás módszerrel (Orion Diagnostica kit), részben immunturbidimetriás módszerrel (Tina-Quant APO A (Version 2; Roche), Tina-Quant APO B (Version 2; Roche) történt.

Paraoxonáz-1 aktivitás mérése

A PON1 paraoxonáz aktivitás mérését egy kinetikus, szemiautomatizált módszerrel végeztük. 285 μ l Tris-HCl-t, 2 mmol/L CaCl_2 -t tartalmazó pufferben, 5,5 mmol/L paraoxon (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát, Sigma, Magyarország) feloldása, majd 15 μ l szérum hozzáadása után 405 nm-en, 25°C-on spektrofotometriás módszerrel (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 6 percenként történt a 4-nitrofenol mennyiségének mérése egy multimodális detektorral felszerelt Beckman Coulter DTX880 típusú leolvasó (Beckman Coulter, California, USA) segítségével. Az enzim aktivitását a paraoxonáz által elbontott paraoxon szubsztrátra jellemző moláris extinkciós koefficiens (17 600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) alapján határoztuk meg. A paraoxonáz aktivitás kifejezésére U/L mértékegységet használtunk, ahol egy egység 1 μ mol szubsztrát elbomlását jelenti egy perc alatt. Az arilészteráz aktivitás meghatározására szintén spektrofotometriás módszert alkalmaztunk. 1 mmol/L fenilacetátot (Sigma) és 20 mmol/L Tris/HCl puffert

(pH=8,0) tartalmazó oldatban, szérum hozzáadását követően 270 nm-en történt az abszorbancia mérése. Az enzimaktivitás $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens segítségével került meghatározásra. Mértékegysége U/L volt, ahol egy egység 1 μmol fenilacetát elbomlását jelenti egy perc alatt.

A paraoxonáz-1 fenotípus meghatározása kettős szubsztrát módszerrel

A PON1 fenotípus meghatározására duál szubsztrát módszert alkalmaztunk. A 192 Q→R kodon genetikai polimorfizmusának (192. pozícióban Arg/Gln csere) van a legnagyobb hatása az enzim aktivitására. R allél esetén a paraoxon hidrolízise gyorsabb, mint Q allél esetén. Az R allél által meghatározott allozimet B, a Q allél által azonosított A típusúnak nevezzük. Ezzel ellentétben az R és Q allélek ugyanolyan arilészteráz aktivitással rendelkeznek. A só stimulálta (1 mol/l NaCl jelenlétében) paraoxon hidolízisének és a fenilacetát hidrolízisének egymáshoz viszonyított aránya alapján az emberek három PON1 fenotípusba oszthatóak: AA (alacsony aktivitásúak), AB (közepes aktivitásúak), BB (magas aktivitásúak). A fenotípusok közötti határértékek a következők: 3,0 alatti arány esetén AA, 3,0 és 7,0 között AB és 7,0 feletti arány esetén BB fenotípusról beszélhetünk.

Az LCAT és CETP aktivitás mérése

A LCAT és CETP aktivitását plazmából, kereskedelmi forgalomban lévő kitek (Roar Biomedical Inc.) segítségével határoztuk meg fluorescens spektrofotometriás módszerrel.

Enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálatok

Az anti-oxLDL antitestek meghatározását kereskedelmi forgalomban lévő enzim immunoassay segítségével történt (IMMCO, Buffalo, N.Y., USA) a gyártó előírásai szerint. Az MPO, MMP-9 és a TIMP-1 koncentráció szendvics enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (ELISA) (R&D Systems Europe Ltd., Abington, England) került meghatározásra a gyártó ajánlásának megfelelően. A szérum sCD40L, sICAM-1 és sVCAM-1 szintjét kereskedelmi forgalomban lévő sandwich ELISA kitek segítségével, az alkalmazási előiratban foglaltak szerint határoztuk meg (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) szintet kompetitív ELISA módszerrel, kereskedelmi forgalomban lévő kit segítségével határoztuk meg az alkalmazási előiratban foglaltak szerint (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Németország). A szérum chemerin szint meghatározás kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (Human Chemerin Quantikine ELISA,

katalógusszám: DCHM00, R&D Systems, MN, USA) történt, a gyártó használati útmutatásának megfelelően. A szérum afamin szint meghatározás kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (Afamin Human ELISA, katalógusszám: RD194428100R, BioVendor, NC, USA), történt, a gyártó használati útmutatásának megfelelően.

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

Az aferezis kezelést követően, a chemerin elúcióját az aferezis oszlopról Dihazi és munkatársai által leírt módszer alapján végeztük. Az aferezis kezelést követően a DALI750 adszorbens oszlopokat foszfát-pufferes sóoldattal (pH 7,4) mostuk át, majd fehérje elúciót egy három lépcsős elúciós folyamattal végeztük. Egymás után három különböző pH-jú 250 µl acetát pufferrel végeztünk az elúciót a következő sorrendben pH 5,0, pH 4,0, pH 3,0. Külön mértük a különböző pH-jú pufferekkel kapott eluátumok chemerin koncentrációját. Az eluátumok chemerin koncentrációjának meghatározását kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (Human Chemerin DuoSet ELISA, katalógusszám: DY2324, R&D Systems, MN, USA) végeztük, a gyártó használati útmutatásának megfelelően.

NO meghatározás

A meghatározás friss plazmából Griess-reakcióval történt. A friss plazmát ZuSO_4 -tal ill. Cd-szuszpenzióval kezeltük. Centrifugálás után a felülúszót 1%-os szulfanilamid és 0,1%-os naftil-etilén-diaminnal inkubáltuk 10 percig 60°C -on. A keletkező szint 546 nm-en fotometráltuk.

TBARS meghatározás

A TBARS koncentrációt a humán plazmából szerves oldószerrel történt extrakciót követően spektrofotométerrel határoztuk meg. A plazmát SDS-sel történő előkezelés után (pH=3,5) tiobarbitursav vizes oldatával inkubáltuk 95°C-on 60 percig. Ezután n-butanol-piridin elegyével történő extrakció után a szerves fázis optikai denzitását mértük spektrofotométerrel 532 nm-en.

Plazma α - és γ -tokoferol szint meghatározása

Az α - és γ -tokoferol mennyiségi meghatározása plazma mintából Zerbinati és munkatársai által leírt módszer alapján történt, gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel, a mérés optimalizálásához szükséges

módosításokkal. A standard görbe elkészítéséhez a belső standard módszert alkalmaztuk. A GC-MS mérések Finnigan Trace GC Ultra gázkromatográffal illetve az ahhoz kapcsolt Polaris Q tömegspektrométerrel történtek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). A mintákat manuálisan injektáltuk egy Agilent J&W oszlopra (DB-5MS UI; 60m x0.25mm x 0.25µm) vivőgázként héliumot használva (áramlási sebesség: 1ml/min, állandó áramlás mód). Az injektálási térfogat 2 µl volt. Az injektálás splitless módban történt, az injektor hőmérséklete a mérés során végig 260 °C volt. A kolonna kezdeti hőmérséklete 150°C volt 2 percig, majd 25°C/perc felfűtési sebességgel 300°C-ra emelkedett melyet további 15 percig tartott. A teljes elemzési idő 23 perc volt. A tömegspektrométer szelektív ionkövetés (selective ion monitoring, SIM) módban működött.

Lymphocytá szeparálás perifériás vérből

A lymphocyták szeparálása buffy coat-ból történt. 500 µl teljes vért rétegeztünk 500 µl Ficoll felé, majd 15 percig centrifugáltuk (1000 g). A buffy coat-ot óvatosan leszívtuk, majd a sejteket PBS-ben mostuk, majd ismét centrifugáltuk 15 percig (1000 g).

Single cell gel electrophoresis (comet-assay)

A szeparált humán lymphocytákat 600 µl, 1%-os LMP agarózban (pH 7,4) szuszpendálva 37 °C-on érdesített felszínű üveg tárgylemezre pipettáztuk, melyet előzőleg 1% NMP agarózzal fedtünk. Az agarózt 10 percig 4 °C-on tartottuk, majd a tárgylemezeket 50 µl H₂O₂-t tartalmazó 100 ml PBS-ben inkubáltuk 35 percig. Ezután a tárgylemezeket 4°C-os lizáló pufferbe (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂ EDTA, NaOH, 1%, Triton X-100, pH=10,0) helyeztük 60 percre, eltávolítva ezzel a sejtfehérjéket. A lysis követően a tárgylemezeket 30 percre horizontális elektroforézis tartályba helyeztük, mely 1 mM Na₂EDTA, 0,3 M NaOH, pH=2,7 puffert tartalmazott, majd futtattuk (25 V, 300 mA, 20 perc, 15°C). A tárgylemezeket háromszor 3 percig mostuk 4°C-os neutralizáló pufferrel (0,4 M Tris-HCl, pH=7,5), 50 µl Ethidium bromiddal (EtBr) jelöltük, majd fedőlemezzel fedtük. A comet-assay értékelése vizuális módszerrel történt. Az EtBr-al megjelölt nukleuszokat Zeiss fluorescens mikroszkóp segítségével értékeltük. Összesen 100 cometet értékeltünk vizuálisan tárgylemezenként, öt osztályba sorolva őket a csóva intenzitása alapján, így 0, 1, 2, 3 vagy 4 értéket kaptak az éptől a maximálisan károsodottig, ezért az összérték lemezenként 0 és 400 között volt.

HDL szubfrakció meghatározás poliakrilamid gradiens gél elektroforézis alkalmazásával

A plazma lipoproteinek méret alapján történő szeparálását nem denaturáló 3-30%-os poliakrilamid gradiens gél elektroforézis alkalmazásával végeztük. A gél festését bromofenol-kékkel végeztük és lézer denzitométerrel szkenneltük. A molekulasúly meghatározása thyreoglobulin, apoferritin, laktát dehidrogenáz és bovin szérum albumin standardok alapján történt. A HDL abszorbancia profilok alapján a szubpopulációk meghatározása az illeszkedő görbéknek megfelelően az irodalomban leírtak szerint történt. A HDL3 (<8,8 nm), HDL2a (8,8-9,8 nm) és HDL2b (>9,8 nm) szubfrakciókat különítettük el a görbék alapján.

LDL-méret meghatározás poliakrilamid gradiens gél elektroforézis alkalmazásával

Az LDL csúcsátmérő meghatározása teljes plazmából, lipid-jelöléssel, nem denaturáló 3-16%-os poliakrilamid gélelektroforézissel történt. A jelölést Sudan Black-kel végeztük, majd lézerszkennelést végeztünk. Az LDL partikulumok méretét latex gyöngyök és nagy molekulasúlyú standardok segítségével határoztuk meg.

LDL szubfrakciók elválasztása Lipoprint módszerrel

Az LDL szubfrakciók elválasztását csöves poliakrilamid gélelektroforézis rendszerrel végeztük a Lipoprint rendszerrel (Quantimetrix Corp., Redondo Beach, CA), a gyártó által kiadott felhasználási útmutatónak megfelelően. LDL szubfrakciós teszt során az előre betöltött akrilamidot tartalmazó üvegcsövek felső részére 25 µl szérum mintát vittünk fel. A mintákban lévő lipoproteineket 200 µl szudán fekete festéket tartalmazó akrilamid folyékony géllal tettük láthatóvá. 30 perces fotopolimerizálást követően a csöveket elektroforézis kádba helyeztük, amelynek alsó és felső részébe Tris és bórsavat tartalmazó puffer oldatot öntöttünk, majd 3 mA/cső áramerősség és 500 V feszültség mellett a mintákat 60 percig elektroforetízáltuk. Az elektroforézis után 30 perccel digitalizáluk a megfuttatott lipoprotein szubfrakciókat tartalmazó csöveket és analizáltuk a Lipoware szoftver (Quantimetrix Corp.) segítségével. Az LDL szubfrakciós teszt során maximálisan 7 különböző LDL szubfrakció elválasztására van lehetőség. A 7 LDL szubfrakciót két nagy csoportba különíthetjük el: a nagyméretű, kevésbé denz LDL-1 és LDL-2, valamint a kisebb és denzebb szubfrakciókból álló csoportot (LDL-3,-4,-5,-6,-7). Az egyes lipoprotein sávok koleszterin koncentrációja megadható az összkoleszterin szint és a Lipoware szoftver által meghatározott görbe

alatti terület ismeretében. Az átlagos LDL méretet (nm) a denzitogram alapján szintén a Lipoware szoftver kalkulálja.

