

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Lipoprotein szubfrakciók vizsgálata lipidanyagcsere
zavarral járó kórképekben**

Lőrincz Hajnalka

Témavezető: Dr. Seres Ildikó



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. Lipoproteinek.....	8
2.1.1. A plazma lipoproteinek általános struktúrája.....	8
2.1.2. Lipoprotein metabolizmus.....	9
2.2. Az LDL és HDL lipoproteinek heterogenitása.....	13
2.2.1. Low-density lipoprotein szerkezete (LDL), funkciója és az LDL szubfrakciók elválasztására alkalmazott módszerek.....	14
2.2.2. High-density lipoprotein (HDL) szerkezete, funkciója és a HDL szubfrakciók elválasztására alkalmazott módszerek.....	17
2.3. Lipidanyagcsere zavarok	21
2.3.1. Az adipokinek és az elhízás	23
2.3.2. Chemerin	24
2.3.3. Lipideltérések elhízásban	27
2.3.4. Smith-Lemli-Opitz szindróma.....	28
3. Célkitűzések	31
4. Betegek és módszerek	32
4.1. Elhízott betegek kiválasztása.....	32
4.2. Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek kiválasztása.....	32
4.3. Vérvétel és laboratóriumi paraméterek mérése	33
4.4. LDL és HDL szubfrakciók elválasztása	34
4.5. Szérum chemerin szint meghatározása.....	39
4.6. 7-dehidrokoleszterin szint és paraoxonáz-1 aktivitás meghatározása	39

4.7. Statisztikai elemzés.....	40
5. Eredmények.....	41
5.1. A szérumban a chemerin koncentráció és lipoprotein szubfrakciók közötti kapcsolat elhízott, nem diabetese és normál testtömegű egyénekben	41
5.2. Lipoprotein szubfrakciók eloszlása SLOS és kontroll gyerekekben.....	49
5.3. Szérumban a PON1 paraoxonáz és arilészteráz aktivitás, valamint a PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein paraméterek közötti összefüggések SLOS és kontroll gyerekekben	54
6. Megbeszélés	56
7. Összefoglalás.....	63
8. Summary	65
9. Irodalomjegyzék.....	66
10. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	77
11. Függelék.....	79

Rövidítésjegyzék

7DHC	7-dehidrokoleszterin
ABCAI	ATP kötő kazetta protein AI
ABCGI	ATP kötő kazetta protein GI
apo	apolipoprotein
BMI	testtömegindex
CETP	koleszterin-észter transzfer protein
CMKLR1	chemokin like receptor1
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
GPR1	G-proteinhez kapcsolt receptor 1
HbA1c	hemoglobin A1c
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein (high-density lipoprotein)
HOMA-IR	homeostasis model assessment inzulin rezisztencia
HPLC	magas nyomású folyadék kromatográfia
hsCRP	high-sensitivity C-reaktív protein
HSPG	heparan szulfát proteoglikán
IDL	intermedier sűrűségű lipoprotein
IL-6	interleukin-6
IKK β	nukleáris faktor kappa-B kináz gátló
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LDL	kis sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein)
MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1

MTP	mikroszómális triglicerid transzfer protein
NF- κ B	nukleáris faktor kappa-B
NMR	mágneses magrezonancia
OGTT	orális glükóz tolerancia teszt
PON1	humán paraoxonáz-1
RBP4	retinol kötő protein 4
SLOS	Smith-Lemli-Opitz szindróma
SR-BI	scavenger receptor BI
TNF α	tumor nekrozis faktor alfa
VLDL	nagyon kis sűrűségű lipoprotein (very low-density lipoprotein)

1. Bevezetés

A plazma lipoproteinek hagyományosan a triglicerid, koleszterin és annak észtereinek szállítását végző bonyolult biokémiai struktúrák, amelyek a szállítási feladatokon kívül rendkívül sokrétű biológiai funkciót töltenek be. A lipoproteinek ugyanis nem egyszerűen lipidekből és proteinekből álló partikulumok, hanem méretük, denzitásuk, szerkezetük és a funkciójuk alapján heterogén szubfrakciókra oszthatók. A kis sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein – LDL) szubfrakciói közül a kis, denz LDL szubfrakció a legkönnyebben oxidálható lipoprotein partikulum, amely oxidálódásával növeli a szervezet oxidatív stressz állapotát, ezáltal elindítva a szabadgyökös folyamatok felgyorsulását, mindezek később fokozott kardiovaszkuláris rizikóhoz, ill. az érlemezés előrehaladásához vezethetnek. Az érlemezés szempontjából a nagyobb, kevésbé denz LDL szubfrakciók kevésbé károsító hatásúaknak tekinthetők. Ezzel szemben a nagy sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein – HDL) védő szerepet tölt be az atherosclerosis folyamatában. A nagy kevésbé denz HDL szubfrakciók magasabb trigliceridtartalmuknál fogva a reverz koleszterin transzportban vesznek részt, míg a kis denz HDL szubfrakcióknak a hozzá asszociáltan keringő antioxidáns enzimeken keresztül fokozott antioxidáns hatása van. A HDL enzimek közül legkifejezettebb antioxidáns hatása a humán paraoxonáz-1 (PON1) enzimnek van.

Korábbi tanulmányokban széles körben vizsgálták az elhízás (különösen a viscerális zsírszövet felhalmozódásával létrejövő centrális elhízás) során kialakuló lipid abnormalitásokat, elsősorban a kis denz LDL megjelenését (Hirayama és Miida, 2012). Leírták továbbá a kis denz LDL szubfrakció magasabb triglicerid szinttel, ill. alacsonyabb HDL-koleszterin (HDL-C) szinttel való kapcsolatát, amely az atherogén lipidprofilhoz járul hozzá (Rizzo és Berneis, 2006). A HDL

szubfrakciók aránya elhízás során eltolódik a kis, denz HDL szubfrakciók irányába, a HDL viszont a szerkezetében bekövetkező változások miatt csak korlátozottan képes ellátni antioxidáns feladatait. A zsírszövet továbbá számos, gyulladásszerű folyamatokban szerepet játszó adipokint pl. chemerint termel, amelyek emelkedett szintje növeli a kardiovaszkuláris rizikót, valamint az elhízás, diabetes mellitus, metabolikus szindróma, dyslipidaemia, hipertensio kialakulásának valószínűségét is. Mivel a szérumban a chemerin szint számos metabolikus rizikófaktort mutat összefüggést (Lehrke és mtsai, 2009), ezért feltételezzük, hogy a chemerin a lipoprotein szubfrakciókkal is kapcsolatban állhat.

Nemcsak az elhízás folyamatában, hanem öröklött koleszterin anyagcserezavarral járó megbetegedésekben, szindrómákban lehet kiemelkedő jelentősége a lipoprotein szubfrakcióknak. Smith-Lemli-Opitz szindrómában (SLOS) a 7-dehidrokoleszterin (7DHC) reductáz enzim részleges vagy teljes hiánya miatt a koleszterin szintézis folyamata megakad, ezért a plazma összkoleszterin szintje rendkívül alacsony, míg a 7DHC szöveti és plazma szintje felszaporodik, amely súlyos mentális és szomatikus retardációhoz vezet (Tint és mtsai, 1995a). Mindezek alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy az SLO szindrómában tapasztalható alacsony összkoleszterin szint mellett az LDL és HDL szubfrakciók aránya is eltolódhat. Továbbá a sejtekben felszaporodó toxikus hatású 7DHC fokozza a szervezetben zajló oxidatív folyamatokat, így feltételezhetjük, hogy a HDL antioxidáns hatása is csökken.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Lipoproteinek

2.1.1. A plazma lipoproteinek általános struktúrája

A lipoproteinek bonyolult lipid és protein komplexből álló makromolekuláris partikulumok, amelyek a lipidek és más zsíroldékony molekulák szállítását végzik a plazmában és a központi idegrendszerben. Ezek a gömb alakú struktúrák szerkezetüket tekintve kívülről amfipatikus tulajdonságú, perifériás és integráns fehérjéket tartalmazó lipid monorétegből, ill. trigliceridből és koleszterin-észterből álló hidrofób lipid magból állnak (Small, 1986). A plazma lipoproteinek méretüket tekintve 5 - >1000 nm átmérőjűek lehetnek, méretük és denzitásuk alapján öt főbb csoportra oszthatóak (1. táblázat). 1) A legkisebb sűrűségű, nagy denzitású high-density lipoproteinre (HDL); 2) kis denzitású lipoproteinre (low density lipoprotein – LDL); 3) intermediér denzitású lipoproteinre (intermediate density lipoprotein – IDL); 4) nagyon kis denzitású lipoproteinre (very low density lipoprotein – VLDL), valamint 5) kilomikronra és kilomikron remnantokra (Jonas, 2002).

A lipoproteinek hidrofíl köpenyében elhelyezkedő fehérjék jelentős hányadát az apolipoproteinek (apoproteinek) alkotják (1. táblázat). Az apolipoproteinek nemcsak a lipoproteinek stabilizálásában, hanem a receptor ligandok aktiválásával a metabolikus folyamatok szabályozásában, ill. az enzimatis folyamatok aktiválásával a lipoproteinek metabolizmusában játszanak szerepet. A májban szintetizálódó, VLDL-hez, IDL-hez és LDL-hez kötött apoB-100 és az intestinumban képződő kilomikronokhoz kötött apoB-48 apolipoproteinek kivételével az apolipoproteinek reverzibilisen asszociálódnak a lipoproteinekhez, dinamikusan cserélődhetnek az egyes partikulumok között (Jonas, 2002).

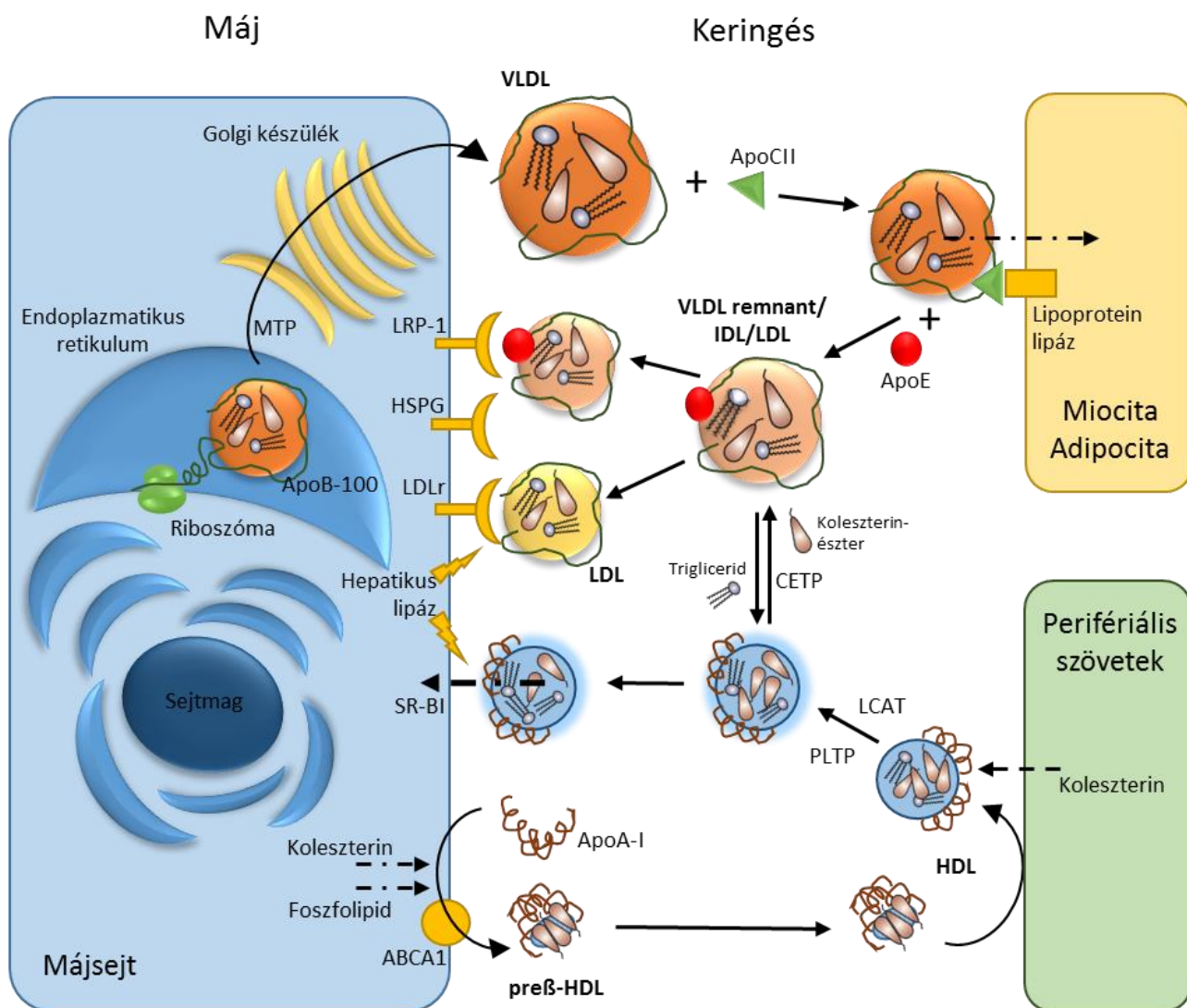
1. táblázat: A lipoproteinek osztályozása denzitásuk szerint (Jonas, 2002 alapján)

	Kilomikron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Denzitás (g/ml)	<0.95	0.95-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210
Átmérő (nm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Teljes lipid tartalom (% wt)	98	90	82	75	67
Összetétel, % száraz tömeg					
Fehérje	2	10	18	25	33
Triglicerid	83	50	31	9	8
Nem észterifikált koleszterin-észterek	8	22	29	45	30
Foszfolipidek (% wt lipid)	7	18	22	21	29
Főbb apolipoproteinek	B-48, A-I, A-IV, E, CI, CII, CIII	B-100, E, CI, CII, CIII	B-100, E CI, CII, CIII	B-100	A-I, A-II, CI, CII, CIII, E

VLDL, very low-density lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein

2.1.2. Lipoprotein metabolizmus

A lipoproteinek szerepét a szervezetben két fő metabolikus útvonal segítségével foglalhatjuk össze. Egyrészt az apoB tartalmú lipoproteinek (kilomikronok, VLDL, IDL, LDL) szállítják a koleszterin és triglicerid molekulákat a májból és a bélhámsejtekből az izomzatba és a zsírszövetbe; másrészt a perifériás szövetekben lévő felesleges koleszterin a májban metabolizálódva az epén keresztül ürül ki a szervezetből. Ezt a folyamatot nevezzük a HDL által mediált reverz koleszterin transzportnak. Mindkét folyamat lipidanyagcsere zavarral járó kórképekben sérül, magával vonva a különböző dyslipidaemiák megjelenését. A lipoprotein metabolizmus sematikus ábrája az 1. ábrán látható.



1. ábra: Lipoprotein metabolizmus (Cohen, 2009, Fisher és mtsai 2012, alapján). Rövidítések: ABCA1, ATP-kötő kazetta protein-A1; apoA-I, apolipoprotein A-I; apoC-II, apolipoprotein C-II; apoE, apolipoprotein E; CETP, koleszterin-észter transzfer protein; HDL, high-density lipoprotein; HSPG, heparan szulfát proteoglikán; IDL, intermediate density lipoprotein; LCAT, lecitin:koleszterin aciltranszferáz; LDL, low-density lipoprotein; LDLr, LDL receptor; LRP-1, LDL-hez kötött protein-1; MTP, mikroszómális triglicerid traszfer protein; PLTP, foszfolipid transzfer protein; SR-BI, scavenger receptor BI; VLDL, very low-density lipoprotein

A triglicerid transzportja az apoB tartalmú lipoproteinek szállításával valósul meg a plazmán keresztül a vázizomzat felé, elősegítve a megfelelő energiatermelést; valamint a zsírszövet felé, ahol a feleslegben lévő zsírsavak energia formájában raktározódnak. A bélhámsejtekben az étkezéssel felvett trigliceridek az apoB-48 tartalmú kilomikronokba csomagolódnak, majd onnan a nyirokrendszeren keresztül a véráramba kerülnek (Cohen, 2009, Iqbal és Hussain, 2009).

A májban termelődő endogén trigliceridek az apoB-100 tartalmú VLDL partikulumokban közvetlenül a plazmába szekretálódnak. Ez úgy történik, hogy a hepatociták endoplazmatikus retikulumában a riboszómák által expresszált apoB-100 és a keletkező trigliceridek a mikroszómális triglicerid transzfer protein (MTP) hatására VLDL-ké szerelődnek össze. A koleszterin-észterek egy egyelőre nem tisztázott mechanizmus során beépülnek a VLDL magba, majd a VLDL a Golgi apparátusba transzportálódik. Itt a VLDL további triglicerideket vesz fel az MTP és az apoC-III által (Hussain és mtsai, 2003). Az érett VLDL így a plazmába kerül. A plazmában a VLDL a hozzá asszociálódó apoC-II hatására teljes mértékben aktiválódik (Shachter, 2001), így az endothel sejtek felszínén lehetővé válik a VLDL kötődése a lipoprotein lipáz számára, hidrolizálva a triglicerideket, amely lehetővé teszi a zsírsavak felvételét a miociták és adipociták számára (1. ábra) (Merkel és mtsai, 2002). A VLDL ezután leválik a lipoprotein lipázról, az apoC-II disszociálódik a VLDL-ről és apoE kötődik hozzá (Mahley és Rall, 2000). Az így keletkező partikulumok a VLDL remnant és az IDL, amelyek későbbi periódusokban továbbra is kötődnek a lipoprotein lipázhoz és egyre denzebbé válnak. Az apoE tartalmú lipoprotein partikulumokat (pl. VLDL remnantok, IDL) a hepatociták veszik fel az LDL-receptorokon, az LDL-hez kötött protein-1-en és a heparan szulfát proteoglikánokon (HSPG) keresztül (Mahley és Ji, 1999).

A későbbiekben az apoE disszociálódik az IDL partikulumról, csak az apoB-100 apolipoprotein marad a felszínén, és ezt a koleszterin-észterben gazdag lipoproteint nevezzük LDL-nek. Az

apoE tartalmú remnantokkal ellentétben, az LDL-t kizárólag az LDL receptorok veszik fel. Mivel az LDL partikulumok viszonylag gyengén kötődnek az LDL receptorhoz, ezért a plazma koleszterin tartalmát elsősorban az LDL koleszterin tartalma adja (Brown és Goldstein, 1986). Az LDL receptorok mintegy 70%-a a májsejteken lokalizálódik, a többi receptor az adrenocorticalis, gonadalis és simaizom sejteken, valamint a makrofágokon és a limfocitákon található (Goldstein és Brown, 2009).

A lipoproteinek metabolizmusának másik fontos folyamata a reverz koleszterin transzport, amely a korong alakú naszcens HDL képződésével indul. A HDL-hez esszenciálisan kötődik a májban termelődő apoA-I apolipoprotein, amely alapjaiban meghatározza a HDL struktúráját és funkcióját. A lipidszegény apoA-I a hepatociták plazma membránjában eszpresszálódó ATP-kötő kazetta protein A1 (ABCA1)-hez kapcsolódva a plazma membránból származó foszfolipidekkel és nem-észterifikált koleszterinnel együtt kisméretű, korong alakú HDL-t, más néven naszcens vagy pre- β HDL-t képez (1. ábra) (Fisher és mtsai, 2012). A továbbiakban a HDL egy ún. érési folyamaton megy keresztül, melynek során egyre nagyobb méretű, gömb alakú HDL partikulummá érik. A folyamat során a HDL felszínéhez asszociált lecitin:koleszterin aciltranszferáz (LCAT) a koleszterint koleszterin-észterekké alakítja, így növeli a HDL koleszterin-észter tartalmát. Az LCAT aktivitásához a foszfolipid transzfer protein (PLTP) aktivitása is hozzájárul, amely további foszfolipideket épít be a HDL felszínére (Zannis és mtsai, 2006). A reverz koleszterin transzport során a koleszterin-észter transzfer protein (CETP) koleszterin-észtert helyez át a HDL-ről az apoB tartalmú lipoproteinekre (VLDL, IDL, LDL), míg a VLDL-ről, IDL-ről, LDL-ről triglicerideket pakol át a HDL-re, így növelve a HDL méretét. A májban a hepaticus lipáz hidrolizálja a HDL mag triglicerid tartalmát, így elősegítve a nagyméretű HDL a scavenger receptor BI-hez (SR-BI)-hez való kötődését. Az apoA-I disszociál

a maradék HDL-ről lehetővé téve az új korong alakú pre- β HDL összeszerelődését (Rye és Barter, 2004).

