

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Gaál Krisztina

**Diszfunkcionális HDL és egyéb kardiovaszkuláris
rizikótényezők vizsgálata szisztémás lupus
erytematosusban**

DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Diszfunkcionális HDL és egyéb kardiovaszkuláris rizikótényezők vizsgálata szisztémás lupus erytematosusban

Dr. Gaál Krisztina

Témavezető: Prof. Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke:	3. oldal
1. Bevezetés:	5. oldal
2. Irodalmi áttekintés:	8. oldal
3. Célkitűzések:	33. oldal
4. Betegek és módszerek:	34. oldal
5. Eredmények:	43. oldal
6. Megbeszélés:	56. oldal
7. Összefoglalás:	69. oldal
8. Summary:	70. oldal
9. Irodalomjegyzék:	71. oldal
10. Tárgyszavak:	88. oldal
11. Köszönetnyilvánítás:	89. oldal
12. Függelék:	90. oldal

Rövidítések jegyzéke

AAPH: 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)
dihydrochloride

ABCA1: adenosine triphosphate-binding
cassette transporter A1

AMI: acute myocardial infarction

Apo: apolipoprotein

BMI: body mass index

CD36: cluster of differentiation 36

CE: cholesterol ester

CETP: cholesterol ester transfer protein

cIMT: carotid intima-media thickness

COX: cyclooxygenase

CV: coefficient of variation

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

eNOS: endothelial nitric oxid synthase

FC: free cholesterol

PL: phospholipid

FMD: flow-mediated dilation

FPLC: fast protein liquid
chromatography

GFR: glomerular filtration rate

GPX: glutathione peroxidase

HDL-C: high-density lipoprotein
cholesterol

HL: hepatic lipase

HEPES: N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-
2-ethane sulfic acid

HO-1: heme oxigenase 1

hsCRP: high-sensitivity C-reactive
protein

ICAM-1: intercellular cell adhesion
molecule-1

IDL: intermediar-density lipoprotein

IFN- γ : interferon gamma

IL: interleukin

iNOS: inducible nitric oxide synthase

ISZB: ischaemiás szívbetegség

KBr: kálium-bromid

LCAT: lecithin-cholesterol
acyltransferase

LDL-C: low-density lipoprotein
cholesterol

LOOH: lipid hydroperoxide

LOX-1: lectin-like oxLDL receptor 1

Lp(a): lipoprotein (a)	SLE: systemic lupus erythematosus
LPL: lipoprotein lipase	SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index
MCP-1: monocyte chemotactic protein-1	TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances
MMP: matrix metalloproteinase	TC: total cholesterol
NO: nitric oxid	TG: triglyceride
oxLDL: oxidized LDL	TIA: transient ischemic attack
PAF-AH: platelet activating factor-acetylhydrolase	TNF-α: tumor necrosis factor alpha
piHDL: proinflammatory high-density lipoprotein	VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1
PON1: paraoxonase 1	VLDL: very-low-density lipoprotein
RA: rheumatoid arthritis	We: Westergreen, azaz vörösvértest süllyedési sebesség
RCT: reverse cholesterol transport	ΔT_{Vmax}: a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges idő
ROS: reactive oxygen species	
SAA: serum amyloid A	
SR-B1: scavenger receptor-B1	

1. BEVEZETÉS

Hazánkban a szív-érrendszeri megbetegedések évek óta vezetnek a halál statisztikáinak (2015-ben a férfiak 31,6 %-a, a nők 37,4 %-a halt meg emiatt), de az Európai Unió országainak összesített mortalitási adatai között is az előkelő második helyet foglalják el. Az e betegségcsoportba tartozó gyakoribb kórképek (pl. szívinfarktus, stroke) jellemzően érelmeszesedés talaján fejlődnek ki [1,2]. A legújabb elméleti megközelítések szerint az atheroszklerózis kialakulásáért és progressziójáért egy az érfalban fellépő, tartósan fennálló enyhe gyulladás felelős, mely az idők során egyre súlyosabb szerkezeti és funkcionális eltérésekhez vezet. A korai makroszkópos morfológiai eltérések közé tartozik a „zsíros csíkok” megjelenése az érfalban, melyeket az intima rétegben felszaporodó habos sejtek, azaz az oxidált low-density lipoproteinnel (oxLDL) zsúfolásig telt makrofágok alkotnak [3]. Szervezetünk az LDL oxidációja ellen egy másik lipoprotein, a high-density lipoprotein (HDL) segítségével védekezik, mely képes kivédeni az LDL oxidációját, illetve a már oxidált lipideket is semlegesíteni tudja. A HDL antiaterogén sajátosságát többféle mechanizmus révén valósítja meg: antioxidáns hatása és a reverz koleszterin transzport (RCT) mellett direkt endotél hatása és endotoxin kötő képessége is szerepet játszik benne [4].

A populációs tanulmányokból régóta ismert, hogy a HDL koleszterin szintje inverz kapcsolatban áll a koronária betegségek kockázatával. Ugyanakkor bizonyos nagyon alacsony HDL-C koncentrációjú családok kardiovaszkuláris kockázata nem különbözik a normális mennyiségű HDL-C-vel rendelkező népességétől, mivel HDL-ük sokkal eredményesebben védi ki a foszfolipidek oxidációját. Ezzel szemben familiáris hiper-alfalipoproteinémiában a magas HDL-C szint a HDL alosztályok csökkent antioxidáns aktivitását kompenzálja, míg akut vagy krónikus gyulladással járó megbetegedésekben a normális HDL szint gyakran csökkent antiaterogén tulajdonságot, diszfunkcionális HDL-t takar [5]. Ezek a megfigyelések a HDL mennyiségének meghatározása mellett funkcionalitás vizsgálatának jelentőségét

hangsúlyozzák.

M. Navab és munkatársai úttörő munkájuk során kezdetben sejtes rendszereken, majd saját fejlesztésű sejtmentes esszéjükkel vizsgálták különböző mintákban a HDL antioxidáns sajátosságát, és igyekeztek kimutatni az esetleg jelenlevő károsodott funkciójú, az ő terminológiájukban proinflammatorikus HDL (piHDL) jelenlétét [6]. Más kutatócsoportok is végeztek hasonló kísérleteket, azonban az egyes reakciók által nyert adatok nem feltétlenül voltak összevethetők a reakcióelegyek összetételében és a mérési módszer típusában fennálló eltérések miatt. A kísérleti reakcióelegyek összetétele és a reakciók körülményei sok esetben lényegesen eltértek az élő szervezetben lejátszódó HDL-LDL interakciótól, így az általuk nyert eredmények relevanciája sem egyértelmű. Bár *Balla J. és mtsai* részletesen igazolták a hemből felszabaduló szabad vas, mint oxidáns szerepét az érlemeszesedés folyamatában, azonban a HDL antioxidáns hatását vizsgáló kísérletekben ezidáig a hemet tudomásunk szerint még nem alkalmazták [7].

A gyulladás során termelődő különböző fehérjék, enzimek, citokinek módosítják a HDL koleszterin koncentrációját, összetételét, valamint a HDL-en levő fehérjék típusát, mennyiségét, szerkezetét és működését. Ezek a módosulások a HDL funkcionális deficitjéhez vezethetnek. Koronária-betegek körében végzett kísérlet során annak ellenére, hogy a lipidek koncentrációja a normál tartományban volt, a betegek többségének HDL-e nem védte az LDL-t az oxidációtól, azaz proinflammatorikus volt [5,8]. A HDL gyulladás okozta funkcionális károsodása legvalószínűbb a kifejezett tartós szisztémás gyulladással jellemzett kórállapotokban, így a szisztémás autoimmun megbetegedésekben, melyek közül az egyik leggyakoribb a szisztémás lupus erythematosus (SLE). A betegség gyulladásos fellángolásokkal tarkított lefolyása során szinte egyetlen szervrendszert sem kímél, a betegek korai halálzásáért a hatékony immunszuppresszív szerek felfedezése előtti érában a súlyos akut gyulladás szövődményei voltak felelősek, míg a jelenlegi sokkal hosszabb átlagos

élettartam mellett a szív-érrendszeri megbetegedések [9]. A betegeknél jóval nagyobb arányban fordulnak elő a hagyományos kardiovaszkuláris kockázati tényezők, azonban ezek önmagukban még nem nyújtanak kellő magyarázatot az SLE-sek körében megfigyelhető felgyorsult érrelmeszesedésre, így annak kialakulásában betegség-specifikus, a gyulladásal összefüggő kockázati tényezők szerepe is felmerült.

Elsőként *McMahon M. és mtsai* vizsgálták szisztémás autoimmun kórképekben, SLE-ben és reumatoid artritiszben (RA) szenvedő betegek körében a HDL antioxidáns tulajdonságát, és meghatározták a piHDL előfordulási gyakoriságát. Eredményeik szerint a HDL RA-ben 20%-ban, SLE-ben pedig 45-48%-ban volt proinflammatorikus, és összefüggést találtak a piHDL jelenléte valamint a koronária-betegség és a szubklinikus ateroszklerózis előfordulása, illetve egyes gyulladásos markerek szintje között [10-12]. A gyulladásos paraméterek, a betegségaktivitás, a lipidprofil, a HDL antioxidáns kapacitás és a HDL szubpopulációk megoszlásának egyidejű komplex összefüggéseit azonban tudomásunk szerint még nem vizsgálták SLE-ben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A lipidek szállítását a keringésben lipoproteinek végzik. Ezek többsége (kilomikron, VLDL, IDL, LDL) a perifériát látja el funkcióikhoz szükséges lipidekkel, és azok túlkínálata esetén hatásuk potenciálisan aterogén. A HDL ugyanakkor képes a perifériás szövetekből a főlegben jelen levő lipidek elszállítására, melyek így újra-hasznosulhatnak vagy kiválasztásra kerülhetnek, tehát hatása alapvetően antiaterogén.

2.1. A HDL jellemzői és érése

A HDL egy foszfolipideket (PL), nem észterifikált koleszterint és fehérjéket tartalmazó egy rétegű külső hidofil burokból, valamint egy elsősorban koleszterin észtereket (CE), kisebb mennyiségben pedig triglicerideket (TG) tartalmazó hidrofób magból épül fel. A lipoproteinek között a fehérje/lipid arány a HDL esetében a legnagyobb, a fehérjék a részecske tömegének 35-65%-át teszik ki, ez magyarázza nagy sűrűségét (1063-1210 g/l) és kis méretét (5-12 nm). A HDL részecskék nem egységesek, több egymástól eltérő jellemzőkkel bíró csoportra, úgynevezett szubpopulációra tagolódnak, melyek a HDL érési folyamata során alakulnak át egymásba. Az egyes alosztályok különböznek méretükben, sűrűségükben, elektromos töltésükben, lipid és fehérje összetételükben és a lipid homeosztázisban betöltött szerepükben (1. és 2. táblázat). Osztályozásuk is heterogén, az elválasztásukra alkalmazott módszertől függ (2. táblázat). A leggyakrabban alkalmazott sűrűség-grádiens ultracentrifugálással ill. grádiens gélelektroforézissel az alábbi frakciók különíthetők el méretük szerint csökkenő sorrendben: $2b > 2a > 3a > 3b > 3c$.

A lipoproteinek szerkezeti fehérjéi az apolipoproteinek (Apo), melyek a felszíni foszfolipid rétegbe integrálódva helyezkednek el, és részt vesznek a részecskék alapvető funkcióiban. A HDL fő strukturális fehérjéje a főként a májban és belekben szintetizálódó

1. táblázat A HDL alosztályok fizikokémiai tulajdonságai [13]

	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Átlagos molekula-tömeg (kDa)	410	400	360	200	160
Relatív lipid tartalom (%)	65	60	55	45	35
Relatív fehérje tartalom (%)	35	40	45	55	65
Felszíni lipidek (mol/mol HDL)					
Foszfolipidek	130	140	120	45	25
Nem-észterifikált koleszterin	70	40	25	15	10
Mag lipidek (mol/mol HDL)					
Koleszterin észterek	180	160	140	70	40
Trigliceridek	30	20	15	10	5
Apolipoproteinek (mol/mol HDL)					
ApoA-I	4,5	4	3-4	3	2-3
Egyebek	≤2	≤2	≤2	1	≤1

ApoA-I, mely a HDL fehérje tartalmának mintegy 70%-át alkotja, és a legtöbb HDL alosztályon megtalálható. Alapvető jelentőségű, mint a HDL szintézis és a RCT kiinduló molekulája, antioxidáns, gyulladáscsökkentő és antiaterogén hatással bír [14]. Az ApoA-II a részecskék 15-20%-án előforduló szerkezeti fehérje, mely szintén részt vesz a RCT-ban, emellett egyes vizsgálatok során antioxidáns, másokban aterogén tulajdonságát észlelték. Az ApoC-II a lipoprotein lipáz (LPL) aktivátora, míg az ApoC-III a LPL és a hepatikus lipáz (HL) inhibitora, így a sejtek lipid felvételét szabályozzák. További fontosabb strukturális fehérjei még: az ApoA-IV, a lecitin-koleszterin-aciltranszferáz (LCAT) aktivátora; az ApoE, mely az LDL-receptor ligandjaként vesz részt a receptor-mediált lipoprotein felvételben; a C5b-9 komplement komplexet inaktiválni képes ApoJ, és a szfingozin-1-foszfátot (S1P) kötő ApoM. A szerkezeti fehérjék mellett a HDL enzimeket is hordoz, melyek egy része antioxidáns hatású, ilyen a humán paraoxonáz-1 (PON1), a PON3, trombocita aktiváló faktor acetilhidroláz (PAF-AH) és a glutation-peroxidáz (GPX), míg más részük a RCT-ban vesz részt, például a LCAT

2. táblázat A HDL osztályozása az alkalmazott elválasztási módszer és fizikai tulajdonságai alapján [15]

	Nagyon nagy HDL (very large)	Nagy HDL (large)	Közepes HDL (medium)	Kis HDL (small)	Nagyon kis HDL (very small)
Denzitás (g/l)	1063-1087	1088-1110	1110-1129	1129-1154	1154-1210
Méret (nm)	12,9–9,7	9,7–8,8	8,8–8,2	8,2–7,8	7,8–7,2
Sűrűség-grádiens ultracentrifugálás	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Sűrűség (g/l)	1063-1087	1088-1110	1110-1129	1129-1154	1154-1170
Grádiens gél-elektroforézisa^a	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Méret (nm)	12,9–9,7	9,7–8,8	8,8–8,2	8,2–7,8	7,8–7,2
2-D gél elektroforézisa	α -1	α -2	α -3	α -4	Pre- β -1 HDL
Méret (nm)	11,2–10,8	9,4–9,0	8,5–7,5	7,5–7,0	6,0–5,0
NMR	Nagy HDL-P ^b	Közepes HDL-P		Kis HDL-P	
Méret (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 és HDL3			
Méret (nm)	14,5–10,5	10,5–7,65			

^a Egy dimenziós gél elektroforézisa nem-denaturáló grádiens poliakrilamid gélen (4%–20%). ^b HDL-P, HDL részecske.

és a koleszterin-észter transzfer protein (CETP). A proteomikai vizsgálatok során a HDL-en detektált több mint 80 különböző fehérje között egyesek gyulladás fennállása esetén jelennek meg (pl. SAA, amyloid B), míg mások szerepe még nem tisztázott [16].

A HDL szintézis kiindulási molekulája az ApoA-I. Ez lép reakcióba a sejtek felszínén levő adenzin-trifoszfát kötő kazetta transzporter A1 (ABCA1) molekulával, melynek segítségével foszfolipideket és koleszterint vesz fel elsősorban a májból, kisebb mértékben a perifériás sejtektől, így jön létre a diszkoid alakú naszcens, vagy más néven pre- β HDL [17]. Ez a HDL érésének és egyben a RCT-nak is az első lépése. A LCAT a szabad koleszterin (FC)

észteresítése révén lehetővé teszi a HDL méretének fokozatos növekedését, és ahogy a pre- β HDL FC és TG tartalma növekszik, HDL3-má alakul és gömb alakot vesz fel. A CETP, mely elsősorban (74%) a HDL-hez kötődik, CE-t helyez át a VLDL és LDL részecskékre, míg onnan trigliceridet juttat a HDL-re [18]. A PL-eket a kilomikron és VLDL részecskékről a PLTP juttatja a HDL2-re, mely a legnagyobb méretű és egyben legkisebb sűrűségű HDL frakció [19]. Végül a HDL-t a máj veszi fel részben a SR-B1 révén, melyhez az ApoA-I segítségével kapcsolódik, részben pedig az LDL-receptoron keresztül, melynek az ApoE a ligandja. A koleszterin a májban a 7α -hidroxiláznak köszönhetően epesavakká alakul és kiválasztásra kerül, vagy az újonnan szintetizált lipoproteinekkal ismét a perifériás szövetek felé indul.