HDL szubfrakció meghatározás Lipoprotein módszerrel

A HDL szubfrakciók elválasztását szintén csöves poliakrilamid gélelektroforézis rendszerrel végeztük a Lipoprint rendszerrel (Quantimetrix Corp., Redondo Beach, CA), a gyártó által kiadott felhasználási útmutatónak megfelelően. A HDL szubfrakciós teszt kivitelezése gyakorlatilag megegyezik az LDL szubfrakciós teszttel, ebben az esetben is 25 µl szérum mintát viszünk fel az akrilamid gél tartalmazó üvegcsövekre, azonban a szudán fekete festéket tartalmazó folyékony gélterfogata 300 µl. 30 perces fotopolimerizálást követően az elektroforézis 50 percig tart 3 mA/cső áramerősség és 500 V feszültség mellett. A HDL szubfrakciós teszt során a Lipoprint rendszer 10 szubfrakciót különít el. A HDL-1,-2,-3 a nagy HDL szubfrakcióhoz, a HDL-4,-5,-6,-7 a közepes, míg a HDL-8,-9,-10 a kis HDL szubfrakcióhoz tartoznak. Az egyes HDL szubfrakciók koleszterintartalma a HDL-koleszterin ismeretében a Lipoware szoftver által meghatározott görbe alatti terület ismeretében megadható.

Az ApoE gén E2, E3, E4 polimorfizmusának meghatározása

A meghatározást a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Laboratóriumi Medicina Intézetben végezték nátrium-citráttal alvadást gátló vérmintából. Az ApoE genotípus meghatározás azon alapszik, hogy a különböző genotípusoknál a polimorf szakaszon különböző számú és elhelyezkedésű restrikciós enzim hasító hely található. A kimutatás a kérdéses szakasz PCR amplifikációját követően RFLP analízissel történt. A 218 bp hosszúságú PCR termék *Hae*II és *Afl*III restrikciós enzimekkel történő hasítása során keletkező fragmentumok agaróz gélelektroforézissel történő elválasztása után kapott restrikciós mintázatból az E2, E3, E4 genotípus megállapítható.

A NPC1L1 genotípus meghatározás

A genomiális dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálása etiléndiamintetraecetsavval (EDTA) vagy citráttal antikoagulált vérből történt a QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) használatának segítségével a Laboratóriumi Medicina Intézetben. A c.-133A>G polimorfizmus (rs17655652) jelenlétének vizsgálata a polimeráz láncreakcióval (polymerase chain reaction, PCR) amplifikált szakaszok BlnI (New England Biolabs, Ipswich, MA) segítségével végzett enzimemésztéssel történt. A NPC1L1 gén 365 bázispár (bp) hosszúságú fragmentjének amplifikálását NPC1L1

rs17655652F (5'- GAC CCT AGC ACC TGC GTGATGA-3') és *NPC1L1* rs17655652R (5'-GTAACGCTCGCCTGGTACACG G -3') primerek használatával végezték. Homozigóta vad típus esetén a BlnI-vel történő emésztés egy 272-bp és egy 93-bp hosszúságú restrikciós fragmentet eredményezett, míg a mutáns allélek esetében ez hiányzott.

Carotis ultrahang vizsgálatok

A carotis ultrahang vizsgálatot közvetlenül a vértvétel követően végeztük színkódolt HP Sonos 4500 (Hewlett Packard, Andover, Mass, USA) készülékkel, carotis duplex üzemmódban egy 7,5 MHz-es lineáris transzducerrel. Az átmérő és a terület csökkenését a European Carotid Surgery Trial során alkalmazott módszer szerint mértük. Az arteria carotis interna szűkületét a systoles csúcs áramlási sebesség alapján kalkuláltuk. Elzáródást abban az esetben véleményeztünk, ha nem tudtunk detektálható áramlást kimutatni szűkület magasságában és afelett. Az ultrahang vizsgálatokat videomagnó segítségével rögzítettük. Az arteria carotis communis intima-média távolság mérése offline módon történt, egy független szakember által, vakon, az Atherosclerosis Risk in Communities vizsgálat protokollja szerint. Az IMT mérése a jobb és bal arteria carotis communis távolabbi falán történt a carotis bulbustól 1 cm-rel proximálisan, összesen 11 mérést végeztünk 1 mm-es távolságonként. Az átlagos IMT értékét a 22 mérés eredményének átlaga alapján adtuk meg.

Statisztikai vizsgálatok

Statisztikai vizsgálatok az 55 évnél fiatalabb arteria carotis szűkületben szenvedő betegek vizsgálata kapcsán

A statisztikai feldolgozást Statistica for Windows version 6.1 (Statsoft, Tulsa, Okla, USA) szoftverrel végeztük. A folyamatos változók normalitás vizsgálatát a Shapiro-Wilk teszttel végeztük. A nem normál eloszlás miatt a Mann-Whitney U tesztet és a Spearman korrelációt alkalmaztuk. Azokat a folyamatos változókat, melyek az egyváltozós korrelációs vizsgálatok során szignifikánsan korreláltak az IMT-vel, egy többváltozós regressziós modellben vizsgáltuk. Az előfordulási gyakoriságokat Pearson-féle χ^2 teszttel hasonlítottuk össze. A $p < 0,05$ értéket tekintettük a szignifikancia szintjének.

Túlsúlyos és elhízott, lipidsökkentővel nem kezelt betegek statisztikai elemzése

A statisztikai analízist a SASTM for WindowsTM 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programmal végeztük. A kapott adatok eloszlásának vizsgálata Kolmogorov-

Smirnov teszttel történt. Normál eloszlás esetén az adatokat átlag±szórás (SD) formájában ábrázoltuk, nem-normál eloszlású paraméterek esetén az adatokat medián ill. alsó és felső kvartilis értékek formájában fejeztük ki. Normális eloszlás esetén a vizsgált csoportok adatainak összehasonlítása Student-féle kétmintás t-próbával történt, míg nem-normál eloszlás esetén Mann-Whitney-féle u-próbát alkalmaztunk. A vizsgált paraméterek közötti összefüggés vizsgálata Pearson korrelációs analízissel történt; a fentebb említett nem-normál eloszlású paramétereket logaritmizáltuk annak érdekében, hogy korrigálni tudjuk az aszimmetrikus eloszlásukat. Multivariációs analízis (backward-stepwise módszer) segítségével meghatároztuk az MPO szinttel legszorosabb összefüggésben álló változókat mind az egész betegcsoportban, mind a VSZ és NVSZ alcsoportokban is. A szignifikancia szintjének a $p < 0,05$ értéket választottuk.

Az atorvastatin kezelésben részesülő hyperlipidaemiás betegek statisztikai elemzése

A statisztikai analízishez PC SAS (6.12) programot használtunk (SAS Institute, Cary NC 275313 USA). A leíró statisztika során a vizsgált paramétereket normál eloszlás esetén átlag±SD, nem normál eloszlás esetén medián (kvartilesek) formájában adtuk meg. A csoportok összehasonlítását Student-féle párosított t-próbával és Wilcoxon teszttel végeztük. A nem normál eloszlású paraméterek esetén a korrelációs vizsgálatok során Spearman rho tesztet alkalmaztunk. A lipidparaméterek változásának elemzését ANOVÁval végeztük. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Statin intoleráns betegek statisztikai elemzése

A statisztikai analízis a STATISTICA (Windows 6) és az IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 19. verzió) számítógépes programokkal történt. Az adatok eloszlásának vizsgálatára Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. Normál eloszlás esetén a paraméterek közötti különbségek vizsgálata egyszempontos varianciaanalízissel történt, amit Newman-Keuls teszt használata segítségével post hoc összehasonlítás követett. Nem-normál eloszlás esetén a különbségek összehasonlítására Kruskal-Wallis és Mann-Whitney féle U próbát használtunk. Normál eloszlás során az adatokat átlag±szórás (SD) formájában ábrázoltuk, nem-normál eloszlású paraméterek esetén az adatokat medián ill. alsó és felső kvartilis értékben fejeztük ki. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikancia szintnek. A változók genotípus függésének vizsgálatára Welch-féle próbát alkalmaztunk. A különböző genotípussal és alléllal

rendelkező személyek paramétereinek összehasonlítása Khí-négyzet és Fisher-féle egzakt próbával történt.

Statisztikai elemzés a szeletív LDL aferezis kezelés során történt vizsgálatokban

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

EREDMÉNYEK

A paraoxonáz aktivitás és genetika jelentősége

A paraoxonáz aktivitás és az artéria carotis intima-méda vastagság összefüggése

A betegek között szignifikánsan magasabb volt a 2-es típusú diabetes mellitus, a dohányzás, az alsóvégtagi érzésküvet és az iszkémiás stroke vagy TIA előfordulási aránya. A betegek és kontrollok PON1 paraoxonáz, só-stimulált paraoxonáz és arileszteráz aktivitása között nem találtunk szignifikáns különbséget. A betegek intima-média távolsága azonban szignifikánsan nagyobb volt a kontrollokéhoz viszonyítva. A PON1 fenotípus megoszlás és allél gyakoriság a korábbi irodalmi adatoknak megfelelő volt, és követte a Hardy-Weinberg ekvibriliumot. A betegek és kontrollok fenotípus megoszlása nem különbözött szignifikánsan. Mivel csak egy beteg esetén találtunk BB fenotípust, az összehasonlítást az AA és az AB fenotípusok esetén végeztük el. A PON1 fenotípus és az IMT között nem találtunk szignifikáns összefüggést. A teljes vizsgálati populációban szignifikáns negatív korrelációt találtunk a PON1 paraoxonáz és só-stimulált paraoxonáz aktivitás és az IMT között még az egyéb tényezőkre (magasvérnyomás, dohányzás) végzett korrigálást követően is, míg az arileszteráz aktivitással nem korrelált az IMT. Szignifikáns negatív korreláció igazolódott a PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitás, valamint az anti-oxLDL antitest szintek között a teljes vizsgálati populációban.

A szérumbioloperoxidáz szint és a paraoxonáz aktivitás közötti összefüggés vizsgálata

A vaszkuláris szövdömménnyel rendelkező betegek életkora szignifikánsan magasabbnak bizonyult, emellett gyakoribb volt a 2-es típusú diabetes mellitus, a magasvérnyomás, a dohányzás előfordulási gyakorisága a vaszkuláris szövdömménnyel nem rendelkező betegekhez képest. A vaszkuláris szövdömmények teintetében a leggyakoribb a cerebrovaszkuláris betegség volt, melyet az iszkémiás szívbetege és a perifériás érbetegség követett. A vaszkuláris szövdömménnyel rendelkező betegeknel szignifikánsan magasabb összkoleszetrin, LDL-C, triglicerid és húgsav szintet észleltünk. Emellett szignifikánsan magasabb MPO szint, TIMP-1 szint és MMP-1/TIMP-1 arány igazolódott a vaszkuláris szövdömménnyel rendelkező csoportban a szövdömménnyel nem rendelkezőkhöz képest. Szignifikánsan magasabb volt az MPO/PON1 arány a vaszkuláris szövdömménnyel rendelkező betegekben az azzal nem rendelkező betegekhez viszonyítva. A bioloperoxidáz szintje szignifikáns negatív korrelációt mutatott a PON1 arileszteráz aktivitással a teljes betegpopulációban, a vaszkuláris szövdömménnyel nem rendelkező és rendelkező betegekben egyaránt. Az MPO szint szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az MMP-9 és a TIMP-1 szintekkel a teljes vizsgált betegcsoportban. Többszörös regressziós analízist végezve az összes beteg és a vaszkuláris szövdömménnyel nem rendelkező betegek esetén az MPO szint független prediktora a PON1 arileszteráz aktivitás, az MMP-9 és a TIMP-1 szint, míg a vaszkuláris szövdömménnyel rendelkező betegek esetén a PON1 arileszteráz aktivitás volt.