2.2. Az LDL és HDL lipoproteinek heterogenitása

A lipoproteinek vizsgálatakor a klinikai tanulmányok többsége a különböző lipoproteineket a koleszterintartalom alapján jól jellemezhető egységnek (LDL-C, HDL-C) tekintik. Azonban a plazma lipoproteinek nem írhatóak le pusztán a koleszterintartalmuk alapján, ugyanis folyamatosan és dinamikusan egymásba alakulnak, a hidrofil köpenyükhöz asszociált strukturális és funkcionális fehérjék révén pedig állandó kölcsönhatást teremtenek egymással és a testi sejtek receptoraival. Ezért a lipoprotein partikulumokat méretük, denzitásuk, elektroforetikus tulajdonságaik, apolipoprotein tartalmuk és különböző betegségekkel való kapcsolatuk alapján heterogén szubfrakciókra lehet osztani.

A lipoprotein szubfrakciók első vizsgálata 1966-ban, Gofman és munkatársai által publikált laboratóriumi módszerrel, analitikai ultracentrifugálással történt (Gofman és mtsai, 1966). Később számos más tanulmány fordított kiemelt figyelmet a lipoprotein szubfrakciók vizsgálatára (Blanche és mtsai, 1981, Griffin és mtsai, 1990, Ensign és mtsai, 2006, Otvos, 2002). Ma is a legnagyobb érdeklődés az LDL és a HDL szubfrakciókra helyeződik, ugyanis ezek a szubfrakciók rendkívül szoros kapcsolatban állnak a kardiovaszkuláris megbetegedésekkel, az atherosclerosisal és az endogén oxidatív stresszel. Az LDL és HDL szubfrakciók vizsgálatával az elválasztási technikák repertoárjának bővülésének nyomán egyre több nagy klinikai tanulmányban foglalkoznak, ill. egyre több új elválasztás technikai módszer jelenik meg a klinikai gyakorlatban is.

2.2.1. Low-density lipoprotein szerkezete (LDL), funkciója és az LDL szubfrakciók elválasztására alkalmazott módszerek

Az LDL denzitása alapján 1,019-1,063 g/ml közötti lipoprotein szubfrakció, amely méretét, denzitását, struktúráját és funkcióját figyelembe véve különböző analitikai eljárásokkal további szubfrakciókra osztható (Hirayama és Miida, 2012). Lipidómját tekintve az LDL hidrofób magja megközelítőleg 170 triglicerid és 1600 koleszterin-észter molekulát tartalmaz; mintegy 600 nem-észterifikált koleszterin molekulájának egyharmada a magban, kétharmada a köpenyben található (Lund-Katz és mtsai, 1988). Az LDL felszíni köpenyét kb. 700 foszfolipid molekula alkotja, de nagy arányban fordulnak elő további foszfolipid komponensek, mint a foszfátidil-kolin és szfingomielin (Sommer és mtsai, 1992). A foszfolipidrétegbe beágyazódva egyetlen 4536 aminosavból álló apoB-100 található, ez alkotja az LDL partikula proteómját (Esterbauer és mtsai, 1992). Ennek a májban szintetizálódó apolipoproteinnek nélkülözhetetlen szerepe van az LDL partikula strukturális integritásának kialakításában, valamint a számos funkcionális domén kötőhely révén az LDL-lipoprotein, LDL-receptor, LDL-enzimfehérjék közötti interakciók szabályozásában (Boren és mtsai, 1998): például az apoB-100 N-terminális részén a lipoprotein lipáz (Sivaram és mtsai, 1994), míg a C-terminális részén a platelet aktiváló faktor acetil-hidroláz kötőhelye található (Stafforini és mtsai, 1999, Arai és mtsai, 2002).

A korábbi tanulmányok alapján jól ismert, hogy az LDL az érlelmeszesedés szempontjából legatherogénebb lipoprotein frakció (Hirayama és Miida, 2012), amely főleg az LDL oxidálódásával és glikálódásával valósul meg. Különböző biológiailag aktív peroxidok, aldehidek, oxiszterolok és más prooxidáns ágens hatására az LDL oxidálódik. Már enyhe mértékű oxidáció elindítja a partikulumok aggregációját; a zsírsavak és az apoB-100 oxidációjával a folyamat tovább folytatódik, amely nagymértékű oxidációhoz, végső soron az

LDL dezintegrálásához vezet. Az LDL szubfrakciói közül a kisméretű, denz LDL szubfrakció a legkönnyebben oxidálható LDL szubfrakció, így a kis denz LDL nagyobb arányú előfordulása tovább növeli a kardiovaszkuláris események kialakulásának kockázatát (Rizzo és Berneis, 2006). Younis és munkatársai arról számoltak be, hogy a kis denz LDL-en található apoB-100 nagyméretű LDL szubfrakciókhoz képest *in vivo* és *in vitro* körülmények között is könnyebben glikálódott, ill. a glikált apoB-100 aránya tízszer magasabb volt a kis denz LDL szubfrakción a nagy kevésbé denz LDL szubfrakcióhoz képest (Younis és mtsai, 2009). Így a különböző módokon oxidálódott LDL nagyobb affinitással kötődik az érfali makrofágok scavenger receptoraihoz, amely fokozza az érlemezés folyamatát.

Az atherosclerosis kialakulásának kezdő lépéseként monociták infiltrálódnak az endotheliumon keresztül a szubendothelialis térbe, ahol makrofágokká alakulnak. A makrofágok gyorsan és kontrollálatlanul képesek felvenni az oxidált LDL-t, amelynek következtében habos sejtekké alakulnak. A mérsékelten oxidált LDL fokozza az intracelluláris és vaszkuláris adhézis molekulák expresszióját, valamint elősegíti a monociták proliferációját és differenciációját (Rafieian-Kopaei és mtsai, 2014, Navab és mtsai, 1991). Mindezek hatására fokozódik a monociták bejutása a keringésből a szubendothelialis térbe. Az érlemezés előrehaladása során a simaizomsejtek fenotípusa megváltozik, az érfal intima rétegéből a mediába vándorolnak, ahol proliferálnak, növekedési faktorokat, extracelluláris mátrix glikoproteineket és metalloproteázokat termelnek. Az érfalban lerakódott koleszterin miatt az érfal rugalmassága csökken, majd a későbbiek során plakkok alakulnak ki (Mertens és Holvoet, 2001, Newby és Zaltsman, 1999).

Az LDL szubfrakciók elválasztására számos analitikai módszer áll rendelkezésre (2. táblázat). Mivel az LDL szubfrakciók elnevezése függ az alkalmazott elválasztási módszertől, ezért

többféle nomenklatúra alakult ki. Sűrűséggrádiens ultracentrifugálással denzitásuk alapján elválasztva az LDL szubfrakciókat 3 vagy 4 szubfrakciót tudunk elkülöníteni: nagy kevésbé denz, közepes és kis denz (további frakció lehet a nagyon kisméretű ún. very small) LDL szubfrakciókat (Griffin és mtsai, 1990). Elektroforetikus mobilitásuk alapján méretük szerint, nem denaturáló körülmények között 2-16%-os agaróz gélen 6 LDL szubfrakció elkülönítésére van lehetőség (Ensign és mtsai, 2006). Mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR) méretük szerint 3 LDL szubfrakció választható el (Otvos, 2002). NMR során a vizsgálandó partikulumokat a lipoproteinen elhelyezkedő terminális lipid metil-csoport egyedi mágneses tulajdonságai alapján választják el. Ezek a tulajdonságok függetlenek az elválasztandó partikulum kémiai összetételétől, azok szabad zsírsav, koleszterin-észter és triglicerid tartalmától.

2. táblázat: Az LDL szubfrakciók nomenklatúrája különböző elválasztás technikai módszerek alapján (Hirayama és Miida, 2012 alapján módosítva)

	Nagy LDL (Large, bouyant)	Közepes LDL (Intermediate)	Kis denz LDL (Small, dense)	Nagyon kis LDL (Very small)
<i>Denzitás grádiens ultracentrifugálás</i>				
	LDL I	LDL II	LDL III	LDL IV
Denzitás (g/ml) (4fr)	1.019-1.023	1.023-1.034	1.034-1.044	1.044-1.060
(3fr)	1.025-1.034	1.034-1.044	1.044-1.060	
<i>Grádiens gélelektroforézis (2%-16%)</i>				
	LDL I	LDL II	LDL IIIA LDL IIIB	LDL IVA LDL IVB
Méret (nm)	26.0-28.5	25.5-26.4	24.7-25.5 24.2-24.6	23.3-24.1 22.0-23.2
<i>Mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR)</i>				
	L3	L2	L1	
Méret (nm)	21.3-22.7	19.8-21.2	18.3-19.7	
<i>Lipoprint rendszer</i>				
	Large		Small dense	
Méret (7 fr)	LDL-1, LDL-2		LDL-3, LDL-4, LDL-5, LDL-6, LDL-7	
Mintázat	Large (Pattern A)	Intermediate (Pattern AB)		Small (Pattern B)
Átlagos méret (nm)	≥26.8	26.8-26.5		≤26.5

2.2.2. High-density lipoprotein (HDL) szerkezete, funkciója és a HDL szubfrakciók elválasztására alkalmazott módszerek

Hagyományosan a HDL ultracentrifugálásos módszerrel elválasztva 1,063-1,021 g/ml denzitású lipoprotein frakció (Asztalos és mtsai, 2011). Az LDL-hez hasonlóan, a HDL partikulumok is méretüket, denzitásukat, struktúrájukat és funkciójukat tekintve inhomogének, szubfrakciókra oszthatóak. Ezek a tulajdonságok mind a HDL lipid összetételében (lipidómjában), mind a fehérjetartalmában (proteómjában) megjelennek.

A HDL lipidómja főként koleszterin-észterből (14-18%), trigliceridből (3-6%) és szabad koleszterinből (3-5%) áll. A HDL foszfolipid köpenyének mintegy 70%-át foszfatidil-kolin alkotja, ezt követi a szfingomielin és más foszfolipid molekulák (Quehenberger és mtsai, 2010, Kontush és mtsai, 2007). A HDL proteómját tekintve a HDL felszínén közel 200 féle különböző fehérjét identifikáltak (Shah és mtsai, 2013). A HDL legjelentősebb strukturális fehérjéit az apoA-I (65%) és az apoA-II (15%) alkotja, de olyan apolipoproteinek is kötődnek a HDL-hez, mint az apoC-I, C-II, C-III és az apoE. A reverz koleszterin transzportban szerepet játszó enzimek közül a CETP és az LCAT, valamint a HDL antioxidáns tulajdonságaiért felelős humán paraoxonáz-1 (PON1) enzimek szintén a HDL-hez asszociálódó fontos fehérjék.

A PON1 (EC 3.1.8.1) egy kalciumdependens, 354 aminosavból álló, 43 kDa tömegű glükoprotein, amely az apoA-I apolipoproteinen keresztül kapcsolódik a HDL-hez. Két gyakori polimorfizmusa ismert, a PON1-192QR glutamin (Q) és arginin (R) és a PON1-55LM leucin (L) és metionin (M) aminosavcsere, melyek az enzim koncentrációját és aktivitását is befolyásolják (Adkins és mtsai, 1993, Garin és mtsai, 1997). A PON1 enzim a HDL legfőbb antioxidáns hatású enzime, amely főként a kisméretű HDL3 szubfrakción lokalizálódik (Schiavon és mtsai, 2002, Kontush és mtsai, 2003). Antioxidáns hatása révén gátolja az LDL oxidációját, ezáltal csökkenti az oxidált LDL

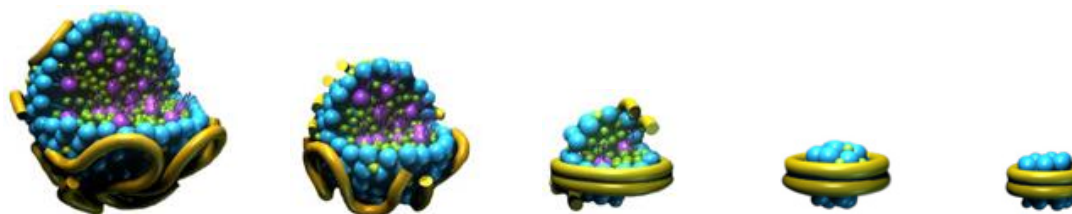
atherosclerotikus és pro-inflammatorikus hatását (Mackness és mtsai, 1998). A PON1 egy sokoldalú enzim: különböző típusú szubsztrátokat képes hidrolizálni, ezért gyakran „promiscuita” enzimnek is nevezik. A hidrolitikus aktivitás alapján a PON1 enzim aktivitását három különböző kategóriába sorolják: arilészteráz, foszfotriészteráz (ide tartozik a névadó paraoxonáz) és laktonáz (Camps és mtsai, 2009). A PON1 aktivitása a fokozott oxidatív stresszel járó kórállapotokban jelentős mértékben csökken (Paragh és mtsai, 1999, Kiss és mtsai, 2007, Szántó és mtsai, 2010), de csökkenti a PON1 aktivitást a dohányzás, alkoholfogyasztás, elhízás, idősebb életkor és a környezeti ártalmak is (Seres és mtsai, 2004, Koncsos és mtsai, 2010, Macharia és mtsai, 2012).

A HDL funkcióját tekintve számos kedvező hatással rendelkezik. Antiatherogén hatása főként a reverz koleszterin transzportnak köszönhető, amikor a HDL koleszterint von el a perifériás szövetekből az ABCA1 és SRBI útvonalakon keresztül (Lewis és Rader, 2005). Reverz koleszterin transzporthoz köthető funkciója továbbá, hogy növeli a pancreas β -sejteinek inzulinszekréciónak és csökkenti a β -sejt apoptózist (Rütti és mtsai, 2009); sőt, a HDL képes szabályozni az anti-inflammatorikus hatású adiponektin kibocsátását a zsírszövetből, így növelve az adiponektin inzulinszenzitizáló képességét (Van Linthout és mtsai, 2010). Továbbá a HDL csökkenti a makrofágok LDL-indukálta apoptózist (Cui és mtsai, 2007), csökkenti az endothelialis adhéziós molekulák expresszióját és gátolja azok bejutását a szubendothelialis térbe (Cockerill és mtsai, 1995), ill. stimulálja a nitrogén-oxid termelést az endothelialis nitrogén-oxid szintáz stabilizálásán és az ABCG1-mediálta koleszterin és a 7-oxiszterol effluxon keresztül (Terasaka és mtsai, 2010). A HDL a PON1 enzimen keresztül gátolja az LDL oxidációját, azáltal, hogy hidrolizálja a keletkező lipid-hidroperoxidokat, így csökkentve az endothelialis oxidatív stresszt (Navab és mtsai, 2001). Újabb vizsgálatok szerint a HDL a veleszületett immunitás részeként képes az apoA-I-en keresztül megkötni a baktériumok lipopoliszacharidjait (Henning és mtsai, 2011).

A HDL szubfrakciók elválasztására – az LDL szubfrakciókhoz hasonlóan – szintén többféle analitikai módszer áll rendelkezésünkre (3. táblázat). Gofman és munkatársai, a HDL szubfrakciókat sűrűséggradiens ultracentrifugálással elválasztva, két fő szubpopulációt azonosított: nagyobb méretű, kevésbé denz HDL2 és kisebb, denzebb HDL3 szubfrakciót (Gofman és mtsai, 1966). 1981-ben Blanche és munkatársai méretük alapján a HDL-t öt szubfrakcióra választotta gradiens gélelektroforézis módszer segítségével: HDL3c, HDL3b, HDL3a, HDL2a és HDL2b. Nem denaturáló körülmények között, 2D gélelektroforézissel a HDL pre- β -1, pre- β -2, pre- α , α -4, α -3, α -2 és α -1 frakciókra különíthető el (Blanche és mtsai, 1981). Mint ahogy korábban ismertetésre került, a pre- β partikulák képesek a legnagyobb affinitással részt venni a reverz koleszterin transzportban.

Későbbiek során olyan kevésbé labor intenzív elválasztás technikai módszerek is megjelentek, mint a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR), amely a HDL szubfrakcióit három csoportba, nagy, közepes és kis HDL partikulumokká különíti el (Otvos, 2002). Nagy felbontású ion-mobilitás (high-resolution ion-mobility, hrIM) technika során lipoproteineket a rendszer gáz fázisba viszi, majd a semlegesített részecskék feszültség-grádiensen áthaladva választódnak el (Caulfield és mtsai, 2008). Itt öt HDL szubfrakció azonosítására van lehetőség, amely megfelel a gradiens gélelektroforézissel elválasztott HDL szubfrakcióknak. Látható tehát, hogy az LDL-hez hasonlóan, a HDL szubfrakciók nomenklatúrája jelentősen eltérő annak megfelelően, hogy azokat milyen technikával választották el (3. táblázat).

3. táblázat: A HDL szubfrakciók nomenklatúrája különböző elválasztás technikai módszerek alapján (Rosenson és mtsai, 2011 alapján)



	Nagyon nagy HDL (very large)	Nagy HDL (large)	Közepes HDL (medium)	Kis HDL (small)	Nagyon kis HDL (very small)
Denzitás (g/ml)	1.063-1.087	1.088-1.110	1.110-1.129	1.129-1.154	1.154-1.21
Átmérő (nm)	12.9-9.7	9.7-8.8	8.8-8.2	8.2-7.8	7.8-7.2
Denzitás grádiens ultracentrifugálás	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Denzitás (g/ml)	1.063-1.087	1.088-1.110	1.110-1.129	1.129-1.154	1.154-1.170
Grádiens gélelektroforézis, 4-20%	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Átmérő (nm)	12.9-9.7	9.7-8.8	8.8-8.2	8.2-7.8	7.8-7.2
2D gélelektroforézis	α -1	α -2	α -3	α -4	pre- β -1
Átmérő (nm)	11.2-10.8	9.4-9.0	8.5-7.5	7.5-7.0	6.0-5.0
NMR	Large HDL-P	Medium HDL-P		Small HDL-P	
Átmérő (nm)	12.9-9.7	9.7-8.8	8.8-8.2	8.2-7.8	7.8-7.2
Ion mobilitás	HDL2b	HDL2a+HDL3			
Átmérő (nm)	14.5-10.5	10.5-7.65			
Lipoprint rendszer	Nagy HDL	Közepes HDL		Kis HDL	
Méret (10 fr)	HDL-1,-2,-3	HDL-4,-5,-6,-7		HDL-8,-9,-10	

A szakirodalomban a HDL szubfrakciók vizsgálatát tekintve sok esetben egymásnak ellentmondó eredményeket publikálnak a vizsgálati protokoll típusától (prospektív vagy retrospektív), a betegcsoporttól, a vizsgálati személyek számától függően, de a szeparációs technika és az adatok értékelésének módszerei is jelentős tényezőnek számítanak az eredmények interpretálását illetően. Epidemiológiai vizsgálatok – a Framingham, a MRFIT és a PROCAM – egyértelműen igazolták, hogy a magas koleszterin- és LDL-szint mellett, az alacsony HDL-szint fokozza a kardiovaszkuláris kockázatot, tehát az alacsony HDL szintnek kiemelkedő jelentősége van a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában. Továbbá strukturális és funkcionális analízisek során megállapították, hogy a HDL atheroprotektív funkciójának jelentős részét a kis denz, fehérjedús HDL3 szubfrakció adja (Camont és mtsai, 2013, de Souza és mtsai, 2010). Superko és munkatársai 80 klinikai vizsgálat metaanalízise során megállapította, hogy az általuk vizsgált tanulmányok közül mindössze nyolc prospektív típusú közleményt publikáltak a HDL kardiovaszkuláris eseményekre gyakorolt hatásának vizsgálatára (Superko és mtsai, 2012). Nyolc tanulmányból négy mindkét HDL szubfrakcióval (HDL2-C és HDL3-C), míg három tanulmány csak a HDL3-C és egy vizsgálat a HDL2-C-vel talált szignifikáns negatív kapcsolatot a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázatával a vizsgálatok követési ideje alatt. Vagyis a tanulmányok adatai alapján mind a nagy, mind a kisméretű HDL szubfrakció koncentrációjának csökkenése egyértelműen növeli a későbbi súlyos kardiovaszkuláris események előfordulását.