2.2. Aterogenezis

Az ateroszklerózis az artériák falában fellépő krónikus gyulladással járó megbetegedés, mely főként módosult endogén anyagok hatására kezdődik, melyek a veleszületett és szerzett immunitás válaszát váltják ki, és a vaszkuláris homeosztázis felborulásához vezetnek. A veleszületett immunválasz a vaszkuláris endotél sejtek és monociták/makrofágok aktivációjával kezdődik, majd gyorsan követi a szerzett immunválasz, melynek során antigén prezentáló sejtek számos potenciális antigént prezentálnak az effektor T limfociták számára. Az immunválaszt indukáló módosult endogén anyagok között kiemelt szereppel bír az oxidált LDL (oxLDL), melyben különböző citotoxikus hatású lipid oxidációs termékek - lipid hidroperoxidok, aldehidek és karbonilok – halmozódnak fel [20]. Az oxidatív ágensek keletkezésében a 12/15 lipoxigenáz, az 5-lipoxigenáz, a myeloperoxidáz (MPO), cyclooxygenáz (COX) és NADPH oxidáz útvonalak szerepét egyaránt felvetették [21,22]. Az endotél sejtek és makrofágok által termelt lipoxigenáz többszörösen telítetlen zsírsavakat konvertál lipid peroxidokká, míg az aktivált mononukleáris sejtek által termelt MPO tirozil gyököket, hipoklórsavat, klóramint és nitritet termel [23]. Az LDL lipid tartalmának oxidációját reaktív

szabad gyökök (ROS) és katalitikusan aktív fémionok egyaránt kiválthatják. A vas nagy mennyiségben van jelen a keringésben, mint a vörösvértestekben található hem alkotóeleme. A vörösvértestek lízise során az érpályában a methemoglobinból könnyen felszabadul a hem, mely hidrofób jellegének köszönhetően be tud lépni az LDL-be, hem oxigenáz-1 (HO-1) és ferritin termelést vált ki. A HO-1 felszabadítja a vasat, melyet a ferritin köt meg, ezáltal védve ki a szabad vas erős oxidatív sajátosságát [7,24,25]. Amennyiben a felszabadult vas megkötése nem történik meg, az oxidatív termékek keletkezéséhez vezet. Az ateroszklerotikus plakkokban nagyobb mennyiségű katalitikusan aktív vas és ferritin jelenlétét igazolták és előfordulásuk összefüggést mutatott a fennálló kardiovaszkuláris betegségekkel [26,27].

Az oxidált LDL az endotél sejtekre a lektin-szerű oxLDL receptor-1-n (LOX-1) és a cluster of differentiation 36 (CD36) scavenger receptoron keresztül fejti ki hatását: fokozza a LOX-1 és a vaszkuláris adhézis molekulák (intercelluláris sejtadhézis molekula-1 (ICAM-1), vaszkuláris sejtadhézis molekula-1 (VCAM-1)) expresszióját, valamint a monocita kemotaktikus protein-1 (MCP-1) felszabadulását [28-30]. További endotél hatása, hogy az endotél nitrogén monoxid szintáz (eNOS) expressziójának gátlása és a ROS termelésének fokozása révén csökkenti a nitrogén monoxid (NO) biológiai hozzáférhetőségét, emellett endotél sejt apoptózist vált ki [31].

A kemotaktikus és sejtadhézis molekulák indukálják a keringő monociták és T-limfociták érendotélhez való adhézíóját, majd a sejtek az érfal intima rétegébe vándorolnak és ott a T-helper limfociták által termelt citokinek hatására a monociták makrofágokká differenciálódnak. A makrofágok scavenger receptoraikon keresztül oxLDL-t vesznek fel, mely közvetlenül, vagy különböző szignalizációs útvonalak révén számos aterogén irányba ható folyamatot indukál. A felvett CE-k a lizoszómákban FC-né hidrolizálódnak, melyeket az endoplazmatikus retikulumban az acil-koleszterin aciltranszferáz-1 ismét észteresít [32]. A CE-k a citoplazmában lipid cseppek formájában tárolódnak, létrehozva a habos sejtek

jellegzetes morfológiai képét, míg az endoplazmatikus retikulumban felhalmozódó FC olyan komplex válaszreakciót indukál, mely a sejtek apoptózisához vezet [3]. Az oxLDL felvétel révén aktivált makrofágok számos proinflammatorikus hatású anyagot termelnek, köztük IL-1 β -t, tumor nekrosis faktor- α -t (TNF- α), MPO-t, 12/15 lipoxigenázt, ROS-t és mátrix metalloproteinázokat (MMP) [33]. A citokinek további immunsejtek bevándorlását teszik lehetővé az intimába, míg az MPO és a 12/15 lipoxigenáz LDL-t oxidálnak, így növelve az oxLDL mennyiségét [21]. Az oxLDL-CD36 kölcsönhatás a makrofágok polarizációjának elvesztését és a fokális adhézis kináz aktivációját váltja ki, meggátolva a makrofágok további migrációját, amelyek így az érfal intima rétegében rekednek [34]. A MMP-k a mátrix degradációja révén plakk instabilitáshoz vezetnek, melyet alátámaszt, hogy a humán aterómák vizsgálata során a sérülékeny területeken fokozott MMP aktivitást észleltek [35].

A vaszkuláris simaizomsejtek is rendelkeznek sejtfelszíni scavenger receptorokkal - köztük LOX-1-el is - és oxLDL hatására aterogén aktivációjuk zajlik, melynek részjelenségei a sejtek csökkent differenciálódása, fokozott proliferációja, és lipid akkumulációja [36]. Így az intimába vándoroló simaizomsejtek proliferálnak, illetve habos sejtekké alakulnak, hozzájárulva ezzel az érfalban szabad szemmel is észlelhető zsíros csíkok kialakulásához, melyek az ateroszklerózis első stádiumát reprezentálják. Az érlelmeszesedés további progresszióját a fokozott intersticiális kollagén szintézis, a gyulladásos sejtek mennyiségének növekedése és az általuk termelt MMP-k okozta mátrix degradáció jellemzi, mely elvékonyítja a plakk fibrózus sapkáját, így növeli annak sérülékenységét. Az instabil plakk megrepedése a trombusképződés révén a lumen súlyos beszűkülését vagy elzáródását váltja ki és így akut cerebro- vagy kardiovaszkuláris esemény kialakulásához vezet.

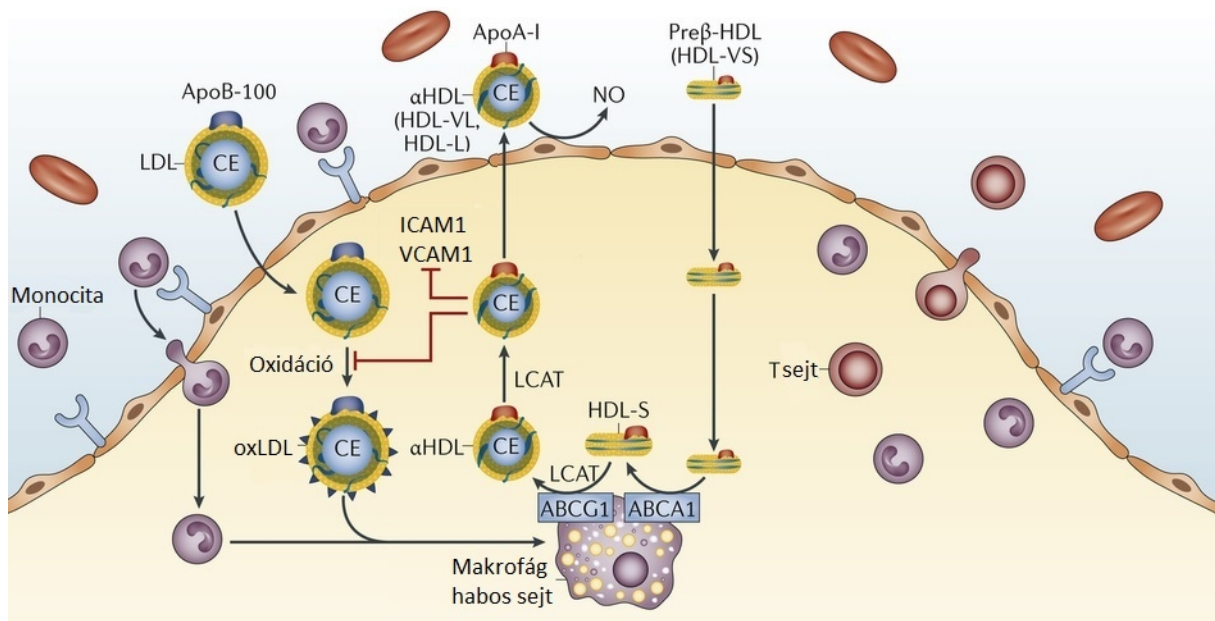
2.3. A HDL antiaterogén tulajdonságai

A HDL a szervezetben számos különböző folyamatban vesz részt, melyekben hatása az

érelmeszesedés kialakulásának megelőzésében illetve progressziójának gátlásában nyilvánul meg. Fő antiaterogén hatásai: a reverz koleszterin transzport, gyulladáscsökkentő, antioxidáns, vazoprotektív és antitrombotikus hatások, valamint az endotoxin semlegesítés [4] (**1. ábra**).

A HDL talán legfontosabb ateroprotektív hatása a *reverz koleszterin transzport*, melynek során a perifériás sejtekből – így az érfali makrofágokból is - az ABCA1 és az ABCG1 transzporterek közvetítésével foszfolipideket és koleszterint vesz fel, melyet részben szabad koleszterinként a felszíni lipid rétegben, részben észteresítést követően a belső magban szállít. A szállított koleszterin egy része a CETP révén átkerül a trigliceridekben gazdag lipoproteinekre további felhasználásra, a többit pedig a HDL a májba juttatja, ahol epesavak keletkeznek belőle, melyek az epecsatornák sejtjeinek apikális membránjában levő ABCG5/ABCG8 transzportereken keresztül választódnak ki az epébe, így szabadulva meg a felesleges koleszterintől [37]. A RCT-hoz nélkülözhetetlen az intakt ABCA1, ABCG1 és ApoA-I molekulák jelenléte. Az ABCA1 és ABCG1 egyaránt ATP kötő kazetta transzporterek,

1. ábra A HDL antiaterogén hatásai [5]



melyek az ATP hidrolízise során nyert energia felhasználásával, szekvenciális, egymást követő működéssel végzik a lipidek egyirányú szállítását a sejtektől a HDL részecskék felé. Az ABCA1 elsősorban lipid-szegény ApoA-I-t köt meg, valamint kisebb mértékben HDL3-t, míg egyáltalán nem transzportál koleszterint és PL-eket a HDL2 részecskékre. Ezzel szemben az ABCG1 csak nagyobb HDL partikulumokra (főleg HDL2-re) transzportál, és egyáltalán nem szállít koleszterint a lipid-szegény ApoA-I-re. Az ABCG1 fokozottan expresszálódik a makrofágokban, fontos szerepe van a habos sejtekből történő koleszterin kiáramlásban [38].

A HDL *antioxidáns hatásának* révén gátolja az LDL oxidációját, melynek mechanizmusa egyrészt az oxidált lipidek - mint a lipid-hidroperoxidok (LOOH) és lizofoszfátidilkolin - átszállítása az oxLDL-ről a HDL-re, másrészt azok inaktiválása. Mindezt főként az ApoA-I és az antioxidáns enzimek, a PON1, PON3, PAF-AH és a GPX biztosítják, melyek LOOH-kat hidrolizálnak hidroxidokká [39]. Bár az említett enzimek mindegyikének észlelték antioxidáns hatását, de részben mennyisége, részben aktivitása miatt közülük a legnagyobb jelentőséggel a PON1 bír, elsősorban ez felelős az LDL oxidáció gátlásáért. A 45 kDa tömegű kalcium dependens enzimet elsőként felfedezett szubsztrátja, a szerves foszfát metabolitok közé tartozó paraoxon alapján nevezték el, melyet hidrolizál. Elsődleges fiziológiás aktivitása valószínűleg laktonáz, a zsírsavak oxidációja során keletkező lipid-peroxidokat semlegesíti, továbbá hidrolizálja a homocisztein tiolaktont is, mely aterogén hatását a HDL, LDL, albumin és a véralvadási faktorok fehérjeláncainak kovalens módosítása - N- és S-homociszteinilációja - révén fejt ki [40,41]. Az enzim működéséhez az intakt szerkezetű HDL nyújtotta makromolekuláris közeg és az ApoA-I jelenléte is szükséges [39]. Koncentrációja a vérplazmában átlagosan 60 mg/l, de nagy egyéni különbségeket mutat (13-szoros) az aktivitásához hasonlóan, melyben 40-szeres eltérés is előfordul. Ennek hátterében a 7-es kromoszómán elhelyezkedő PON1 gén polimorfizmusa áll, melyből jelenleg közel 200 ismert. Az enzim koncentrációjának fő determinánsa a gén promóter régiójában megfigyelhető

PON1 C107T polimorfizmus, míg az aktivitását a kódoló régió Q192R és L55M polimorfizmusok határozzák meg. Adott allélekkel rendelkező személy PON1 aktivitása különböző szubsztrátokkal szemben eltérő [42]. A PON1 genotípus jelentős variabilitása miatt a mindennapi gyakorlatban az enzimaktivitás szempontjából a fenotípus meghatározása bír nagyobb jelentőséggel. A paraoxon és fenilacetát szubsztrátokkal szemben mutatott enzimaktivitások eltérő aránya alapján az emberek három fenotípusba sorolhatók: az AA alacsony, az AB közepes és a BB nagy aktivitású csoportokba [43]. A HDL antioxidáns aktivitásának további fontos determinánsa a felszíni lipid réteg fluiditása, mely a szfingomielin/foszfatidilkolin, szabad koleszterin/foszfatidilkolin és a telített/többszörösen telítetlen zsírsavak arányának csökkenésével párhuzamosan növekszik. Nagyobb fluiditás esetén fokozott a LOOH-k transzportja a sejtmembránból a HDL-re, és ekkor az ApoA-I antioxidáns aktivitása is kifejezettebb [44]. A HDL oxidációt gátló hatásai közé tartozik még a ROS termelés gátlása a neutrofil NADPH oxidáz inaktiválása által, valamint az endotél sejtek oxLDL, illetve SAA indukált szuperoxid anion termelésének csökkentése [45,46].

A HDL *gyulladáscsökkentő hatása* összetett, antioxidáns tulajdonsága mellett szerepet játszik benne endotoxin semlegesítő képessége, az endotél sejtek sejtadhéziós és kemotaktikus molekuláinak, valamint a monociták MMP expressziójának gátlása. A HDL gátolja az aktivált endotél sejtek felszínén a sejtadhéziós molekulák lizofoszfatidilkolin, illetve citokin indukált expresszióját, ezáltal akadályozza a monociták és limfociták oxLDL kiváltotta migrációját az érfal intima rétegébe. Hatása részben szfingozin-1-foszfát tartalmának köszönhető, mely egy lizoszfingolipid, ami specifikus G-protein kapcsolt receptorain keresztül fejt ki biológiai hatásainak széles palettáját, köztük a VCAM-1 és ICAM-1 expressziójának csökkentését [47]. A HDL a MCP-1 termelés gátlásán keresztül is akadályozza a monociták intimába vándorlását, emellett *endotoxinokat köt meg és semlegesít*, elsősorban a PON1 és az ApoA-I révén, így védi ki az általuk indukált sejtaktivációt és a következményes gyulladást [46].

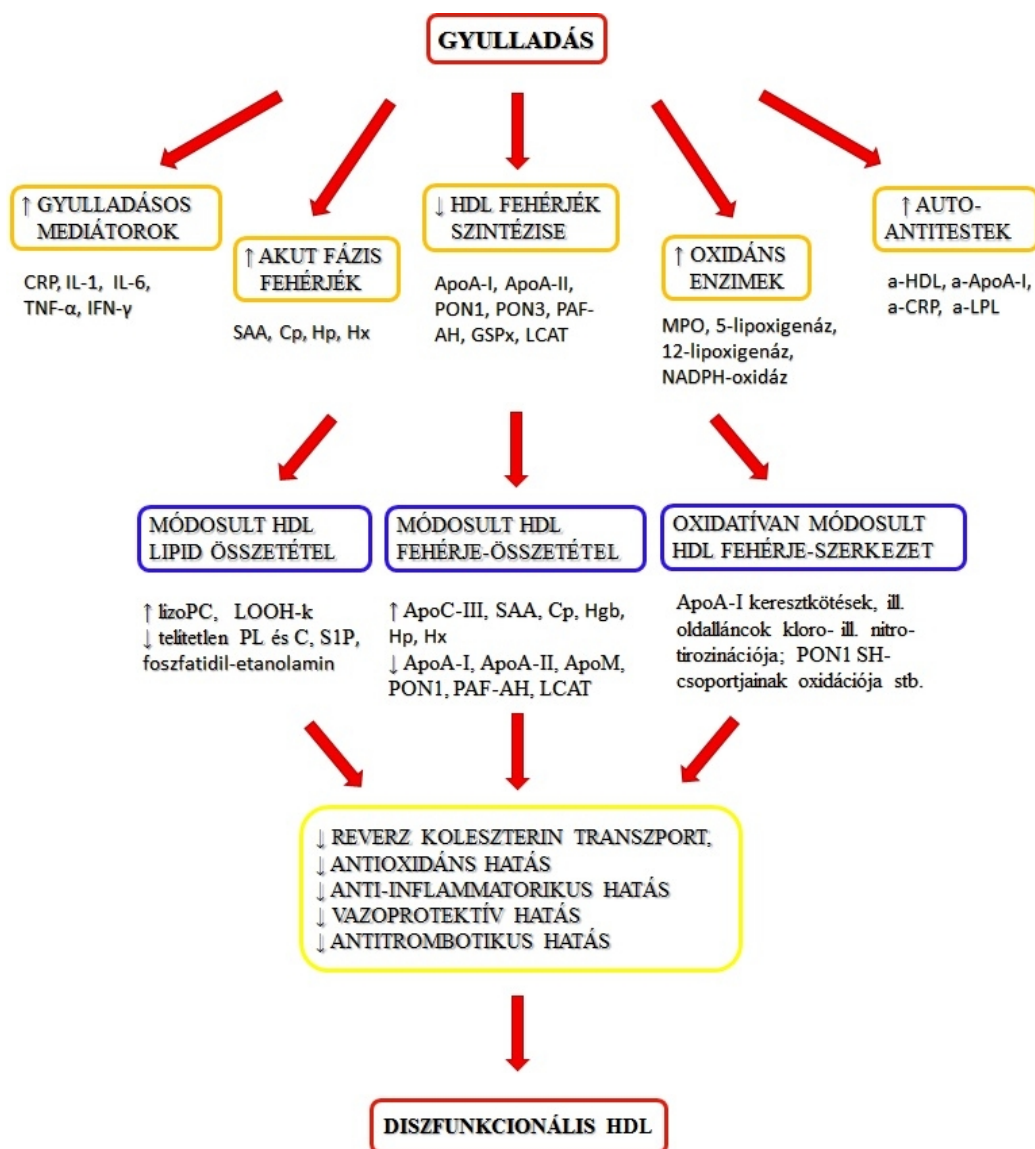
Vazoprotektív hatásainak köszönhetően fontos szerepet tölt be az *érendotél épségének megőrzésében* is. Gátolja a trigliceridben gazdag lipoproteinek, TNF α , vagy komplement által mediált sejtízist, miközben stimulálja az endotélsejt proliferációt és migrációt, melynek kiváltásában az ApoA-I és a lizoszíngolipidek egyaránt részt vesznek [47-48]. Részt vesz továbbá a vaszkuláris tónus fenntartásában: gátolja a vazokonstriktor endotelin-1 szekrécióját, aktiválja az endotél sejteken az eNOS-t és a COX-2-t, a felszabaduló NO és prosztaciklin pedig vazodilatációt vált ki [50,51]. Komplex *antitrombotikus hatása* a véralvadás és a vérlemezke adhézió gátlásában, valamint a fibrinolízis elősegítésében egyaránt megnyilvánul [52,53].