A szérumbioloperoxidáz szint, a paraoxonáz aktivitás és egyes vaszkuláris biomarkerek szintje közötti összefüggés vizsgálata

A hiperlipidaemiás betegek szignifikánsan idősebbek voltak, átlagosan több mint 8,5 évvel, BMI értékük és haskörfogatuk nők és férfiak esetén is nagyobb volt, mint az egészséges kontroll populációé. Emellett szignifikánsan magasabb haskörfogat, szérumbglükóz, HbA1c, összkoleszetrin, LDL-C, triglicerid, Lp(a), ApoB és CRP szinttel rendelkeztek, míg nem volt különbség a nemek megoszlásában, a HDL-C, az ApoA1 és a sTSH szintekben. A hiperlipidemiás betegek bioloperoxidáz, sCD40L, sICAM-1, sVCAM-1 és oxLDL szintje szignifikánsan magasabb volt a kontroll populációhoz viszonyítva, míg nem találtunk különbséget a betegek és kontrollok PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitása és az ADMA szintje között. Az érszövdömménnyel rendelkező betegek életkora, glükóz, HbA1c, összkoleszetrin, LDL-C, triglicerid, Lp(a), CRP és húgsav szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az érszövdömménnyel nem

rendelkező betegeké. Az érszövődménnyel rendelkező betegek esetében szignifikánsan magasabb MPO, sCD40l, ADMA és sICAM-1 szintet mértünk az érszövődménnyel nem rendelkezőkhöz viszonyítva. A PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitás nem különbözött szignifikánsan a két csoportban.

A szérumbioloperoxidáz szint, a paraoxonáz aktivitás és a HDL szubfrakciók közötti összefüggés vizsgálata

81 kezeletlen hyperlipidaemiás beteg és 32 egészséges kontroll személynél vizsgáltuk a lipid paramétereiket, a bioloperoxidáz szintet, a PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitást és az MPO/PON1 arányt. Emellett meghatároztuk a HDL szubfrakciók szintjét és arányát a vizsgált populációban. A betegek életkora, BMI és haskőrfogat értéke szignifikánsan magasabb volt a betegek esetén. Szignifikánsan magasabb vércukor, HbA1c, összkoleszterin, LDL-C, triglicerid, Lp(a), ApoB és CRP szinteket észleltünk a betegekben a kontrollokhoz viszonyítva. A szérumbioloperoxidáz szintje szignifikánsan magasabb volt a betegekben, míg a PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és kontrollok között. Mind az MPO szint, mind a PON1 aktivitások esetén igen nagy egyéni különbségek mutatkoztak a betegek és a kontrollok esetében is. A HDL funkció jellemzésére használt MPO/PON1 hányados szignifikánsan magasabb volt a betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva. Sem a HDL szubfrakciók szintjében, sem azok százalékos arányában nem találtunk érdemi eltérést a betegek és kontrollok között, bár a betegek esetén a kisebb HDL szubfrakciók felé tapasztaltunk némi eltolódást. Egyedül az intermediér HDL százalékos aránya volt szignifikánsan alacsonyabb a betegekben a kontrollokhoz képest.

Az atorvastatin kezelés hatása a HDL funkcióra és összetételre

Az atorvastatin kezelés hatásának vizsgálata a paraoxonáz aktivitásra és a Comet assay-vel detektált oxidatív DNS-károsodásra

13 IIa típusú hyperlipidaemiás betegben vizsgáltuk a 10 mg/nap atorvastatin kezelés hatását a Comet assay-vel detektált hidrogén-peroxid indukált limfocita DNS károsodás mértékére, a lipidszintekre és a szérumbioloperoxonáz aktivitásra. A 6 hónapig tartó napi 10 mg atorvastatin kezelés szignifikánsan csökkentette a betegek összkoleszterin és LDL-C szintjét. A szérumbioloperoxid és a HDL-C szint nem változott szignifikánsan. A DNS károsodás mértékére jellemző visual score, valamint a lipid peroxidáció szintjét jelző plazma TBARS szint szignifikánsan csökkent a kezelés hatására. Bár a szuperoxid anion szérumbioloperoxid szintje nem változott szignifikánsan, a PMA indukálta szuperoxid anion

termelés szignifikánsan csökkent, míg az FMLP indukált szuperoxid anion termelés szignifikánsan nőtt a kezelést követően. A nitrogén-monoxid koncentráció nem változott szignifikánsan. A szérumban PON1 paraoxonáz aktivitás, valamint az egységnyi HDL-re jutó PON1 aktivitás (PON1/HDL-C) szignifikáns emelkedését tapasztaltuk a kezelést követően. A só-stimulált paraoxonáz és arileszteráz aktivitás, valamint a PON1 koncentráció nem változott szignifikánsan a kezelés hatására. Negatív korreláció igazolódott a DNS károsodás mértéke és a PON1 paraoxonáz és só-stimulált paraoxonáz aktivitás között mind az atorvastatin kezelés előtt, mind a kezelést követően.

Az atorvastatin kezelés hatásának vizsgálata a HDL szubfrakciókra és a HDL-hez kötött enzimek (PON1, LCAT és CETP) aktivitására

33 IIa és IIb típusú hyperlipidaemiában szenvedő betegben vizsgáltuk az LDL méretet és a HDL szubfrakciók megoszlását gradiens gél elektroforézis alkalmazásával három hónapos, napi 20 mg-os atorvastatin kezelés előtt és azt követően. Emellett CETP, LCAT és PON1 aktivitás méréseket végeztünk. A kezelés hatására szignifikánsan csökkent az összkoleszterin, LDL-C, triglicerid és ApoB szint, valamint az LDL-C/ApoB arány. Bár a HDL-C és apoA1 szintek kissé emelkedtek, a változás nem bizonyult szignifikáns mértékűnek. Az oxidált LDL szintje szignifikánsan csökkent. A PON1 paraoxonáz és LCAT aktivitást szignifikánsan növelte a kezelés, míg a CETP aktivitás szignifikánsan csökkent. Nem változott azonban a kezelés hatására a PON1 arileszteráz aktivitás. A 3 hónapos atorvastatin kezelés szignifikánsan növelte a HDL3 és csökkentette a HDL2a és HDL2b szubfrakció arányát. A HDL2/HDL3 arány szignifikánsan csökkent. Az átlag LDL méret szignifikánsan nőtt. A CETP aktivitás szignifikánsan, pozitívan korrelált a HDL2b aránnyal és negatívan korrelált a HDL3 and HDL2a arányával, bár az összefüggés csak a HDL3 esetén volt szignifikáns. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a CETP aktivitás és az LCAT aktivitás változása és a HDL2a arány változása között. A paraoxonáz genotípus és allél gyakoriság megoszlása megfelelt az irodalmi adatoknak és követte a Hardy-Weinberg egyensúlyt.

Az ezetimib kezelés hatékonyságát befolyásoló genetikai tényezők vizsgálata

4.3.1. ApoE

Az általunk vizsgált 63 statin intoleráns betegben az ezetimib monoterápia már 3 hónapos kezelést követően szignifikánsan csökkentette az összkoleszterin, LDL-C és triglicerid szintjét, de nem változtatta szignifikánsan a HDL-C, az ApoA1 és az ApoB

szinteket. Az 1 éves kezelés hatására az LDL-C és az összkoleszterinszint csökkenés elérte az egyéb vizsgálatokban észlelt mértéket. A kiindulási lipid paraméterek nem tértek el egymástól a különböző ApoE genotípusú betegcsoportokban. Új eredmény, hogy az ezetimib kezelés hatékonyabban csökkentette az összkoleszterin és LDL-C szintjét az ApoE 3/4 genotípusú betegekben a 2/2 genotípusú betegekhez viszonyítva, ami alátámasztja a kiindulási hipotézist, mely szerint a koleszterin felszívó, ε4 allélt hordozó betegek esetében az ezetimib hatékonyabban képes kifejteni a koleszterin felszívódást gátló hatását

A Niemann–Pick C1-Like 1 c.-133A>G polimorfizmus hatása az ezetimib monoterápia hatékonyságára

A vizsgált 101 statin intoleráns beteget vizsgálva három hónapos ezetimib kezelés után az összkoleszterin, az LDL-C és a hsCRP szintje szignifikánsan csökkent, miközben a többi vizsgált paraméter (triglicerid, HDL-C, apoB, apoAI és CK) szintje nem változott szignifikánsan. Hat hónapos kezelés után az összkoleszterin, az LDL-C, és a hsCRP szint mellett a triglicerid és az apoB szintje is szignifikánsan csökkent a kezdeti értékekhez képest. Tizenkét hónapos kezelést követően pedig szignifikánsan csökkent az összkoleszterin, az LDL-C, a triglicerid, és az apoB szint. Az egész betegcsoportot vizsgálva a 12 hónapos kezelés során nem változott szignifikánsan a HDL-C és az apoAI szintje. A vizsgált betegpopulációban a NPC1L1 c.-133A >G genotípus megoszlása a következő volt: 57,42% volt az AA, 34,65% volt az AG és 7,92% volt a GG genotípus aránya. Mivel a GG genotípusba tartozó betegek aránya alacsony volt, a vizsgált betegeket két csoportra osztottuk: AA (G-t nem hordozók) és AG+GG (G hordozók) alcsoportra. A kezelés előtti antropometriai és laboratóriumi paramétereiben nem találtunk szignifikáns eltéréseket. Az ezetimib kezelés hatására mind az AA, mind az AG+GG genotípusú betegekben szignifikáns csökkenést észleltünk az összkoleszterin és az LDL-C szintjében 3 és 12 hónapos kezelést követően. A triglicerid, a HDL-C és az ApoB szintje egyik csoportban sem csökkent szignifikáns mértékben. Míg az AA genotípusú betegekben az ApoA1 szintje nem szignifikánsan csökkent, az AG+GG genotípusúakban 3,6 és 12 hónap után is szignifikáns mértékű emelkedést tapasztaltunk. Az AA genotípusú betegekben az ezetimib kezelés hatására nem szignifikáns mértékű csökkenést észleltünk az ApoA1 és HDL-C szintekben, míg a G allélt hordozó AG és GG genotípusú betegekben az ApoA1 szintje szignifikánsan, a HDL-C szintje nem szignifikánsan nőtt.