2.3. Lipidanyagcsere zavarok

A lipidanyagcsere zavarai részben genetikai, részben környezeti tényezők hatására jöhetnek létre, amelynek eredményeképpen a szérum koleszterinszint kóros emelkedését vagy éppen

ellenkezőleg, csökkenését észleljük. Populációs szinten a hyperlipidaemiák kifejezettebb jelentőséggel bírnak. Hátterükben valamilyen veleszületett örökletes eltérés áll, ezért ezeket primer hyperlipoproteinaemiáknak nevezzük (Durrington, 2003). Klinikai szempontból a Fredrickson-féle beosztás ma is jól alkalmazható a lipidanyagcsere-eltérések jellemzésére, amelynek alapja az összkoleszterin és trigliceridszint meghatározásán kívül a részletes lipoprotein analízis, így a kilomikronok, VLDL és LDL szintjéből következtethetünk a lipidabnormalitásra (Fredrickson és Lees, 1965). Gyakoriságukat tekintve a primer lipidanyagcsere zavarok közül a familiáris hyperkoleszterinaemia (IIa típus, 1:500 a heterozigóták aránya), a familiáris kombinált hyperlipidaemia (IIb típus, 1:100) és a familiáris hypertrigliceridaemia (IV típus, 1:100) tekinthetők a leggyakoribbnak.

A szekunder hyperlipoproteinaemiákat számos alapbetegség, mint pl. az elhízás, inzulinrezisztencia, 2-es típusú diabetes, pajzsmirigyhormon eltérések, vesebetegség, alkoholizmus okozhatja. Sok esetben az alapbetegség kezelése a dyslipidaemia megszűnését is jelenti, ám szükség lehet lipidcsökkentő kezelés megindítására is (Durrington, 2003).

Egyre több tanulmányban számolnak be a szerzők arról, hogy primer és szekunder dyslipidaemiában nemcsak a lipoproteinek szintje változik meg, hanem az egyes LDL és HDL szubfrakciók aránya és mennyisége is eltolódhat egy-egy lipoprotein szubfrakció irányába. Mivel az elhízás egészségügyi, szociológiai és pénzügyi problémái világszerte egyre több országot érintenek, kiemelten fontos az elhízásban fellépő metabolikus és a gyulladáshoz vezető folyamatok jobb megértése, ezért vizsgálataink első részében erre koncentráltunk. Vizsgálataink második részében egy öröklött koleszterinanyagcsere-betegségben, Smith-Lemli-Opitz szindrómában vizsgáltuk a lipoprotein szubfrakciókat, ahol a koleszterinszintézis zavara miatt nem képződik elég koleszterin, ill. a köztitermékek felhalmozódása következtében fokozottabb oxidatív stresszrel kell számolnunk.

2.3.1. Az adipokinek és az elhízás

A túlzott táplálékfelvétel és a mozgásszegény életmód a lipidek akkumulációját eredményezi a szubkután és a viscerális zsírszövetben, amely elhízáshoz vezet. Az elhízás világszerte növekvő egészségügyi problémát okoz, amely különösen a fejlett országokat érinti. Az elhízással kapcsolatban nagyobb esély van a metabolikus szindróma, inzulin rezisztencia, 2-es típusú diabetes, magas vérnyomás, nem-alkoholos zsírmáj kialakulására, amelyekhez szekunder lipidanyagcsere zavarok is gyakran társulnak (Finkelstein és mtsai, 2012).

Ma már jól tudjuk, hogy a zsírszövet nem csupán energiaraktárként funkcionál, hanem aktív hormontermelő szervként működve biológiailag aktív molekulákat, ún. adipokinek termel, amelyek autokrin, parakrin és szisztémás hatásuk révén számos szervben fejtik ki hatásukat. Az adipokinek részt vesznek az adipogenezis mediálásán kívül a lipoprotein metabolizmus, a vérnyomás, a vaszkuláris és glükóz homeosztázis szabályozásában, de fontos szerepük van a gyulladásban adott válaszreakcióban is (Khan és Joseph, 2014). Az először 1994-ben leírt leptin, majd az adiponektin felfedezése adja az „klasszikus adipokinek” csoportját (Zhang és mtsai, 1994, Arita és mtsai, 1999), később azonban számos más „új” adipokint azonosítottak, mint a chemerin, resistin, visfatin, omentin, nesfatin és az apelin (Kwon és Pessin, 2013), de várható, hogy az adipokinek csoportja továbbra is bővülni fog.

Az elhízás számos ponton megváltoztatja a zsírszövet szerkezetét, mind a zsírsejtek mérete (hipertrófia), mind a zsírsejtek száma megnő (hiperplázia), fokozva ezzel a szöveti hipoxiát, amely kedvez az oxidatív stressz és a proinflammatorikus környezet kialakulásának, így az elhízással egy alacsony fokú gyulladás alakul ki (Kwon és Pessin, 2013). Normál testtömeg mellett az egészséges zsírszövetben döntően az M1 fenotípusú makrofágok dominálnak, amelyek elengedhetetlenek a zsírszövet normál működéséhez. Ezzel szemben az elhízás generálta

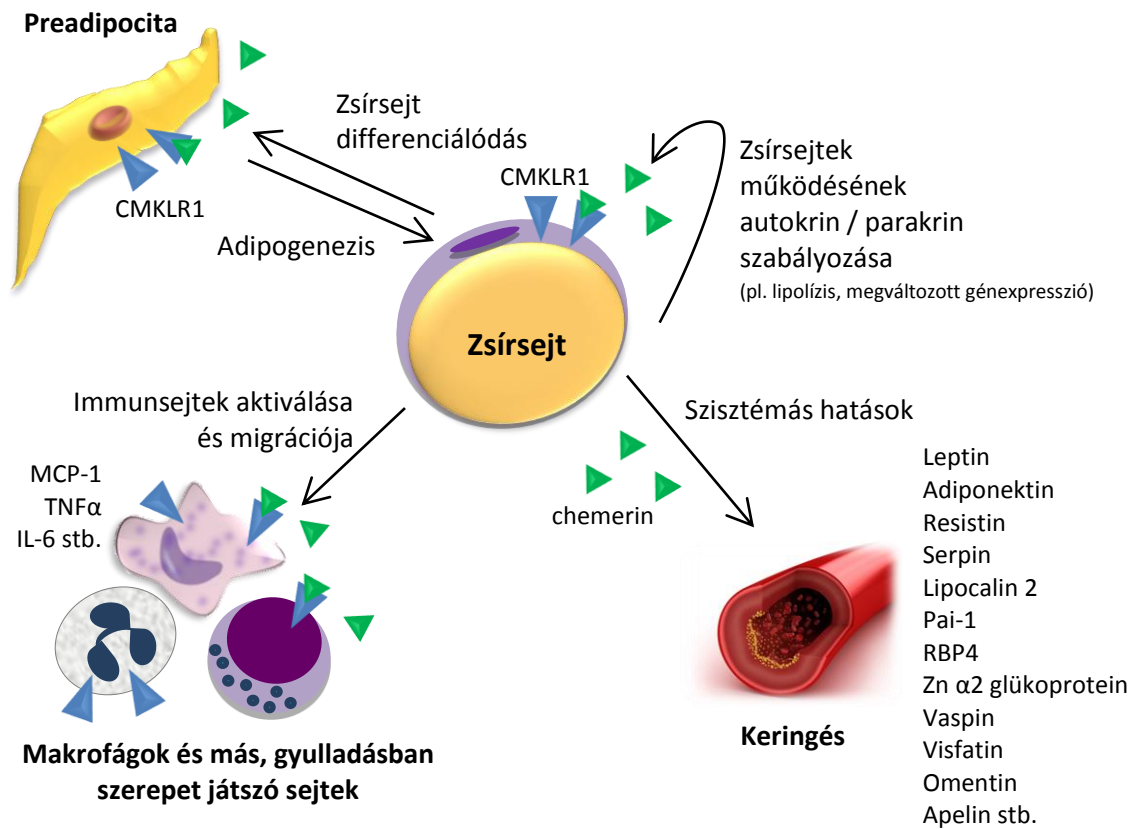
gyulladásos környezetben M2 típusú makrofágok akkumulálódnak a zsírszövetben, stimulálva a gyulladásos citokinek (TNF α , interleukinok, monocita kemoattraktáns protein-1 – MCP-1) termelődését, továbbá megindul a zsírszövet fokozott vaszkularizációja is. A normál adipokin termelődés kényes egyensúlya megbomlik, megnő a gyulladással összefüggő adipokinek (pl. leptin, chemerin) mennyisége az antiinflammatorikus hatású adipokinek (pl. adiponektin, omentin) arányának rovására, amely fokozza a makrofágok további akkumulációját a zsírszövetben, valamint elősegíti az endothelium károsodását hasonlóan az artériás erekben zajló érlemezésedési folyamatokhoz (Kraakman és mtsai, 2014). A túlzott táplálékfelvétel miatt hyperlipaemia és hyperglycaemia alakul ki. A zsírszövetben a lipolízis és glükoneogenezis fokozza a mitokondriális diszfunkciót, az endoplazmatikus retikulum stresszt és az endogén oxidatív stresszt, amely stimulálja a JNK és IKK β gyulladásos útvonalakat (Samuel és Shulman, 2012). A telített zsírsavak és béleredetű bakteriális lipopoliszacharidok aktiválják az NF- κ B útvonalat (Shi és mtsai, 2006).

2.3.2. Chemerin

A chemerin egy nemrégiben leírt tagja az adipokinek családjának, amelyet egyre több tanulmány összefüggésbe hoz az adipogenezis, az energia metabolizmus és a gyulladás folyamatával (2. ábra). A chemerint először 1997-ben psoriasisos léziókban identifikálták (Nagpal és mtsai, 1997), azonban a biológiai szerepéről származó első adatok csak hat évvel később jelentek meg, amikor ovárium karcinómában és rheumatoid arthritises betegek sinovialis folyadékában detektálták (Wittamer és mtsai, 2003). A chemerin 163 aminosavból álló prepro-chemerinként transzlálódik, amely egy N-terminális hasadás révén előbb pro-chemerinné, később a C-terminális végén történő hasadás révén különböző izoformájú aktív chemerinné alakul. Ezek közül a chemerinS¹⁵⁷

és a chemerinF¹⁵⁶ rendelkeznek a legnagyobb biológiai aktivitással, míg más izoformái, mint a chemerinK¹⁵⁸ és a chemerinF¹⁵⁴ kisebb aktivitással bírnak (Mattern és mtsai, 2014).

A chemerin legnagyobb mennyiségben a májban és a fehér zsírszövetben expresszálódik, azonban a barna zsírszövet, a tüdő, a szívizomszövet, a vesék és az ovárium is termelik (Bozaoglu és mtsai, 2007). Funkcionális vizsgálatok során azonosították ligandjait, először a G-proteinhez kapcsolt receptor chemokin-like receptor 1-t (CMKLR1 vagy ChemR23) (Goralski és mtsai, 2007), majd két másik receptorát, a chemokin-like receptor 2-t és a G-proteinhez kapcsolt receptor 1-t (GPR1) (Zabel és mtsai, 2008, Barnea és mtsai, 2008). A CMKLR1 túlnyomó részt a fehér zsírszövetben, makrofágokban és éretlen dendritikus sejtekben, kisebb részben a csontban, tüdőben, agyban, szívizomszövetben és a placentában expresszálódik. Így a fehér zsírszövet az egyetlen olyan szövet, ahol mind a chemerin, mind a receptora nagy mennyiségben expresszálódik, ezzel erősítve azt a kezdeti feltételezést, mely szerint a fehér zsírszövet a chemerin termelődésének és biológiai hatásának fő helye (Goralski és mtsai, 2007) (2. ábra).



2. ábra: A chemerin biológiai hatásai (MacDougald és Burant, 2007 alapján). Rövidítések: CMKLR1, chemokin-like receptor 1; IL-6, interleukin-6; MCP-1, monocita kemoattraktáns protein-1; TNF α , tumor nekrozis faktor alfa; RBP4, retinol kötő protein 4

A chemerin a zsírszövetben CMKLR1 receptorához kötődve autokrin és parakrin módon szabályozza az adipociták működését, ill. elősegíti a preadipociták zsírsejteké történő differenciálódását, ezzel serkentve az adipogenezist (Goralski és mtsai, 2007). Mivel a makrofágok és más, a gyulladásban szerepet játszó sejtek felszínén is található CMKLR1, ezért a chemerin kemoattraktáns faktorként részt vesz az immunfolyamatok aktiválásában (Ernst és mtsai, 2010). A keringésbe kerülve szisztémás hatása a megnövekedett oxidatív stresszrel, atherosclerossissal és inzulinrezisztenciával járó kórállapotokban is érvényesül. Számos klinikai

tanulmányban foglalkoznak a chemerin elhízáshoz köthető hatásával, ahol kemoattraktáns hatása az elhízásban fennálló, szisztémás alacsony fokú gyulladásos állapot miatt kifejezettebb (Fatima és mtsai, 2014). Több metabolikus paraméterrel pozitív összefüggést mutatott, mint a testtömegindex (BMI), haskőrfogat, hsCRP, szérum összkoleszterin, LDL-C és éhomi glükóz és inzulin szint, ill. negatívan korrelált a szérum HDL-C szinttel. A chemerin szint szignifikánsan nő az elhízás mértékével, az elhízott betegek szérum chemerin szintje szignifikánsan magasabb a normál testtömegű egyénekhez képest (Shin és mtsai, 2012). Az elhízott betegek súlycsökkenésével foglalkozó tanulmányok tovább erősítik a chemerinnek az elhízással való kapcsolatát: szintje szignifikánsan csökken életmódváltást vagy kalóriarestrikciót követően, ill. gyomorszűkítő műtéten átesett betegek esetében (Kim és mtsai, 2013, Sell és mtsai, 2010).

Az elhízásban betöltött szerepén kívül, kemoattraktáns és immunfolyamatokat moduláló hatásai miatt emelkedett szérum chemerin szintről számoltak be Chron-betegségben (Weigert és mtsai, 2010a), hepatitis-C fertőzésben (Kukla és mtsai, 2011), továbbá szisztémás lupus erythematosusban (De Palma és mtsai, 2011), rheumatoid arthritisben (Dessein és mtsai, 2014) és psoriasisban (Gisoni és mtsai, 2013) is.

2.3.3. Lipideltérések elhízásban

Gyakori eltérés elhízott betegekben a postprandialis hyperlipidaemia, amely azt jelenti, hogy főleg viszcerális elhízásban a betegek plazma triglicerid szintje étkezést követően akár 8 óra múltán sem tér vissza a kiindulási értékre, hanem tartósan magas marad (Chan és mtsai, 2013). Viszcerális elhízásban fokozódik a zsírsejtek szabad zsírsav termelése, amely a VLDL prekursora, ezért a máj fokozottabb mértékben termel trigliceridben gazdag VLDL-t. A VLDL köti az endotheliumban elhelyezkedő lipoprotein lipáz kötőhelyeit, ezáltal az étkezéssel a

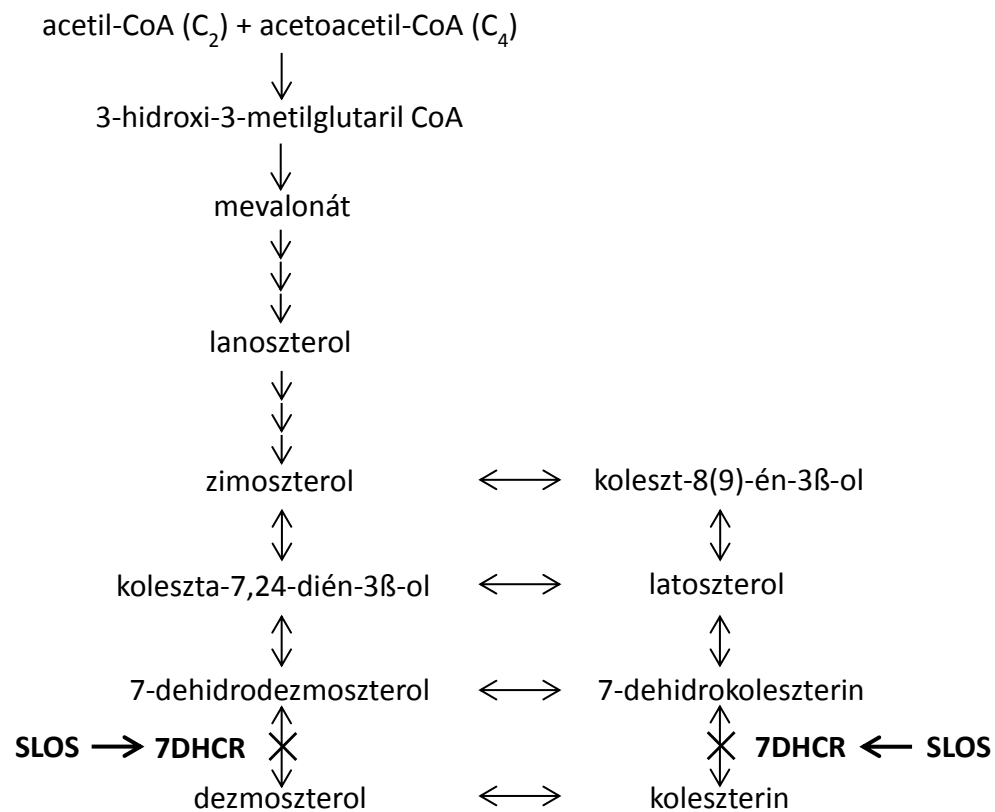
keringésbe kerülő kilomikronok nem tudják leadni trigliceridtartalmukat és tovább maradnak a keringésben. A fokozott VLDL többlet miatt emelkedik a plazma LDL-C szintje, amely fokozza a hepatikus lipáz és a CETP aktivitását, ezáltal a HDL remodellingjét is, így a trigliceridben gazdag nagyméretű HDL fokozottabban metabolizálódik a hepatikus lipáz által. A folyamat eredményeképpen a plazma össz HDL-C szintje csökken, szubfrakciós szinten azonban a HDL egyre kisebbé és denzebbé válik. A viszcerális elhízáshoz társulva azonban a HDL mégsem tudja ellátni feladatát HDL partikulum felszínén bekövetkező strukturális változások miatt, így a HDL antioxidáns és atheroprotektív kapacitása csökken (Bastien és mtsai, 2014). Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy elhízott betegek esetében a trigliceridben gazdag apoB tartalmú VLDL részecskék szintjének emelkedése mellett, az LDL-C mérsékelt emelkedését és a HDL-C szint csökkenését észleljük.

2.3.4. Smith-Lemli-Opitz szindróma

A Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLOS) egy ritka, autoszomális recesszív módon öröklődő anyagcsere-betegség, amelyet először 1964-ben Smith és munkatársai írtak le (Smith és mtsai, 1964). A fenotípusbeli eltérések közül a legsúlyosabbak az idegrendszeri és mentális károsodások, tanulási és táplálási nehézségek, fotoszenzitivitás, agresszió, cataracta, microcephalia, genitáliát érintő rendellenességek és az ujjak összenövése (Kelley és Hennekam, 2000). Gyakori, hogy a súlyos esetek újszülött vagy kora kisgyermek korban elhalnak.

A betegségért a 11. kromoszómán elhelyezkedő *DHCR7* gén mutációja felelős, amely a 7-dehidrokoleszterin-reduktáz enzimet (EC 1.3.1.21) kódolja. Az első mutáció leírása óta a *DHCR7* génnek több mint 100 különböző mutációja vált ismerté (DeBarber és mtsai, 2011).

A 7-dehidrokoleszterin-reduktáz enzim aktivitásának részleges vagy teljes hiányának következtében a 7-dehidrokoleszterin (7DHC) nem alakul át koleszterinné, így a koleszterinszintézis zavart szenved (3. ábra). Az SLOS gyerekek szérumában ezért extrém magas 7DHC szint (akár >1000-szeres) és több esetben rendkívül alacsony összkoleszterin szint detektálható (Tint és mtsai, 1995a).