2.4. Diszfunkcionális HDL keletkezése, jellemzői, szerepe az érrelmeszesedésben

Diszfunkcionális HDL alatt olyan HDL részecskéket értünk, melyek a szervezetben nem képesek fiziológiás antiaterogén szerepük ellátására. Az ilyen HDL további rokon értelmű megnevezései még a proinflammatorikus HDL (piHDL), akut fázis HDL (A-HDL), oxidált HDL (oxHDL), ahol az elnevezések egyben a HDL megváltozott viselkedésére is utalnak. Gyulladás során a felszabaduló szabadgyökök, enzimek, lipid oxidációs termékek nemcsak az LDL lipid tartalmát oxidálják, hanem amennyiben mennyiségük meghaladja azt a küszöböt, melyet az egészséges HDL ellensúlyozni képes, a HDL-t is oxidatívan módosíthatják (**2. ábra**). In vitro kísérletek során bizonyították, hogy a HDL és lipid tartalma könnyen oxidálható [54]. Az oxidált HDL jelenlétét anti-oxHDL monoklonális antitest segítségével igazolták humán abdominális aorta ateromatózis plakkjának intima rétegében, valamint immunhisztokémiai vizsgálattal ApoA-I és ApoA-II jelenlétét is detektálták az ateroszklerózisos érfalban [55].

A HDL oxidációja többféle módon is létrejöhet, kialakulásában a MPO, lipoxigenáz, peroxinitrit, tokoferoxi gyökök és fém ionok is szerepet játszhatnak [23,44,56-59]. Ezek az ágensek típusuktól függően más-más mechanizmussal oxidálják a HDL-t, és a létrejövő oxidatív változások nem egyforma mértékben érintik annak lipid és fehérje alkotóit.

2. ábra A diszfunkcionális HDL kialakulása



A lipoxigenáz és a fém ionok elsősorban a lipideket oxidálják és a fehérjék oxidatív módosulását már a lipid oxidációs termékek (koleszterin-észter és foszfolipid-hidroperoxid származékok) generálják, míg a MPO termelte szabadgyökök az apolipoproteinek szerkezetét változtatják meg. A lipoxigenáz illetve Cu^{2+} hatására keletkező foszfatidilkolin és koleszterin-észter hidroperoxidok először az ApoA-I és ApoA-II specifikus metionin gyökeit oxidálják [23]. Erősebb oxidatív hatásra, mint amilyen például a MPO által termelt hipoklorit, az

ApoA-I további - főként cisztein, lizin és triptofán - aminosavai is oxidálódhatnak, valamint keresztkötések jöhetnek létre az ApoA-I és ApoA-II molekulák között, melyek így ApoA-I homodimereket és -trimereket, valamint ApoA-I-ApoA-II heterotrimereket képeznek [56]. Hasonló hatást vált ki az erős oxidáns peroxinitrit, mely az aktivált endotél és makrofág sejtek által termelt NO és szuperoxid reakciójával jön létre, és a fehérjék tirozin oldalláncjaival reagálva azok nitrotirozin módosulatait hozza létre, és funkciójuk romlásához vezet [57]. A peroxinitrit keletkezését az MPO is elősegíti, ezzel az ApoA-I-ben nemcsak a klorotirozin, hanem a nitrotirozin oldalláncok kialakulásához is hozzájárul [59].

A HDL lipidom oxidációja többféle változást idéz elő: a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációja során foszfolipid-hidroperoxidok, míg a koleszterinek oxidációjával koleszterin-hidroperoxidok képződnek. Az oxHDL CE tartalma a csökkent LCAT aktivitásnak köszönhetően alacsonyabb, hasonlóan a foszfatidilkolin tartalmához, míg ezzel párhuzamosan az oxidált állapotra jellemző lizofoszfatidilkolinok mennyisége nő és a foszfatidiletanolamin eltűnése figyelhető meg. A HDL peroxinitrittel illetve AAPH-val való oxidációja során az ApoA-I fokozza a HDL magjában levő foszfatidilkolin aldehidek képződését, melyeket ezt követően a PON1 lizofoszfatidilkolinná hidrolizál [58]. Az oxidáció a HDL lipid összetételének módosítása – a telített zsírsavak, koleszterin és szfingomielin arányának növelése - révén csökkenti a lipid burok fluiditását, mely a koleszterin efflux kapacitás csökkenéséhez vezet [44].

Az akut fázis HDL-ben több olyan komponens is nagyobb mennyiségben található, mely a natív HDL-ben nincs, vagy csak nagyon kis mennyiségben van jelen. Ezek közé tartozik a szérum amyloid A (SAA), a cöruoplazmin (CP), ApoC-III, a hemoglobin és kötőfehérjéi, a haptoglobin és hemopexin. Ezek a gyulladás hatására szintetizálódó proteinek részben saját proinflammatorikus hatásuknál fogva, részben pedig antiinflammatorikus fehérjék (ApoA-I, ApoA-II, ApoM, ApoJ, PON1) HDL-ről való leszorítása révén járulnak hozzá a HDL

antiaterogén funkciójának csökkenéséhez (**2. ábra**).

A szérum amyloid A elsősorban a máj által termelt kisméretű (12 kDa) apolipoproteinek családjába, melyeket 4 különböző gén kódol, de ezek közül csak 3 expresszálódik. Az SAA1 és SAA2 fontos akut fázis fehérjék, szintjük az akut fázis reakció során órákon belül emelkedik és akár 1000-szeres koncentrációt is elérhet. Az SAA4 ezzel szemben fiziológiás alkotója a HDL-nek és nem-gyulladásos körülmények között ez adja a HDL SAA tartalmának több mint 90%-át. Az akut fázis SAA (A-SAA) előszeretettel kötődik a HDL3 szubfrakcióhoz, miközben leszorítja róla az ApoA-I-t. Ennek eredményeként az ApoA-I jelenlétéhez kötött HDL funkciók – ABCA1 receptor kötés és RCT, PON1 aktiváció és antioxidáns aktivitás, LCAT aktiválás és HDL remodelling - defektusa figyelhető meg [60]. Az A-SAA fokozza a HDL kötődését a vaszkuláris proteoglikánokhoz valamint retencióját az érfa intima rétegében, így lehetővé teszi oxidatív módosulását. A mononukleáris sejtekre az A-SAA kemotaktikus, migrációt, adhéziót és szöveti infiltrációt elősegítő hatást gyakorol [61]. A SAA HDL funkcióra gyakorolt negatív hatását több nagy populációs tanulmányban is igazolták. A HDL-C és SAA koncentráció összefüggését vizsgálva megállapították, hogy a magasabb HDL értékkel rendelkező betegek között az alacsony SAA koncentráció csökkent, míg a magas SAA szint megnövekedett kardiovaszkuláris- és ösztörtalitással jár együtt [62].

Koszorúérbetegekben és krónikus vesebetegekben a HDL ApoC-III-ban gazdagabb, mint az egészséges kontrollokban. Az ApoC-III proinflammatorikus mediátor: az ApoC-III tartalmú HDL részecskék pozitív korrelációt mutattak a fokozott kardiovaszkuláris rizikóval, míg az ApoC-III negatív részecskék kardioprotektív hatásúnak mutatkoztak [14]. A cöroloplazmin (CP) egy úgynevezett „holdvilág” fehérje, azaz olyan multifunkcionális protein, mely a szubsztrát, lokalizáció, expresszió függvényében változtatni tudja a hatását. Egyszerre réztranszporter, részt vesz a vas homeosztázis és az angiogenezis szabályozásában, keringő antioxidáns, ugyanakkor gyulladásos körülmények között fokozza az LDL oxidációját [63].

Mennyisége akut fázis reakció során 2-3-szorosára nő. Simaizomsejtek és endotélsejtek által termelt szuperoxid anionok jelenlétében elősegíti a lipid peroxidok képződését, és több nagy populációs tanulmányban (Helsinki Heart Study, Rotterdam Study, The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study) is összefüggést mutattak ki a CP magasabb szérumszintje, valamint a koszorúbetegség és a szívelégtelenség előfordulása, továbbá a kardiovaszkuláris mortalitás között [64]. A hemoglobin (Hb) és scavenger fehérjéi, a haptoglobin (Hp) és hemopexin (Hx) mennyisége szignifikánsan növekedett a koronáriabetegek HDL-ében az egészséges kontrollokéhoz képest, és hasonló jelenség figyelhető meg a hiperlipidémia egérmodelljében. A Hb, Hp, Hx jelenléte pozitív korrelációt mutatott a HDL LOOH tartalmával, valamint a HDL Hb tartalma a hem, ROS és IL-6/IL-10 hányados, mint a szisztémás gyulladás markerének értékeivel [65].

A HDL különböző konstitucionális fehérjéinek mennyisége, illetve aktivitása a diszfunkcionális HDL-ben csökkent, mely három fő okra vezethető vissza. A gyulladás során megváltozik a fehérjeszintézis profilja: előtérbe kerül az akut fázis fehérjék szintézise, miközben csökken a HDL antiinflammatorikus proteinjeinek szintézise. Bizonyos akut fázis fehérjék előszeretettel kötődnek a HDL-hez, és onnan leszorítják a kötéstől a szerkezeti fehérjéket és az antioxidáns enzimeket, emellett a szóban forgó proteinek egy része oxidatív módosulást is elszenved, mely fiziológiai funkcióik károsodásához vezet. Ilyen fehérjék az ApoA-I és ApoA-II, ApoM, ApoJ, PON1 és LCAT. A HDL ApoA-I tartalmának csökkenését számos betegségben leírták, köztük krónikus vesebetegségben, pszoriázisban és RA-ben. Szerkezeti módosulása többféle módon is létrejöhét, tirozin, metionin, cisztein, lizin és triptofán gyökei oxidatív módon módosulhatnak, valamint keresztkötések jöhetnek létre az egyes molekulák között, mely mind funkcióvesztést von maga után [23,56,59]. Az ApoA-II szintje szintén csökken RA-ben és krónikus veseelégtelenségben, metionin gyökei oxidatív módon módosulhatnak és prooxidáns hatásra heterotrimereket képez az ApoA-I-gyel [56]. Az ApoM csökkent szintjét leírták már

krónikus vesebetegségben, diabetes mellitusban és pszoriázisban. Az ApoJ alacsonyabb koncentrációját figyelték meg koszorúérbetegek HDL-ében, és szintje negatív korrelációt mutatott az inzulinrezisztenciával és a BMI-vel [14]. Különböző kórképekben - köztük koszorúér-betegségben, krónikus veseelégtelenségben, 2-es típusú diabetes mellitusban, RA-ben, pszoriázisban és Sjögren-szindrómában - észlelték a PON1 csökkent aktivitását, mely pozitív asszociációt mutatott a HDL gyengült antioxidáns kapacitásával [14,66].

A HDL szerkezetében bekövetkező változások a részecskék antiaterogén funkcióinak változó mértékű deficitjéhez vezetnek, amit állatkísérletes modellekben és humán betegcsoportokban is kimutattak (**2. ábra**). Natív és oxidált HDL-t makrofágokból származó habos sejtekkel inkubálva a natív HDL jelentős koleszterin kiáramlást hoz létre a sejtekből, azonban az oxHDL efflux kapacitása elmaradt a natív HDL-étől [67]. Akut szepszisben szenvedő betegeknél több mint 70%-kal csökkent koleszterin kiáramlást észleltek, mely a gyógyulást követően csaknem normalizálódott [68]. Intravénásan alkalmazott endotoxin hatására humán kísérletben influenzaszerű tünetek jelentkeztek CRP, és szérum illetve HDL-hez kötött SAA szint emelkedés kíséretében, miközben a HDL koleszterin kiáramlást kiváltó képessége a gyulladás előrehaladásával párhuzamosan egyre csökkent [69]. Az SAA fokozott termelődése szisztémás gyulladás hiányában is szignifikánsan csökkentette a RCT-ot [68]. Több kísérletben igazolták, hogy a lipid peroxidációnak kulcsszerepe van a koleszterin kiáramlás romlásában [56,70]. Az enyhe oxidáns hatásra létrejövő RCT csökkenésben inkább a HDL lipid komponenseinek oxidatív módosulása játszik szerepet [71]. Az erősebb oxidáció kapcsán kialakuló ApoA-I inaktiváció részben az ABCA1, részben a SR-B1 iránti csökkent affinitásban nyilvánul meg [70]. A RCT csökkenését RA-ben, SLE-ben, pszoriázisban, periodontális betegségekben, HIV infekcióban és szepszisben is kimutatták [72].

A HDL oxidáció mértéke korrelál a PON inaktivációjával. Eset-kontroll tanulmányok mellett prospektív kohorsz vizsgálatban is igazolták, hogy az alacsonyabb PON1 aktivitás a

koronária-betegség független rizikófaktora [73]. Akut koronária szindrómában szenvedő betegek és egészséges kontrollok HDL2 és HDL3 szubpopulációjának összehasonlítása során a betegek HDL frakcióiban magasabb volt a LOOH és gyulladásos index értéke, és alacsonyabb a PON1 aktivitás és a koleszterin efflux kapacitás [74]. A lipid oxidációs termékek emelkedett szintje mellett észlelt csökkent PON1 enzimaktivitásról számos különböző betegcsoportban is beszámoltak (pl. krónikus vesebetegség, COPD, pszoriázis, rozácea, Sjögren-szindróma, SLE, RA stb.). Szarkoidózisban szenvedőknél a kisebb PON1 aktivitás inverz asszociációt mutatott a SAA és malondialdehid koncentrációjával, miközben az enzim szulfhidril csoportjainak csökkent szintjét észlelték, csakúgy mint az akut stroke miatt kezelt betegeknél [75,76].

Az oxidáció révén a HDL nemcsak elveszíti antioxidáns tulajdonságát, hanem az oxLDL-hez hasonlóan a makrofágokra citotoxikus részecskévé változik, mely növeli az intracelluláris ROS szintjét, ugyanakkor hozzájárul az antioxidáns enzimek termelésének csökkentéséhez, valamint leírták endotél sejt apoptózist indukáló hatását is [77]. A rézzel erősen oxidált HDL hatására jelentősen csökken az eNOS expresszió, és így a NO felszabadulás az endotél sejtekben [57,77]. Az oxidált HDL3-mal, illetve annak lipid komponensével történt stimuláció csaknem teljesen megakadályozza az endotél sejtekben a NO hatására fellépő cGMP felszabadulást, így hozzájárul a NO-hoz kötött antiaterogén hatások gyengüléséhez. Fokozza továbbá a plazminogén aktivátor inhibitor-1 expresszióját, mRNS-ének stabilitását és felszabadulását az endotél sejtekben, s mivel az oxLDL-hez hasonlóan képes a vérlemezkék aktivációjára, ezért protrombotikus hatású [78,79]. Az oxHDL nem képes kivédeni az oxLDL indukált makrofág adhéziót, sőt fokozza a monociták kötődését az endotél réteghez [80]. A végstádiumú vesebetegektől származó HDL-nek az LDL-indukált monocita kemotaktikus aktivitásra gyakorolt gátló hatása jelentősen csökkent, és az egészséges kontrollal összehasonlítva fokozta a makrofágok gyulladásos citokin (TNF α , IL-6, IL-1 β) termelését, melynek mértéke pozitívan korrelált az urémiás betegek SAA szintjével [81].