A szelektív LDL aferezis kezelés hatása a chemerin, afamin és E vitamin szintekre, valamint a mennyiségi és minőségi lipidparaméterekre**A szelektív LDL aferezis kezelés hatása a lipoproteinek és a szérum chemerin szintjére**

A kezelés hatására szignifikáns mértékben csökkent a betegek összkoleszterin, LDL-C, HDL-C, ApoB, ApoA1 és szérum kreatinin szintje. A szérum chemerin szint szintén szignifikánsan csökkent. Jelentősen csökkent a kicsi denz LDL szubfrakció és a kicsi HDL szubfrakció százalékos aránya, míg az átlagos LDL méret szignifikánsan nőtt. Annak vizsgálatára, hogy a chemerin szint csökkenésért a fehérje aferezis oszlophoz történő kikötődése felel-e, az oszlopról a kezelést követően eltérő pH-jú pufferoldatok felhasználásával eluáltuk a fehérjéket, és az eluátumból meghatároztuk a chemerin koncentrációkat. A legmagasabb chemerin szintet a pH 5,0 eluáló oldattal nyertük. Ezzel igazoltuk, hogy a kezelés során a chemerin az aferezis oszlophoz kötődik. Mindegyik beteg esetén csökkent a chemerin szint a kezelés hatására. Bár a vizsgált betegek alacsony száma miatt egyértelmű következtetés nem vonható le, a csökkenés mértéke a kiindulási chemerin szintjével mutat némi összefüggést. A chemerin/kreatinin arány 4 beteg esetén csökkent, míg kettő esetében értemben nem változott. Egy beteg esetén 12 hónapon át követtük a kezelésekek előtt mért chemerin szinteket a hosszú távú hatás megítélése céljából. A rendszeres (havonkénti) kezelésekek hatására a szérum chemerin szint egyértelmű csökkenést mutatott. 5 kezelést követően a kezelésekek a beteg kérésére megszakítottuk, majd 3 hónap elteltével ismét elindítottuk. A kezelésekek elmaradásával a chemerin szintje ismét megemelkedett, majd a rendszeres kezelésekek hatására ismét csökkenő tendenciát mutatott. Jelentős eltolódás következett be a nagyobb méretű LDL szubfrakciók irányába. A kis-denz LDL szubfrakciók mennyisége jelentősen csökken a kezelést követően.

A szelektív LDL aferezis kezelés hatása a szérum alfa és béta tokoferol, valamint afamin szintjére

A betegeknél a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb összkoleszterin, LDL-C, HDL-C, ApoB és ApoA1 szinteket észleltünk. Szignifikánsan magasabb afamin, afamin/HDL-C és afamin/ApoA1, valamint α - és γ -tokoferol, illetve oxidált LDL szintet mértünk a betegekben a kontrollkhoz viszonyítva a kezelés előtt. A kezelés szignifikánsan csökkentette a betegek összkoleszterin, LDL-C, HDL-C, ApoB és ApoA1 szintjét. Mérsékleten, de szignifikánsan csökkent a szérum afamin szintje, és jelentősen csökkent az α - és γ -tokoferol szint. Az afamin/HDL-C és az afamin/ApoA1 hányados ugyanakkor nem változott szignifikáns mértékben. Az α -

tokoferol/koleszterin és az α -tokoferol/koleszterin hányados ugyanakkor szignifikáns mértékben emelkedett. Jelentősen és szignifikánsan csökkent az oxidált LDL szintje a kezelést követően. A betegeknél a szignifikánsan kisebb volt a nagy HDL szubfrakciók, míg szignifikánsan nagyobb a kis HDL szubfrakciók százalékos aránya a kontrollokhoz viszonyítva. A kezelés hatására a betegek szérumban szignifikáns mértékben csökkent a kis HDL szubfrakciók százalékos aránya, míg a nagy és közepes HDL szubfrakciók százalékos arányában nem szignifikáns mértékű emelkedést észleltünk. A szérumban afamin szint 5 beteg esetén mérsékelten csökkent, egy beteg esetén mérsékelt emelkedést tapasztalunk, a változás mértéke ugyanakkor nem függött a kiindulási afamin szintektől. Az afamin/HDL-C hányados egyik beteg esetén sem mutatott érdemi változást a kezelés hatására. Az α -tokoferol szintje minden beteg esetén jelentősen csökkent a kezelés hatására, míg az α -tokoferol/koleszterin hányados minden beteg esetén jelentősen magasabb volt a kezelést követően a kiindulási értékekhez képest. A γ -tokoferol szintje 5 beteg esetében jelentősen csökkent a kezelés hatására, egy beteg esetén nem észleltünk érdemi változást. A csökkenés mértéke nem függött össze a kiindulási γ -tokoferol szintekkel. A γ -tokoferol/koleszterin hányados ezzel szemben minden beteg esetében szignifikánsan emelkedett a kezelést követően.

MEGBESZÉLÉS

A paraoxonáz aktivitás összefüggése egyes, az érrelmeszesedés kialakulásában szerepet játszó tényezőkkel

A paraoxonáz aktivitás és a carotis intima-média távolság közötti összefüggés

A B-mód ultrahang vizsgálattal mért IMT az érrelmeszesedés korai szakaszának elfogadott markere, melyet a nemzetközi irodalom is széles körben alkalmaz. Bár korábban már leírták a PON1 paraoxonáz védő szerepét az érrelmeszesedés kialakulásában, az IMT és a PON1 aktivitás közötti összefüggés tekintetében az irodalmi adatok nem voltak egységesek. Eredményeink alapján a PON1 aktivitás és az IMT között negatív korreláció igazolódott a teljes vizsgálati populációban. Bár a CAAD betegek esetén mind a PON1 paraoxonáz, mind a só stimulált paraoxonáz aktivitás alacsonyabb volt, a különbség a kontroll csoporthoz képest nem bizonyult szignifikáns mértékűnek, részben az egyénenként igen eltérő PON1 aktivitások miatt, de korábbi vizsgálatok sem észleltek csökkent PON1 aktivitást CAAD betegeknél. Az anti-oxLDL antitestek szintje emellett jól jellemzi az LDL oxidatív módosulásának mértékét. Mivel a PON1 képes kivédeni az LDL oxidációját az oxidált lipidek

hidrolízisen keresztül, feltételeztük, hogy a magasabb PON1 aktivitáshoz alacsonyabb anti-oxLDL szintek társulnak. Eredményeink altámasztják ezt, mivel szignifikáns negatív korrelációt találtunk mind a PON1 paraoxonáz, mind a PON1 só stimulált paraoxonáz aktivitás és az anti-oxLDL szintje között, ami jelzi a PON1 aktivitás jelentőségét az LDL oxidáció gátlásában, és korábban nem leírt összefüggés. Nem találtunk ugyanakkor összefüggést a PON1-192 fenotípusok és az IMT között, mely egybevág a PON1 genotípus és IMT összefüggését vizsgáló irodalmi adatok egy részével, mások azonban igazolták a genotípus és az IMT összefüggését. Meg kell azonban jegyezni, hogy az utóbbi évtizedek kutatási eredményei alapján klinikai szempontból a PON1 aktivitás (fenotípus) jelentőségét nagyobbban találták, mint a genotípusét. Az eredmények rávilágítanak az LDL oxidáció kiemelt szerepére a korai érlemezésedés folyamatában, és igazolják a PON1 aktivitás védő szerepét.

A paraoxonáz aktivitás összefüggése a mieloperoxidáz és a mátrix metalloproteáz-9 szintjével

A HDL-hez kapcsolódó enzimek közül a lipid paraméterek mellett a pro-oxidáns hatású MPO koncentráció és az anti-oxidáns tulajdonságokkal rendelkező PON1 aktivitás közötti összefüggést vizsgáltuk újonnan diagnosztizált, még kezeletlen, részben már érszövödéssel rendelkező, részben ismert szövődményektől mentes hyperlipidaemiás betegnél. Emellett az érlemezésedés folyamatában szerepet játszó MMP-9 és annak szöveti inhibitorának, a TIMP-1-nek a szintjét is mértük, a korábbinál komplexebb módon mérve fel ezen betegcsoport kockázatát az érlemezésedés kialakulására. Szignifikánsan magasabb összkoleszterin, LDL-C, triglicerid és húgysav szinteket találtunk a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező betegeknél a szövődménnyel nem rendelkező betegekhez képest, igazolva ezen ismerten pro-atherogén tényezők kedvezőtlen hatását az érszövödények kialakulására. A vaszkuláris szövődménnyel rendelkező és szövődménymentes betegcsoport HDL-C szintje között nem találtunk szignifikáns eltérést. A jelentős mértékben a HDL-hez kötötten keringő MPO szintje szignifikánsan magasabb volt a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező csoportban, igazolva a nagyobb mértékű oxidatív stresszt ezeknél a betegeknél. A PON1 arileszteráz és paraoxonáz aktivitásban szignifikáns mértékű különbséget nem találtunk, feltehetően a jelentős egyéni aktivitás eltérések miatt. Szignifikáns pozitív korrelációt mutattunk ki az MPO és MMP-9, valamint az MPO és a TIMP-1 szintek között a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező és nem rendelkező betegeknél egyaránt, ami jelezheti az ismert szövődménnyel még nem rendelkező betegek szubklinikus, tüneteket még nem okozó, de már jelen lévő kezdődő

érelmeszesedését. Az MPO szint és a PON1 arileszteráz aktivitás között szignifikáns negatív korrelációt találtunk mind a teljes betegpopulációban, mind a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező és nem rendelkező alcsoportokban. Ugyanakkor a PON1 paraoxonáz aktivitás és az MPO szint közötti negatív összefüggést nem bizonyult szignifikáns mértékűnek. A szoros inverz korrelációt magyarázza az MPO és a PON1 szoros kapcsolata és egymásra kifejtett gátló hatása, melyet *in vitro* vizsgálatok bizonyítottak. Ennek hatásra vezették be az MPO/PON1 arányt a HDL funkció jellemzésére, mely vizsgálatunk eredményei alapján szignifikánsan magasabbnak bizonyult a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező csoportban a szövődménymentes csoporthoz viszonyítva, alátámasztva az MPO/PON1 arány alkalmazásának potenciális hasznát a kardiiovaszkuláris kockázatbecslésben. Többszörös regressziós analízist alkalmazva azt találtuk, az MMP-9 és TIMP-1 szint, valamint a PON1 arileszteráz aktivitás az MPO szint szignifikáns prediktorai mind a teljes betegpopulációt, mind a vaszkuláris szövődménnyel nem rendelkező alcsoportot tekintve. A vaszkuláris szövődménnyel rendelkező betegeknél azonban az MPO szint egyetlen független prediktora a PON1 arileszteráz aktivitás volt. Eredményeink rávilágítanak az érelmeszesedés folyamatában részvevő pro- és anti-oxidáns enzimek és egyéb fehérjék működésének komplexitására, az egymásra kifejtett hatások sokrétű jellegére, mely magyarázza az egyes biomarkerek alkalmazhatóságának korlátait klinikai gyakorlatban. Aláhúzza ugyanakkor a HDL funkció jelentőségét, melynek komplex értékeléséhez a mai napig nem áll rendelkezésre igazoltan hatékony módszer. Eredményeink első ízben igazolták az MPO és az MMP-9, valamint az MPO és a TIMP-1 szintek közötti szoros összefüggéseket, és megerősítették a más beteganyagon észlelt összefüggéseket az MPO szint és a PON1 aktivitás között kezeletlen hyperlipidaemiás betegekben.

A paraoxonáz aktivitás és a mieloperoxidáz szint összefüggése egyes vaszkuláris markerek szintjével

Számos korábbi vizsgálat bizonyította, hogy a statin és ezetimib kezelés jelentősen befolyásolja a kardiiovaszkuláris markerek szintjét. Ezért az érelmeszesedés kialakulásában résztvevő fehérjék szerepe kezelt betegeken nem vizsgálható megfelelő módon, mivel a legtöbb hyperlipidaemiás beteg esetén kezdődő érelmeszesedés már megfigyelhető, még ha a klinikumban alkalmazott vizsgálómódszerekkel még nem kimutatható mértékű is. Ezért az általunk vizsgált frissen diagnosztizált, még kezeletlen, részben már vaszkuláris szövődménnyel rendelkező, részben vaszkuláris szövődmény mentes betegcsoport vizsgálata értékes információkkal szolgálhat.