3. ábra: Koleszterin bioszintézis útvonal defektusa Smith-Lemli-Opitz szindrómában (SLOS), amelyet a 7-dehidrokoleszterin-reduktáz (7DHC) enzim részleges vagy teljes funkcióvesztése okoz.

A koleszterin elengedhetetlenül fontos a sejtmembránok és az idegsejtek mielinhüvelyének felépítésében, valamint a szteroidhormonok és epesavak szintézisében. Mivel a koleszterin molekulaméreténél fogva nem jut át a placentán, ezért a diagnózis felállítását követően el kell kezdeni a megfelelő koleszterinpótlást (Clayton, 1998, Kelley és Hennekam, 2000). Máiig a koleszterin szupplementáció számít terápiás standardként az SLOS betegek kezelésére, azonban néhány esetben a kombinált koleszterin-simvastatin terápia is effektív lehet a perinatális tünetek megjelenésében (Jira és mtsai, 2000, P. Szabó és mtsai, 2010). A legújabb humán kutatások arra utalnak, hogy a retinakárosodások súlyosságát az antioxidáns terápia mérsékelheti (Fliesler, 2013), azonban az erre irányuló vizsgálatok még megerősítésre várnak.

A 7DHC a lipid peroxidáció szempontjából igen reaktív lipid komponens, amelynek következtében oxidációs termékek, pl. oxiszterolok keletkeznek *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt. Valószínűleg ezek a 7DHC-ből származtatott szterolok és oxiszterolok fontos szerepet játszanak az SLOS pathofiziológiájában, ugyanis humán fibroblast és rágcsáló modellben csökkentik a sejtproliferációt és különböző gén transzkripciós változásokat idéznek elő (Korade és mtsai, 2013, Xu és mtsai, 2011). Továbbá ezek az oxidációs termékek növelhetik az SLOS betegek szervezetében fennálló oxidatív stresszt és hatással lehetnek a lipoprotein metabolizmusra is.

3. Célkitűzések

1. Vizsgálataink során célkitűzésünk volt az LDL és HDL szubfrakciók mennyiségének és arányainak, valamint a szérum chemerin koncentrációjának meghatározása morbid elhízott, diabetes mellitussal nem rendelkező betegpopulációban.

Korábbi irodalmi adatok alapján jól ismert, hogy a szérum chemerin szint számos metabolikus rizikófaktorral mutatott összefüggést. Továbbá, ezek a tanulmányok kifejezetten a chemerin szint és az LDL-C ill. a HDL-C *összmennyisége* közötti kapcsolatokat vizsgálták, pedig ezen lipid partikulák funkcióját a strukturális, összetételbeli változások határozzák meg. Ezért célul tűztük ki a szérum chemerin szint és az LDL és HDL szubfrakciók kapcsolatának vizsgálatát elhízott, nem diabeteses betegcsoportban, mely értékes információkat szolgáltathat a lipoproteinek *kvalitatív* változására elhízás során. Vizsgáltuk továbbá a szérum chemerin szinttel leginkább összefüggő lipoprotein szubfrakciót.

2. Vizsgálataink második felében az öröklött koleszterin anyagcserezavarban szenvedő Smith-Lemli-Opitz szindrómás (SLOS) betegekben meghatároztuk az LDL és a HDL szubfrakciók arányának megoszlását.

További célkitűzésünk volt, hogy vizsgáljuk az oxidatív stressz mértékét a citotoxikus 7-dehidrokoleszterin (7DHC) szint monitorozásán keresztül. Mivel SLO szindrómában az összkoleszterin szint alacsonyabb a normál, kontroll populációhoz képest, ezért feltételeztük, hogy alacsonyabb HDL-C szint mellett a HDL-hez kötődve keringő PON1 enzim aktivitása is jelentősen redukálódik, és hozzájárulhat az SLO szindrómás gyerekek szervezetében fennálló fokozott oxidatív stresszhez. Vizsgáltuk a PON1 aktivitás és a lipoprotein szubfrakciók megoszlása közötti lehetséges összefüggéseket.

4. Betegek és módszerek

4.1. Elhízott betegek kiválasztása

Vizsgálatainkba 50 elhízott, nem diabeteses beteg (életkoruk: $44,2 \pm 13,5$ év, 43 nő és 7 férfi, BMI: $41,96 \pm 8,63$ kg/m²) került bevonásra, a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Obesitas szakrendeléséről. Adataikat 38 nemből és korban illesztett, normál testtömegindexű (BMI) egészséges önkéntes (életkoruk: $42,26 \pm 11,36$ év, 33 nő és 5 férfi, BMI: $24,05 \pm 3,21$ kg/m²) adataival hasonlítottuk össze. A BMI értékét a testsúly és a testmagasság négyzetének hányadosaként határoztuk meg az SI mértékegységrendszernek megfelelően (kg/m²); az elhízott csoportba a BMI ≥ 30 kg/m² egyéneket választottuk be. Azok a résztvevők, akiknek aktív máj vagy endokrin eredetű betegsége (pajzsmirigy és mellékpajzsmirigy betegségek, hypophysis és mellékvese eredetű megbetegedések, mindkét típusú diabetes mellitus), kardiovaszkuláris megbetegedése, veseelégtelensége vagy malignitása volt, kizárásra kerültek. Továbbá kizártuk a terheseket vagy szoptató anyákat, a rendszeres dohányzókat és alkoholfogyasztókat, ill. a lipidcsökkentő terápiában részesülő személyeket. Egyik résztvevő sem részesült antihipertenzív terápiában, kivéve 10 elhízott, nem diabeteses beteget, akik diuretikumot (indapamide) kaptak mérsékelt hipertóniájuk miatt. A vizsgálatba történő bevonás időpontjában a résztvevők részletes beleegyező nyilatkozatot írtak alá, amelyet a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága támogatott.

4.2. Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek kiválasztása

Vizsgálataink második részében 11, korábban diagnosztizált Smith-Lemli-Opitz szindrómás gyermeket (1 hónap és 20 év közötti életkorúak, négy leány és hét fiú) valamint 10, a Debreceni Egyetem Gyermekklinikájára egyéb okok miatt szakrendelésre érkezett, egészséges gyermeket

(életkoruk 3 hónap és 19 év közötti, 5 leány és 5 fiú) vontunk be. Kizárási kritériumok voltak bármilyen aktív fertőzés illetve visszatérő, klinikailag jelentősebb fertőzés a kezelőorvos megítélése alapján, malignitás, máj- és veseelégtelenség. A gyerekek a vérvétel időpontját megelőző 3 hónapban multivitamin készítményeket nem fogyasztottak. Az SLO szindrómás gyerekek esetében a fenotípusos jellemzők alapján a betegség súlyosságát Kelley és Hennekam 2000-ben közzétett súlyossági score rendszere alapján határoztuk meg (Kelley és Hennekam, 2000). Ennek megfelelően enyhe (n=3; score: <20), közepes vagy más néven tipikus (n=7; score: 20-50) és súlyos SLOS fenotípust (n=1; score: >50) különböztethetünk meg. A diagnózis felállítást követően 6 beteg koleszterinpótlásban részesült (Cholesterol Module, 50–250 mg/ttkg/nap, Nutricia; no 18.012), amelyet simvastatin adásával egészítették ki (0,2-0,4 mg/ttkg/nap dózisban). A vizsgálatba történő bevonásról a szülők részletes beteg beleegyező nyilatkozatot írtak alá, amelyet a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága támogatott.

4.3. Vérvétel és laboratóriumi paraméterek mérése

A vizsgálatba bevont betegektől és a kontrolloktól 12 órás éhezést követően vénás vérvétel történt. A mintákból a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében standard laboratóriumi módszerekkel meghatározták a szénhidrát- és lipidanyagcserére jellemző paramétereket Cobas c501 típusú analizátorral (Roche Ltd, Mannheim, Németország). Az éhomi glükóz, fruktózamin és húgysav értékét enzimatikus kolorimetriás módszerrel határozták meg. Az elhízott, nem diabeteses és normál testtömegű személyek esetében a diabetes mellitus kizárására orális glükóz tolerancia tesztet alkalmaztunk (75 g glükóz bevitelét követően) 12 órás éhezést követően. Ugyanebben az időben a hemoglobin A1c (HbA1c) és az inzulin értékét HPLC és immunoradiometrikus módszerekkel határozták meg. A homeostasis model assessment inzulin

rezisztencia (HOMA-IR) értékét az éhomi inzulinkoncentráció ($\mu\text{U/ml}$) \times éhomi glükóz koncentráció (mmol/l) / 22,5 képlet alapján számítottuk ki.

A szérum összkoleszterin és a triglicerid koncentráció meghatározása enzimatikus, kolorimetriás módszerrel, a HDL-C és az LDL-C esetében homogén, enzimatikus módszerrel (Roche HDL-C plus 3rd generation és Roche LDL-C plus 2nd generation) történt. Az apolipoprotein AI (apoAI), az apolipoprotein B (apoB) és a lipoprotein(a) (lp(a)) értékét immunoturbidimetriás módszerrel mérték (Tina-quant ApolipoproteinA-1 ver.2, Tina-quant ApolipoproteinB ver.2 és Tina-quant lipoprotein(a) ver.2).

A vizsgálatokat a gyártó által megadott útmutató szerint végezték. További laboratóriumi mérésekre a szérum mintákat -70°C -on helyeztük el és 2 hónapon belül felhasználtuk.

4.4. LDL és HDL szubfrakciók elválasztása

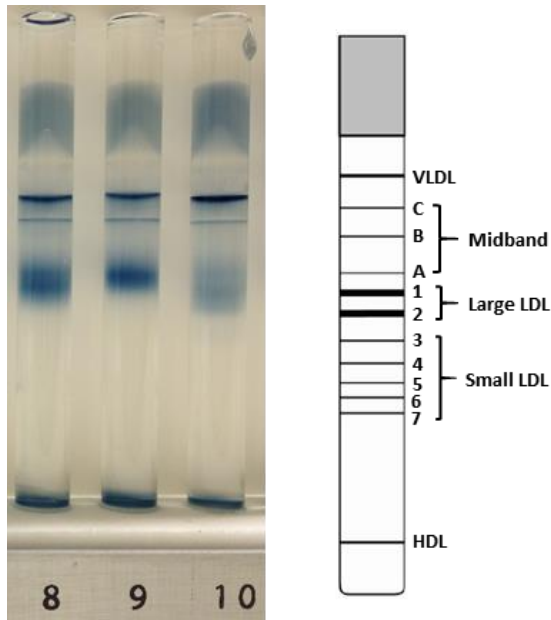
A korábban ismertetésre került elválasztás technikai módszerek közül kutató laboratóriumunkban csöves nem-grádiens gélelektroforézis rendszert (Lipoprint rendszert) használunk lipoprotein szubfrakciók elkülönítésére. Segítségével, méretük alapján, lehetőségünk van az LDL teszt esetében 7 különböző LDL szubfrakció, addig a HDL teszt esetében 10 különböző HDL szubfrakció elválasztására. A Lipoprint LDL szubfrakciós teszt során elválasztott 7 szubfrakció közül az LDL-1 és LDL-2 szubfrakciók jól korrelálnak az ultracentrifugálás során elválasztott nagy, kevésbé denz LDL szubfrakcióval, míg az LDL-3,-4,-5,-6 és -7 szubfrakciók kis denz LDL szubfrakcióval vethetők össze (Hoefner és mtsai, 2001) (2. táblázat). A HDL szubfrakciós teszt során meghatározott HDL-1,-2,-3 szubfrakciókat a rendszer a nagy, a HDL-4,-5,-6,-7 szubfrakciókat a közepes, ill. a HDL-8,-9,-10 szubfrakciókat a kis HDL szubfrakciókhoz sorolja. A Lipoprint HDL szubfrakciós teszt során meghatározott nagy HDL

szubfrakció (1-3) az ultracentrifugálás során elválasztott HDL2, míg a közepes és kis HDL szubfrakciók (4-10) az ultracentrifugált HDL3 frakcióval homológok (3. táblázat).

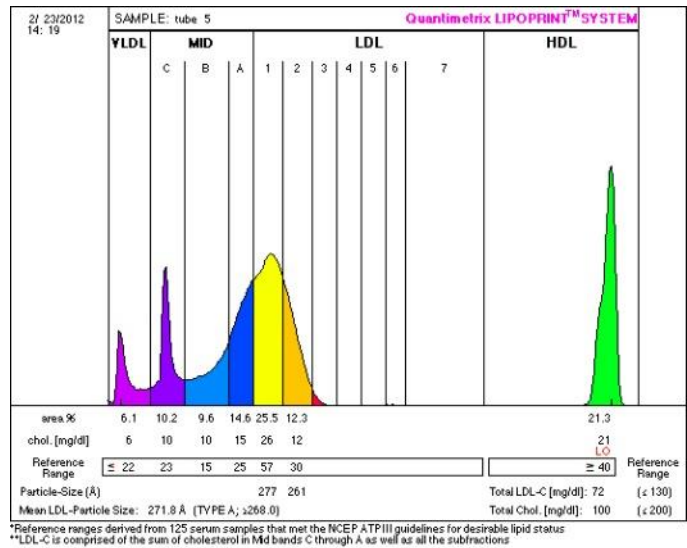
LDL szubfrakciók elválasztása. Az LDL szubfrakciók elválasztását csöves poliakrilamid gélelektroforézis rendszerrel végeztem (Lipoprint rendszer, Quantimetrix Corp., Redondo Beach, CA) a gyártó által kiadott felhasználási útmutatónak megfelelően. LDL szubfrakciós teszt során az előre betöltött 3%-os akrilamidot tartalmazó üvegcsövek felső részére 25 µl szérum mintát vittem fel. A mintákban lévő lipoproteineket 200 µl szudán fekete festéket tartalmazó akrilamid folyékony géllal tettem láthatóvá. 30 perces fotopolimerizálást követően a csöveket elektroforézis kádba helyeztem, amelynek alsó és felső részébe Tris és bórsavat tartalmazó puffer oldatot öntöttem, majd 3 mA/cső áramerősség és 500 V feszültség mellett 60 percig elektroforetizáltam a mintákat. Az elektroforézis után 30 perccel a megfuttatott lipoprotein szubfrakciókat tartalmazó csöveket digitalizáltam és a Lipoware szoftver (Quantimetrix Corp.) segítségével analizáltam.

Az LDL szubfrakciós teszt során maximálisan 7 különböző LDL szubfrakció elválasztására van lehetőség. Az elkülönített lipoproteinek méretük szerint haladnak a gélben, ezért a leggyorsabb a HDL, míg a leglassabb a VLDL lesz (4. ábra). A kilomikronok (amennyiben a minta tartalmazott) a felvitel helyén maradnak. Ennek eredményeként egy sávos eloszlást fogunk látni, melyben az első sáv lesz a VLDL sávja, az ezt követő 3 sáv az úgynevezett Midband, ami IDL-t és VLDL remnantokat tartalmaz, majd az LDL szubfrakciók és a HDL sávja következnek. 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). A döntően nagyméretű, kevésbé denz LDL szubfrakciókat tartalmazó lipidprofil normál LDL profilnak, a döntően kisebb méretű, denzebb LDL szubfrakciókat tartalmazó profilt abnormális LDL lipidprofilnak tekintjük.

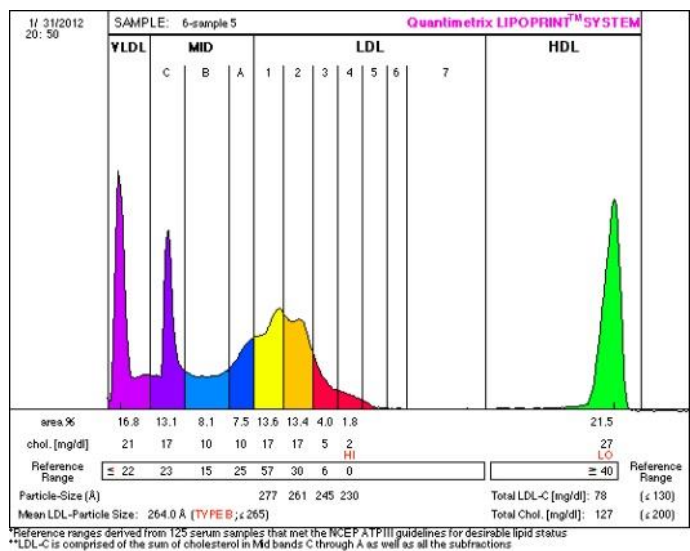
(a)



(b)



(c)

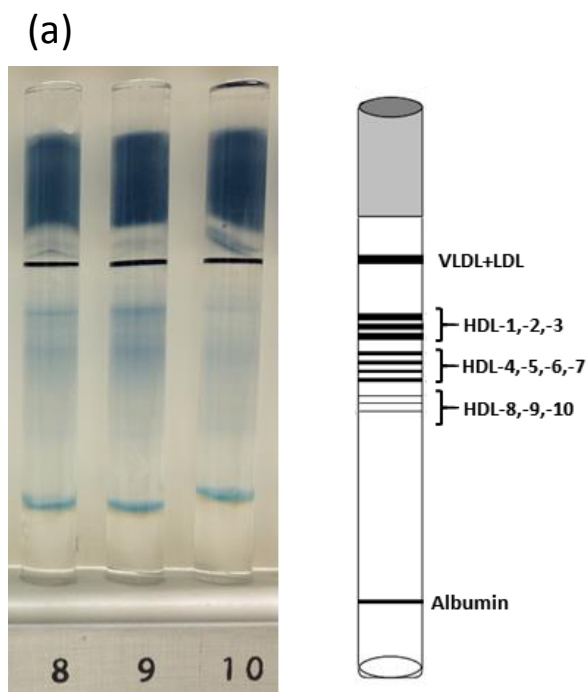


4. ábra: (a) Az LDL szubfrakciós sávok sematikus mintázata elektroforézist követően: az első sáv a VLDL, alatta az IDL-t és VLDL remnantokat tartalmazó 3 Midband sáv, majd a nagy LDL szubfrakciók (LDL-1, -2), a kis denz LDL szubfrakciók (LDL-3,-4,-5,-6,-7) és a HDL sávja következnek. A (b) panelen egy egészséges személy denzitometriás képe látható döntően nagy LDL szubfrakciókkal (átlagos LDL méret 27.18 nm; sárga színnel jelölve), míg a (c) panelen egy beteg reprezentatív abnormalis denzitometriás képe látható, ahol megjelenik a kis denz LDL szubfrakció (átlagos LDL méret 26.40 nm; piros színnel jelölve).

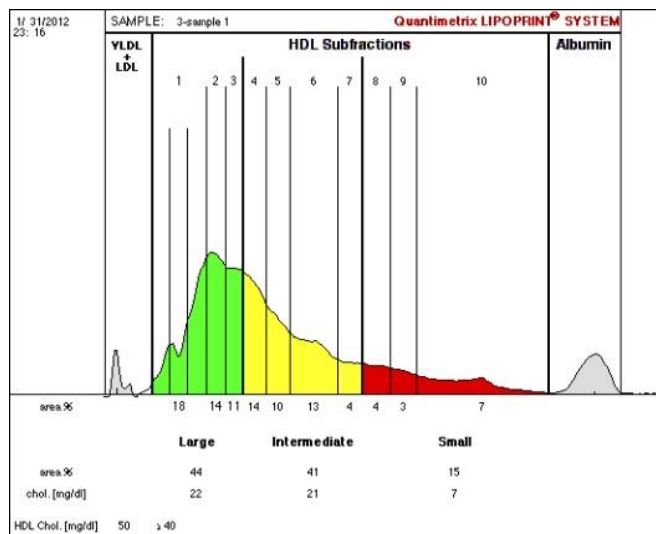
Az egyes lipoprotein sávok koleszterin koncentrációja megadható az összkoleszterin szint és a Lipoware szoftver által meghatározott görbe alatti terület ismeretében. Az átlagos LDL méretet (nm) a denzitogram alapján szintén a Lipoware szoftver kalkulálja.