2.5. A diszfunkcionális HDL előfordulása

A diszfunkcionális HDL kialakulását már jó néhány akut vagy krónikus gyulladással járó állapotban kimutatták. Képződése szempontjából döntő fontosságú a gyulladással járó jelenléte. Akut gyulladással járó sebészeti beavatkozások, illetve influenza vírus infekció során igazolták a piHDL előfordulását, mely a gyógyulás során visszanyerte antiaterogén sajátosságait és natív HDL-lé alakult vissza [82,83]. Krónikus gyulladással járó kórképek közül koszorúér-betegségben, akut koronária szindrómában, 2-es típusú cukorbetegségben, metabolikus szindrómában, krónikus veseelégtelenségben, dializált betegekben, SLE-ben, RA-ben, szisztémás szklerózisban, Crohn-betegségben, szívtranszplantáción átesettek körében, pulmonális hipertóniában, valamint obstruktív alvási apnoében és akut stroke-ban is igazolták jelenlétét [6,8,10,84-86].

2.6. A HDL szubpopulációk jelentősége

A HDL részecskék méretükben, felépítésükben és funkciójukban heterogének (**1. és 2. táblázat**). Összetételük részben genetikailag meghatározott, de befolyásolják a fennálló gyulladással járó folyamatok, a táplálkozás, dohányzás és egyéb környezeti tényezők, valamint a gyógyszerek is. Funkciójukat a rajtuk található apolipoproteinek, enzimek és egyéb fehérjék, valamint a lipid komponensek minősége és mennyisége szabja meg. Mivel a több, mint 80 ismert HDL-hez asszociált fehérje koncentrációja többnyire alacsonyabb annál, hogy minden HDL részecskén előfordulhasson, valószínű, hogy jelenlétük egyes specifikus HDL frakciókhoz köthető. Ezt támasztják alá a különböző lipoproteomikai vizsgálatok eredményei is. Az ApoE, ApoC-I, ApoC-II és Apo C-III a nagyméretű HDL2 alosztályon található meg, míg a PON1, PON3, PAF-AH antioxidáns enzimek, valamint az LCAT elsősorban a denz HDL3, azon belül is HDL3c részecskéken fordul elő nagyobb arányban [87,88]. Az egyes HDL

szubpopulációk lipidomja is eltér egymástól: a denzitás növekedésével párhuzamosan az egyes frakciók koleszterin/koleszterin-észter és szfingomielin/foszfatidilkolin aránya csökken [89]. A lipidek közül a S1P kizárólag az ApoM tartalmú HDL3 részecskéken található meg [47].

Az eltérő felépítésű HDL frakciók az érrelmeszesedés folyamatának gátlásában is más szerepet játszanak. Mivel főként a denz HDL3 frakcióhoz kapcsoltnak találhatók az antioxidáns hatású enzimek és lipidek, valamint e frakciónak a RCT-ban is alapvető jelentősége van, ezért ez az alosztály felelős az érrelmeszesedést gátló hatás túlnyomó részéért. A HDL szubpopulációk antioxidáns tulajdonságának összehasonlítása során valamennyi gátolja az LDL oxidációját, és ez a hatás a denzitás fokozódásával párhuzamosan nő az alábbi sorrendben: HDL2b < HDL2a < HDL3a < HDL3b < HDL3c [88]. Ezzel összhangban a kicsi denz HDL3 ellenállóbb az oxidatív módosulással szemben, eredményesebben gátolja a VCAM-1 expressziót a vaszkuláris endotél sejteken, és az oxLDL-lel szemben is jobban védi azokat, mint a nagy HDL2 [90]. Az endotél sejtek apoptózisának gátlásában és proliferációjának elősegítésében szintén a HDL3 frakció szerepe az elsődleges. A HDL2 és HDL3 egyaránt stimulálják az endotél sejtekben a prosztaciklin szekrécióját, azonban míg a HDL3 fokozza a vazokonstriktor és protrombotikus hatású tromboxán A2 termelését, addig a HDL2 gátolja azt, ezért utóbbi vazorelaxáns hatása a kifejezettebb [91]. Az apoE tartalmú HDL2 trombocita aggregációt gátló hatása jelentősebb, azonban a szöveti faktor útvonal gátló speciálisan a HDL3-hoz kötődik, s így annak antikoaguláns tulajdonsága hangsúlyosabb [92].

Az egyes kórképekben a HDL mennyiségében és funkciójában bekövetkező változások nem feltétlenül arányosan érintik az egyes HDL frakciókat. Obez és normál testsúlyú nők HDL-jeinek összehasonlítása során az obezeknél szignifikánsan kevesebb volt a nagy és több a közepes HDL aránya, míg kis HDL szintjükben nem volt eltérés [93]. Alacsony és normál HDL-C koncentrációjú csoportok HDL összetételének, szubpopulációs profiljának és antioxidáns aktivitásának összehasonlítása során az alacsony HDL szinttel rendelkező

populációban a HDL2 koncentrációja számottevően alacsonyabb volt a kontrollénál. A HDL oxidáció propagációs rátája alacsonyabb volt az alacsony HDL-C koncentrációjúak körében, és pozitív összefüggést mutatott a HDL2 részecske tömeggel és mérettel [90]. Metabolikus szindrómában szenvedő alanyok HDL3c részecskéinek endotél sejtekre gyakorolt antiapoptotikus aktivitása 35%-kal elmaradt az egészséges kontrollokétól, melynek hátterében e részecskék magjának megváltozott összetétele, emelkedett triglicerid és csökkent koleszterin-észter tartalma igazolódott [94].

2.7. SLE, érlemeszesedés és diszfunkcionális HDL

Az autoimmun kórképek egy olyan betegségcsoportot képviselnek, mely fő jellemzője, hogy az immunrendszer saját antigénjeivel szemben indít támadást. Az immunreakcióban résztvevő autoreaktív T- és B-sejtek granulocita és makrofág aktivációt váltanak ki, valamint citokineket, citotoxikus mediátorokat és autoantitesteket termelnek. Ezek hatására lokális vagy szisztémás gyulladás lép fel, mely szövet- illetve szervkárosodáshoz vezet. A szisztémás autoimmun betegségek lefolyása során aktív, a gyulladás tüneteinek fellángolásával jellemzett, és jelentős gyulladásra utaló panasz nélküli, nyugalmi periódusok váltakoznak. A szisztémás lupus erythematosus egyike a leggyakoribb autoimmun megbetegedéseknek (70/100000 fő). Kialakulásában genetikus és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak, melyek változatos tünetek megjelenéséhez vezetnek. A leggyakrabban előforduló általános, mozgásszervi és bőrtünetek, valamint hematológiai eltérések mellett gyakori a neuropszichiátriai-, légzőszervi,- kardiális-, emésztőrendszeri- és veseérintettség is. A betegségre jellemző a nagyszámú autoantitest jelenléte. Diagnosztikus jelentőségű a betegek több mint 95%-ában megtalálható antinukleáris antitest (ANA), azonban jelenléte nem specifikus SLE-re. Az anti-Sm fajlagos a lupusra, míg az anti-dsDNS előfordulása a betegség aktivitásának jelzője. További gyakran kimutatható antitestek az antifoszfolipid antitestek

(antikardiolipin – anti-CL, lupus antikoaguláns- LA), antineutrofil citoplazmatikus antitest (ANCA), reumatoid faktor (RF), anti-SSA, anti-SSB, anti-U1RNP, de előfordulhatnak vörösvértest, fehérvérsejt, trombocita és endotél, sőt oxLDL, HDL és ApoA-I elleni antitestek is. A betegeknél a jellegzetes poliklonális immunglobulin szaporulat mellett magasabb immunkomplex (IC) szint, alacsony C3 és C4 komplement szint és komplement aktivitás igazolható. Az aktív periódusokban egyéb általános gyulladást jelző eltérések, így gyorsult vörösvértest-süllyedés (We), emelkedett CRP, és a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek megnövekedett koncentrációja is észlelhető. Az elmúlt évtizedekben a betegek életkilátásai az immunszuppresszív gyógyszereknek köszönhetően drámaian javultak. Jelenleg az 5 éves túlélés 95%, ebben a periódusban a betegségaktivitás szövődményei (veseelégtelenség, hematológiai vagy központi idegrendszeri szövődmény) szerepelnek halálokként. Öt év elteltével a szív-érrendszeri betegségek okozta mortalitás (AMI, stroke) kerül előtérbe, a betegek 10 éves túlélése 85% [95].

SLE-ben a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás jelentősen meghaladja az átlagnépességet, annak 6-9-szerese. Korcsoportonkénti bontásban vizsgálva azonban a kockázat jóval nagyobb is lehet, a 35-44 éves nők számára a betegség fennállása 52-szeres miokardiális infarktus rizikót jelent [96]. A betegek érlemezésének folyamata felgyorsult, melyet a megnövekedett carotis intima-media vastagság (cIMT), carotis plakkok jelenléte, endotél diszfunkció, és az artéria brachialis megromlott áramlásfüggő dilatációja (FMD) jelez [97]. A plakk képződés folyamatában a hagyományos kardiovaszkuláris rizikófaktorok gyakoribb előfordulásának és betegség-specifikus tényezőknek a szerepét egyaránt felvetették [96]. A tradicionális kockázati tényezők közé tartozó lipid eltérések megjelenési formája SLE-ben igen sokszínű. Egyes tanulmányok a betegek lipo-proteinjeinek jellegzetes „lupus mintázatról” számolnak be, amit magasabb TG és VLDL, valamint csökkent HDL-C szint jellemez, s az eltérések általában a betegség aktív fázisában lépnek fel [98-100]. Mások az SLE

alacsony betegségaktivitással járó szakaszaiban emelkedett LDL, TG és össz-koleszterin (TC) koncentrációt tapasztaltak [98,101]. A magasvérnyomás előfordulása szintén nagyobb arányú a betegek körében, mely részben a kortikoszteroid használat, részben a lupusz nefritisz következménye [96,100]. A betegek többsége relatíve fiatal nő, akiknél a dohányzás előfordulása az egészségesekéhez hasonló, míg az elhízás és az inzulin rezisztencia gyakoribb.

A gyulladás az SLE-nek és az érlemeszesedésnek egyaránt kulcsfontosságú tényezője. Az autoimmun kórképeket az ateroszklerózishoz hasonlóan a Th1/Th2 limfocita egyensúly Th1 irányba való eltolódása jellemzi, melyet makrofág aktiváció és gyulladásos citokinek felszabadulása kísér. Szisztémás gyulladás esetén a keringésben jelen levő gyulladásos mediátorok az érfalban is gyulladást provokálhatnak, mely az érlemeszesedés „low grade inflammation” elméletével összhangban hozzájárulhat a betegekben észlelt akcelerált ateroszklerózis kialakulásához. Az akut fázis fehérjék közül a CRP, SAA növekedett szintjét és magasabb We értékeket írtak le SLE-s betegekben, valamint emelkedett MCP-1 és IL-6 koncentrációkat, melyek pozitív korrelációban álltak a koronária meszesedés mértékével [102,103]. A CRP szerepe az aterogenezisben sokrétű, többek között aktiválja a vaszkuláris endotélt, sejtadhéziós molekulák és a MCP-1 fokozott expresszióját váltva ki, valamint elősegíti a makrofágok és habos sejtek proinflammatorikus citokinjeinek (IL-6, TNF- α , IL-1 β) felszabadulását [104]. Az IL-6 amellet, hogy a máj CRP termelésének fő stimulusa, a fibroblasztokra proliferatív hatású, valamint fokozza a fibrinogén és egyéb véralvadási faktorok termelődését is [96]. Az SAA SLE-ben érzékenyebb markere a gyulladásnak, mint a CRP. HDL-hez kötődve funkcionális deficittel járó szerkezeti változást idéz elő, mely a vaszkuláris simaizomsejtek MCP-1 termelésének csökkent gátlásában nyilvánul meg [105]. A HDL antioxidáns védelme is sérül, a szérum össz-antioxidáns kapacitása mellett fő antioxidáns enzimének, a PON1-nek az aktivitását több vizsgálatban is alacsonyabbnak találták az SLE-s betegekben, mint egészséges társaikban, és az enzim aktivitása negatívan korrelált a betegek a-

HDL és a-ApoA-I auto-antitestjeinek szintjével. [106,107]. Az említett autoantitesteket in vitro humán HDL-lel inkubálva igazolták azok PON aktivitást gátló hatását [108].

McMahon M. és mtsai sejtmentes esszével vizsgálták a betegek HDL-ének antioxidáns tulajdonságát. Arról számoltak be, hogy az általuk vizsgált SLE-sek csaknem felének volt piHDL-e, melynek az előfordulási gyakorisága 86,7%-ra nőtt azoknak a körében, akiknél carotis plakk is kimutatható volt. A betegekben a piHDL prevalenciája a carotis plakk és a kardiovaszkuláris komplikációk jelenlétével, valamint az oxLDL koncentrációjával korrelált [10,11]. A HDL megváltozott antiaterogén hatásának hátterében felmerült a szubpopulációk arányának változása, illetve egyes frakciók fokozott érintettségének lehetősége is. Mostanáig azonban csak néhány tanulmány vizsgálta a HDL alosztályok eloszlását SLE-ben, és a kapott eredmények ellentmondásosak. *Hua X. és mtsai* SLE-s betegek HDL alosztályait vizsgálva úgy találták, hogy tekintet nélkül a betegek kardiovaszkuláris anamnézisére a kis HDL szubfrakciók (sHDL) mennyisége kevesebb volt az SLE-s betegekben, mint egészséges társaikban [109]. Ezzel ellentétben egy 69 SLE-s beteget tartalmazó kohorszban a sHDL részecskék pozitív korrelációban álltak a cIMT, C3, C4 és CH50 komplement szintekkel [110].

A fentiek jól illusztrálják, hogy bár jó néhány tanulmány foglalkozott már az SLE-ben tapasztalható felgyorsult érlemeztesedés hátterének vizsgálatával, a fennálló gyulladás és a HDL minőségi változásának, azaz a diszfunkcionális HDL-nek és az esetleges szerkezeti és szubpopulációs változásoknak az együttes szerepét még nem sikerült tisztázni a folyamatban.

2.8. A HDL antioxidáns tulajdonságának vizsgálata

A HDL antioxidáns kapacitásának meghatározására alkalmazott tesztek közös jellemzője, hogy valamely prooxidáns alkalmazásával oxidálják az LDL-t, összehasonlítják a reakció során LDL jelenlétében kapott eredményeket a HDL-t is tartalmazó reakcióeleggyel nyert adatokkal, és ezek különbségével jellemzik a HDL antioxidáns hatását. A vizsgálati

módszerek azonban igen heterogének abban a tekintetben, hogy sejtes vagy sejtmentes esszét használnak, milyen módszerrel különítik el a vizsgált HDL-t, milyen típusú és erősségű oxidánst alkalmaznak, milyen anyag mennyiségét követik a reakció során, valamint hogy kinetikus vagy végpontos mérést végeznek-e. A mérési technikában mutatkozó különbségek a velük nyert eredmények kisebb, vagy éppen szélsőséges különbségeihez vezethetnek.

Kezdetben a HDL antioxidáns kapacitásának meghatározására sejtes rendszerekben került sor, azonban a sejtekkel való munka időigényes, bonyolult volta miatt ez a módszer nem volt alkalmas nagyszámú minta egyidejű feldolgozására. Elsőként *Navab M. és mtsai* dolgoztak ki sejtmentes esszét a HDL LDL oxidációt gátló hatásának meghatározására, mellyel számos minta relatíve gyors elemzésére nyílt lehetőség [8]. Sejtmentes módszerükben a levegőn oxidálódó LDL váltja ki a diklorofluoreszcein-diacetát (DCF-DA) átalakulását fluoreszcens formába, amely mennyisége 485 nm-es excitációs és 530 nm-es emissziós hullámhossz mellett mérhető. Proinflammatorikus HDL-t észleltek akkor, ha az oxidáció során keletkező fluoreszcens szignál nagyobb volt a HDL és LDL együttes jelenlétében, mint az LDL-é önmagában. A további gyakran alkalmazott módszerek közül a tiobarbitursav reaktív anyag (TBARS) teszt az LDL oxidáció során keletkező lipid peroxidok és malondialdehid mennyiségét méri 535 nm-en végpontos méréssel, míg a konjugált dién teszt során kinetikus méréssel 234 nm-en követik a keletkező diének mennyiségét.

A reakciókban alkalmazott HDL szeparálására gold standardnak tekintett módszer a sűrűség-grádiens ultracentrifugálás, mivel ez tökéletesen elkülöníti azt a többi proteintól, azonban a kivitelezése eszköz, munka és időigényes [111]. Ez vezethetett egyéb elválasztási módszerek (FPLC, gélelektroforézis) alkalmazásához, melyek azonban ebben a vizsgálat típusban a mindennapi gyakorlatban nem terjedtek el [6,88]. *Navab M.* illetve *McMahon M. és mtsai* a HDL előállításához dextrán-szulfát tartalmú kicsapót használtak, mely precipitálja az ApoB tartalmú lipoproteineket (VLDL, IDL, LDL), azonban nincs számottevő hatással a többi

fehérjére. Kritikaként merülhet fel, hogy a minta, melyet a tanulmányokban HDL-nek neveznek, így valójában ApoB mentes vérplazma, mely ennek megfelelően számos más fehérjét (főként albumint) és gyulladásos mediátort is tartalmaz, s ezek jelenléte módosíthatja a kísérleti eredményeket [6,8,88,112]. Lényeges továbbá a reakcióelegyben alkalmazott HDL-C:LDL-C koncentrációk aránya, mely fiziológiás körülmények között többnyire 1:1 és 1:7 között változik, azonban a különböző kísérletekben a legváltozatosabb HDL és LDL koncentrációkkal lehet találkozni, melyeket hol koleszterin, hol fehérje, hol részecske tartamra vonatkoztatnak, tovább rontva az eredmények összevethetőségét.