Ismert, hogy hyperlipidaemiás betegekben a polimorfonukeáris leukociták termelte MPO és a szérumban MPO aktivitás emelkedett. A saját betegeinknél talált pozitív összefüggés az MPO, valamint a sCD40L, ADMA és sICAM-1 szintek között a teljes betegcsoportban alátámasztja azt, hogy a polimorfonukeáris leukociták jelentős szerepet játszanak az érlemezés korai szakaszának kialakulásában. Az ADMA korábbi megfigyelések szerint csökkenti a polimorfonukeáris leukociták nitrogén monoxid termelését, mely fokozza a leukociták endothel sejtekhez történő adhézióját, szuperoxid anion és MPO termelését. Az általunk talált szignifikáns pozitív korreláció az ADMA és az MPO szintje között alátámasztja a fenti ADMA/MPO interakció koncepcióját. Bár a PON1 aktivitás kedvező hatása az érlemezés folyamatában jól ismert, a pontos mechanizmus nem tisztázott minden részletében. A PON1 laktónáz aktivitásának jelentősége az immunrendszer működésében korábban már felmerült. Az 5-hidroxi-ikozatetrénsav (5-HETE) laktont a PON1 képes bontani, mely hozzájárulhat a PON1 lokális gyulladáscsökkentő hatásához. Mivel a PON1 laktónáz és arileszteráz aktivitása szorosan korrelál, az általunk észlelt szignifikáns negatív korreláció a sCD40L, ADMA és sICAM-1 szintekkel a teljes betegcsoportban a PON1 laktónáz aktivitásából fakadó anti-inflammatorikus hatását tükrözheti. Érdekes módon többszörös regressziós analízist végezve azt találtuk, hogy a PON1 arileszteráz aktivitás az MPO szérumban szintjének független prediktora, de csak a vaszkuláris szövődménnyel még nem rendelkező betegcsoportban, ami arra utalhat, hogy az érlemezés kezdeti szakaszában a korábban leírt HDL-MPO-PON1 hármass komplexnek klinikai szempontból is van jelentősége. Vizsgálatunk először igazolta a PON1 arileszteráz aktivitás valamint a szérumban sCD40L, ADMA és sICAM-1 szintek közötti szignifikáns negatív, illetve a szérumban MPO valamint a sCD40L, ADMA és sICAM-1 szintek közötti szignifikáns pozitív korrelációkat kezeletlen hyperlipidaemiás betegek vizsgálata során. Eredményeink rávilágítanak a HDL-hez között pro- és antioxidáns hatású enzimek jelentőségére az endothel diszfunkció és az érlemezés korai szakaszához kapcsolódó gyulladásos folyamatokban.

A HDL szubfrakciók és a HDL-hez kötött enzimek vizsgálata

A HDL funkció és összetétel összefüggése a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásával a mai napig vitatott kérdés, ezért a témában végzett új kutatási eredmények mindegyike nagy jelentőséggel bír. A szubfrakciók meghatározását illetően szintén nem egységes az álláspont, de a kutatási eredmények többsége azt igazolta, hogy a lipidekben gazdagabb, nagyobb méretű HDL2 szubfrakció főként a reverz koleszterin transzportban bír jelentőséggel, így védő hatású az érlemezés

és a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulása szempontjából, míg a nagyobb fehérje tartalmú, kisebb méretű HDL3 szubfrakció kedvező hatása az érlelmeszesedés szempontjából kevésbé nyilvánvaló, de számos antioxidáns enzim, köztük a PON1 hordozója. Kezeletlen hyperlipidaemiás, igazolt vaszkuláris szövödménnyel még nem rendelkező betegeinknél a poliakrilamid gélelektroforézissel meghatározott HDL szubfrakciók aránya a kisebb HDL részecskék irányba tolódott el az egészséges kontroll csoporthoz képest, ami vélhetően kedvezőtlen a hyperlipidaemiás betegek szempontjából. Ugyanakkor ezek az eltérések nem jelentős mértékűek, és az alkalmazott módszer akár jelentős mértékben módosíthatja a kapott eredmény ugyanazon betegcsoporton is, ami ráirányítja a figyelmet a HDL funkciós vizsgálatok jelentőségére, melyek közül a HDL felszínén egymáshoz fizikai közelségben elhelyezkedő PON1 aktivitását és az MPO szintjét vizsgáltuk a betegek szérumból mintáiból.

Sem a PON1 paraoxonáz, sem az arileszteráz aktivitás nem mutatott szignifikáns eltérést az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva. A PON1 aktivitás egyénenkénti igen nagy, akár 40-szeres variabilitása azonban megnehezíti az értékelést. Mivel a PON1 génpolimorfizmusai, elsősorban a PON1-Q192R ebben jelentős szerepet játszik, kettős szubsztrát módszerrel meghatároztuk a betegek és a kontrollok fenotípus megoszlását, mely mindkét csoportban követte a Hardy-Weinberg egyensúlyt és nem mutatott szignifikáns eltérést egymástól. Mindez alátámasztja azt az általános szakmai véleményt, mely szerint önmagában a PON1 aktivitás mérése nem elegendő a HDL funkció értékelésére, ezért, mint biomarker, alkalmatlan a kardiovaszkuláris kockázat felmérésére. A prooxidáns, szérumból MPO szintjét azonban szignifikánsan nagyobbak találtuk az egészséges kontroll vizsgálatokhoz képest, hasonlóan korábbi vizsgálatainkhoz. Mivel a HDL felszínén a PON1 és az MPO egymásra kölcsönösen gátló hatást fejtenek ki, korábbi tanulmányok felvetették az MPO/PON1 arány, mint a HDL funkciózavarának jellemzőjének alkalmazását a szív- és érrendszeri betegségek kockázatbecslésére. Meghatározva az MPO/PON1 arányt, az szignifikánsan nagyobbak bizonyult a hyperlipidaemiás betegekben a kontroll populációhoz viszonyítva, jelezve a HDL funkciójának prooxidáns irányú eltolódását. A vizsgálat újdonságát a vizsgált paramétereket egyébként jelentősen befolyásoló lipidszökkentő kezelés hiánya és a HDL összetétel és funkció együttes vizsgálata szolgálja.

Az atorvastatin kezelés hatása a HDL funkciójára és összetételére

Egy korábbi tanulmány arról számolt be, hogy az atorvastatin hidroxilált metabolitjai képesek kivédeni az egyes lipoprotein frakciók *in vitro* oxidációját. Egy másik vizsgálat igazolta, hogy az atorvastatin o-hidroxi metabolitja dóziszfüggő módon gátolja az LDL oxidációját, míg más statin ágensek jóval kisebb mértékben fejtettek ki gátló hatást. Az atorvastatin tehát kifejezett antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik.

Az atorvastatin kezelés hatásának vizsgálata a PON1 aktivitásra és a Comet assay-vel detektált oxidatív DNS-károsodásra

Az LDL oxidatív módosulása az érlelmeszesedés kialakulásának egyik legfontosabb kezdeti lépése, többek között csökkenti az NO szintjét, mely a gyulladásos folyamatokkal együtt endothel diszfunkciót eredményez. Az LDL oxidációja kapcsán, a többszörösen telített zsírsavak peroxidációja során képződött lipid peroxidok egy láncreakció végeredményeként igen reaktív végtermékek, köztük MDA, 4-hidroxi alkánok és 2-alkének keletkezését okozzák, melyek DNS szerkezetének jelentős károsodását, annak fragmentációját, DNS kereszkötések és adduktok kialakulásához vezetnek, ezáltal mutagének. A HDL-hez kötött PON1 a lipid peroxidok hidrolízise révén az LDL oxidációt képes gátolni. Munkacsoportunk korábban már igazolta a PON1 aktivitás és a comet assay-vel detektált oxidatív DNS károsodás mértéke közötti negatív korrelációt hyperlipidaemiás betegenél. Hatékony lipidcsökkentő és antioxidáns tulajdonsága miatt vizsgáltuk három hónapos atorvastatin kezelés hatását a PON1 aktivitásra, a szuperoxid anion és TBARS szintekre és a comet assay-vel detektált oxidatív DNS károsodásra hyperlipidaemiás betegekben.

A kezelés az irodalmi adatoknak megfelelő mértékben csökkentette az összkoleszterin és az LDL-C szintet, míg nem találtunk szignifikáns eltérést a HDL-C és triglicerid szintek tekintetében. Vizsgálatunkban a három hónapos atorvastatin kezelés szignifikánsan emelte a PON1 paraoxonáz aktivitást, míg a só stimulált paraoxonáz aktivitás és az arileszetráz aktivitás nem változott szignifikáns mértékben. A PON1 szérum koncentrációjában sem találtunk szignifikáns változást, de az egységnyi HDL-re jutó PON1 paraoxonáz aktivitás, azaz PON1/HDL arány szignifikánsan nőtt a kezelés hatására. A PMA indukált szuperoxid anion és a TBARS szint szignifikánsan csökkent, vagyis eredményeink alátámasztják az atorvastatin korábban leírt kedvező hatásait az oxidatív folyamatokra. A nyugalmi állapotban mért szuperoxid anion szint nem változott szignifikánsan a kezelés során. Az FMLP indukált szuperoxid anion termelés ugyanakkor szignifikánsan emelkedett. Egy korábbi *in vitro* vizsgálat hasonló eredményre jutott, melyet az FMLP receptor útvonal módosulásával magyaráztak. Ennek oka a hyperlipidaemia következtében a polimorfonukleáris sejtek megváltozott

membránfluiditása lehet, mely mind az FMLP receptor, mind a PKC aktivitást befolyásolhatja. A lipid preoxidációra gátló hatást kifejtő plazma NO szint nem szignifikáns mértékben, de emelkedett az atorvastatin kezelés során, mely eredmény egybeesik azon korábbi vizsgálatokban leírtakkal, melyben az atorvastatin emelte a NOS expresszióját az endothel sejtekben az mRNS stabilitásának fokozásán keresztül. A fribrátok, ezen belül a ciprofibrát comet assay-vel mért oxidatív DNS károsodásra kifejtett kedvező hatására az irodalomból ismert. Egy *in vitro* tanulmány pedig fluvastatin DNS károsodást gátló hatásáról számolt be. Vizsgálatunk eredményei szerint az atorvastatin kezelés szignifikánsan csökkentette a comet-assay-vel detektált oxidatív DNS károsodás mértékét. A visual score eredmények negatívan korreláltak az antioxidáns hatást jellemző PON1 paraoxonáz aktivitással és a só stimulált paraoxonáz aktivitással a kezelés előtt és után egyaránt, míg az enzim szintjével korreláló arileszteráz aktivitással nem találtunk hasonló összefüggést. Mindez arra utal, hogy az oxidatív DNS károsodás mértékének csökkentésében a PON1 paraoxonáz aktivitás fontos szerepet játszik, míg az enzim szérumszintje kevésbé meghatározó. A vizsgálat elsőként igazolta humán beteganyagban a statinok, ezen belül az atorvastatin kedvező hatását az oxidatív DNS károsodásra, és talált összefüggést a PON1 aktivitással ennek mértékét tekintve.