HDL szubfrakciók elválasztása. A HDL szubfrakciók elválasztását szintén csöves poliakrilamid gélelektroforézis rendszerrel végeztem (Lipoprint rendszer, 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 viszek fel a 3%-os akrilamid gélt tartalmazó üvegsövekre, azonban a szudán fekete festéket tartalmazó folyékony gél térfogata 300 µl. 30 perces fotopolimerizálást követően az elektroforézis 50 percig tart 3 mA/cső áramerősség és 500 V feszültség mellett.

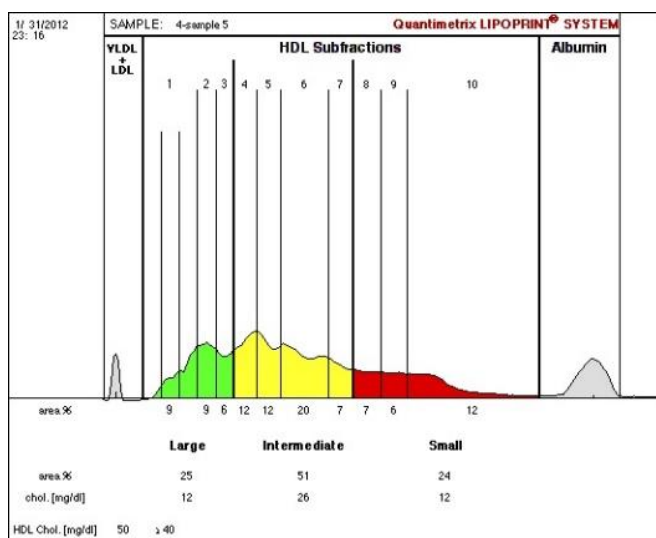
A HDL szubfrakciós teszt kivitelezése során a leggyorsabban mozgó frakció az albumin, a leglassabban a VLDL+LDL sávja halad (5. ábra). A kilomikronok, az LDL teszthez hasonlóan itt is a felvitel helyén maradnak. A HDL szubfrakciós teszt során a Lipoprint rendszer 10 szubfrakciót különít el. A HDL-1,-2,-3 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.



(b)



(c)



5. ábra: (a) A HDL szubfrakciós sávok sematikus mintázata az elektroforézist követően: a felső, lassan mozgó frakció a VLDL+LDL sávja, amelyet a nagy HDL (HDL-1,-2,-3), a közepes HDL (HDL-4,-5,-6,-7) és kis HDL (HDL-8,-9,-10) szubfrakciók követnek. A leggyorsabban mozgó frakció az albumin. A **(b)** panelen egy egészséges személy denzitometírás képe, míg a **(c)** panelen egy beteg reprezentatív denzitometriás képe látható.

4.5. Szérum chemerin szint meghatározása

A teljes szérum chemerin koncentráció meghatározását a kereskedelmi forgalomban kapható szendvics ELISA kit segítségével végeztem (USCN Life Science Inc, Wuhan, Kína) a gyártó által megadott útmutató szerint. Az intra-assay variációs koefficiens <10%, míg az inter-assay variációs koefficiens <12% alatt volt.

4.6. 7-dehidrokoleszterin szint és paraoxonáz-1 aktivitás meghatározása

A 7-DHC koncentráció mérése UV spektrometriás módszerrel történt Honda és mtsai által publikált módszer alapján (Honda és mtsai, 1997). A módszer alsó detektálási határa 15 mg/l és a változások 15-400 mg/l-es tartományban lineárisak. Az extrakció során 0,2 ml szérum és 1,6 ml c-hexán:i-propanol 3:1 arányú keverékét vortexeltem 20 másodpercen keresztül, majd centrifugáltam, és a tiszta felülúszó abszorbanciáját 282 nm-en mértem meg.

A PON1 paraoxonáz aktivitás meghatározásakor 100 mmol/L Tris-HCl (pH=8,0), 2 mmol/L CaCl₂-t tartalmazó pufferben 5,5 mmol/L paraoxont (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát, Sigma) oldottam fel, majd szérum hozzáadása után 405 nm-en, szobahőmérsékleten spektrofotometriás módszerrel monitoroztam a képződő 4-nitrofenol mennyiségét. Az egy percre jutó abszorbancia változás és az enzim által 405 nm-en elbontott paraoxon szubsztrátra jellemző moláris extinkciós koefficiens ($17\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) alapján meghatároztam a PON1 enzim paraoxonáz aktivitását. A mértékegység: U/L, ahol egy unit (egység) 1 μmol szubsztrát elbomlását jelenti egy perc alatt (Fülöp és mtsai, 2014).

A PON1 arilészteráz aktivitás meghatározása során 1 mmol/L fenilacetátot (Sigma) és 20 mmol/L Tris/HCl puffert (pH=8,0) tartalmazó oldatot használtam, szérum hozzáadását követően 270 nm-en végeztem az abszorbanciamérést. Szubsztrátvak segítségével korrigáltam a fenilacetát

spontán hidrolízisét. Az enzimaktivitást $1310 \text{ mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens segítségével számoltam, és U/L-ben fejeztem ki. Egységnyi (1 unit) PON1 arilészteráz aktivitásnak a fenti körülmények között percenkénti 1 μmol fenilacetát bomlása felel meg (Fülöp és mtsai, 2014).

4.7. Statisztikai elemzés

A statisztikai analízist a STATISTICA (ver: 8,0; StatSoft Inc., Tulsa, OK) programmal végeztük. Az adatok eloszlásának vizsgálatát a Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük. A két vizsgálati csoport adatainak összehasonlítása normális eloszlás esetén Student-féle kétmintás t-próbával történt. A mért paraméterek nem normális eloszlásakor a Mann-Whitney u-próbát alkalmaztuk. A normál eloszlást mutató paramétereknél az adatok átlag \pm szórás (SD) formájában fejeztük ki, míg a nem-normál eloszlást mutató adatoknál a medián ill. alsó és felső kvartilis értékeket alkalmaztunk. A folytonos változók közti összefüggést Pearson korrelációs analízissel vizsgáltuk. Multivariációs analízis (backward-stepwise módszer) során meghatároztuk a szérum chemerin szinttel legjobban összefüggő lipoprotein szubfrakciót. Szignifikancia szintnek a $p < 0,05$ értéket választottuk.

5. Eredmények

5.1. A szérumban chemerin koncentráció és lipoprotein szubfrakciók közötti kapcsolat elhízott, nem diabeteses és normál testtömegű egyéneknél

Az elhízott, nem diabeteses betegek és kontrollok antropometriai és laboratóriumi paramétereit a 4. táblázatban foglaltam össze. A szérumban chemerin koncentráció szignifikánsan magasabb volt az elhízott, nem diabeteses csoportban a normál testtömegű kontrollokhoz képest. Az emelkedett hsCRP szint alapján a betegekben az elhízással összefüggésben alacsony szintű, szisztémás gyulladás igazolódott. A triglicerid és lipoprotein(a) szintek szignifikánsan magasabbak, míg a HDL-C és apoA-I koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak voltak a betegcsoportban a kontrollokhoz viszonyítva, azonban az értékek a normál fiziológiás tartományon belülre estek. A kontrollokhoz képest az elhízott, nem diabeteses betegekben szignifikánsan magasabbnak találtuk a húgysav, hemoglobin A1c és éhomi glükóz szinteket, azonban az említett paraméterek szintén a referencia tartományon belül voltak, amelyet a 2 órás OGTT méréssel és HOMA-IR számításával is igazoltunk (4. táblázat).

4. táblázat: A vizsgálati résztvevők antropometriai és laboratóriumi értékei

	Elhízott (n=50)	Kontroll (n=38)	P-érték	Referencia tartomány
Nem (nő/férfi)	43 / 7	33 / 5		
Életkor (év)	44.20 ± 13.50	42.26 ± 11.36	n.s.	
BMI (kg/m ²)	41.96 ± 8.63	24.05 ± 3.21	<0.001	
hsCRP (mg/l)	8.24 (3.2 – 13.09)	0.85 (0.5 – 1.38)	<0.001	<5.2
Triglicerid (mmol/l)	1.4 (1.1 – 2.0)	0.9 (0.7 – 1.6)	<0.01	<1.70
Összkoleszterin (mmol/l)	5.04 ± 0.83	5.06 ± 1.03	n.s.	<5.2
HDL-koleszterin (mmol/l)	1.36 ± 0.33	1.72 ± 0.47	<0.001	ffi: >1.0; nő: >1.3
LDL-koleszterin (mmol/l)	3.17 ± 0.74	2.93 ± 0.98	n.s.	<3.4
Apolipoprotein A-I (g/l)	1.48 ± 0.24	1.66 ± 0.39	<0.01	>1.15
Apolipoprotein B (g/l)	0.86 ± 0.20	0.78 ± 0.26	n.s.	<1.0
Lipoprotein(a) (mg/l)	248 (120 - 586)	112 (80 - 300)	<0.01	<300
Fruktózamin (µmol/l)	225.32 ± 27.95	233.90 ± 15.76	n.s.	<285
Húgysav (µmol/l)	315.24 ± 91.61	258.67 ± 70.54	<0.001	ffi:200-420; nő:140-340
Hemoglobin A1c (%)	5.81 ± 0.57	5.06 ± 0.33	<0.001	4.2-6.1
Éhomi glükóz (mmol/l)	4.90 ± 0.75	4.41 ± 0.57	<0.01	3.6-6.0
2 órás OGTT (mmol/l)	7.00 ± 2.01	6.54 ± 1.13	n.s.	7.8
Inzulin (mU/l)	17.14 ± 9.91	14.26 ± 6.02	n.s.	2.1-22
HOMA-IR	3.2 (2.2 – 5.1)	2.4 (1.3 – 3.3)	n.s.	
Chemerin (ng/ml)	590.08 ± 90.29	404.99 ± 127.07	<0.001	

n.s., nem szignifikáns

BMI, tömegindex; hsCRP, high-sensitivity C-reaktív protein; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; OGTT, orális glükóz tolerancia teszt; HOMA-IR, homeostasis model assessment – inzulin rezisztencia

Az LDL és HDL szubfrakciók százalékos és mennyiségi eloszlása az 5. és 6. táblázatban látható. Az LDL szubfrakciók eloszlását tekintve az össz LDL-C értékhez hasonlóan nem volt szignifikáns különbség a két vizsgálati csoportban a nagy LDL szubfrakció arányát illetően (5. táblázat). Ezzel ellentétben a kis LDL szubfrakció aránya, továbbá mind a nagy, mind a kis LDL szubfrakció abszolút mennyisége szignifikánsan nagyobb volt elhízott, nem diabeteses egyéneknél a kontroll csoporthoz képest. Elhízottakban az LDL átlagos mérete szignifikánsan alacsonyabb volt.

5. táblázat: Az LDL szubfrakciók százalékos és mennyiségi eloszlása elhízott, nem diabeteses betegek és kontrollok esetében

	Elhízott (n=50)	Kontroll (n=38)	p-érték
<i>LDL szubfrakciók százalékos eloszlása</i>			
Nagy LDL (%)	25.8 ± 4.1	24.4 ± 4.7	n.s.
Kis denz LDL (%)	2.196 ± 2.275	0.6029 ± 0.646	<0.001
<i>LDL szubfrakciók mennyiségi eloszlása</i>			
Nagy LDL (mmol/l)	1.317 ± 0.361	1.146 ± 0.405	<0.05
Kis denz LDL (mmol/l)	0.113 ± 0.118	0.029 ± 0.034	<0.001
Átlagos LDL méret (nm)	26.98 ± 0.32	27.28 ± 0.18	<0.001

n.s., nem szignifikáns
LDL, low-density lipoprotein

Bár a HDL-C koncentrációk mindkét csoportban a normál tartományba estek, a HDL szubfrakciók vizsgálatakor az elhízott csoportban eltolódást tapasztaltunk a kis HDL szubfrakció irányába (6. táblázat). A nagy HDL szubfrakció aránya szignifikánsan alacsonyabb, míg a közepes és kis HDL szubfrakciók aránya szignifikánsan magasabb volt az elhízottak körében a normál testtömegű kontrollokhoz képest. Az elhízott, nem diabeteses csoportban a nagy és a közepes HDL szubfrakciók abszolút mennyisége szignifikánsan alacsonyabb, a kis HDL szubfrakció mennyisége szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz viszonyítva.

6. táblázat: A HDL szubfrakciók százalékos és mennyiségi eloszlása elhízott, nem diabeteses betegek és kontrollok esetében

	Elhízott (n=50)	Kontroll (n=38)	p-érték
<i>HDL szubfrakciók százalékos eloszlása</i>			
Nagy HDL (%)	22.5 ± 5.7	34.6 ± 8.5	<0.001
Közepes HDL (%)	52.3 ± 3.4	48.3 ± 4.4	<0.001
Kis HDL (%)	25.2 ± 5.9	17.1 ± 5.7	<0.001
<i>HDL szubfrakciók mennyiségi eloszlása</i>			
Nagy HDL (mmol/l)	0.319 ± 0.157	0.635 ± 0.300	<0.001
Közepes HDL (mmol/l)	0.708 ± 0.169	0.832 ± 0.182	<0.01
Kis HDL (mmol/l)	0.333 ± 0.070	0.285 ± 0.087	<0.01

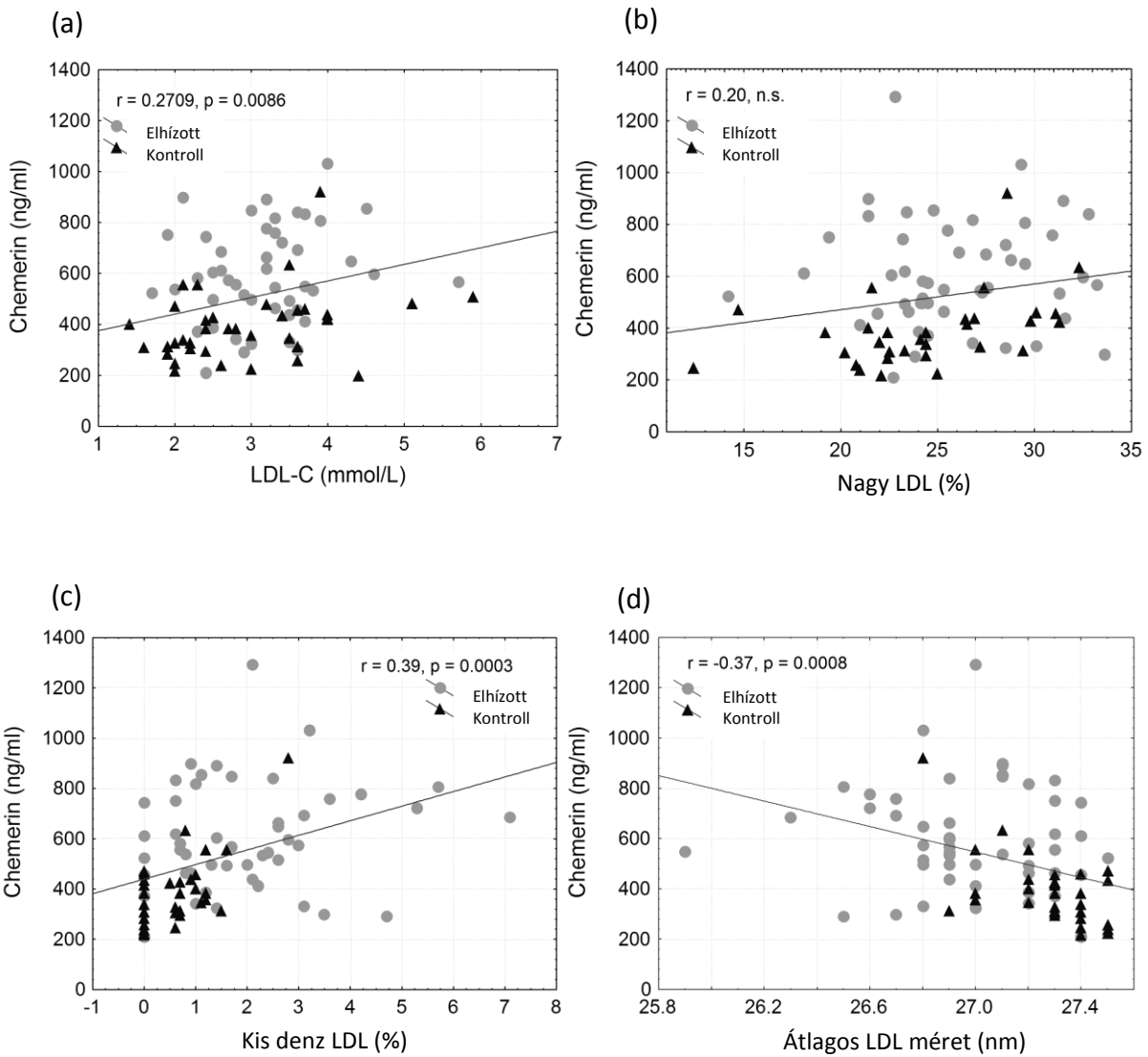
HDL, high-density lipoprotein

A szérumban chemerin koncentráció és az apolipoprotein molekulák szintje közötti kapcsolat vizsgálatakor szignifikáns negatív korrelációt találtunk a chemerin és az apoA-I ($r=-0,24$; $p=0,03$) szintek között, ill. szignifikáns pozitív összefüggést mutattunk ki a chemerin és az apoB ($r=0,35$; $p=0,001$), valamint a chemerin és a lipoprotein(a) szintje között ($r=0,38$; $p=0,0003$).

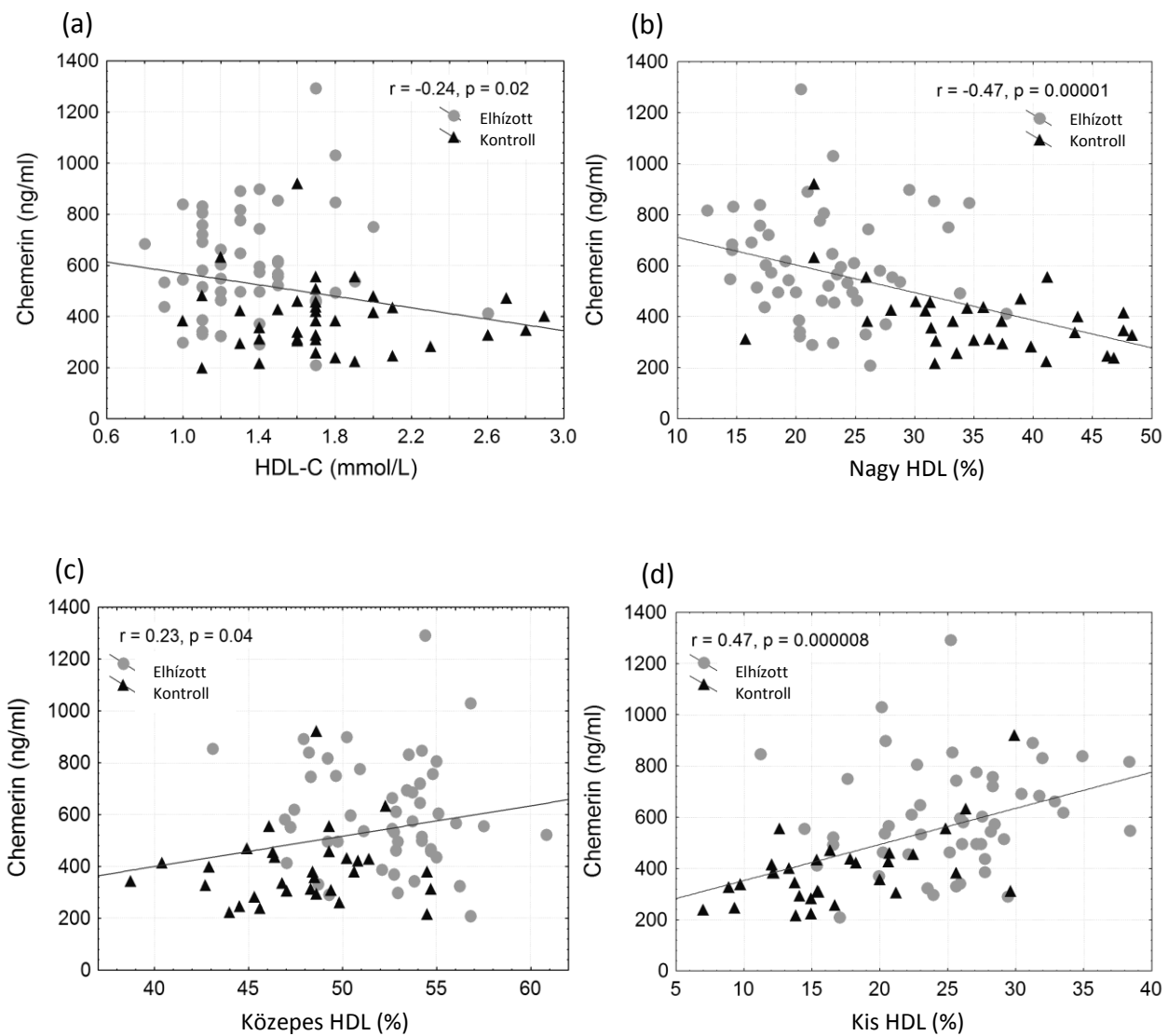
Minden vizsgálati személyt együtt tekintve a szérumban chemerin szint pozitívan korrelált az LDL-C szintjével ($r=0,27$; $p=0,0086$) (6.a. ábra). Pozitív, bár nem szignifikáns trend mutatkozott a chemerin szint és a nagy LDL szubfrakció arányát tekintve ($r=0,20$; n.s.) (6.b. ábra), míg szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a chemerin koncentráció és a kis denz LDL szubfrakció között ($r=0,39$; $p=0,0003$) (6.c. ábra). Ahogy a 6.d. ábrán is látható, inverz korrelációt mutattunk ki a chemerin szint és az átlagos LDL méret között ($r=-0,37$; $p=0,0008$). Továbbá szoros összefüggést találtunk a BMI és az átlagos LDL méret között ($r=-0,39$; $p=0,0002$).