Eltérés mutatkozik az egyes munkacsoportok között az alkalmazott prooxidáns típusában is: használtak oxidált lipideket, AAPH-t, katalitikusan aktív fémionokat (Cu^{2+}), az LDL inkubációját humán artériafal sejtekkel, illetve az LDL enyhe keverését fiziológiás sóoldat és levegő elegyében [6,8,88]. A fenti oxidánsok közül a nagyobb mintaszámú vizsgálatokban leggyakrabban az AAPH-t, a rezet illetve az LDL keverését alkalmazták. A katalitikusan aktív réz jelenlétét bár igazolták már ateromatózis plakkokban, mégsem tisztázott szerepe az LDL oxidációjában [27]. Az AAPH egy vízőldékony azo-vegyület, mely közvetlenül generál peroxil gyököket, hosszú féléletideje miatt szabadgyök termelése tartósan azonos ütemű, ezért gyakran használják különböző oxidációs modellekben, azonban nem fordul elő a szubendoteliális környezetben, így nincs szerepe az in vivo LDL oxidációban [113]. Az LDL keveréssel vagy sejtes inkubációval történő oxidálásának standardizálása pedig nem megoldott, és így eleve oxidált LDL-t viszünk be a rendszerbe. Az alkalmazott prooxidáns típusában, koncentrációjában, és így oxidáns hatásának erősségében mutakozó különbségek miatt a vizsgált HDL-eknek nem egyforma oxidatív kihívással szemben kell helytállnia, ami nagyon ellentmondásos kutatási eredményeket eredményezhet. Erős oxidáns hatás mellett a HDL nem tudja kivédeni az LDL oxidációját, sőt lipidtartalma miatt inkább fokozza azt [88]. Ez lehet a magyarázata, hogy rézzel oxidált HDL antioxidáns hatását értékelve akadt olyan kutatócsoport,

mely a vizsgált HDL mintákat egyöntetűen az LDL oxidációját fokozó, prooxidáns hatásúnak találta [114]. Hasonlóan ellentmondásos eredmények születtek két fluoreszcens esszé összehasonlítása kapcsán. A DCF esszét alkalmazó független kutatócsoport koronáriabetegek, magas SAA, MPO, illetve TG szintű betegek és egészséges kontrollok csoportjaiban végzett méréseket, azonban piHDL-t egyik csoportban sem tudtak kimutatni, sőt a magas MPO szinttel rendelkezők HDL antioxidáns kapacitása nem különbözött a kontrollétól, míg a magas SAA szintű csoporté szignifikánsan meghaladta azt [115].

Az LDL oxidáció folyamatának monitorozása többnyire a keletkező lipid oxidációs termékek (konjugált dién, LOOH, TBARS) mennyiségének követése révén valósul meg, míg a DCF módszernél az oxidáció során generált fluoreszcens szignált mérik. A mérés módja lehet kinetikus vagy végpontos. Kinetikus mérés, például a konjugált dién mérés esetében, az adott anyag (pl. konjugált dién) abszorbanciájának rövid időintervallumonként történő meghatározásával az oxidáció során folyamatosan monitorozzuk annak mennyiségét. A reakció során lehetőség van a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges idő megállapítására, mely jól jellemzi az LDL illetve a HDL oxidatív rezisztenciáját, ugyanakkor a keletkezett lipid oxidációs termékek mennyisége is meghatározható. A végpontos mérések (pl. TBARS, sejtmentes esszé) esetében ugyanez a reakció zajlik le, azonban mérés csak egy (vagy több) tetszőlegesen megválasztott időpontban történik, mellyel az adott időpontban jelen lévő oxidációs termékek mennyisége állapítható meg. A végpontos mérés elvégzésének időpontja végletesen befolyásolhatja az eredményeket – túl korán vagy túl későn mérve nem feltétlenül találunk különbséget a minták oxidatív rezisztenciájában.

A fenti metodikai problémák miatt szükség lenne a HDL antioxidáns kapacitás pontos, megbízható, jól reprodukálható és viszonylag könnyen kivitelezhető meghatározására, mely a jelenlegi ismeretek szerint legjobban reprezentálja az in vivo LDL-HDL interakciót.

3. CÉLKITŰZÉSEK

- A HDL antioxidáns kapacitásának vizsgálatára olyan módszer kidolgozása, mely a korábban alkalmazott tesztekkel összehasonlítva jobban megközelíti az in vivo LDL-HDL kölcsönhatást.
- Az általunk kidolgozott módszerrel - a hem-indukált LDL-oxidáció módszerével - végzett HDL antioxidáns kapacitás mérés standardizálása az érvényes laboratóriumi guideline-ok alapján.
- Egészséges személyek HDL-jeinek, illetve azok szubfrakcióinak antioxidáns kapacitás vizsgálata, és a kapott eredmények összevetése korábbi, más tesztekkel nyert eredményekkel.
- SLE-s betegek és egészséges kontrolljaik lipidprofiljának, HDL antioxidáns kapacitásának, a HDL alosztályok mennyiségének és arányának meghatározásával a HDL minőség jellemzése, és a csoportok eredményeinek összehasonlítása.
- Az SLE-s betegekben fennálló szisztémás gyulladás vizsgálata a gyulladásos markerek és betegségaktivitási index meghatározása révén.
- A gyulladásos markerek és a megváltozott lipidprofil közötti kapcsolatok elemzésével a szisztémás gyulladás okozta oxidatív stressz lipid metabolizmusra gyakorolt hatásának jellemzése.

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Betegek

Az első vizsgálatban 53 fiatal (19–44 év) egészséges önkéntes vett részt, akiknél veseelégtelenség, májbetegség, kardiovaszkuláris megbetegedés valamint diszlipidémia nem állt fenn.

A második tanulmányba a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Immunológia Tanszékén kezelt 51 SLE-s beteget, valamint az egészségügyi dolgozók és helyi lakosok közül 49 egészséges kontrollt választottunk be. Valamennyi beteg teljesítette az SLE diagnosztikus kritériumait, azaz legalább 4 jelen volt az Amerikai Reumatológus Kollégium (ACR) által 1997-ben felülvizsgált diagnosztikai kritériumok közül [116]. A vizsgálatban való részvétel szempontjából kizáró kritériumnak számított a veseelégtelenség ($\text{GFR} < 60 \text{ ml/perc/1,73 m}^2$) és a cukorbetegség fennállása, továbbá a statinok szedése, mivel ezek módosítják a HDL antioxidáns funkcióját [8,117]. A betegeket és kontrollokat korban, nemből és dohányzási szokások tekintetében is illesztettük, mert ezek a tényezők szintén hatással vannak a lipid profilra és a HDL antioxidáns kapacitására [118].

A tanulmány résztvevőinek klinikai adatai közül a következőket rögzítettük: életkor, nem, dohányzás, statin szedés, hipertónia (vérnyomás $\geq 140/90 \text{ Hgmm}$ vagy antihipertenzív gyógyszerek használata), cukorbetegség (éhomi vércukorszint $\geq 7 \text{ mmol/l}$ vagy posztprandiális vércukorszint $\geq 11,1 \text{ mmol/l}$ vagy antidiabetikumok alkalmazása), korábbi cerebrovaszkuláris (TIA, stroke) vagy kardiovaszkuláris (AMI, angina pectoris) megbetegedés. Az SLE-s betegek betegség-aktivitását a Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) alapján értékeltük [119], továbbá információkat gyűjtöttünk betegségtartamukra, SLE-s tüneteikre és az alkalmazott kezelésre vonatkozóan is.

Mindkét tanulmány résztvevői a tervezett vizsgálatokra vonatkozóan részletes

tájékoztatást kaptak, ezt követően részvételi szándékukat beleegyező nyilatkozat aláírásával rögzítették. A tanulmányokat a DE OEC Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (3294-2010) illetve az ETT-TUKEB (45163/2012/EKU) engedélyezte.

4.2. Rutin laboratóriumi vizsgálatok

A vizsgálatok résztvevőitől 12 órás éhezést követően vénás vérvétel történt, a vérmintát ezután 3500 g-n 4°C-on 10 percig centrifugáltunk. A rutin laboratóriumi paramétereket, beleértve a vérképet, vércukor szintet, vese és májfunkciós teszteket a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében friss szérumból Cobas c501 analizátorral (Roche Ltd, Mannheim, Germany) mérték. A hsCRP, ApoA-I, ApoB és lipoprotein (a) (Lp(a)) koncentrációkat Tina-quant reagenssel immunturbidimetriás tesztekkel vizsgálták. Az összkoleszterin (TC), TG, HDL-C és LDL-C szinteket enzimatikus kolorimetriás tesztekkel mérték (Modular P-800 Analyzer, Roche/Hitachi). Az SLE és az antifoszfolipid szindróma jellemző autoantitestjeit (anti-dsDNA, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB; anti-CL (IgA, IgG és IgM), anti-β2-glikoproteinI (anti-β2GPI: IgA, IgG, IgM)), immunglobulin (IgA, IgG, IgM), komplement (C3, C4) és immunkomplex koncentrációikat kereskedelmi forgalomban kapható enzim-kötött immunoszorbens próbákkal vizsgálták (ELISA). A maradék szérumot kis adagokban -70°C-on fagyasztottuk és tároltuk a HDL szubfrakciók, PON1 aktivitás, HDL antioxidáns kapacitás mérésekig és ELISA tesztekig. A citokinek, akut fázis fehérjék és oxLDL vizsgálatát kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitekkel (IL-6: R&D Systems Inc., Minneapolis, USA; SAA: Antigenix America Inc., NY, US; MCP-1: R&D systems Inc., Minneapolis, USA; oxLDL: Biomedica, Wien, Austria) végeztük a gyártó utasításai szerint.

4.3. Speciális laboratóriumi vizsgálatok

4.3.1. LDL szeparálás

Az LDL-t sűrűség-grádiens ultracentrifugálási módszerrel különítettük el [120]. 4 egészséges önkéntestől vett EDTA-val antikoagulált vénás vért 10 percig centrifugáltunk (2000 g, 4 °C), majd eltávolítottuk a plazmát, és annak denzitását KBr (Sigma Life Science) hozzáadásával 1210 g/l-re állítottuk be. Ebből az oldatból 11,5 ml-t töltöttünk 40 ml-es Quick-Seal Ultra-Clear csövekbe (Beckman Coulter), melyre fiziológiás sóoldatot rétegezve két rétegből álló grádiens jött létre. A csöveket 4 °C-on 120 percen át 50000-es fordulatszámmal (227 220g) ultracentrifugáltuk egy 50.2 Ti rögzített szögű rotorral (Beckman Coulter Optimal LE-80K) az LDL izolálása céljából, mely a folyamat végén sárga sávként jelent meg a csőben. Az ultracentrifugálás befejezését követően a csövek aljába tűt vezettünk, melyen keresztül telített KBr oldatot jutattunk be 200 ml/óra sebességgel, s közben a tetejükhöz illesztett kifolyócsövön keresztül a sűrűség-grádiens frakcionáltuk, az LDL frakciókat (1006-1063 g/l) összegyűjtöttük és a különböző személyektől származó LDL mintákat elegyítettük. Az így nyert LDL tisztaságát elektroforézissel igazoltuk (Hydragel7 lipoprotein, Sebia), fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay (Thermo Scientific), koleszterin tartalmát pedig enzimatis teszt (Cholesterol ADPS, Diagnosticum Ltd.) segítségével határoztuk meg. Az LDL-t fiziológiás sóoldattal történt hígítást követően kis adagokban lefagyasztottuk, -70 °C-on tároltuk, és csak közvetlenül a HDL antioxidáns kapacitás mérés előtt olvasztottuk ki. Valamennyi mérésnél ugyanazt az LDL elegyet használtuk.

4.3.2. HDL szeparálás

A vizsgált személyek vénás vérmintáját 10 percig centrifugáltunk 4 °C-on 2000 g fordulatszámmal, majd eltávolítottuk a szérumot és annak denzitását KBr (Sigma Life Science) hozzáadásával 1340 g/l-re állítottuk be. A 13,5 ml-es Quick-Seal Ultra-Clear ultracentrifuga

csövekbe (Beckman Coulter) három rétegű grádiens készítettünk: a legalsó réteg 3,5 ml 1340 g/l denzitású KBr-os szérum, a középső és felső réteg 5-5 ml 1240 g/l, illetve 1060 g/l sűrűségű KBr oldat. A lezárt csöveket 4 °C-on 70000-es fordulatszámmal (336140 g) centrifugáltuk 4 órán keresztül egy 70.1 Ti rögzített szögű rotorral (Beckman Coulter Optimal LE-80K). Az ultracentrifugálást követően a sűrűség-grádiens frakciónként gyűjtöttük az ultracentrifugacső tetejéhez rögzített kifolyócsövön át, miközben a cső aljába szűrt tűn keresztül telített KBr oldatot jutattunk be 100 ml/óra sebességgel. A sűrűség-grádiens legfelső, VLDL-t és LDL-t tartalmazó 3 ml-ét eldobtuk, majd a HDL-t tartalmazó következő 4 ml-t (1063-1210 g/L) gyűjtöttük. Az első tanulmányban 8 egészséges résztvevő HDL-jét egymást követő 0,5 ml-es frakciókban gyűjtöttük és a begyűjtés sorrendjében számoztuk (a legkisebb sűrűségű lett az 1. frakció, a legnagyobb pedig a 8.). Ezeket a HDL frakciókat használtuk a HDL antioxidáns kapacitás módszerének jellemzése, és az eltérő sűrűségű HDL frakciók vizsgálata során. A többi résztvevő HDL-jét nem frakciónként, hanem egészében gyűjtöttük. A HDL tisztaságát elektroforézissel (Hydragel7 lipoprotein, Sebia) igazoltuk. A HDL minták fehérje- és koleszterin tartalmát az LDL izolálás kapcsán korábban már ismertetett módon határoztuk meg. Az első tanulmányban a HDL antioxidáns kapacitás vizsgálatokat az ultracentrifugálást követő 24 órán belül végeztük, és addig a mintákat 4 °C-on tartottuk. A második tanulmányban a HDL-t ultracentrifugálást követően kisebb adagokban lefagyasztottuk, -70 °C-on tároltuk, és csak közvetlenül a HDL antioxidáns kapacitás mérés előtt olvasztottuk ki.

4.3.3. HDL antioxidáns kapacitás vizsgálat

A HDL LDL oxidációt gátló hatását a hem indukált LDL oxidáció során vizsgáltuk oly módon, hogy meghatároztuk önmagában az LDL-nek az oxidációja során a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges időt a propagációs fázisban ($\Delta T_{V_{max}}$) és összehasonlítottuk a HDL jelenlétében mért értékkel. Az első reakcióelegy 6 mmol/l

koncentrációjú, 7,4 pH-jú HEPES-puffert (Sigma), 5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú hem oldatot (Sigma), 570 $\mu\text{mol/l}$ koleszterin koncentrációjú LDL-t tartalmazott, míg a második reakcióelegy az előbbieket mellett 57 $\mu\text{mol/l}$ koleszterin koncentrációjú HDL-t is. A megelőző kísérletek során a jelentősen különböző antioxidáns kapacitású HDL-ek vizsgálatához az 1:10 HDL:LDL koleszterin koncentráció arány bizonyult optimálisnak. A reakcióelegyet egy 96-lyukú sima aljú plate-re mértünk be, melyet ezt követően 15 percig 37 °C fokon inkubáltuk. Az oxidációt 75 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú hidrogén-peroxid (Sigma) hozzáadásával indítottuk be, ami a hem gyűrű felhasítása és az oxidatív hatású vas kiszabadítása révén katalizálja a reakciót. A fenti végkoncentrációkat az összesen 200 μl térfogatú reakcióelegy tartalmazta.

Az LDL oxidáció folyamatát a hem degradáció követése révén monitoroztuk: egy multimodális microplate olvasóval (Beckman Coulter DTX 880 Multimode 108 Detector) 405 nm-en 5 órán keresztül 3 percenként végeztük spektrofotometriás méréseket. A reakció kezdeti, iniciációs szakaszában még alig oxidálódik az LDL, ezért a hem mennyisége lassan csökken, majd a propagációs szakban a nagyfokú oxidáció jelentős hem bomlást eredményez, amit az abszorbancia jelentős csökkenése kísér. Végül a terminális fázisban nincs már lényeges abszorbancia változás, mert a rendelkezésre álló hem már elfogyott. A hem bomlás maximális reakciósebességének eléréséhez szükséges időt ($\Delta T_{V_{\max}}$) a Multimode Analysis Software (Beckman Coulter) számolta ki. A HDL antioxidáns kapacitást a HDL jelenlétében és hiányában mért $\Delta T_{V_{\max}}$ értékek százalékos arányával jellemeztük: 100%-nak tekintettük az LDL oxidációjának $\Delta T_{V_{\max}}$ értékét, és ehhez képest adtuk meg hány % az oxidáció $\Delta T_{V_{\max}}$ értéke az LDL és a vizsgált HDL minta együttes jelenlétében. Az egységnyi HDL koleszterin antioxidáns hatását jellemző értéket specifikus HDL antioxidáns kapacitásnak neveztük el. Az össz-HDL antioxidáns kapacitást a szérumban HDL koncentráció és a specifikus HDL antioxidáns kapacitás szorzataként számoltuk ki.

Először 8 egészséges személy fokozatosan növekvő sűrűségű, 0,5 ml-es HDL-

frakcióinak antioxidáns kapacitását hasonlítottuk össze, valamint 41 egészséges önkéntes HDL-jének antioxidáns kapacitását mértük meg. A második tanulmányban 51 SLE-s beteg és 49 egészséges kontroll HDL antioxidáns kapacitását teszteltük.