Az atorvastatin kezelés hatásának vizsgálata a HDL szubfrakciókra és a HDL-hez kötött enzimek (PON1, LCAT és CETP) aktivitására

Az atorvastatin az irodalmi adatoknak megfelelő mértékben, a várt módon csökkentette az összkoleszterin, a triglicerid, az LDL-C és az ApoB szintjét, valamint az LDL-C/ApoB arányát, igazolva az atorvastatin hatékony HMG-KoA reduktáz gátló hatékonyságát. Ismert, hogy az atorvastatin kiemelkedő antioxidáns hatékonysággal rendelkezik, mely megkülönbözteti más statin ágensektől. A vizsgálatunk során a három hónapos atorvastatin kezelés hatására kialakult szignifikáns oxLDL szint csökkenést mindez magyarázhatja. Az oxLDL csökkent szintje miatt a PON1 aktivitás megőrzött marad, mely részben magyarázatul szolgálhat a jelzett, nem szignifikáns mértékű PON1 paraoxonáz aktivitás emelkedésre. A HDL3 szubfrakció védő szerepét korábban már több szerző igazolta. Korábban az atorvastatin kezelés hatását az LDL és HDL szubfrakciókra csak kevesen vizsgálták, és a kapott eredmények igen eltérőek részben a vizsgált betegcsoport jellegéből, részben az alkalmazott atorvastatin dózistól, részben a szubfrakció meghatározásra használt módszertől függően. Saját vizsgálatunkban a három hónapos atorvastatin kezelés hatására szignifikánsan nőtt a HDL3 szubfrakció aránya, míg a HDL2a és 2b szubfrakciók aránya ennek megfelelően

csökkent. Mivel a PON1 döntően a HDL3 szubfrakcióhoz kötődik, a szubfrakciókban észlelt eltolódás is hozzájárulhat a jelzett PON1 aktivitás növekedéshez. Emellett szignifikánsan nőtt az átlagos LDL méret, mely az éremeszesedés szempontjából kedvezőtlen, kicsi, sűrű LDL részecskék arányának csökkenésére utal, egybehangzóan számos irodalmi adattal. Korábbi vizsgálatok alapján az atorvastatin csökkenti a CETP aktivitását. Jelen vizsgálatunkban szintén a CETP aktivitás szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. Ez felelhet a HDL3 szubfrakció arányának emelkedéséhez, melyet alátámaszt a HDL3 százalékos aránya és a CETP aktivitás közötti szignifikáns negatív korreláció. A CETP aktivitás negatívan, de nem szignifikáns mértékben korrelált a HDL2a aránnyal, a CETP aktivitás változása viszont szignifikáns negatív korrelációt mutatott a HDL2a arány változásával. A HDL2b szubfrakció aránya ugyanakkor szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a CETP aktivitással, mely alátámasztja a CETP központi szerepét a szubfrakciók kialakulásában. Eredményeink egybevágnak egy korábbi vizsgálat eredményeivel, bár ettől eltérő adatokat is közöltek. Bár egy korábbi vizsgálatban az LCAT aktivitás és a nagy HDL2a szubfrakció között negatív korrelációt írtak le, saját vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns összefüggést az LCAT aktivitás és a szubfrakciók aránya között. Ugyanakkor, az atorvastatin kezelés hatására szignifikánsan nőtt az LCAT aktivitás, és ennek változása pozitívan korrelált a HDL2a szubfrakció arányának változásával, mely megfigyelés okainak tisztázása további vizsgálatokat igényel. Az atorvastatin kedvező hatását a PON1 szintre és aktivitásra FH betegcsoporton korábban már leírták. Egy másik vizsgálat azt igazolta, hogy bár a PON1 egyformán képes kötődni az ApoA1 és ApoA2 tartalmú HDL részecskékhez, az ApoA1-et és ApoA2-t is tartalmazó HDL részecskékhez kötött PON1 jobban ellenáll az oxidatív stressz okozta PON1 inaktivációnak, mint a csak ApoA1-et tartalmazó HDL-hez kötött PON1. Bár a PON1 aktivitás és a szubfrakciók megoszlása között nem találtunk összefüggést, a HDL3 szubfrakció arányának növekedése, mely nagyobb arányban tartalmaz ApoA1/A2 tartalmú partikulumokat, hozzájárulhat a PON1 aktivitás megőrzéséhez. Bár az atorvastatin kezelés során vizsgált paramétereket külön-külön már többnyire vizsgálták korábban, komplex módon hyperlipidaemiás betegekben először kerültek közlésre.

Az ezetimib kezelés HDL szintre kifejtett hatékonyságát befolyásoló genetikai tényezők vizsgálata

A koleszterin anyagszere endogén és exogén útvonalát, és ezen keresztül a szérumban a koleszterin és triglicerid szintjét is jelentősen befolyásolják a részvevő fehérjék, köztük az apolipoproteinek, enzimek és receptorfehérjék génpolimorfizmusai. Az utóbbi

időben egyre nagyobb figyelem irányul az gyógyításban a személyre szabott orvoslásra, melynek során figyelembe veszik az adott egyén jellemzőit, beleértve az alkalmazott terápiára adott választ is, melyet szintén nagymértékben az adott gyógyszer felszívódásában, hatásában és metabolizmusában részvevő fehérjék génpolimorfizmusai szabnak meg. Az ezekre vonatkozó információk segíthetnek megérteni azt, hogy az egyes betegek számára egyik vagy másik kezelés igen eltérő hatékonyságú, ami a nagy betegszámú multicentrikus randomizált tanulmányok eredményein nyugvó terápiás irányelvek világában nehezíti az adott egyén számára ideális kezelési mód kialakítását. Az ezetimib a vékonybélben történő koleszterin felszívódás gátlásán keresztül fejti ki hatását. Statin kezeléssel kombinálva igen jelentős, akár 65%-os LDL-C csökkentésre képes. Az ezetimib a jelenlegi terápiás irányelvek alapján monoterápiában csak az abszolút statin intoleráns betegek esetén ajánlott. Bár monoterápiában az LDL-C csökkentő hatása, mely átlagosan 18%-os, elmarad a hatékony statinokétól, kiváló tolerálhatósága miatt alkalmas kezelés a statin intoleráns betegek kezelésére a mindennapi klinikai gyakorlatban. Ez a hatás azonban egyénenként igen jelentős eltéréseket mutat, egyeseknél alig van mérhető LDL-C csökkenés, míg másoknál akár az 50%-ot is elérheti attól függően, hogy az egyén inkább „felszívó” vagy „szintetizáló” típusba tartozik. Az eltérések mögött ebben az esetben is génpolimorfizmusok állnak, mely közül az ApoE és a NPC1L1 génjeinek polimorfizmusait vizsgáltuk.

Az ApoE génpolimorfizmus ezetimib monoterápia hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálata statin intoleráns betegekben

A koleszterin anyagcserét befolyásoló génpolimorfizmusok közül az egyik legjelentősebb az ApoE polimorfizmus hatása, mely alapvetően befolyásolja a bélben történő koleszterin felszívódás hatékonyságát, a szterolok májba történő receptor-mediált felvételét, a máj koleszterin termelését és az LDL receptorok expresszióját. Korábbi vizsgálatok alapján az $\epsilon 2$ allél hordozók esetén a leghatékonyabb a bélből történő koleszterin felszívódás, míg az $\epsilon 3$ allél jelenléte esetén közepes, az $\epsilon 2$ allél esetén alacsony a felszívódás mértéke. Ugyanakkor a koleszterin szintézis ezzel ellentétesen $\epsilon 2$ allél hordozás esetén a legnagyobb mértékű, és az $\epsilon 4$ allél jelenléte esetén a legalacsonyabb. Vizsgálatunkban statin intoleráns hyperlipidaemiás betegeken értékeltük az ApoE polimorfizmusnak az ezetimib monoterápia hatékonyságára kifejtett rövid és hosszútávú hatását. Az ezetimib kezelés a teljes betegpopuláción az egy éves követés során az irodalmi adatoknak megfelelően szignifikánsan csökkentette az összkoleszterin, az LDL-C, a triglicerid, és az ApoB szintjét, míg a HDL-C és az ApoA1 szintje nem változott szignifikáns mértékben. A betegek ApoE genotípus és

allél megoszlása a vizsgált betegek esetén lényegében megegyezett a korábbi hazai populáción találtakkal. A különböző genotípusú betegek kiindulási lipidparaméterei szignifikánsan nem tértek el, bár az $\epsilon 2$ hordozók esetén tendenciáját tekintve magasabb triglicerid és alacsonyabb LDL-C szintek észlelhetők. Az ezetimib kezelés hatására az összkoleszterin és LDL-C csökkenés kifejezettebb volt a 3/4 genotípus esetén a 2/2 genotípushoz viszonyítva, míg a trigliceridszint csökkenés a 2/2 genotípus esetén bizonyult a legnagyobb mértékűnek, de a csoportok közötti különbségek nem voltak szignifikáns mértékűek. A betegek a kezelés jól tolerálták, a kezelés elhagyására vagy felfüggesztésére mellékhatás kialakulása miatt egyetlen esetben sem került sor. Eredményeink alátámasztják az ezetimib monoterápia rövid és hosszútávú hatékonyságát és igazolják az ezetimib kezelés biztonságos voltát. Elsőként vizsgáltuk, a szokásosnál hosszabb, egy éves követési periódussal, az ApoE polimorfizmus befolyásoló szerepét az ezetimib monoterápia hatékonyságára, azonban ennek igazolására nagyobb betegszámú populáción elvégzett vizsgálatok szükségesek.

A NPC1L1 génpolimorfizmusok ezetimib monoterápia hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálata statin intoleráns betegekben

A NPC1L1 génjében számos polimorfizmust írtak le, melyek közül a NPC1L1 c.-133 A>G promóter polimorfizmus esetén korábban kimutatták a statin és a kombinált statin+ezetimib kezelés hatékonyságának eltéréseit. Az ezetimib monoterápiára gyakorolt hatásáról azonban korábban nem volt adat. Ezetimib monoterápiában részesülő statin intoleráns betegeket követtünk egy éven keresztül, és értékeltük a fenti polimorfizmus hatását a kezelés hatékonyságára. A teljes vizsgálati populáción kezelés az irodalmi adatoknak megfelelően befolyásolta a lipid paramétereket, szignifikáns mértékben csökkentve az összkoleszterin, LDL-C, ApoB és triglicerid szinteket. A genotípus megoszlás és az allélfrekvencia megfelelt egy korábbi vizsgálatban közöltekkel. A GG genotípus alacsony aránya miatt a betegeket csak A allélt hordozó AA és G allélt hordozó AG+GG csoportba osztottuk. A két vizsgált csoport között a kiindulási lipid paraméterekben nem volt szignifikáns letérés. Az egy éves ezetimib kezelés a két csoportban egyedül az ApoA1 szintek változásában mutatott szignifikáns és következetes eltérést. Míg az AA csoportban nem szignifikáns, mérséklet csökkenést, addig az AG+GG csoportban szignifikáns, jelentős mértékű emelkedést tapasztaltunk az ApoA1 szintekben végig a kezelés során. Bár a HDL-C szintek az ApoA1 szintjéhez hasonlóan ellentétes irányban változtak a két csoportban, az eltérések nem bizonyultak szignifikáns mértékűnek. Az eredmények alapján felmerül a HDL szerkezeti módosulása az ezetimib kezelés hatására, mely egyúttal a HDL funkcióját is

befolyásolhatja. A betegek a kezelést ezúttal is jól tolerálták. Elsőként igazoltuk, hogy az ezetimib monoterápia ApoA1 szintre kifejtett hatékonyságát jelentősen befolyásolja a NPC1L1 c.-133 A>G promóter polimorfizmus, mely a HDL struktúrájának változásán keresztül annak érelmeszesedést gátló tulajdonságait is befolyásolhatja.