Minden résztvevőt együtt véve a chemerin szint és a HDL szubfrakciók közötti kapcsolat vizsgálatakor a chemerin szint negatívan korrelált a HDL-C szintjével ($r=-0,24$; $p=0,02$) (7.a. ábra), hasonlóan a nagy HDL szubfrakció arányával ($r=-0,47$; $p=0,00001$) (7.b. ábra). Ezzel ellentétben, a közepes és a kis HDL szubfrakciók aránya pozitív összefüggést mutatott a szérumban chemerin koncentrációval ($r=0,23$; $p=0,04$ és $r=0,47$; $p=0,000008$) (7.c. és 7.d. ábra).

A chemerin koncentráció és a lipoprotein szubfrakciók közötti összefüggéseket a vizsgálati csoportokban külön-külön is tanulmányoztuk. A korrelációk a kontrollok esetében szignifikánsak maradtak a HDL-C és a közepes HDL szubfrakciók kivételével. Az elhízottak esetében nem találtunk szignifikáns összefüggést.



6. ábra: Összefüggések a szérumban a chemerin koncentráció és az LDL-C szint (a), a nagy LDL szubfrakció aránya (b), a kis denz LDL szubfrakció aránya (c) és az átlagos LDL méret között (d)



7. ábra: Összefüggések a szérumban lévő chemerin koncentráció és a HDL-C (a), a nagy HDL szubfrakció (b), a közepes HDL szubfrakció (c) és a kis HDL szubfrakció között (d)

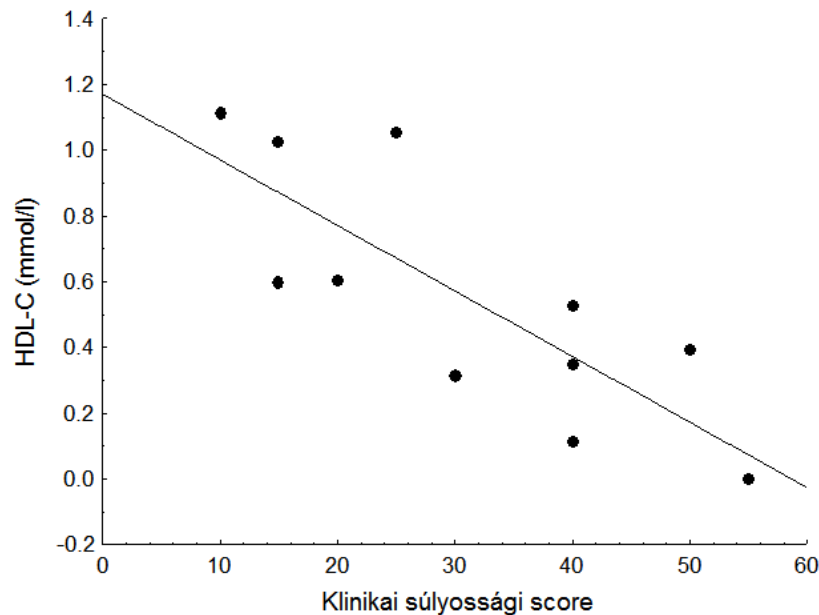
A BMI hatásának figyelembevételével a chemerin és az LDL-C szint ($p=0,01$), a kis denz LDL szubfrakció aránya ($p=0,03$), az átlagos LDL méret ($p=0,03$), a nagy HDL szubfrakció aránya ($p=0,03$) és a kis HDL szubfrakció aránya ($p=0,005$) közötti korrelációk maradtak szignifikánsak. Vizsgálataink további részében többszörös regressziós analízist alkalmaztunk a BMI hatásának tisztázására, ahol függő változóként a chemerint jelöltük meg. A modellbe az alábbi paramétereket foglaltuk bele: életkor, nem, BMI, hsCRP, HDL-C, nagy HDL, közepes HDL, kis HDL, LDL-C, nagy LDL, kis denz LDL és átlagos LDL méret. Az analízis eredménye alapján szérumszerű chemerin koncentrációval legszorosabban összefüggő faktorok a hsCRP ($p<0,001$) és a kis HDL szubfrakció voltak ($p<0,001$). Vizsgálataink alapján a BMI a szérumszerű chemerin koncentrációnak nem volt független előrejelzője ($p=0,895$) (7. táblázat).

7. táblázat: Többszörös regressziós analízis eredménye (függő változó a szérumszerű **chemerin** szint)

	Beta	p-érték
hsCRP	0.565	<0.001
Kis HDL (mmol/l)	0.383	<0.001
Nagy HDL (mmol/l)	-0.17	0.053
Életkor	0.103	0.262
LDL-C (mmol/l)	0.093	0.291
Nagy LDL (mmol/l)	-0.09	0.594
Kis denz LDL (mmol/l)	-0.05	0.638
Átlagos LDL méret (nm)	-0.07	0.759
HDL-C (mmol/l)	0.118	0.762
Közepes HDL (mmol/l)	-0.25	0.809
Nem	-0.020	0.838
BMI	-0.020	0.895

5.2. Lipoprotein szubfrakciók eloszlása SLOS és kontroll gyerekekben

A vizsgálatunkban résztvevő SLOS és egészséges gyerekek klinikai és laboratóriumi paramétereit a 8. táblázatban foglaltam össze. Az SLOS gyerekeket Kelley és Hennekam score rendszere alapján klinikai súlyosság szerint tipizáltuk. Az átlagos klinikai súlyossági score az SLOS csoportban $30,9 \pm 15,1$ volt. Egy súlyos fenotípusú gyerek (score >50) újszülöttként exitált, 7 gyerek közepes súlyosságú – típusos – csoportba (score 20-50), míg 3 gyerek enyhe fenotípusba tartozott (score <20). A 7DHC szintje a betegcsoportban 205 (85-274) mg/l volt, míg az egészséges gyerekekben a detektálási határ alá esett (<0,15 mg/l). A lipidparaméterek tekintetében az összkoleszterin, LDL-C és HDL-C szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban a kontrollhoz képest (8. táblázat). Szignifikáns negatív korrelációt mutattunk ki a klinikai súlyossági score és a HDL-C szintje között ($r=-0,804$; $p=0,003$) (8. ábra).



8. ábra: Összefüggés a klinikai súlyossági score és a HDL-C szint között SLOS betegekben
($n=11$; $r=-0,804$; $p=0,003$)

8. táblázat: A Smith-Lemli-Opitz szindrómás és kontroll gyerekek klinikai és laboratóriumi értékei

	SLOS (n=11)	Kontroll (n=10)	p
Nem	4 lány / 7 fiú	5 lány / 5 fiú	
Életkor (év)	5.71 ± 6.93	5.36 ± 6.02	n.s.
Klinikai súlyossági score	30.9 ± 15.1		
7-Dehidrokoleszterin (mg/l)	205 (85-274)	n.d.	
Összkoleszterin (mmol/l)	1.73 ± 0.9	3.52 ± 0.63	<0.0001
LDL-koleszterin (mmol/l)	0.9 ± 0.4	1.88 ± 0.46	<0.0001
Nagy LDL (%)	16.9 (14.5-22.4)	26.1 (23.8-30.4)	<0.001
Kis denz LDL (%)	10.2 (2.3-13.3)	0.8 (0.0-2.7)	<0.01
Átlagos LDL méret (nm)	25.7 ± 0.83	27.16 ± 0.32	<0.001
LDL szubfrakciós mintázat			
normál (n)	3	8	
átmeneti (n)	1	2	
abnormál (n)	7	0	
HDL-koleszterin (mmol/l)	0.55 ± 0.38	1.04 ± 0.27	<0.01
Nagy HDL (%)	73.5 (47.4-77.2)	34.5 (31.6-41.8)	<0.001
Közepes HDL (%)	19.8 (18.9-39.6)	49.5 (44.3-50.5)	<0.001
Kis HDL (%)	7.1 (2.3-11.0)	16.0 (13.9-18.5)	<0.01

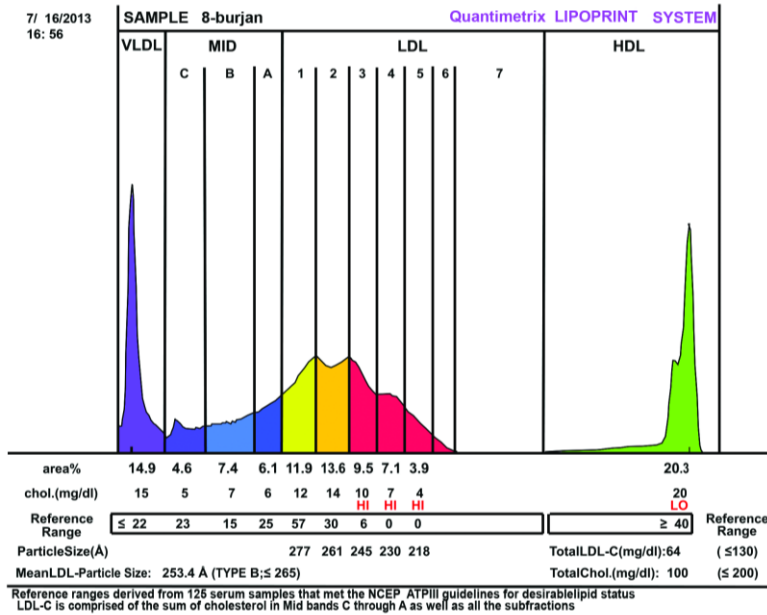
n, esetszám; n.s. nem szignifikáns, n.d. nem detektálható (<0,15 mg/l)

SLOS, Smith-Lemli-Opitz szindróma; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein

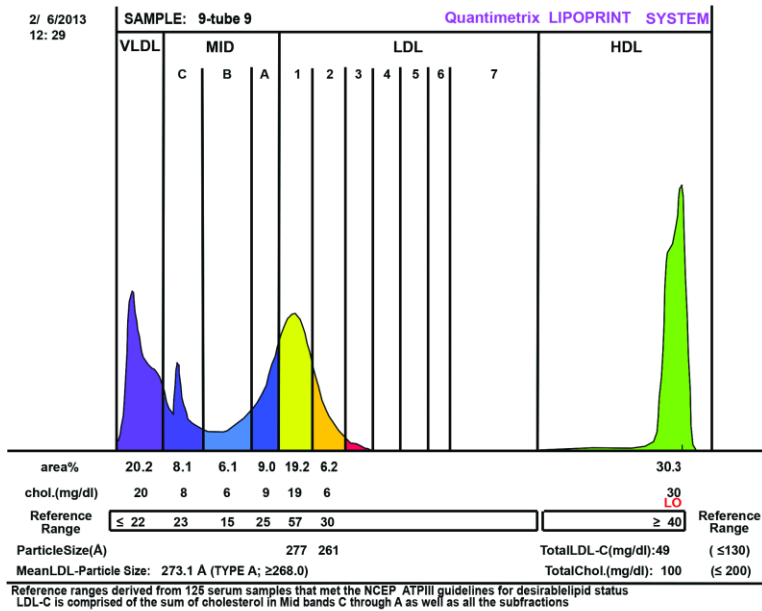
Az LDL szubfrakciók vizsgálatakor a kontrollokhöz képest a nagy LDL szubfrakció aránya szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,001$), míg a kisméretű denz LDL szubfrakció aránya szignifikánsan magasabb ($p < 0,01$) volt az SLOS csoportban (8. táblázat). Továbbá az átlagos LDL méret szignifikánsan kisebb volt a betegcsoportban a kontrollokhöz viszonyítva ($p < 0,001$). Ezek az adatok összhangban voltak az LDL szubfrakciós mintázattal is: 7 SLOS gyerek abnormális, egy beteg átmeneti és 3 gyerek normál LDL szubfrakciós mintázattal rendelkezett, szemben az egészséges csoporttal, ahol a kontrollok döntő többsége normál LDL szubfrakciós mintázattal bírt (8. táblázat). A 9.a. ábrán egy típusos SLOS gyerek abnormális LDL szubfrakciós mintázata látható (átlagos LDL méret: 25,34 nm) döntően kisméretű denz LDL szubfrakcióval (9.a. ábra, piros színnel jelölve). A 9.b. ábrán egy egészséges gyerek normál denzitometriás képét mutatom be, ahol jellegzetesen a nagyméretű, kevésbé denz LDL szubfrakciók látszanak (sárga színnel jelölve).

A HDL szubfrakciók monitorozása során kapott eredmények alapján az SLOS betegekben eltolódást mutattunk ki a nagyméretű HDL szubfrakció irányába (8. táblázat). A nagy HDL szubfrakció aránya markánsan magasabb ($p < 0,001$), míg a közepes és a kis HDL szubfrakció aránya alacsonyabb ($p < 0,001$ és $p < 0,01$) volt a betegcsoportban az egészséges gyerekekhez viszonyítva. A 10.a. ábrán a HDL szubfrakciók denzitometriás képét mutatom be egy típusos SLOS gyerek esetében (10.a. ábra), ahol a nagy HDL szubfrakció egyértelmű dominanciája figyelhető meg a közepes és a kis HDL szubfrakció rovására, míg a 10.b. ábrán egy egészséges gyerek HDL szubfrakciós mintázata látható.

(a)

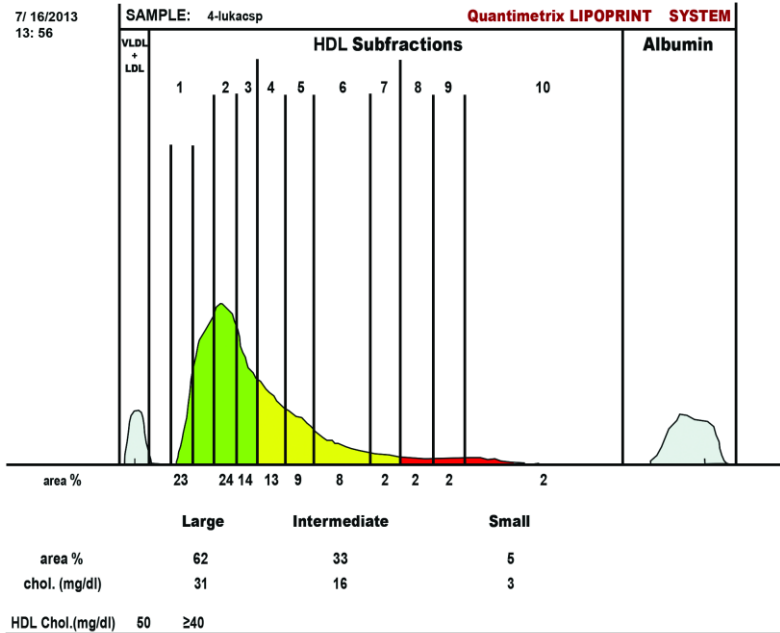


(b)

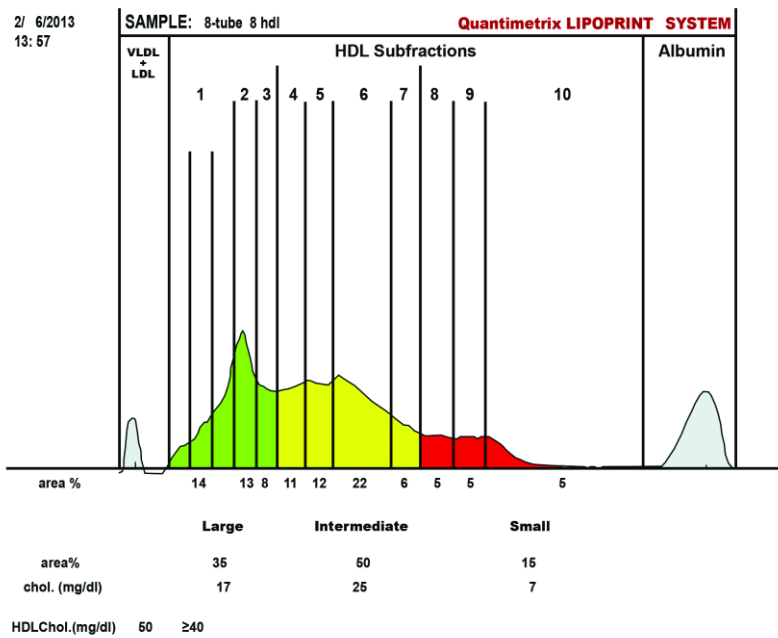


9. ábra: (a) LDL szubfrakciós mintázat egy típusos SLOS beteg esetében döntően kisméretű denz LDL szubfrakcióval (átlagos LDL méret 25,34 nm; piros színnel jelölve). (b) LDL szubfrakciós mintázat egy kontroll gyerek esetében, ahol jellegzetesen a nagyméretű, kevésbé denz LDL szubfrakciók látszanak (átlagos LDL méret 27,31 nm; sárga és narancs színnel jelölve).

(a)



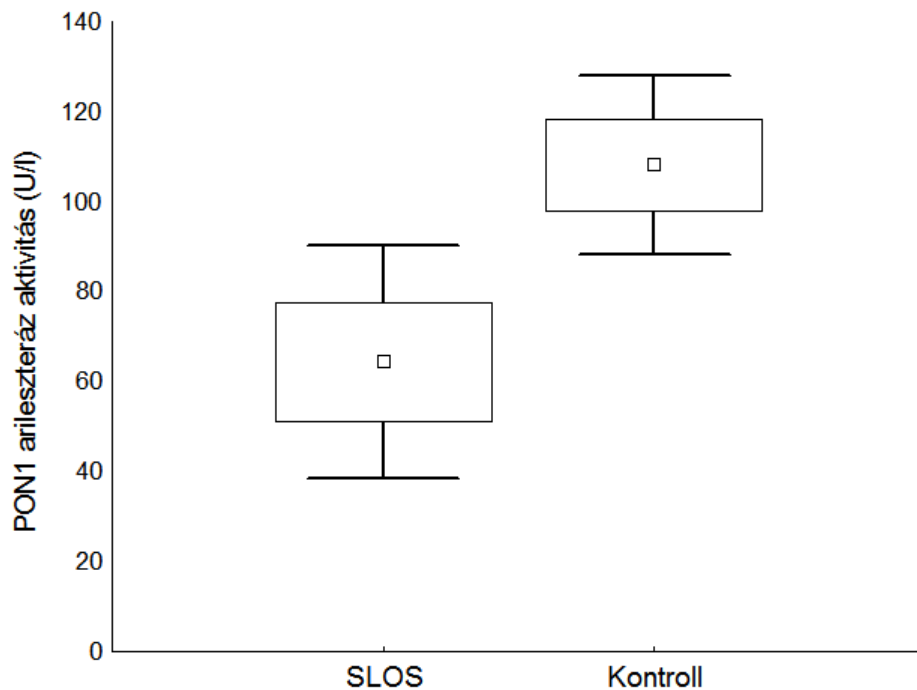
(b)



10. ábra: (a) HDL szubfrakciós mintázat egy típusos SLOS beteg esetében, ahol a nagy HDL szubfrakciók aránya (zöld színnel jelölve) dominál; és (b) egy kontroll gyerek esetében, ahol a beteghez képest nagyobb arányban jelennek meg a közepes és a kis HDL szubfrakciók (sárga és piros színnel jelölve).