4.3.4. A módszer optimalizálása és standardizálása

Tesztünk *optimalizálása* céljából vizsgáltuk eltérő hem (3–9 $\mu\text{mol/l}$) és hidrogén-peroxid (50–125 $\mu\text{mol/l}$) koncentrációk hatását a $\Delta T_{V_{\max}}$ és a HDL antioxidáns kapacitás értékére. Valamennyi mérésnél ugyanazt a hat HDL mintát használtuk, a tesztek duplikátumban végeztük. A módszer *pontosságát* a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 148 Wayne, PA) EP5-A2 guideline-ja alapján ellenőriztük, ugyanazon két HDL mintát duplikátumban 20 napon keresztül teszteltünk.

Az eredmények *linearitását* egyazon HDL minta három különböző frakciójának hét eltérő koleszterin koncentrációjú hígításával tanulmányoztuk, mialatt az LDL koleszterin koncentrációja változatlan maradt (570 $\mu\text{mol/l}$) a reakcióelegyben. A HDL koncentrációkat (40,689; 47,475; 56,98; 71,225; 94,975; 142,45; 284,9 $\mu\text{mol/l}$ HDL-C) úgy választottuk meg, hogy a HDL:LDL koleszterin arány lehetséges fiziológiás arányokat reprezentáljon: 1:14, 1:12, 1:10, 1:8, 1:6, 1:4, 1:2.

A *módszerek összehasonlítása* során a tesztünkkel nyert eredményeket a konjugált dién képződés monitorozásával kapott értékekkel vetettük össze [117]. A hem indukált LDL oxidáció során 30 HDL mintát vizsgáltunk, a hem bomlást és a konjugált dién képződést 405 nm-en és 234 nm-en végzett szimultán mérésekkel követtük. A *konjugált dién képződés módszerével* az LDL oxidáció követése a lipid peroxidáció közti termékeit reprezentáló konjugált diének mennyiségének folyamatos mérése révén történik. Abszorpciójuk 234 nm-en spektrofotometriás módszerrel detektálható a reakció három egymást követő fázisa során: az iniciációs fázisban még kevés dién képződik, ezért az abszorpció alig változik; a propagációs

fázisban a diének mennyiségének és ezáltal abszorpciójuknak gyors növekedése figyelhető meg; míg a terminális fázisban a diének lassan lebomlanak, melyet lassú abszorpció csökkenés jelez. A HDL hem indukált LDL oxidációt gátló hatása a reakció propagációs fázisában a konjugált dién képződés $\Delta T_{V_{max}}$ -nak meghatározása révén vizsgálható. Az alkalmazott reakcióelegy összetétele és az összemérés menete azonos a HDL antioxidáns kapacitás vizsgálatnál leírtakkal. Az abszorbancia méréseket 5 órán keresztül 3 percenként végeztük, és az eredmények alapján a keletkezett konjugált diének mennyiségét, illetve a $\Delta T_{V_{max}}$ -ot a Multimode Analysis Software (Beckman Coulter) kalkulálta. A HDL antioxidáns kapacitást a HDL jelenlétében és hiányában mért $\Delta T_{V_{max}}$ értékek százalékban kifejezett arányával jellemeztük.

4.3.5. HDL alosztályok meghatározása

A HDL alosztályokat egy poliakrilamid gélelektroforézisen alapuló módszerrel, a Lipoprint Rendszerrel (Quantimetrix Corp., CA, USA) azonosítottuk, mely a gyárilag előtöltött gél tartalmazó csövek alkalmazásával képes a HDL szubfrakciókat méretük alapján elkülöníteni a humán szérumból. Ezzel a módszerrel 51 SLE-s beteg és 40 kontroll mintáját analizáltuk. A meghatározás során a HDL alcsoportok detektálásához gyárilag előtöltött poliakrilamid gél tartalmú csövekbe 25 μ l szérum mintát és 300 μ l lipofil festéket (szudánfekete) is tartalmazó betöltő gél-oldatot mértünk be. A csöveket 30 percig fotopolimerizáltuk, majd 11 szérummintát tartalmazó csövet és egy gyári minőségi kontrollt elektroforézis kamrába helyeztünk, és állandó, csövenként 3 mA áramerősséggel 50 percen keresztül elektroforézist végeztünk. A lipid szubfrakciók sávjait ArtixScan M1 digitális szkennel (Microtek International Inc., CA, USA) beszkeneltük, és mobilitásuk alapján azonosítottuk. Kezdő referencia pontként a VLDL (R_f 0.0), végső referencia pontként az albumin (R_f 1.0) sávja szolgált. A LDL/VLDL és albumin csúcsok között 10 HDL alosztályt

különítettünk el, melyeket három nagyobb osztályba soroltunk: nagy (HDL1-HDL3), közepes (HDL4- HDL7) és kis (HDL8-HDL10) HDL-ek csoportjába. Az egyes HDL frakciók koleszterin koncentrációját a minták össz-koleszterin koncentrációjának és a szubfrakciós sávokhoz tartozó relatív görbe alatti területeknek (AUC) a szorzataként számítottuk ki.

4.3.6. A humán paraoxonáz-1 (PON1) enzimaktivitás és fenotípus eloszlás meghatározása

A PON1 paraoxonáz aktivitását kinetikus, félig automatizált módszerrel határoztuk meg, melyben paraoxont (O,O-dieil-O-p-nitrofenilfoszfát, Sigma) használtunk az enzim szubsztrátjaként, és a keletkező 4-nitrofenol mennyiségét mikrotiter plate-en (Greiner Bio-one GmbH, Germany) mértük. 15 μ l szérumot oldottunk 285 μ l Tris-HCl pufferben (100 mmol/l, pH=8.0), mely 2 mmol/l CaCl_2 -t és 5,5 mmol/l paraoxont tartalmazott. Az abszorbanciát 405 nm-en monitoroztuk 25 °C-on, 6 percig, percenként Beckman Coulter DTX880 Plate Reader alkalmazásával, mely Multimode Detector-ral is rendelkezett. Az enzimaktivitás kiszámításakor a $17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens alkalmaztuk. A szérum paraoxonáz aktivitását U/l-ben fejeztük ki, ahol 1 egységnyi aktivitás percenként 1 μ mol szubsztrát hidrolízisének felelt meg.

A PON1 arilészteráz aktivitást 20 mM Tris-HCl-ban (pH=8,0) vizsgáltuk, mely 1 mM-os fenilacetát szubsztrátot (Sigma, Hungary) tartalmazott. A reakciót a szérum hozzáadásával indítottuk el és az abszorbanciát 270 nm-en monitoroztuk. A fenilacetát spontán hidrolízisére vakkal korrigáltunk. Az enzim aktivitást az $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens alkalmazásával számoltuk ki. Az arilészteráz aktivitást U/l-ben adtuk meg, 1 egységnyi aktivitás percenként 1 μ mol fenilacetát hidrolízisét jelentette.

A 192Q→R kodon genetikai polimorfizmusa alapján két PON1 izotípus különböztethető meg: az A alacsony és a B magas aktivitással. Az enzim fenotípus megoszlását a kettős szubsztrát módszerrel vizsgáltuk. Az 1 mol-os NaCl jelenlétében hidrolizált paraoxonnak (só-

stimulált PON1 aktivitás) a hidrolizált fenilacetáthoz viszonyított aránya alapján az embereket a három lehetséges fenotípus (AA, AB, BB) egyikébe soroltuk. AA fenotípust állapítottunk meg, ha a hányados < 3 , AB fenotípust ha ≥ 3 és < 7 , BB fenotípust ha > 7 .

4.4. Statisztikai analízis

A dichotóm változókat a Pearson-féle Khí-négyzet illetve a Fisher-féle egzakt próbával elemeztük. Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk a folyamatos változók normalitását. Eredményeinkben a parametrikus adatok átlagát ($\pm$ SD), míg a non-parametrikusak mediánját (interquartile range [IQR]) tüntettük fel. A folyamatos változók összehasonlítását az adatok normál eloszlása esetén Student-féle t-próbával, nem normál eloszlásnál Mann-Whitney teszttel végeztük, a közöttük fennálló kapcsolatokat előbbi esetben Pearson, utóbbiban Spearman korrelációs koefficienssel jellemeztük. Szignifikancia szintnek a $p < 0,05$ értéket választottuk. A HDL antioxidáns kapacitás módszerének linearitását lineáris regressziós analízissel, a hem és a hidrogén peroxid koncentráció változtatásának HDL antioxidáns kapacitásra gyakorolt hatását többszörös regressziós analízissel vizsgáltuk. Szintén többszörös regressziós analízist („backward-stepwise” módszert) alkalmaztunk az össz-HDL antioxidáns kapacitást legjobban befolyásoló tényezők meghatározásánál. A két különböző módszerrel nyert HDL antioxidáns kapacitás eredményeket Deming és Passing-Bablok regresszióval is összehasonlítottuk a MedCalc Software -Version 12.2.1. (MedCalc Software) segítségével. A többi statisztikai analízisnél Statistica -Version 8 (StatSoft Inc.) statisztikai programot használtunk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Módszerbeállítás

5.1.1. Optimalizálás

Tesztünk optimalizálása során a reakcióelegyben alkalmazott különböző hem és hidrogén-peroxid koncentrációk hatását vizsgáltuk a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges időre ($\Delta T_{V_{\max}}$) és a HDL minták ($n=6$) antioxidáns kapacitásra. A prooxidáns hem koncentrációjának növelése a 3–9 $\mu\text{mol/l}$ tartományban rövidítette a $\Delta T_{V_{\max}}$ -t, és csökkentette a HDL antioxidáns kapacitás értékeit ($r=-0,7082$; $p<0,0001$) (**3. táblázat**). Bár a hidrogén-peroxid koncentráció növelése (50 - 125 $\mu\text{mol/l}$) is rövidebb $\Delta T_{V_{\max}}$ -t eredményezett, mégsem volt kihatással a HDL antioxidáns kapacitás értékekre ($r=0,0696$; $p=0,5464$) (**3. táblázat**). Ahhoz, hogy az antioxidáns kapacitás mérés kinetikus görbéjének alakja a HDL jelenlétében és hiányában egyaránt a legmegfelelőbb legyen 5 $\mu\text{mol/l}$ bizonyult az optimális hem, és 75 $\mu\text{mol/l}$ az optimális hidrogén-peroxid koncentrációnak a reakcióelegyben.

3. táblázat A hem és a hidrogén-peroxid koncentráció hatása a HDL antioxidáns kapacitás mérés eredményeire

Hem koncentráció ($\mu\text{mol/l}$)	Hidrogén-peroxid koncentráció ($\mu\text{mol/l}$)			
	50	75	100	125
3	-	173,68 $\pm$ 19,29	-	-
5	159,92 $\pm$ 21,69 ^a	161,48 $\pm$ 17,53	155,13 $\pm$ 14,32	154,71 $\pm$ 11,62
7	-	148,61 $\pm$ 27,71	-	-
9	-	114,71 $\pm$ 13,54	-	-

^a HDL antioxidáns kapacitás átlaga (%) $\pm$ SD

5.1.2. Reprodukálhatóság

A két HDL mintával 20 napon keresztül duplikátumban végzett mérésekkel az egyes minták esetében az optimális hiba értékei 1,87% és 1,72%-nak, míg a rutin hiba értékei 4,09% és 4,93%-nak adódtak. (**4. táblázat**).

4. táblázat A HDL antioxidáns kapacitás mérések reprodukálhatósága

HDL minta	HDL antioxidáns kapacitás átlaga (%)	Optimális hiba (CV%)	Inter-assay hiba (CV%)	Rutin hiba (CV%)
1.	127,34	1,87	3,64	4,09
2.	139,75	1,72	4,62	4,93

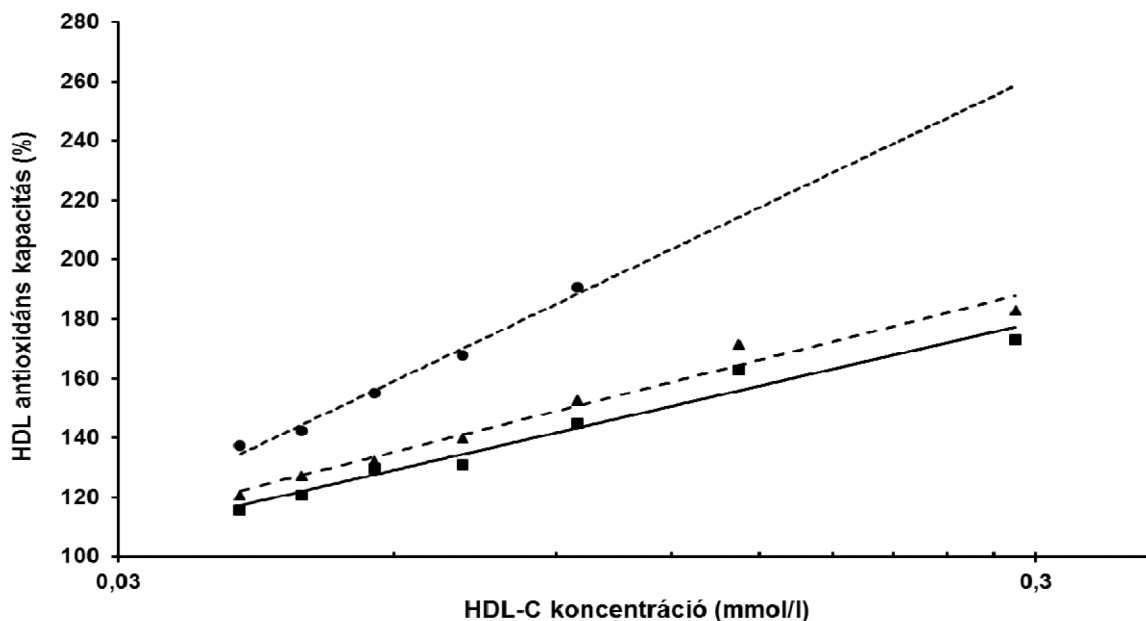
5.1.3. Linearitás

A módszer linearitását egyazon személy három eltérő sűrűségű frakciójával vizsgáltuk. Az egyes frakciók hét különböző hígításának antioxidáns aktivitását teszteltük, és erős pozitív korrelációt találtunk a HDL koncentrációja és antioxidáns aktivitása között ($r \geq 0,9834$; $p < 0,0001$) (**3. ábra**).

5.1.4. Módszerek összehasonlítása

A hem indukált LDL oxidáció során végzett HDL antioxidáns kapacitás méréssel nyert eredményeink megbízhatóságát úgy ellenőriztük, hogy az irodalomban az LDL oxidáció követésére legáltalánosabban használt, ezért általunk „gold standard”-nak tekintett konjugált dién módszerrel nyert értékekkel vetettük össze azokat [121]. Adatainkat több statisztikai módszerrel is elemeztük: Deming regresszióval (**4. ábra**) a regressziós vonal meredeksége 1,0762 (95% CI: 0,9361 - 1,2163; SE: 0,0684), tengelymetszete pedig -6,9878 (95% CI:

3. ábra A HDL antioxidáns kapacitás mérés linearitása



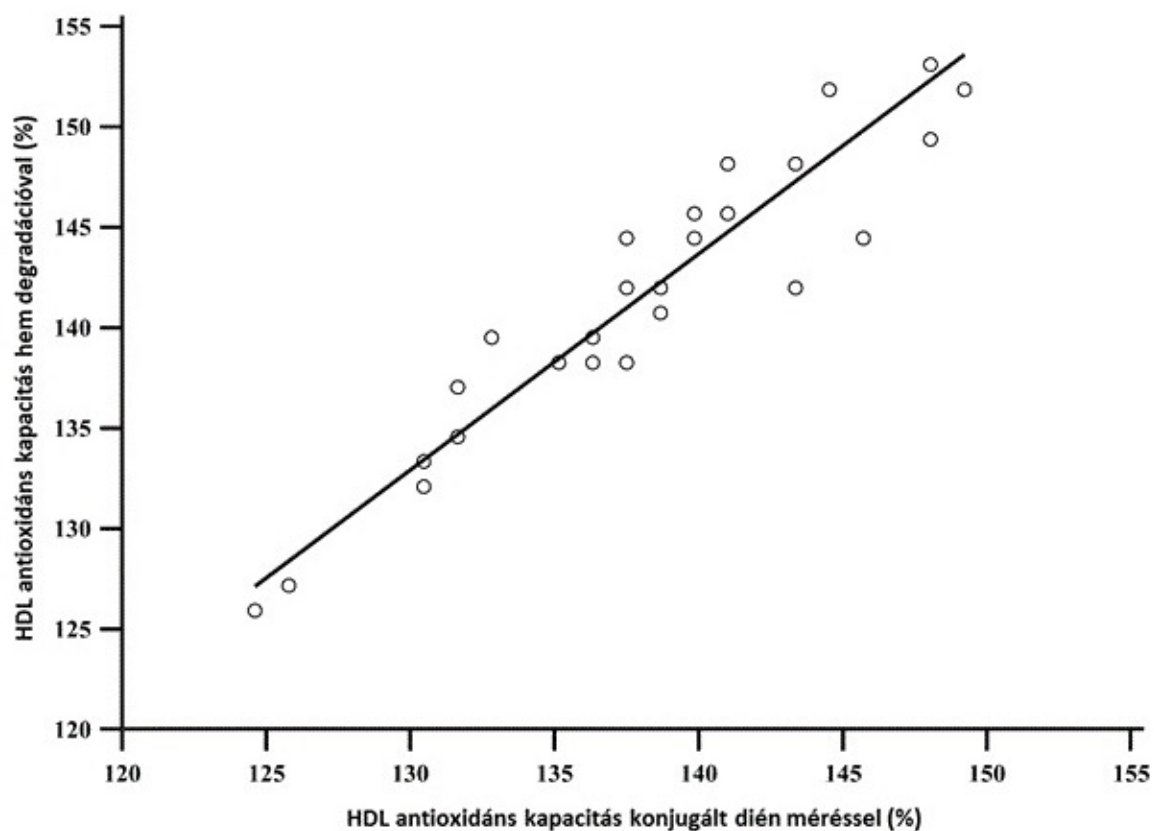
(■) 1. HDL frakció ($r=0,9834$; $p<0,0001$), (▲) 2. HDL frakció ($r=0,9874$; $p<0,0001$), (●) 3. HDL frakció ($r=0,9938$; $p<0,0001$). A 3. frakció 0,14 and 0,29 mmol/l HDL-C koncentrációi az LDL oxidációt olyan erősen gátolták, hogy a vizsgált időtartamon belül a teljes oxidáció nem zajlott le, így esetükben a $\Delta T_{V_{max}}$ -t és ez alapján a HDL antioxidáns kapacitást nem lehetett meghatározni.