A szelektív LDL aferezis kezelés hatásnak vizsgálata egyes biológiai aktív fehérje szintekre súlyos heterozigóta familiáris hypercholeszterinaemiás betegekben

A szelektív LDL aferezis kezelés hatásnak vizsgálata a szérum chemerin szintekre súlyos heterozigóta familiáris hypercholeszterinaemiás betegekben

A korábbi irodalmi adatoknak megfelelően a szelektív LDL aferezis kezelés szignifikánsan csökkentette az FH betegek összkoleszterin, LDL-C és Lp(a) szintjét. Emellett az aferezis kezelés pleiotróp hatásairól is vannak irodalmi adatok, mely szerint a kezelés csökkenti számos gyulladásos citokin, kemokin és adhéziós molekula, továbbá a CRP plazmaszintjét. Bár e hatások pontos mechanizmusa nem tisztázott, mind az oszlophoz történő direkt kötődés, mind az indirekt, az említett fehérjék génexpresszióján keresztül megvalósuló hatás lehetősége felmerült. Az LDL aferezis előtt és után elvégzett proteomikai analízis során több mint hetven fehérje csökkent szintjét igazolták, melyek között a vérárvadási kaskádban szereplő, gyulladásos, adhéziós és rheológiai szempontból egyéb fontos fehérjék szerepelnek. Korábban a chemerin szintek változását az aferezis kezelés során nem vizsgálták, így hat súlyos heterozigóta FH beteg első kezelése során a lipidparaméterek mellett a chemerin szintet, valamint az LDL és HDL szubfrakciók arányát is meghatároztuk. A kezelés hatására a szérum chemerin szintje minden beteg esetén csökkent, a változás szignifikáns mértékűnek bizonyult. Egy beteg esetén, hosszútávon, egy éven keresztül követtük a chemerin szintek alakulását, mely kezelésről kezelésre csökkent, majd a kezelés átmeneti felfüggesztését követően ismét megközelítette a kiindulási értéket. Az újabb rendszeres kezelésekre hatására a chemerin szintje ismét jelentősen csökkent. Mivel a chemerin pro-inflammatorikus és pro-atherogén hatással rendelkezik, a szelektív LDL aferezis kezelés chemerin szint csökkentő hatása hozzájárulhat a kezelés hosszútávú kedvező eredményeihez az érelmeszesedéssel járó szövődmények kialakulása szempontjából. A chemerin csökkentés mechanizmusának tisztázása céljából a kezelést követően a fehérjéket az alkalmazott oszlopról eluáltuk, és az eluáló oldatban jelentős mennyiségű chemerint mutattunk ki, igazolva az oszlophoz történő kikötődést. Bár nem találtunk irodalmi adatot a chemerin felszíni töltését illetően, feltételeztük, hogy a negatív töltésű felülethez a többszörösen pozitív töltésű ApoB100-

hoz hasonlóan képes kikötődni. Ugyanakkor felmerülhet az is, hogy a chemerin egy másik, pozitív töltésű molekulához vagy lipoproteinhez kapcsolódva kötődik az oszlophoz indirekt módon. Korábban már vizsgálták az LDL szubfrakciók változását az LDL aferezis során, és azt találták, hogy akisebb, sűrűbb LDL részecskéket nagyobb arányban távolítja el a rendszer, és a szubfrakciós mintázata anti-atherogén irányba tolódik el. Vizsgálatunk során a kifejezetten atherogén, kicsi, sűrű LDL részecskék szintje és aránya is szignifikánsan csökkent. A HDL szubfrakciók vizsgálata során a kis HDL szubfrakció arányának csökkenését, valamint a közepes és nagy HDL szubfrakciók arányának növekedését tapasztaltuk a HDL-C szint mérsékelt csökkenése mellett. Mivel általánosan elfogadott, hogy a nagyobb HDL szubfrakciók a reverz koleszterin transzportban betöltött szerepük miatt anti-atherogén hatást fejtenek ki, a HDL szubfrakciók arányának eltolódását a nagyobb részecskék felé szintén kedvezőnek tartjuk a betegek szempontjából. Mivel egy korábbi vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a keringő chemerin szint pozitívan korrelál a kicsi, sűrű LDL szintjével, valamint a kicsi HDL szubfrakcióval felvetődött, hogy a chemerin egyéb pro-atherogén tulajdonságai mellett talán kedvezőtlen hatást gyakorol a lipoproteinek metabolismusára, ugyanakkor a kezelés során észlelt változások inkább arra utalhatnak, hogy a chemerin legalább részben e szubfrakcióhoz kötődik a keringésben. Bár a vizsgálatba bevont betegek száma igen alacsony, elsőként bizonyítottuk a szelektív LDL aferezis kezelés szérumszintű chemerin szintet csökkentő hatását rövid és hosszútávon egyaránt, emellett adatokkal szolgáltunk a csökkenés mechanizmusát illetően, kimutatva a chemerin oszlophoz történő kikötődését.

A szelektív LDL aferezis kezelés hatásnak vizsgálata a szérumszintű afamin és E vitamin szintekre

A tokoferol a lipoproteinekhez kötődő egyik leghatékonyabb antioxidáns, de összefüggését a FH betegek afamin szérumszintjével, illetve az LDL aferezis kezelés hatását a tokofeol és afamin szintekre korábban nem vizsgálták együttesen. Az afamin fontos szerepet játszik a sejtek anti-apoptotikus válaszában az oxidatív folyamatok során, és ígéretes új marker lehet 2-es típusú diabetes mellitusban, valamint a terhesség során kialakuló anyagcsere rendellenességekben. Emellett szolubilizálja a hidrofób, nehezen oldódó Wnt fehérjéket, amelyek számos alapvető sejtfolyamat, köztük az őssejt regeneráció, csontképződés, és karcinogenezis szabályozásában vesznek részt. FH betegekben a fokozott oxidatív stressz és a csökkent csontsűrűség megjelenése jól ismert. Eredményeink alapján az afamin szintje ebben a súlyos FH betegcsoportban a kontroll csoporthoz képest magasabb. Bár ennek pontos oka nem

ismert, talán a fenti, FH-ban észlelt eltérésekre adott védekező válaszreakció részét képezi. Bár a kis esetszám miatt vizsgálatunk pilot jellegű, eredményeink alapján a szelektív LDL aferezis kezelés során szignifikáns mértékben csökkent a szérum afamin szint, átlagosan 9,4%-kal. Ezzel párhuzamosan a HDL-C és Az ApoA1 szint is csökkent. Mivel az afaminnak csak kisebb hányada, kb. 13%-a kötődik a HDL-hez, a mérsékelt HDL-C szint csökkenés nem magyarázza a jelentős afamin szint csökkenést. Az afamin/HDL-C és az afamin/ApoA1 arány nem is változott szignifikáns mértékben a kezelés hatására. Korábbi vizsgálatok során azt igazolták, hogy a HDL részecskék közül az afamin főként a kicsi, nagyon sűrű szubfrakcióhoz kötődik. Mivel vizsgálatunkban a kezelés hatására a HDL szubfrakciókon belül a nagyobb szubfrakció felé találtunk eltolódást, a kezelés során eltávolított kisebb HDL részecskék legalább részben felelősek lehetnek az afamin szintjének csökkenéséért. Ugyanakkor valószínűleg számos egyéb szérumfehérje képes kötni a keringésben az afamint. Az afamin direkt kötődése az oszlophoz lehetséges, de nem zárható ki, hogy az afamint kötő fehérjék kikötődése felel az afaminszint csökkenéséért. Korábbi *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok igazolták, hogy az afamin több tokoferol kötőhellyel rendelkezik. Különösen nagy affinitással köti az α - és γ -tokoferolt, melyek az E vitamin fegfontosabb típusai. Mivel korábban beszámoltak a szelektív LDL aferezis kezelés α - és γ -tokoferol szintet csökkentő hatásáról, felteteleztük, hogy ennek oka az afamin szint csökkenése a kezelés során. hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz, az α - és γ -tokoferol szint jelentős csökkenését tapasztaltuk az LDL aferezis kezelés során. Ugyanakkor, az igen jelentős összkoleszterinszint csökkenés következtében az α -tokoferol/összkoleszterin és a γ -tokoferol/összkoleszterin arányok szignifikánsan nőttek a kezelés hatására. Az α - és γ -tokoferol szint csökkenése sokkal nagyobb arányúnak bizonyult, mint az afaminszint csökkenés, és a tokoferolszint csökkenés jobban korrelált az LDL-C szint változásával, mint az afaminéval. Mindezek alapján a keringő α - és γ -tokoferol szintet az afamin szintje döntően nem befolyásolja. Mindez alátámasztja az a korábbi megfigyelést, mely szerint a plazma afamin és E vitamin szintje nem mutat szoros összefüggést, és az E vitamin döntően lipoproteinekhez kötötten transzportált. Érdekes módon a kontroll populációhoz képest az FH betegek kiindulási α - és γ -tokoferol szintje jelentősen magasabb. Korábbi vizsgálatok egyéb hyperlipidaemiás betegeknél hasonló eredményekről számoltak be. Ezen arányok emelkedése a kezelés hatására az oxidatív stresszre gyakorolt kedvező hatást tükrözheti, melyet az oxLDL szint jelentős csökkenése is alátámaszt. Az LDL aferezis kezelés oxLDL szint csökkentő hatása egyébként ismert. A csökkenés mértéke olyan kifejezett, hogy a kezelés végén mért értékek még a kontroll populáció oxLDL szintjénél is

alacsonyabbak. A HDL szubfrakciók változását az LDL aferezis kezelés hatására csak néhány esetben vizsgálták. Az eltérő kezelési módok és mérési módszerek miatt a korábbi adatok igen eltérőek, és nehezen összevethetőek. Vizsgálatunkban a kis HDL frakció csökkenése szignifikánsan nagyobb volt, mint a nagy HDL szubfrakcióé, azonban ennek hosszútávú klinikai haszna nem egyértelmű. Az FH betegekben a kezelés előtt a kis HDL szubfrakció aránya szignifikánsan nagyobb, míg a nagy HDL szubfrakcióé szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll populációé. Mindezek alapján valószínű, hogy a kezdeti nem megfelelő arányt a HDL szubfrakciók megoszlásában az aferezis kezelés legalább részlegesen helyrehozza, így vélhetően kedvező hatású. A kapott eredmények adalékul szolgálnak az LDL aferezis kezelés nem-lipid hatásainak igazolásához.

ÚJ EREDMÉNYEK

Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiában szenvedő betegekben:

1. Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a PON1 paraoxonáz és só-stimulált paraoxonáz aktivitás és az artéria carotis intima média vastagság között a teljes vizsgált populációban 55 év alatti carotis szűkülettel rendelkező betegekben és kontrollokban.
2. Szignifikáns negatív korrelációt észleltünk a PON1 arileszteráz aktivitás és a MPO szintje között a teljes betegpopulációban, a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező és nem rendelkező, lipidcsökkentő kezelésben nem részesülő hyperlipidaemiás betegekben. Az MPO szintje szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az MMP-9 és a TIMP-1 szintekkel a teljes betegcsoportban, vaszkuláris megbetegedésben szenvedő és nem szenvedő, lipidcsökkentővel nem kezelt betegekben.
3. A PON1 arileszteráz aktivitás szignifikáns negatív, míg a MPO szint szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a szérum sICAM-1, sCD40L és ADMA szintjével a teljes betegcsoportban vaszkuláris megbetegedésben szenvedő és nem szenvedő, lipidcsökkentő kezelésben nem részesülő betegekben.
4. Az atorvastatin kezelés szignifikánsan emelte a PON1 paraoxonáz aktivitást és szignifikánsan csökkentette a Comet assay-vel detektált oxidatív DNS-károsodás mértékét, melyek egymással szignifikáns negatív korrelációt mutattak.
5. Az atorvastatin kezelés szignifikáns módon befolyásolta a HDL-hez kötött PON1, LCAT és CETP aktivitását, valamint a HDL szubfrakciók megoszlását. A PON1 aktivitásának emeléséhez a HDL3 szubfrakció arányának növekedése is hozzájárulhat.