5.3. Szérum PON1 paraoxonáz és arilészteráz aktivitás, valamint a PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein paraméterek közötti összefüggések SLOS és kontroll gyerekekben

A HDL-hez asszociált szérum PON1 paraoxonáz aktivitás alacsonyabb volt az SLOS csoportban az egészséges gyerekekhez képest (SLOS 37,5 (9,98-93,22) U/l vs. kontroll: 72,85 (42,04-206,93) U/l; $p=0,069$), bár a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. Azonban a kontrollokhoz viszonyítva a PON1 arilészteráz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban (SLOS: $64,30 \pm 52,69$ U/l vs. kontroll: $107,93 \pm 26,83$ U/l; $p=0,022$) (11. ábra).



11. ábra: Szérum PON1 arilészteráz aktivitás SLOS és kontroll gyerekekben ($p=0,022$; □ átlag; box: átlag \pm SD; whiskers: átlag \pm 1,96 \cdot SD)

A szérum PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein paraméterek közötti összefüggéseket vizsgálva szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a PON1 arilészteráz aktivitás és az összkoleszterin szint között ($r=0,543$; $p=0,045$) (9. táblázat). Továbbá pozitív trend volt a PON1

arilészteráz aktivitás és az LDL-C valamint a nagy LDL szubfrakció között. Azonban a PON1 arilészteráz aktivitás szignifikáns negatív összefüggést mutatott a kis denz LDL szubfrakció arányával ($r=-0,578$; $p=0,031$), ill. pozitívan korrelált az átlagos LDL mérettel ($r=0,610$; $p=0,021$).

Bár nem volt szignifikáns kapcsolat a PON1 arilészteráz aktivitás és a HDL-C között, szubfrakciós szinten számos összefüggést mutattunk ki (9. táblázat). A nagy HDL szubfrakció aránya erős negatív összefüggést mutatott a PON1 arilészteráz aktivitással ($r=-0,798$; $p=0,001$), viszont a közepes és a kis HDL szubfrakció aránya már a PON1 arilészteráz aktivitással pozitívan korrelált ($r=0,652$; $p=0,012$ és $r=0,663$; és $p=0,010$).

9. táblázat: Korrelációk a szérumban PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein paraméterek között
($n=21$)

Változók	r	p
Összkoleszterin (mmol/l)	0.543	0.045
LDL-koleszterin (mmol/l)	0.533	n.s.
Nagy LDL (%)	0.349	n.s.
Kis denz LDL (%)	-0.578	0.031
Átlagos LDL méret (nm)	0.610	0.021
HDL-koleszterin (mmol/l)	0.457	n.s.
Nagy HDL (%)	-0.798	0.001
Közepes HDL (%)	0.652	0.012
Kis HDL (%)	0.663	0.010

n.s. nem szignifikáns

HDL-C, high-density lipoprotein; LDL-C, low-density lipoprotein

6. Megbeszélés

Korábbi tanulmányok alapján jól ismert, hogy az LDL és HDL lipoproteineknek fontos szerepük van az atherosclerotikus ill. fokozott oxidatív stresszel járó kórfolyamatokban. Ezek a lipoproteinek inhomogén partikulumok; lipid és protein összetételük, funkciójuk, méretük és denzitásuk alapján különböző szubpopulációkra oszthatók. Patológias körülmények között az LDL és HDL szubfrakciók aránya eltolódhat, lipidómjukban és proteómjukban kedvezőtlen változások állhatnak be, amelyek normál működésüket jelentősen befolyásolhatják.

Vizsgálatunk első felében normál lipid paraméterekkel rendelkező elhízott, nem diabeteses csoportban vizsgáltuk a lipoprotein szubfrakciók eloszlását. Bár a vizsgálati csoportban az LDL-koleszterin szintje normál tartományban volt, az LDL szubfrakciók arányát és mennyiségét tekintve eltérést tapasztaltunk. Az elhízott csoportban a kis denz LDL szubfrakció aránya és abszolút mennyisége is szignifikánsan magasabb volt a normál testtömegű csoporthoz képest, míg az átlagos LDL méret szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban. Mivel a kisméretű denzebb LDL partikulumok szoros kapcsolatban állnak a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatával (Mertens és Holvoet, 2001, Krauss, 1995), ezért az LDL szubfrakciós vizsgálat alapján elmondható, hogy az elhízott betegek normál LDL-C szint ellenére magasabb rizikóval rendelkeznek a kardiovaszkuláris betegségek tekintetében. Míg a kis denz LDL szubfrakció megnövekedett mennyisége egyértelmű pozitív összefüggést mutat a kardiovaszkuláris rizikóval, addig a különböző HDL szubfrakciók funkcionális és strukturális heterogenitásuk miatt eltérő antiatherogén tulajdonsággal rendelkeznek (Superko és mtsai, 2012). Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a nagy HDL szubfrakció arányának csökkenése és a kis HDL szubfrakció arányának növekedése hozzájárul a koronária betegség magasabb rizikójához (Kontush és Chapman, 2006). Több irodalmi adat arra utal, hogy a HDL szubfrakciók közül a kis HDL

szubfrakció magasabb oxidatív rezisztenciával rendelkezik a teljes HDL tartalomhoz képest (Shuhei és mtsai, 2010), míg más tanulmányok szerint a nagy HDL szubfrakció jelzi az alacsonyabb kardiovaszkuláris kockázatot (Laasko és mtsai, 1993). Jelen vizsgálatunkban az elhízott betegcsoport esetében normál tartományban lévő HDL-C szint ellenére szignifikáns mértékű eltolódást figyeltünk meg a kisméretű HDL szubfrakció irányába. Az LDL és HDL szubfrakciók szintjén bekövetkező változások az elhízott betegek korai szűrésére hívják fel a figyelmet a későbbi kardiovaszkuláris komplikációk kialakulásának megelőzése érdekében. Továbbá az LDL és a HDL szubfrakciók mennyiségi eloszlásában bekövetkező változások számos minőségi eltérést vonhatnak maguk után, mint pl. a csökkent antioxidáns képességű, diszfunkcionális HDL vagy az enzimatikusan módosult LDL.

Korábban emelkedett szérum chemerin szintről számoltak be számos elhízással és emelkedett kardiovaszkuláris kockázattal járó betegségben, pl. koronária betegségben (Xiatao és mtsai, 2012), metabolikus szindrómában (Jialal és mtsai, 2013), elhízott nem diabeteses betegek esetében (Sledzinski és mtsai, 2013) és 2-es típusú diabetes mellitusban (Yang és mtsai, 2010, Weigert és mtsai, 2010b). A szérum chemerin szint szoros kapcsolatban van az elhízással és gyulladással összefüggő markerekkel (Lehrke és mtsai, 2009), továbbá szintje fogyás hatására csökken (Kim és mtsai, 2013). Az említett adatokkal összhangban szignifikánsan magasabb szérum chemerin koncentrációt mutattunk ki az elhízott csoportban, amely az emelkedett hsCRP szint mellett alátámasztja az elhízottakban az elhízás során fennálló, alacsony szintű krónikus gyulladás jelenlétét. Adataink támogatják azt az elképzelést, mely szerint az általunk vizsgált elhízott betegek normál szénhidrát és lipid paraméterek ellenére is fokozott kardiovaszkuláris kockázatnak lehetnek kitéve.

Az elhízott és normál testtömegű, nem diabeteses betegek adatainak elemzése során a szérum chemerin szint pozitívan korrelált az LDL-C szinttel, amely összecseng a korábbi publikációk

eredményeivel (Xiatao és mtsai, 2012, El-Mesallamy és mtsai, 2011). Tudomásunk szerint az irodalomban elsőként vizsgáltuk az LDL szubfrakciók szérumban chemerin szinttel való kapcsolatát. Szoros összefüggést mutattunk ki az atherogén kis denz LDL szubfrakció aránya és a szérumban chemerin szint között, ill. szignifikáns negatív korrelációt találtunk az átlagos LDL méret és a chemerin szint között. Spiroglou és munkatársai az atherosclerotikus léziókban a chemerin akkumulációját figyelték meg, ill. szoros kapcsolatot találtak az aorta érlemezés mértéke és a vaszkuláris simaizomsejtek és a habos sejtek chemerin expressziója között (Spiroglou és mtsai, 2010). A fenti adatokból kiindulva feltételezésünk szerint a chemerin parakrin hatása révén módosíthatja az LDL összetételét, kisméretű könnyebben oxidálható LDL partikulumokat hozva létre, amelyek hozzájárulnak az atherosclerosis progressziójához. Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan jelen vizsgálatunkban a szérumban chemerin koncentráció negatív kapcsolatban állt a HDL-C szinttel (Jialal és mtsai, 2013, Sell és mtsai, 2010, Lehrke és mtsai, 2009), azonban a chemerin szint és a különböző HDL szubfrakciók közötti összefüggések már nem voltak ilyen egyöntetűek. A chemerin szint és a nagy HDL szubfrakció arányával negatívan, míg a közepes és a kis HDL szubfrakció arányával pozitívan korrelált. Eredményeink alapján felvetődött a kérdés, ezek az összefüggések milyen mértékben tudhatóak be a BMI hatásának, ill. melyik az a lipoprotein szubfrakció, amely a legszorosabb összefüggésben van a szérumban chemerin szinttel. A kérdések tisztázására többszörös regressziós modellt dolgoztunk ki, amelynek eredménye alapján elmondható, hogy a hsCRP mellett a kis HDL szubfrakció bizonyult a szérumban chemerin koncentráció független előrejelzőjének, míg a BMI nem volt a chemerin független prediktora. Számos szerző beszámolt a HDL patológiás környezetben történő lipid és protein szerkezetének megváltozásáról (Lo Prete és mtsai, 2009, Holzer és mtsai, 2011, Berrougui és mtsai, 2012), ill. több vizsgálatban elemezték a HDL partikulum méretének és koncentrációjának változását gyulladásos körülmények között (Yu és mtsai, 2012). Továbbá fontos megjegyezni, hogy a HDL

anti-inflammatorikus tulajdonságaihoz az apoA-I apolipoprotein jelentős mértékben hozzájárul, ugyanis főként a kisméretű, diszkoidális HDL-en lokalizálódva védi annak foszfolipid tartalmát az oxidációtól (Rye és Barter, 2013, Barter és mtsai, 2013). Úgy tűnik tehát, hogy az elhízással járó, alacsony fokú gyulladás változásokat idézhet elő a HDL lipid és fehérje szerkezetében, beleértve a szabad koleszterin és koleszterin-észter tartalom csökkenését, amely hozzájárulhat a HDL méretének csökkenéséhez. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy vizsgálatunkban a szérumban a chemerin szint szorosan összefügg a valószínűleg csökkent antioxidáns hatású, kis HDL szubfrakcióval.

Vizsgálataink második felében öröklött koleszterin anyagcserezavarban szenvedő, csökkent szérumban az összkoleszterin szinttel rendelkező SLOS gyerekekben vizsgáltuk a lipoprotein szubfrakciók eloszlását. Korábbi tanulmányokban széles körben vizsgálták a lipid paraméterek szintjét és a koleszterin bioszintézis folyamatát SLOS-ban (Merkens és mtsai, 2004, Behúlová és mtsai, 2000), azonban eddig nem született publikáció szubfrakciós szintű vizsgálatokról. Továbbá megállapították, hogy a diagnózis felállítása során mért kezdeti koleszterin koncentráció alapvetően meghatározza a betegség súlyosságát, ezzel együtt a várható élettartamot (Tint és mtsai, 1995b, V. Oláh és mtsai, 2013). Vizsgálatunkban az irodalmi adatokkal megegyezően, mind az LDL-C, mind a HDL-C szint markánsan alacsonyabb volt SLOS-ban az egészséges gyerekekhez képest, továbbá negatív összefüggést mutattunk ki a klinikai súlyossági score és a szérumban az HDL-koleszterin szint között. Eredményeink hangsúlyozzák a HDL lehetséges központi szerepét az SLOS pathomechanizmusában.

Az LDL szubfrakciók vizsgálatakor a beteg gyerekek esetében nem várt módon markánsan magasabb volt a kis denz LDL szubfrakció aránya a kontroll gyerekekhez képest. Ezzel együtt az abnormális LDL szubfrakciós mintázat prevalenciája SLOS-ban mintegy 63% volt, míg egyetlen egészséges gyermek sem rendelkezett abnormális LDL szubfrakciós mintázattal. Adataink

összhangban vannak a STRIP (Special Turku coronary Risk factor Intervention Project) tanulmány eredményeivel, ahol 7 éves egészséges gyerekek körében a kis denz LDL szubfrakció előfordulását 1-4% közé becsülték (Kaitosaari és mtsai, 2009). Mivel az LDL szubfrakciók közül a kisméretű denz LDL szubfrakció hajlamos leginkább az oxidatív degradációra (Mertens és Holvoet, 2001), ezért a kis denz LDL szubfrakció ilyen nagyarányú előfordulása jelentősen hozzájárulhat az SLOS-ban fellépő fokozott lipidperoxidációhoz. A HDL szubfrakciók tekintetében jelentős mértékű eltolódást tapasztaltunk a nagy HDL szubfrakció irányába SLOS gyerekekben; a nagy HDL szubfrakció aránya szignifikánsan magasabb, míg a közepes és a kis HDL szubfrakciók aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban a kontrollhoz képest. Feltételezésünk szerint ennek a markáns eltolódásnak a háttérében fokozott reverz koleszterin transzport állhat, amellyel a szervezet megpróbálja kompenzálni a keringésben és az agyban fellépő rendkívül alacsony koleszterin szintet, bár ennek tisztázására további vizsgálatok tervezése szükséges.

A PON1 a legismertebb HDL-hez asszociált antioxidáns és anti-inflammatorikus hatású enzim, amely főleg a kis HDL szubfrakciókon lokalizálódik (Schiavon és mtsai, 2002, Kontush és mtsai, 2003). Korábbi tanulmányok csökkent PON1 aktivitásról számoltak be számos megnövekedett oxidatív stresszel járó kórállapotokban (Camps és mtsai, 2009), ezért az SLOS gyerekek körében tapasztalt alacsony mennyiségű kis HDL szubfrakció és csökkent PON1 arilészteráz aktivitás alapján feltételezhető a májban történő csökkent termelődésük, amely szintén hozzájárulhat a szervezet csökkent antioxidáns kapacitásához. Fontos megjegyezni, hogy a PON1 enzim különféle szubsztrátspecifitással, pl. paraoxonáz és arilészteráz aktivitással rendelkezik. A PON1 paraoxonáz aktivitás nagyban függ a Q192R polimorfizmustól és trimodális eloszlást mutat, ezért az átlag populációban a PON1 paraoxonáz aktivitás széles interindividuális változatossággal (akár 15-40 szerez) rendelkezik (Camps és mtsai, 2009). Ezzel szemben a PON1 arilészteráz

aktivitás független a Q192R polimorfizmustól, így aktivitása populációs szinten unimodális eloszlást mutat, ill. az enzim fehérje koncentrációjával és antioxidáns kapacitásával arányos (Furlong és mtsai, 2006, Deakin és James, 2004). Az SLOS gyerekek körében ugyan alacsonyabb PON1 paraoxonáz aktivitást észleltünk az egészséges gyerekekhez képest, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns, amely valószínűleg a paraoxonáz aktivitás trimodális eloszlásával, valamint a SLOS természetéből adódóan az alacsony betegszámmal hozható kapcsolatba. Ugyanakkor a PON1 arilészteráz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban a kontrollhoz viszonyítva és számos lipoprotein szubfrakcióval összefüggést mutatott. A PON1 arilészteráz aktivitás negatívan korrelált a kis denz LDL szubfrakció arányával. Továbbá a HDL szubfrakciók esetében, a PON1 arilészteráz aktivitás negatívan korrelált a nagy HDL szubfrakció arányával, míg a közepes és a kis HDL szubfrakció arányával pozitívan függött össze. Ezek a korrelációk alátámasztják azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint a kisméretű HDL szubfrakció rendelkezik a legmagasabb PON1 aktivitással (Bergmeier és mtsai, 2004). Eredményeink arra utalnak, hogy a csökkent PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein szubfrakciók eltolódása SLOS-ban új biomarkerként szolgálhatnak a kedvezőtlen oxidatív változások becslésére.

A csökkent PON1 arilészteráz aktivitással egyidejűleg magas 7DHC szintet mutattunk ki az SLOS betegek szérumában, amely szintén hozzájárulhat a betegségben fennálló fokozott oxidatív stressz állapothoz. A 7DHC rendkívül gyorsan reagál a molekuláris oxigénnel, citotoxikus hatású oxiszterolok képződése közben. Jelenleg a molekuláris biológiai vizsgálatok középpontjába a 3 β ,5 α -dihidroxikoleszt-7-én-6-on nevű oxiszterolt helyezik, amelyről kimutatták, hogy koncentrációjának mérése szintén hasznosnak bizonyulhat az oxidatív stressz monitorozására SLOS-ban (Korade és mtsai, 2010, Korade és mtsai, 2014, Xu és mtsai, 2011). Mivel a 7DHC és a 7DHC-ből származtatott oxiszterolok potenciális prooxidáns ágensek, ezért ezek a molekulák

fontos szerepet játszhatnak a megnövekedett lipid peroxidációban, ill. a lipoproteinek felszínén található fehérjék, így a PON1 enzim degradációjában is.

7. Összefoglalás

A plazma lipoproteinek struktúrájuk, funkciójuk, méretük és denzitásuk alapján szubfrakciókra osztható partikulumok, amelyeknek eloszlása számos lipidanyagcsere zavarral járó kórképben megváltozhat. A lipoprotein szubfrakciók kapcsolatban vannak a gyulladáshoz és oxidatív folyamatokhoz kapcsolódó markerekkel is. A chemerin egy nemrégiben leírt adipokin, amelyet döntően a vizcerális zsírszövet expresszál és pozitívan korrelál a gyulladással, valamint az elhízással összefüggő metabolikus rizikófaktorokkal. A humán paraoxonáz-1 (PON1) a HDL-hez kötődő antioxidáns hatású enzim, amelynek aktivitása az oxidatív stresszel járó kórfolyamatokban csökken. Munkánk célja volt a lipoprotein szubfrakciók és a szérumban a chemerin közötti kapcsolat vizsgálata elhízott nem diabetesez betegekben. Továbbá öröklött koleszterin anyagcserezavarban szenvedő Smith-Lemli-Opitz szindrómás (SLOS) gyerekekben vizsgáltuk az LDL és a HDL szubfrakciók eloszlását és a PON1 enzimmel való kapcsolatát.

A szérumban a chemerin koncentráció szignifikánsan magasabb volt az elhízott csoportban és pozitívan korrelált az atherogén kis denz LDL szubfrakcióval. Elhízottakban a HDL szubfrakciók aránya és mennyisége a kisméretű HDL szubfrakciók irányába tolódott el. A nagy HDL szubfrakció a chemerin szinttel negatív, míg a közepes és a kis HDL szubfrakcióval pozitív összefüggést mutatott. Többszörös regressziós analízis alapján a chemerin szint független előrejelzője a hsCRP és a kis HDL szubfrakció. Az SLOS gyerekek körében szignifikánsan magasabb volt a citotoxikus 7-dehidrokoleszterin koncentrációja és a kis denz LDL szubfrakció aránya. A HDL szubfrakciók aránya a nagy HDL szubfrakciók felé tolódott el, továbbá a PON1 arilészteráz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt SLOS-ban az egészséges gyerekekhez

képest. A PON1 arilészteráz aktivitás a kis denz LDL szubfrakcióval negatív, ugyanakkor a kis HDL szubfrakcióval pozitív kapcsolatban állt.