-26,0304 - 12,0548; SE: 9,2963) volt. Hasonló értékeket kaptunk Passing-Bablok regresszióval: a regressziós vonal meredeksége 1,0535 (95% CI: 0,9833 - 1,2450), tengelymetszete -4,1152 (95% CI: -30,0037 - 5,4595), a maradékok standard deviációja pedig 1,6357 (SE: $\pm 3,2060$) volt, és nem találtunk szignifikáns különbséget az eltérő módszerekkel nyert eredményeink között ($p=0,73$).

5.2. HDL frakciók antioxidáns kapacitása

Egészséges alanyok ($n=6$) fokozatosan növekvő denzitású HDL frakcióinak (1.fr. → 8.fr.) antioxidáns kapacitását külön-külön vizsgáltuk. Valamennyi HDL frakció szignifikánsan nyújtotta az LDL oxidáció maximális reakciósebességének eléréséhez szükséges időt ($p<0,05$). Az egymást követő, növekvő sűrűségű HDL frakciók antioxidáns kapacitása sűrűségükkel

4. ábra A módszerek összevetése Deming regresszió alkalmazásával

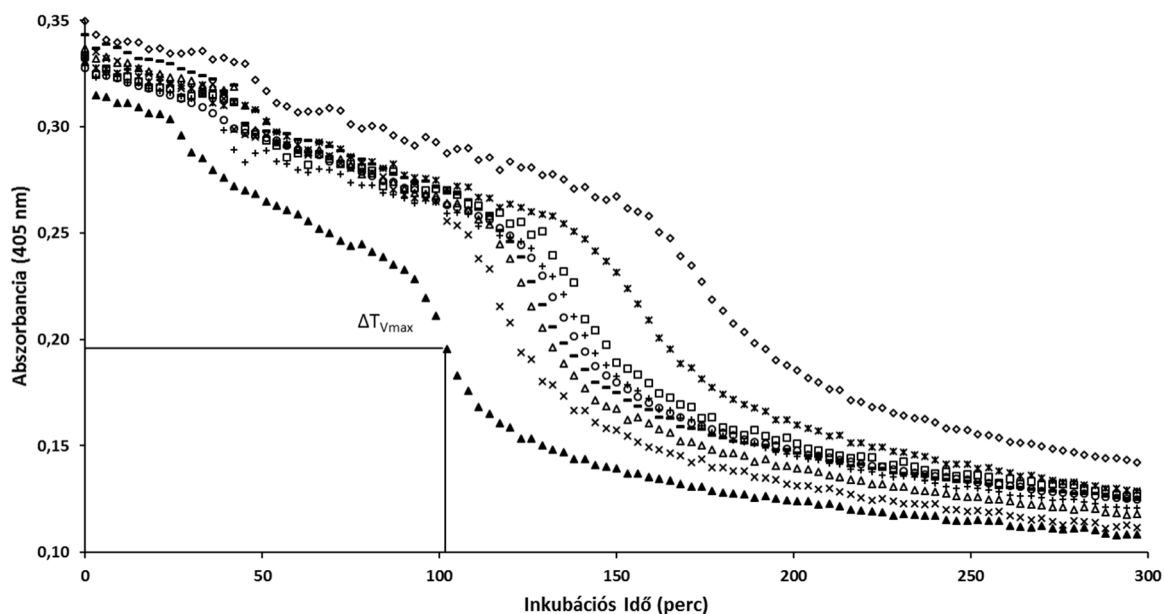


5. táblázat Eltérő sűrűségű HDL frakciók antioxidáns kapacitása ($n=48$)

HDL frakció	LDL ΔT_{Vmax} (perc) ^a	HDL+LDL ΔT_{Vmax} (perc) ^a	HDL antioxidáns kapacitás (%) ^b
1.	99,13	114,25	115,26 $\pm$ 6,86
2.	101,80	126,40	124,17 $\pm$ 6,43
3.	98,92	126,33	127,72 $\pm$ 4,66
4.	98,92	128,83	130,24 $\pm$ 4,44
5.	98,92	131,50	132,94 $\pm$ 7,77
6.	98,92	136,33	137,83 $\pm$ 8,94
7.	98,92	151,08	152,74 $\pm$ 18,53
8.	98,92	172,17	174,05 $\pm$ 13,38

^a Átlag; ^b Átlag $\pm$ SD

5. ábra A hem indukált LDL lipid peroxidáció kinetikus görbéi egyetlen egészséges önkéntes növekvő denzitású HDL frakcióinak jelenlétében illetve hiányában



(▲) LDL, (×) 1. HDL frakció (fr.), (Δ) 2. HDL fr., (–) 3. HDL fr., (○) 4. HDL fr., (+) 5. HDL fr., (□) 6. HDL fr., (*) 7. HDL fr., (◇) 8. HDL fr. Az egyes frakciók HDL antioxidáns kapacitás értékei a növekvő denzitás sorrendjében: 114,43%, 124,38%, 128,36%, 133,33%, 137,31%, 138,31%, 158,21%, és 174,13%.

párhuzamosan jelentősen emelkedett (5. ábra, 5. táblázat). Az LDL oxidáció maximális reakciósebességének eléréséhez szükséges időt az egyes HDL frakciók sűrűségük függvényében 6,12% - 94,12%-kal növelték meg.

5.3. Egészséges önkéntesektől nyert HDL minták antioxidáns kapacitása

Az egészséges önkéntestől szeparált 41 HDL minta antioxidáns kapacitásának értékei 120% és 140,23% között alakultak, átlaguk $127,67\% \pm 4,88$ volt.

5.4. SLE-s betegek és egészséges kontrolljaik minőségi és mennyiségi lipidprofilja, gyulladásos markerei és azok lipidekre gyakorolt hatása

5.4.1. A vizsgálati populációk lipidprofilja és jellemzése

A tanulmányozott csoportok alapvető klinikai és laboratóriumi jellemzőit, beleértve lipoprotein koncentrációikat, a **6. táblázatban** foglaltam össze. A bevont SLE-s betegek viszonylag fiatalok voltak, $6,59 \pm 5,26$ év átlagos betegségtartammal. A vizsgálat időpontjában betegségaktivitásuk (SLEDAI) átlaga $4,0 [2,0 - 6,0]$ volt, értéke az egyes betegeknél 0 és 38 közötti tartományba esett.

Bár az SLE-s betegek vércukor szintje a kontroll csoporttal összehasonlítva szignifikánsan magasabb volt, azonban így is jóval a normál tartomány határain belül maradt. A lipidek koncentrációit vizsgálva a betegeknél szignifikánsan alacsonyabb HDL és ApoA-I, ugyanakkor szignifikánsan magasabb TG és ApoB-100 szinteket mértünk, mint a kontrolloknál (**6. táblázat**).

6. táblázat. A vizsgálati csoportok alapvető klinikai és laboratóriumi jellemzői

Jellemzők	SLE-s beteg (n=51)	Kontroll (n=49)	<i>p</i>
Nem (nő/ffi)	44/7	41/8	0,717
Kor (év)	$31,82 \pm 6,40$	$31,8 \pm 6,81$	0,983
Testtömeg index (kg/m ²)	$24,45 \pm 4,13$	$23,86 \pm 4,28$	0,489
Dohányzik (%)	31,37	26,53	0,484
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	115 [110-120]	117 [110-120]	0,952
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 [70-80]	78 [70-80]	0,592
Glükóz (mmol/l)	$4,89 \pm 0,77$	$4,32 \pm 0,57$	<0,001
Össz-koleszterin (mmol/l)	$4,57 \pm 1,12$	$4,81 \pm 0,80$	0,222
LDL-koleszterin (mmol/l)	$2,60 \pm 0,84$	$2,71 \pm 0,69$	0,473
HDL- koleszterin (mmol/l)	$1,26 \pm 0,47$	$1,71 \pm 0,45$	<0,001
Non-HDL koleszterin (mmol/l)	$3,22 \pm 1,23$	$3,10 \pm 0,78$	0,573
Triglicerid (mmol/l)	$1,25 [0,9-1,9]$	$0,90 [0,7-1,4]$	0,005
Apolipoprotein A-I (g/l)	$1,39 \pm 0,35$	$1,66 \pm 0,41$	<0,001
Apolipoprotein B-100 (g/l)	$0,86 \pm 0,26$	$0,76 \pm 0,22$	0,047
Lipoprotein (a) (mg/l)	106 [29-294]	76 [29-169]	0,240
ApoA-I/HDL (g/mmol)	$1,17 \pm 0,26$	$0,99 \pm 0,17$	<0,001

5.4.2. HDL antioxidáns kapacitás, PON1 aktivitás és gyulladásos markerek

A HDL oxidációval szembeni védő hatását vizsgálva jelentős szignifikáns össz-HDL antioxidáns kapacitás csökkenést (-23,83%) tapasztaltunk az SLE-s csoportban, ugyanakkor a betegek specifikus HDL antioxidáns kapacitása enyhén, de szignifikánsan magasabb (+3,72%) volt egészséges társaikénál.

A PON1 aktivitását két különböző szubsztráttal vizsgáltuk. Az SLE-s betegek PON1 arilészteráz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoporté. A PON1 paraoxonáz aktivitása is csökkent, de a csoportok közötti különbség nem érte el a szignifikancia szintjét (**7. táblázat**). Hogy tisztázzuk, az alacsonyabb PON1 aktivitás hátterében a csökkent HDL szint áll-e, meghatároztuk az egységnyi HDL-re jutó enzimaktivitás mértékét, melyet a PON1/HDL hányadossal jellemeztünk. Az így standardizált enzimaktivitás a specifikus HDL antioxidáns kapacitáshoz hasonlóan kismértékben, de szignifikánsan magasabb volt az SLE-s betegekben a kontrolloknál mérténél. A PON1 fenotípusok közül a legalacsonyabb enzimaktivitással rendelkező AA típus az SLE-s betegek 94%, míg a kontrollok 87,23%-ában, a közepes aktivitású AB fenotípus a betegek 6%, míg a kontrollok 12,77% -ában volt jelen. A legnagyobb enzimaktivitást mutató BB fenotípus egyik vizsgálati csoportban sem volt kimutatható. A PON1 magasabb enzimaktivitásáért felelős B allél kétszer olyan gyakori volt az egészséges kontrollok csoportjában, mint az SLE-s betegek között (6,38% ill. 3%).

A betegek mintáiban a kontrollokkal összevetve a vizsgált gyulladásos markerek szintje szignifikánsan emelkedett volt, köztük az IL-6, MCP-1 és SAA koncentrációi is (**7. táblázat**). Vizsgáltuk továbbá különböző autoantitestek előfordulási arányát a betegekben: a-dsDNA 78,4%; a-Sm 15,7%; a-SM/RNP 25,5%; a-SSA 25,5%; a-SSB 21,6%; a-β2-GPI 23,5%; a-CL 13,7%.

7. táblázat HDL antioxidáns enzim aktivitás és gyulladásos markerek

Jellemzők	SLE-s beteg (n=51)	Kontroll (n=49)	p
PON1 paraoxonáz aktivitás (U/l)	118,01 ± 85,49	124,68 ± 102,96	0,857
PON1 arilészteráz aktivitás (U/l)	125,65 ± 26,87	148,35 ± 39,34	0,001
Paraoxonáz aktivitás/HDL	98,48 ± 69,92	76,20 ± 64,34	0,025
Arilészteráz aktivitás/HDL	109,05 ± 38,23	93,51 ± 33,30	0,036
Spec. HDL antioxidáns kapacitás (%)	132,42 ± 8,56	127,67 ± 4,88	0,002
Össz-HDL antioxidáns kapacitás (%)	165,82 ± 58,28	217,71 ± 54,36	<0,001
oxLDL (mg/l)	3,55 ± 4,19	2,63 ± 3,22	0,291
hsCRP (mg/l)	5,02 ± 6,64	1,68 ± 1,88	0,002
We (mm/óra)	24,38 ± 17,96	7,90 ± 5,93	<0,001
IL-6 (ng/l)	0,54 [0-3,25]	0 [0-0,17]	0,002
MCP -1 (ng/l)	473,24 [342,72-599,16]	309,72 [242,91-353,86]	<0,001
SAA (µg/l)	19017,07 ± 25899,25	2666,05 ± 2301,11	<0,001
SAA/HDL (µg/mmol)	18217,14 ± 29453,17	1692,24 ± 1459,34	<0,001

8. táblázat A HDL szubfrakciók megoszlása

HDL alosztályok	SLE-s beteg (n=51)	Kontroll (n=49)	p
nagy HDL (mmol/l) ^a	0,48 ± 0,26	0,62 ± 0,27	0,012
közepes HDL (mmol/l) ^b	0,60 ± 0,17	0,83 ± 0,18	<0,001
kis HDL (mmol/l) ^c	0,17 ± 0,06	0,26 ± 0,09	<0,001
kis HDL/nagy HDL	0,41 ± 0,19	0,53 ± 0,41	0,077
nagy HDL (%) ^a	36,57 ± 7,27	34,79 ± 8,02	0,268
közepes HDL (%) ^b	49,32 ± 5,42	49,50 ± 4,78	0,869
kis HDL (%) ^c	14,08 ± 3,94	15,69 ± 5,63	0,114

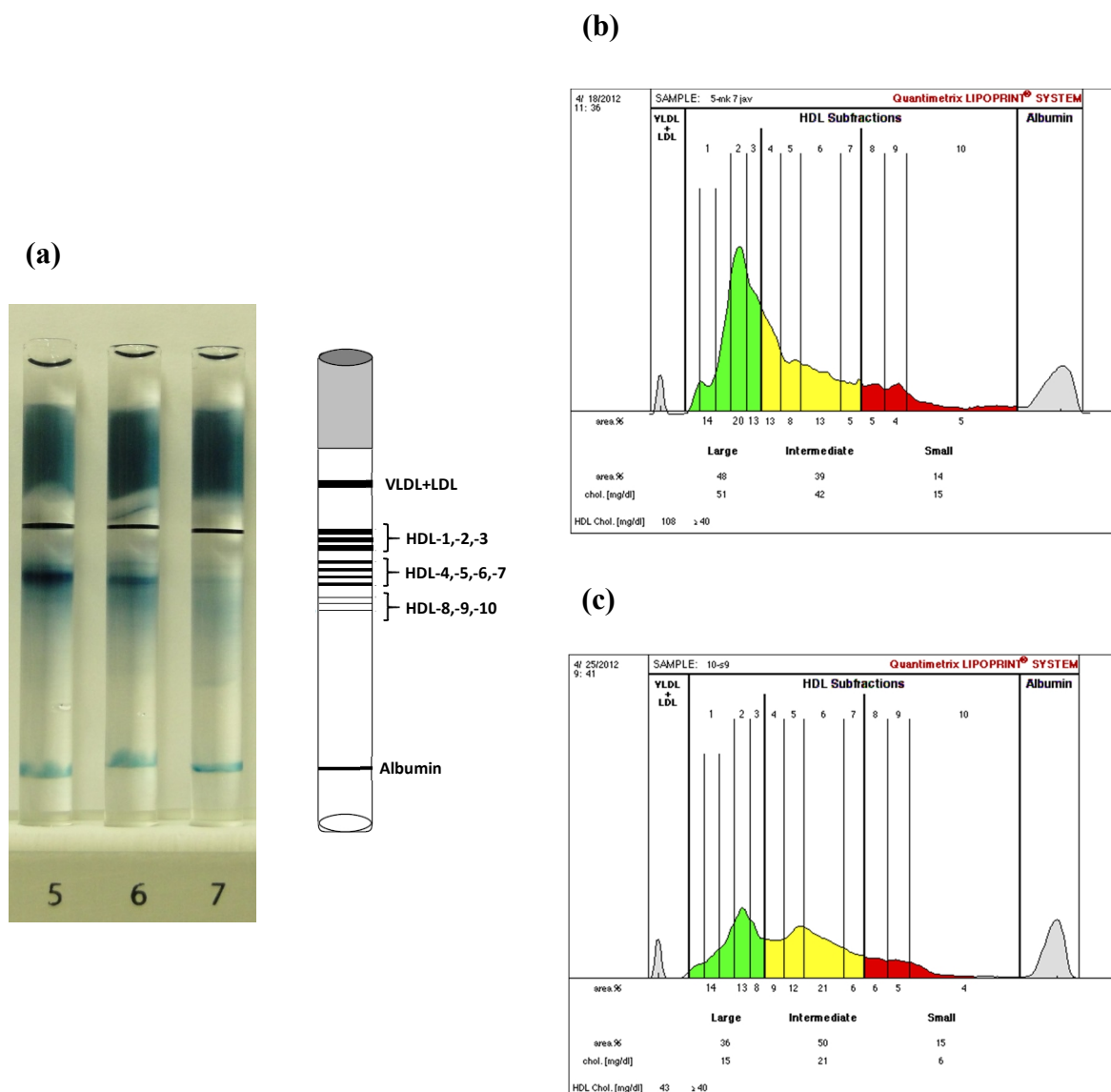
^a a HDL1, HDL2 és HDL3 összege; ^b a HDL4, HDL5, HDL6 és HDL7 összege; ^c a HDL8, HDL9 és HDL10 összege