6. Az ApoE genotípus ezetimib kezelésre gyakorolt hatásának vizsgálata során azt találtuk, hogy a kiindulási össz- és LDL-C szintek a legmagasabbak az ApoE 2/2 és 3/3 genotípusú betegek, legalacsonyabbak a 2/3 genotípusú betegek esetében voltak. A legmagasabb triglicerid szintet a 2/2 és 2/3 genotípusú csoportban, a legalacsonyabbat a 3/4 genotípusú betegek esetében mértük. A HDL-koleszterin szintje 3/3 genotípusú betegekben volt a legmagasabb. A myopathiás betegek esetében a 3/3 genotípus ritkábban fordult elő. Bár az össz- és LDL-koleszterin és az apoB csökkenés kifejezettebb volt a 3/4 genotípusú csoportban a 2/2 genotípusú csoporthoz viszonyítva, és a trigliceridszint csökkenés kifejezettebb volt a 2/2 genotípusú csoportban a 3/4 genotípusú betegcsoporthoz képest, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.
7. A NPC1L1 c.-133A>G génpolimorfizmus szignifikáns módon befolyásolta az ezetimib monoterápia apolipoprotein A1 szintre kifejtett hatékonyságát statin intoleráns betegekben. Az AA genotípusú betegekkel szemben az AG+GG genotípusúak esetén az ApoA1 szintje szignifikánsan emelkedett az ezetimib kezelés hatására.
Súlyos familiáris hypercholesterinaemiában szenvedő betegekben:
8. Igazoltuk, hogy a szelektív LDL aferezis kezelés szignifikánsan csökkenti a szérumban a chemerin szintet már az első kezelés során, és a kedvező hatás a 12 hónapos követés során is megmaradt. A chemerin szint csökkenésért az alkalmazott aferezis oszlophoz történő kötődés tehető felelőssé.
9. A szelektív LDL aferezis kezelés mérsékelten, de szignifikáns mértékben csökkenti a szérumban az afamin és E vitamin (α - és γ -tokoferol) szintjét, de szignifikánsan emeli az α -tokoferol/koleszterin és a γ -tokoferol/koleszterin szinteket. Az α - és γ -tokoferol szintjének csökkenéséért a transzportjukért felelős egyéb fehérjék és lipoproteinek eltávolítása felelhet.

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

Az irányelvek alapján optimálisnak tartott kezelés ellenére a betegek jelentős részénél kardiovaszkuláris megbetegedés alakul ki. Az érfali gyulladásos, immun és oxidatív folyamatok jelentős hányadát teszik ki ennek a maradék kockázatnak. A PON1 szerepét mind az érlelmeszesedés biomarkereként, mind lehetséges antioxidánsként, terápiás területen is számtalanszor felvetették. A PON1 aktivitás és az IMT szoros kapcsolata a vizsgált 55 év alatti betegcsoportban arra utal, hogy a kockázatbecslés szempontjából a PON1 aktivitás mérés lényeges információ. Bár jelenleg sem a PON1 aktivitás, sem az azt befolyásoló polimorfizmusok meghatározása nem szerepel az irányelvekben, ez a jövőben változhat. Bár az enzim pótlása eddig csak organofoszfát mérgezés esetén vetődött fel, ez is egy jövőbeni terápiás lehetőség. Az enzimaktivitás emelésének másik módja az antioxidánsok, például a magas polifenol tartalmú gránátalma fogyasztása. Az atorvastatin PON1 aktivitást emelő hatása figyelemre méltó tulajdonság. Az, hogy emellett az oxidatív stressz okozta DNS károsodás mértékét is csökkenti, részben magyarázza a statinok kedvező hatását a tumorgenezis és a demencia kialakulásának kockázatára. Folyamatban van több MPO inhibitor kifejlesztése [277, 278], így az MPO szint vagy aktivitás, valamint MPO/PON1 arány mérése segíthet azonosítani a terápia szempontjából ideális, magas MPO szintű betegeket, emellett a terápia hatékonyságának követésére is alkalmas lehet. Az atorvastatin globális kedvező hatása a HDL-hez kötött enzimek aktivitására arra utal, hogy az atorvastatin ideális választás lehet azoknak, akiknél fokozott az oxidatív stressz. Az ezetimib hatékonysága egyénenként igen eltérő a genetikai variabilitásnak köszönhetően. Az ún. farmakogének, azaz a gyógyszeres terápia hatékonyságát meghatározó gének azonosításával valóban egyénre szabott terápiás megoldásokat tehet lehetővé. Az általunk leírt ApoE és NPC1L1 promóter polimorfizmusok ezetimib hatékonyságra kifejtett hatása adalékul szolgálhat a farmakogénekkel kapcsolatos kutatásokhoz. A szelektív LDL aferezis kezelés során a célzott lipidsökkentő hatás mellett egyéb fehérjék szérumszintjét is befolyásolhatjuk. Ezek ismerete segíthet megérteni a kezelés hatását, de felhívhatja a figyelmet kedvezőtlen járulékos hatásokra is, melyek a terápiás eszköz továbbfejlesztéséhez, vagy a terápia kiegészítéséhez, módosításához vezethetnek, akár új indikációk megjelenésével.

Köszönetnyilvánítás

Kiemelt köszönet illeti Paragh György Professzor urat, aki PhD témavezetőként, majd intézet- és tanszékvezetőként, valamint mentorként támogatta és végigkísérte tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom Kakuk György Professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy nappali tagozatos PhD hallgatóként, később rezidensként a Belgyógyászati Intézetben dolgozhattam, valamint Balla József Professzor úrnak, jelenlegi intézetvezetőmnek, akit számailag és emberileg is segíti a munkámat.

Köszönet illeti Buzás Edit Professzornőt, aki tudományos diákköri hallgatóként felkeltette érdeklődésemet a tudomány és a laboratóriumi munka iránt.

Hálás vagyok Gerd Schmitz Professzor úrnak és köszönöm Charalampos Aslanidis és Wolfgang Kaminski segítségét, akiktől a Regensburgi Egyetemen töltött időszakban sokat tanultam. Sokat köszönhetek Remenyik Éva Professzornőnek és Emri Gabriellának a Comet assay-vel történt munkákban nyújtott segítségért és támogatásért. Hálásan köszönöm Seres Ildikó Tanárnő állandó szakmai segítségét és baráti támogatását a kezdetektől a mai napig. Köszönöm Lőrincz Hajnalka, Katkó Mónika és a Kutató Laboratórium összes dolgozója által nyújtott rengeteg segítséget.

Köszönöm Bereczki Dániel Professzor úrnak és Magyar Tünde Tanárnőnek a közös munkában nyújtott támogatását.

Hálás vagyok Balogh István Tanár úr és Madar László támogatásáért és a genetikai vizsgálatokban nyújtott segítségért.

Köszönet illeti Balla József Professzor Urat és Soltész Pál Professzor urat, akik lehetővé tették a szelektív LDL aferezis kezelések elindítását és támogatták a kapcsolódó tudományos kutatásokat.

Köszönöm minden társszerző kollégám értékes hozzájárulását.

Hálás vagyok kitűnő végzett PhD hallgatóim: Dr. Zsíros Noémi, Varga Viktória Evelin és Szentpéteri Anita lelkes és odaadó munkájáért. Köszönöm minden TDK és PhD hallgatóm segítségét.

A kutatásokhoz elengedhetetlen a betegek és egészséges önkéntesek részvétele, melyért hálás vagyok.

Végül, de nem utolsósorban nagy köszönet illeti családomat, akik végigkísértek és támogattak az eddigi utamon. Édesapámnak, aki örök példaképem emberi és szakmai szempontból egyaránt. Édesanyámnak, aki nélkül nem boldogulnék. Páromnak, Dorner Zsoltnak, és gyermekeimnek: Annának és Gergőnek, akiknél jobbat nem kívánhatok. Köszönet Vargáné Oláh Annának és Varga Józsefnek, akik mindig támaszaim voltak.

Vizsgálatainkat a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 “Nemzeti Kiválóság Program”, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 számú projektek, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA 84196 és 115723) és a DEOEC Mec-7/2008 támogatták. A munkánkat támogatta továbbá a Debreceni Egyetem Orvos-, és Egészségtudományi Centrum Áthidaló Alapja (IB). A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

Készült a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 „A magyar gazdaság versenyképességének növelése a lakosság egészségi állapotát javító népegészségügyi intervenciók célcsoportjainak és tartalmának azonosítása révén” című projekt támogatásával.

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények

Harangi M, Seres I, Magyar MT, Csipo I, Sipka S, Valikovics A, Csiba L, Bereczki D, Paragh G. Association between human paraoxonase 1 activity and intima-media thickness in subjects under 55 years of age with carotid artery disease. *Cerebrovasc Dis*. 2008; 25(1-2):122-8.

Zsíros N, Koncsos P, Lőrincz H, Seres I, Katkó M, Szentpéteri A, Varga VE, Fülöp P, Paragh G, **Harangi M**. Paraoxonase-1 arylesterase activity is an independent predictor of myeloperoxidase levels in overweight patients with or without cardiovascular complications. *Clin Biochem*. 2016; 49(12):862-7.

Szentpéteri A, Zsíros N, Varga VE, Lőrincz H, Katkó M, Seres I, Fülöp P, Paragh G, **Harangi M**. Paraoxonase-1 and myeloperoxidase correlate with vascular biomarkers in newly diagnosed untreated hyperlipidemic patients. *VASA - Eur J Vasc Med*. 2017; 46 (5), 370-376.

Harangi M, Szentpéteri A, Nádró B, Lőrincz H, Seres I, Páll D, Paragh G. HDL subfraction distribution and HDL function in untreated dyslipidemic patients. *Vessel Plus*. 2017; 1:166-73.

Harangi M, Seres I, Varga Z, Emri G, Szilvássy Z, Paragh G, Remenyik E. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004; 60(10):685-91.

Harangi M, Mirdamadi HZ, Seres I, Sztanek F, Molnár M, Kassai A, Derdák Z, Illyés L, Paragh G. Atorvastatin effect on the distribution of high-density lipoprotein subfractions and human paraoxonase activity. *Transl Res*. 2009; 153(4):190-8.

Harangi M, Seres I, Harangi J, Paragh G. Benefits and difficulties in measuring HDL subfractions and human paraoxonase-1 activity during statin treatment. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009; 23(6):501-10.

Harangi M, Seres I, Balogh I, Köbling T, Harangi J, Varga J, Márk L, Paragh G. Effect of apolipoprotein E genotypes on the efficacy of ezetimibe monotherapy in patients with statin induced adverse effects. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2013; 51(9):746-52.

Zsíros N, Bodor M, Varga V, Berta E, Balogh I, Seres I, Paragh G, **Harangi M**. The c.-133A > G polymorphism in NPC1L1 gene influences the efficacy of ezetimibe monotherapy on apolipoprotein A1 in hyperlipidemic patients. *Pharmazie.* 2014; 69(6):424-9.

Varga VE, Lőrincz H, Zsíros N, Fülöp P, Seres I, Paragh G, Balla J, **Harangi M**. Impact of selective LDL apheresis on serum chemerin levels in patients with hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* 2016; 15(1):182.

Varga VE, Lőrincz H, Szentpéteri A, Juhász L, Seres I, Paragh G Jr, Balla J, Paragh G, **Harangi M**. Changes in serum afamin and vitamin E levels after selective LDL apheresis. *J Clin Apher.* 2018; 33(5):569-75.

1.1. SCIENTOMETRIA

Harangi Mariann tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.09.09)				
Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk ²	127	---	---	---
szacikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	47	717	826
szacikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szacikk, magyar nyelvű	---	62	7	8
szacikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	15	94	100
rövid közlemény	---	3	13	17
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	4	---	---	---
idegen nyelvű	---	2	22	22
magyar nyelvű	---	1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	1	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	2	---	8	10
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	1	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)	---	132	861	983
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	133	---	861	983
V. További tudományos művek	11	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	11	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Olthalmak (szabadalmak)	---	0	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	1	---	1	1
Összes hivatkozás ¹	---	---	862	984
Hirsch index ⁶	21	---	---	---
g index ⁶	29	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	31	200
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	36	24
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	105	758
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	62	391
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	70	7,11%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	29
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0