Eredményeink alapján a chemerinnek szerepe lehet a lipoprotein metabolizmus szabályozásában. Elhízás során megváltozik a lipoprotein szubfrakciók eloszlása, amely hozzájárulhat az érlemezésedés progressziójához fokozva a kardiovaszkuláris kockázatot. SLOS-ban a csökkent PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein szubfrakciók kedvezőtlen irányú megváltozása erősítheti a betegek szervezetében fennálló oxidatív stresszt. A PON1 arilészteráz aktivitás monitorozása fontos kiegészítő biomarker lehet az SLOS pathomechanizmusának pontosabb megértésében.

8. Summary

Plasma lipoproteins are heterogeneous particles that consist multiple lipoprotein subpopulations and vary in structure, function, size and density; therefore, their distribution might change in several lipid metabolic disorders. Indeed, lipoprotein subfractions are also associated with inflammatory and oxidative markers. Chemerin is a recently described adipokine expressed primarily in the white adipose tissue and showing positive correlations with obesity- and inflammatory-related risk factors. Human paraoxonase-1 (PON1) is an HDL-linked antioxidant enzyme with diminished activity in diseases characterized by enhanced oxidative stress.

First, we aimed to study the relationship between the distribution of lipoprotein subfractions and serum chemerin levels in non-diabetic obese (NDO) subjects. Furthermore, we also examined the associations between the distribution of lipoprotein subfractions and PON1 activity in children with an inherited cholesterol metabolic disorder termed Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS).

Serum chemerin concentration was significantly higher in NDO patients and correlated positively with the highly atherogenic small-dense LDL subfraction. Compared to the lean subjects, we demonstrated a shift towards the small-sized HDL subfractions in the NDO patients. Also, a significant negative correlation was found between serum chemerin concentration and the proportion of large HDL subfraction, while there were significant positive correlations between chemerin levels and proportions of intermediate and small HDL subfraction. Based upon the multivariate analysis, hsCRP and small HDL subfraction turned out to be the best independent predictors of chemerin.

Analyzing data from children with SLOS, the levels of the cytotoxic 7-dehydrocholesterol were significantly higher in them, compared to healthy infants. We also observed a shift towards the small-dense LDL and the large HDL subfractions in SLOS. PON1 arylesterase activity was significantly decreased in the affected children and correlated negatively with the proportions of the small-dense LDL and the large HDL subfractions. Significant positive associations were detected between PON1 arylesterase activity and the proportions of intermediate and small HDL subfractions.

In conclusion, chemerin may be involved in the regulation of lipoprotein metabolism in non-diabetic obese subjects. Early changes in the distribution of the lipoprotein subfractions may contribute to the progression of atherosclerosis, leading to increased cardiovascular risk. Decreased PON1 activity and deleterious shifts in the distribution of lipoprotein subfractions may also contribute to the impaired antioxidant status observed in SLOS; therefore, monitoring of serum PON1 arylesterase activity may serve as a complementary biomarker in SLOS.

9. Irodalomjegyzék

Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet.* 1993;52(3):598-608.

Arai H, Koizumi H, Aoki J, Inoue K. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem.* 2002;131(5):635-640.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(1):79-83.

Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22(3):176-185.

Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, et al. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(1):64-69.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004;95(8):764-772.

Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014;56(4):369-381.

Behúlová D, Bzdúch V, Skodová J, Dello Russo A, Corso G, Ponc J, et al. Serum lipids and apolipoproteins in children with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23(4):413-415.

Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin Chem.* 2004;50(12):2309-2315.

Berrougui H, Momo CN, Khalil A. Health benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases. *J Clin Lipidol.* 2012;6(6):524-533.

Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1981;665(3):408-419.

Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding

activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest.* 1998;101(5):1084-1093.

Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2007;148(10):4687-4694.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232(4746):34-47.

Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(12):2715-2723.

Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(2):83-106.

Caulfield MP, Li S, Lee G, Blanche PJ, Salameh WA, Benner WH, et al. Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis. *Clin Chem.* 2008;54(8):1307-1316.

Chan DC, Pang J, Romic G, Watts GF. Postprandial hypertriglyceridemia and cardiovascular disease: current and future therapies. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(3):309.

Clayton PT. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child.* 1998;78(2):185-189.

Cohen, DE. Lipoprotein metabolism and cholesterol balance. In: Arias, IM.; Alter, H.; Boyer, JL.; Cohen, DE.; Fausto, N.; Shafritz, DA.; Wolkoff, AW., editors. *Biology and Pathobiology.* 5th ed.. Oxford: Wiley Blackwell; 2009. p. 271-285.

Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):1987-1994.

Cui D, Thorp E, Li Y, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR, et al. Pivotal advance: macrophages become resistant to cholesterol-induced death after phagocytosis of apoptotic cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82(5):1040-1050.

De Palma G, Castellano G, Del Prete A, Sozzani S, Fiore N, Loverre A, et al. The possible role of ChemR23/Chemerin axis in the recruitment of dendritic cells in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2011;79(11):1228-1235.

de Souza JA, Vindis C, Nègre-Salvayre A, Rye KA, Couturier M, Therond P, et al. Small, dense

HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med.* 2010;14(3):608-620.

Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond).* 2004;107(5):435-447.

DeBarber AE, Eroglu Y, Merkens LS, Pappu AS, Steiner RD. Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e24.

Dessein PH, Tsang L, Woodiwiss AJ, Norton GR, Solomon A. Circulating concentrations of the novel adipokine chemerin are associated with cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2014;41(9):1746-1754.

Durrington P. Dyslipidaemia. *Lancet.* 2003;362(9385):717-731.

El-Mesallamy HO, El-Derany MO, Hamdy NM. Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet Med.* 2011;28(10):1194-1200.

Ensign W, Hill N, Heward CB. Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics. *Clin Chem.* 2006;52(9):1722-1727.

Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(11):660-667.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992;13(4):341-390.

Fatima SS, Rehman R, Baig M, Khan TA. New roles of the multidimensional adipokine: chemerin. *Peptides.* 2014;62:15-20.

Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogon JG, Pan L, Sherry B, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med.* 2012;42(6):563-570.

Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(12):2813-2820.

Fliesler SJ. Antioxidants: The Missing Key to Improved Therapeutic Intervention in Smith-Lemli-Opitz Syndrome? *Hereditary Genet.* 2013;2(2):119.

Fredrickson DS, Lees RS. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation.* 1965;31:321-327.

Furlong CE, Holland N, Richter RJ, Bradman A, Ho A, Eskenazi B. PON1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(3):183-190.

Fülöp P, Seres I, Lőrincz H, Harangi M, Somodi S, Paragh G. Association of chemerin with oxidative stress, inflammation and classical adipokines in non-diabetic obese patients. *J Cell Mol Med*. 2014;18(7):1313-1320.

Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*. 1997;99(1):62-66.

Gisoni P, Lora V, Bonauguri C, Russo A, Lippi G, Girolomoni G. Serum chemerin is increased in patients with chronic plaque psoriasis and normalizes following treatment with infliximab. *Br J Dermatol*. 2013;168(4):749-755.

Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. *Circulation*. 1966;34(4):679-697.

Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):431-438.

Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem*. 2007;282(38):28175-28188.

Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis*. 1990;83(1):59-67.

Henning MF, Herlax V, Bakás L. Contribution of the C-terminal end of apolipoprotein AI to neutralization of lipopolysaccharide endotoxic effect. *Innate Immun*. 2011;17(3):327-337.

Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2012;414:215-224.

Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, Meissner I, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem*. 2001;47(2):266-274.

Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, Wadsack C, et al. Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1631-1641.

Honda A, Batta AK, Salen G, Tint GS, Chen TS, Shefer S. Screening for abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: rapid determination of plasma 7-dehydrocholesterol by ultraviolet spectrometry. *Am J Med Genet.* 1997;68(3):288-293.

Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res.* 2003;44(1):22-32.

Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):E1183-1194.

Jialal I, Devaraj S, Kaur H, Adams-Huet B, Bremer AA. Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E514-517.

Jira PE, Wevers RA, de Jong J, Rubio-Gozalbo E, Janssen-Zijlstra FS, van Heyst AF, et al. Simvastatin. A new therapeutic approach for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2000;41(8):1339-1346.

Jonas, A. Lipoprotein structure. In: Vance, DE.; Vance, JE., editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* 4th eds.. Amsterdam: Elsevier; 2002. 483-404.

Kaitosaari T, Simell O, Viikari J, Raitakari O, Siltala M, Hakanen M, et al. Tracking and determinants of LDL particle size in healthy children from 7 to 11 years of age: the STRIP Study. *Eur J Pediatr.* 2009;168(5):531-539.

Kelley RI, Hennekam RC. The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet.* 2000;37(5):321-335.

Khan M, Joseph F. Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:328592.

Kim SH, Lee SH, Ahn KY, Lee DH, Suh YJ, Cho SG, et al. Effect of lifestyle modification on serum chemerin concentration and its association with insulin sensitivity in overweight and obese adults with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;80(6):825-833.

Kiss E, Seres I, Tarr T, Kocsis Z, Szegedi G, Paragh G. Reduced paraoxonase1 activity is a risk for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1108:83-91.

Koncsos P, Seres I, Harangi M, Illyés I, Józsa L, Gönczi F, et al. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. *Pediatr Res.* 2010;67(3):309-313.

Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(10):1881-

1888.

Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(3):144-153.

Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Nègre-Salvayre A, de Souza JA, et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1843-1849.

Korade Z, Xu L, Harrison FE, Ahsen R, Hart SE, Folkes OM, et al. Antioxidant supplementation ameliorates molecular deficits in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biol Psychiatry*. 2014;75(3):215-222.

Korade Z, Xu L, Mirnics K, Porter NA. Lipid biomarkers of oxidative stress in a genetic mouse model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 2013;36(1):113-122.

Korade Z, Xu L, Shelton R, Porter NA. Biological activities of 7-dehydrocholesterol-derived oxysterols: implications for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*. 2010;51(11):3259-3269.

Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol*. 2014;5:470.

Krauss RM. Dense low density lipoproteins and coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1995;75(6):53B-57B.

Kukla M, Mazur W, Bułdak RJ, Zwirska-Korcza K. Potential role of leptin, adiponectin and three novel adipokines--visfatin, chemerin and vaspin--in chronic hepatitis. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1397-1410.

Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:71.

Laakso M, Lehto S, Penttilä I, Pyörälä K. Lipids and lipoproteins predicting coronary heart disease mortality and morbidity in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Circulation*. 1993;88(4 Pt 1):1421-1430.

Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, von Ziegler F, et al. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(2):339-344.

Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005;96(12):1221-1232.

- Lo Prete AC, Dina CH, Azevedo CH, Puk CG, Lopes NH, Hueb WA, et al. In vitro simultaneous transfer of lipids to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. *Lipids*. 2009;44(10):917-924.
- Lund-Katz S, Laboda HM, McLean LR, Phillips MC. Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry*. 1988;27(9):3416-3423.
- MacDougald OA, Burant CF. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metab*. 2007;6(3):159-161.
- Macharia M, Hassan MS, Blackhurst D, Erasmus RT, Matsha TE. The growing importance of PON1 in cardiovascular health: a review. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2012;13(7):443-453.
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett*. 1998;423(1):57-60.
- Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res*. 1999;40(1):1-16.
- Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507-537.
- Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life*. 2014;66(1):19-26.
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*. 2002;43(12):1997-2006.
- Merkens LS, Connor WE, Linck LM, Lin DS, Flavell DP, Steiner RD. Effects of dietary cholesterol on plasma lipoproteins in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Pediatr Res*. 2004;56(5):726-732.
- Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J*. 2001;15(12):2073-2084.
- Nagpal S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, et al. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol*. 1997;109(1):91-95.
- Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, et al. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(4):481-488.
- Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration

induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991;88(6):2039-2046.

Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res.* 1999;41(2):345-360.

Oláh AV, Szabó GP, Varga J, Balogh L, Csábi G, Csákváry V, et al. Relation between biomarkers and clinical severity in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Eur J Pediatr.* 2013;172(5):623-630.

Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab.* 2002;48(3-4):171-180.

Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res.* 2010;51(11):3299-3305.

Paragh G, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lőcsey L, Kárpáti I, et al. Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron.* 1999;83(2):126-131.

Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014;5(8):927-46.

Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM.* 2006;99(1):1-14.

Rosenson RS, Brewer HB, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem.* 2011;57(3):392-410.

Rütti S, Ehses JA, Sibler RA, Prazak R, Rohrer L, Georgopoulos S, et al. Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 2009;150(10):4521-4530.

Rye KA, Barter PJ. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(3):421-428.

Rye KA, Barter PJ. Cardioprotective functions of HDLs. *J Lipid Res.* 2014;55(2):168-179.

Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148(5):852-871.

Schiavon R, Battaglia P, De Fanti E, Fasolin A, Biasioli S, Targa L, et al. HDL3-related

decreased serum paraoxonase (PON) activity in uremic patients: comparison with the PON1 allele polymorphism. *Clin Chim Acta*. 2002;324(1-2):39-44.

Sell H, Divoux A, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Bedossa P, et al. Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2892-2896.

Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol*. 2004;39(1):59-66.

Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(3):297-304.

Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res*. 2013;54(10):2575-2585.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-3025.

Shuhei N, Söderlund S, Jauhiainen M, Taskinen MR. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. *Lipids Health Dis*. 2010;9:104.

Sivaram P, Choi SY, Curtiss LK, Goldberg IJ. An amino-terminal fragment of apolipoprotein B binds to lipoprotein lipase and may facilitate its binding to endothelial cells. *J Biol Chem*. 1994;269(13):9409-9412.

Sledzinski T, Korczynska J, Hallmann A, Kaska L, Proczko-Markuszczyńska M, Stefaniak T, et al. The increase of serum chemerin concentration is mainly associated with the increase of body mass index in obese, non-diabetic subjects. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(6):428-434.

Small, DM. *The Physical Chemistry of Lipids. From Alkanes to Phospholipids*. New York: Plenum Press; 1986. p. 672

Smith DW, Lemli L, Opitz JM. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr*. 1964;64:210-217.

Sommer A, Prenner E, Gorges R, Stütz H, Grillhofer H, Kostner GM, et al. Organization of phosphatidylcholine and sphingomyelin in the surface monolayer of low density lipoprotein and lipoprotein(a) as determined by time-resolved fluorometry. *J Biol Chem*. 1992;267(34):24217-24222.

Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, Papadaki HH. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *J Atheroscler*

Thromb. 2010;17(2):115-130.

Stafforini DM, Numao T, Tsodikov A, Vaitkus D, Fukuda T, Watanabe N, et al. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J Clin Invest.* 1999;103(7):989-97.

Superko HR, Pendyala L, Williams PT, Momary KM, King SB, Garrett BC. High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease. *J Clin Lipidol.* 2012;6(6):496-523.

Szabó GP, Oláh AV, Kozak L, Balogh E, Nagy A, Blahakova I, et al. A patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome: novel mutation of the DHCR7 gene and effects of therapy with simvastatin and cholesterol supplement. *Eur J Pediatr.* 2010;169(1):121-123.

Szántó A, Harangi M, Seres I, Paragh G, Zeher M. Decreased human paraoxonase-1 activity in patients with Sjögren's syndrome. *Int Immunol.* 2010;22(7):605-609.

Terasaka N, Westerterp M, Koetsveld J, Fernández-Hernando C, Yvan-Charvet L, Wang N, et al. ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(11):2219-2225.

^aTint GS, Sellar M, Hughes-Benzie R, Batta AK, Shefer S, Genest D, et al. Markedly increased tissue concentrations of 7-dehydrocholesterol combined with low levels of cholesterol are characteristic of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 1995;36(1):89-95.

^bTint GS, Salen G, Batta AK, Shefer S, Irons M, Elias ER, et al. Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr.* 1995;127(1):82-87.

Van Linthout S, Foryst-Ludwig A, Spillmann F, Peng J, Feng Y, Meloni M, et al. Impact of HDL on adipose tissue metabolism and adiponectin expression. *Atherosclerosis.* 2010;210(2):438-444.

^aWeigert J, Obermeier F, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, et al. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(4):630-637.

^bWeigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, et al. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72(3):342-348.

Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med.* 2003;198(7):977-985.

Xiaotao L, Xiaoxia Z, Yue X, Liye W. Serum chemerin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2012;23(6):412-416.

Xu L, Korade Z, Rosado DA, Liu W, Lamberson CR, Porter NA. An oxysterol biomarker for 7-dehydrocholesterol oxidation in cell/mouse models for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*. 2011;52(6):1222-1233.

Yang M, Yang G, Dong J, Liu Y, Zong H, Liu H, et al. Elevated plasma levels of chemerin in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus with hypertension. *J Investig Med*. 2010;58(7):883-886.

Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis*. 2009;202(1):162-168.

Yu Y, Sheth N, Krishnamoorthy P, Saboury B, Raper A, Baer A, et al. Aortic vascular inflammation in psoriasis is associated with HDL particle size and concentration: a pilot study. *Am J Cardiovasc Dis*. 2012;2(4):285-292.

Zabel BA, Nakae S, Zúñiga L, Kim JY, Ohyama T, Alt C, et al. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med*. 2008;205(10):2207-2220.

Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(4):276-294.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-432.

10. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/43/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lőrincz Hajnalka
Neptun kód: G3XUPQ
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037740

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lőrincz, H.**, Harangi, M., Oláh, A.V., Szabó, G.P., Fülöp, P., Somodi, S., Paragh, G., Seres, I.:
Altered lipid subfraction profile and impaired antioxidant defense of high-density lipoprotein in
Smith-Lemli-Opitz syndrome.
Pediatr. Res. 77, 703-709, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2015.33>
IF:2.84 (2013)
2. **Lőrincz, H.**, Katkó, M., Harangi, M., Somodi, S., Gaál, K., Fülöp, P., Paragh, G., Seres, I.: Strong
correlations between circulating chemerin levels and lipoprotein subfractions in nondiabetic
obese and nonobese subjects.
Clin. Endocrinol. 81 (3), 370-377, 2014.
IF:3.353 (2013)





További Közlemények

3. Fülöp, P., Seres, I., **Lőrincz, H.**, Harangi, M., Somodi, S., Paragh, G.: Association of chemerin with oxidative stress, inflammation and classical adipokines in non-diabetic obese patients.
J. Cell. Mol. Med. 18 (7), 1313-1320, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12282>
IF:3.698 (2013)
4. Gaál, K., **Lőrincz, H.**, Seres, I., Harangi, M., Oláh, A.V., Paragh, G.: Characterization of a novel high-density lipoprotein antioxidant capacity assay and its application to high-density lipoprotein fractions.
Clin. Biochem. 46 (9), 825-827, 2013.
IF:2.229

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,12

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,193

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

Debrecen, 2015.05.06.



11. Függelék

Tárgyszavak: lipoprotein szubfrakciók, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, chemerin, humán paraoxonáz-1, elhízás, Smith-Lemli-Opitz szindróma

Keywords: Lipoprotein subfractions, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, chemerin, human paraoxonase-1, obesity, Smith-Lemli-Opitz syndrome

Támogatás: Vizsgálatainkat az Országos Tudományos Kutatási alap (OKTA 84196), a TÁMOP-4.2.1./B-09/KONV/2010-0007, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 számú projektek támogatták. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Seres Ildikó tudományos főmunkatársnőnek, aki biológushallgató korom óta támogatott laboratóriumi és tudományos munkám során, valamint a kísérletek megtervezésében és a felmerülő kérdések megválaszolásában mindig a segítségemre volt. Köszönetemet fejezem ki Dr. Paragh György professzorúrnak, aki lehetővé tette, hogy tudományos munkámat a DE Belgyógyászati Intézetében végezhessem.

Hálával tartozom Dr. Vargáné Dr. Oláh Anna tudományos főmunkatársnőnek, Dr. Harangi Mariann és Dr. Fülöp Péter egyetemi adjunktusoknak, valamint Dr. P. Szabó Gabriella klinikai genetikus szakorvosnak, akik a kutatási eredmények megvitatásában és a publikációjában nélkülözhetetlen segítségemre voltak. Továbbá szeretnék köszönetet mondani tudományos közleményeim társszerzőinek, Dr. Gaál Krisztinának, Katkó Mónikának és Dr. Somodi Sándornak.

Köszönöm a DE Belgyógyászati Intézet A épület minden dolgozójának kedves és őszinte barátságát.