5.4.3. HDL szubfrakciós analízis

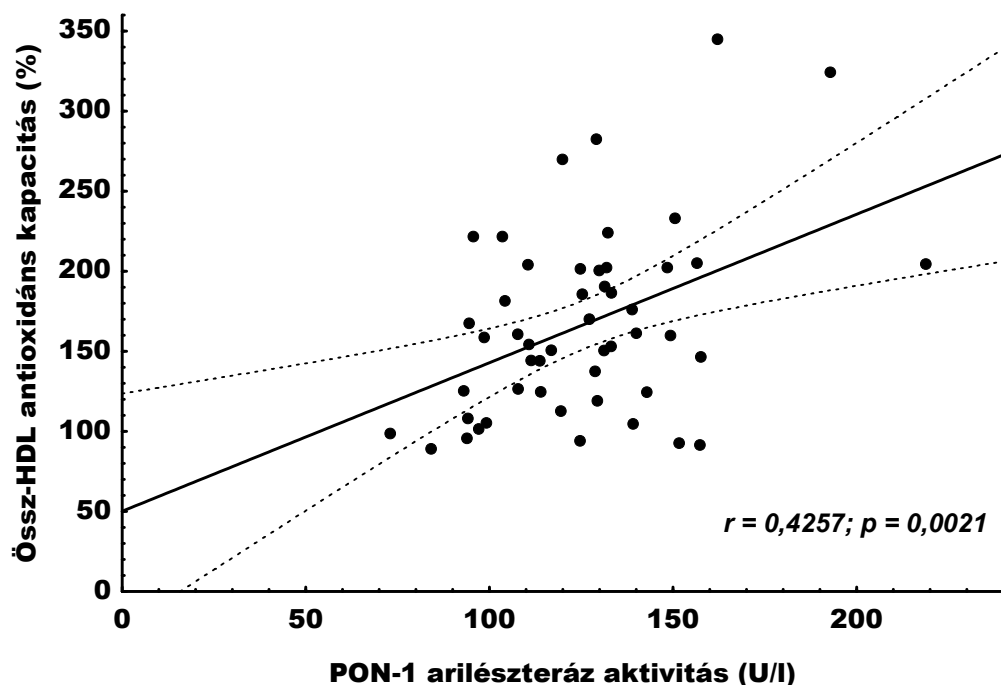
A betegek és kontrolljaik szérumainak Lipoprint analízise valamennyi HDL frakció

menyiségének szignifikáns csökkenését mutatta a betegek mintáiban (6. ábra, 8. táblázat). Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns különbséget a HDL szubfrakciók megoszlásában a csoportok között, bár az SLE-s betegekben a kis HDL/nagy HDL arány csökkentése csaknem elérte a szignifikancia szintet.

6. 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 denzitometriás képe, míg a **(c)** panelen egy SLE beteg reprezentatív denzitometriás képe látható.



7. ábra Az össz-HDL antioxidáns kapacitás és PON1 arilészteráz aktivitás korrelációja az SLE-s betegek csoportjában

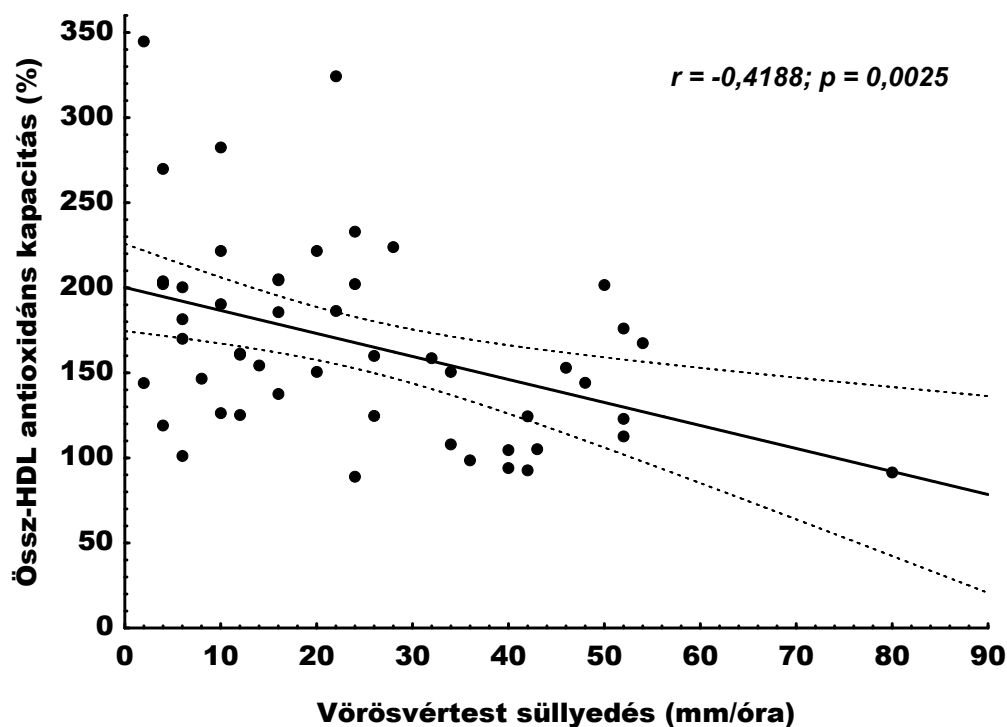


5.4.4. Korrelációk a gyulladás és az oxidatív stressz markerei között

Az SLE-s betegekben mind a HDL-C, mind az össz-HDL antioxidáns kapacitás pozitív korrelációt mutatott a PON1 arilészteráz (7. ábra) és paraoxonáz aktivitásával, míg a kontrolloknál nem volt ilyen kapcsolat. A specifikus-HDL antioxidáns kapacitás a betegek csoportjában a kis HDL/nagy HDL aránnyal korrelált ($r=0,3787$, $p=0,006$), míg a PON1 arilészteráz aktivitása valamennyi HDL szubpopulációval pozitív asszociációt mutatott, mely a legkifejezettebb a kis HDL-k esetében volt ($r=0,402$; $p=0,0038$). A betegekben a paraoxonáz aktivitás pozitívan korrelált a nagy HDL arányával ($r=0,3481$; $p=0,0123$) és koncentrációjával ($r=0,336$; $p=0,0159$), míg negatív kapcsolatban állt a közepes HDL aránnyal ($r=-0,3815$; $p=0,0057$). A kontrollokban a PON1 paraoxonáz és arilészteráz aktivitás csak a közepes HDL koncentrációjával korrelált.

A HDL-C és az össz-HDL antioxidáns kapacitás szignifikáns negatív kapcsolatban állt

8. ábra Az össz-HDL antioxidáns kapacitás és a vörösvértest süllyedés korrelációja az SLE-s betegek csoportjában



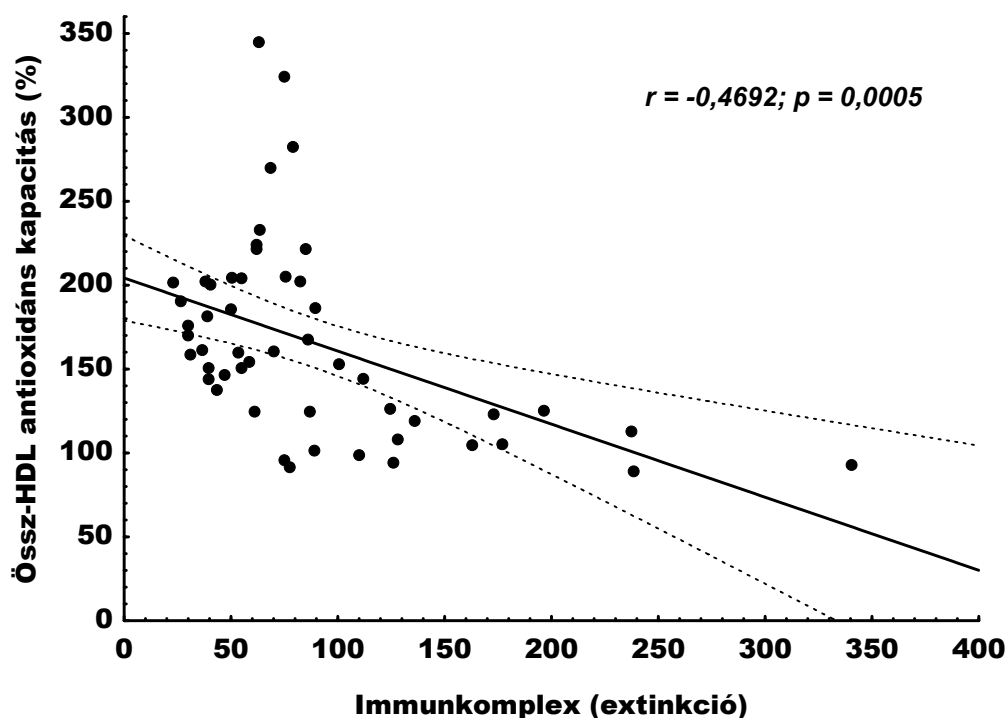
9. táblázat Az oxidatív stressz és a gyulladás markerei között megfigyelhető korrelációk SLE-s betegekben

	HDL-C		Össz-HDL antioxidáns kapacitás	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
PON1 arilészteráz aktivitás	0,378	< 0,01	0,425	< 0,01
PON1 paraoxonáz aktivitás	0,289	< 0,05	0,290	< 0,05
We	-0,489	< 0,0001	-0,419	< 0,01
hsCRP	-0,314	< 0,01	-0,347	< 0,001
IL-6	-0,489	< 0,0001	-0,500	< 0,0001
MCP-1	-0,467	< 0,0001	-0,413	< 0,0001
SAA	-0,288	< 0,01	-0,283	< 0,01

a vizsgált gyulladásos markerek szintjével, beleértve a We (8. ábra), hsCRP, IL-6, MCP-1, és SAA értékeit (9. táblázat). A PON1 arilészteráz aktivitása az a-SSB autoantitesttel ($r=-0,3306$; $p=0,019$), valamint az össz-HDL antioxidáns kapacitás az immun-komplex szinttel negatívan korrelált (9. ábra), de ennek ellenére sem találtunk kapcsolatot a betegség aktivitási index és ApoA-I, HDL-C illetve össz-HDL antioxidáns kapacitás között.

A SLEDAI pontszámmal értékelt betegségaktivitás valamennyi gyulladásos marker szintjével pozitívan korrelált, de a legerősebb kapcsolatban az SAA koncentrációval állt ($r=0,460$; $p<0,001$). Az SAA és a többi gyulladásos paraméter egymással szintén pozitívan asszociált volt, de ez legkifejezettebbnek a CRP és az IL-6 esetében mutatkozott ($r=0,664$; ill. $r=0,594$; $p<0,001$). A betegségaktivitás az oxLDL koncentrációval is kapcsolatot mutatott ($r=0,3472$; $p=0,0126$). A betegek oxLDL szintje emellett szignifikánsan korrelált az SAA

9. ábra Az össz-HDL antioxidáns kapacitás és immunkomplex szint korrelációja az SLE-s betegek csoportjában



($r=0,3128$; $p=0,0344$) és a fibrinogén koncentrációjával ($r=0,5125$; $p=0,0001$), valamint a We ($r=0,3023$; $p=0,0368$), hsCRP ($r=0,27253$; $p=0,0582$) és ApoB szintjeivel ($r=0,3124$; $p=0,0256$). A magasabb oxLDL szint csökkent nagy HDL ($r=-0,2712$; $p=0,0595$) és növekedett közepes HDL aránnyal párosult ($r=0,3938$; $p=0,0042$).

Hogy megtudjuk vajon az egyváltozós analízis során észlelt kapcsolatok függetlenek-e más laboratóriumi paraméterektől többszörös regressziós analízist végeztünk az össz-HDL antioxidáns kapacitást használva függő változóként. Az IL-6-t, hsCRP-t és MCP-1-t is tartalmazó modellben az össz-HDL antioxidáns kapacitást leginkább a PON1 arilészteráz aktivitás ($p<0,05$; $\beta=0,348$) és a vörösvértest süllyedés értéke ($p<0,01$; $\beta=0,61$) befolyásolta.

6. MEGBESZÉLÉS

A HDL antioxidáns kapacitásának a tudományos kutatásokban eddig alkalmazott vizsgálati módszerei sokszínűek, akárcsak az általuk nyert kutatási eredmények. A reakció típusa, az alkalmazott LDL:HDL arány, s főként az alkalmazott prooxidáns típusa és koncentrációja végletesen meghatározhatja az eredményként kapott értékeket. Egy-egy kutatócsoport általában egyetlen általa preferált módszerrel dolgozott, mely a tesztek standardizálásának hiányában egy másik kutatócsoport által alkalmazva esetenként lényegesen eltérő mérési eredményekhez és végkövetkeztetésekhez juttatta a felhasználókat [115]. Ezért láttuk szükségesnek a HDL antioxidáns kapacitás mérésére az *in vivo* oxidáció körülményeit jobban reprezentáló új módszer kifejlesztését és standardizálását.

Nagy mintaszámú vizsgálati csoportok analizálására is alkalmas tesztre volt szükségünk, ezért sejtmentes esszét fejlesztettünk és annak érdekében, hogy a HDL antioxidáns kapacitását pontosan jellemezhessük kinetikus mérési módot választottunk, mellyel az LDL oxidáció folyamata lépésről lépésre követhető. Az LDL oxidálására először *Balla és mtsai* alkalmaztak hemet [24]. Kutatásaik során igazolták a vörösvértestek lízise során felszabaduló hem, illetve az abból felszabaduló katalitikusan aktív vas szerepét az LDL oxidációban, s az ateromatózus plakkokban a katalitikusan aktív vas jelenlétét is kimutatták. Bizonyították továbbá, hogy a plakkból származó lipidek, illetve az oxidált LDL képes kiváltani a vörösvértestek lízisét és a szabad hemoglobin oxidációját, aterogén *circulus viciosus*-t indukálva [7,24-27]. Ezek alapján a hem fiziológiás oxidánsnak tekinthető, így ezt választottuk prooxidánsnak. A hem gyűrű felhasítására és a vas kiszabadítására pedig hidrogén-peroxidot alkalmaztuk, melyet a fagocita sejtek NADPH-dependens oxidáza is szintetizál, így megtalálható az érfali gyulladásos miliőben. A reakció során a hem mennyiségét monitoroztuk, mert annak abszorbanciája a látható fény spektrumában 405 nm-en követhető. A vizsgált HDL-

t a minta tisztaságának érdekében sűrűség-grádiens ultracentrifugálással különítettük el, mivel azok albumin tartalma így kevesebb, mint 1%, szemben például FPLC-vel előállított HDL-lel, mely összprotein tartalmának kb. 30%-ban tartalmaz albumint. Utóbbi antioxidáns hatását eltérő BSA koncentrációk alkalmazásával pedig már bizonyították az LDL oxidáció során [88].

A módszer optimalizálása során különböző hem és hidrogén-peroxid koncentrációk alkalmazásával kerestük a reakció ideális kinetikus görbéjét. Fontos szempont volt, hogy a propagációs fázis ne alakuljon ki se túl korán, se túl későn, mert az előbbi esetben a piHDL, utóbbiban pedig az erős antioxidáns tulajdonságú HDL vagy HDL szubpopuláció nem lesz megfelelően vizsgálható – egyik esetben az iniciációs, a másikban pedig a propagációs szakasz nem lesz megfelelően detektálható. A reakcióhoz optimálisnak az 5 $\mu\text{mol/l}$ -s hem és a 75 $\mu\text{mol/l}$ -s hidrogén-peroxid koncentráció bizonyult. A kísérlet ugyanakkor rávilágított arra, hogy a hidrogén-peroxid koncentráció növelése bár csökkenti a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges időt, de nincs szignifikáns khatással a HDL antioxidáns kapacitás értékekre. Ennek köszönhetően, ha azt a HDL antioxidáns tulajdonsága megkívánja, a H_2O_2 koncentráció igény szerint módosítható a reakcióelegyben anélkül, hogy az befolyásolná a végeredményt, aminek erős antioxidáns tulajdonsággal rendelkező HDL frakciók vizsgálata során vehetjük hasznát. Ezzel szemben a hem koncentrációjának növelése a reakció során nemcsak a $\Delta T_{V_{\text{max}}-t}$ rövidítette, hanem szignifikánsan csökkentette a HDL-t jellemző antioxidáns kapacitás értékeket is, így a hem mennyisége a reakcióelegyben nem módosítható. Ezt támasztja alá, hogy erős prooxidáns alkalmazása mellett egyetlen HDL szubpopuláció sem tudja megakadályozni az LDL oxidációját [88].

Tesztünk standardizálását a CLSI EP5-A2 guideline-jának elvárásai szerint végeztük. A megkívánt mintaszám mellett bizonyítottuk reprodukálhatóságát, linearitását, és a referencia módszernek tekintett konjugált dién méréssel való összevethetőségét, így az teljesítette a standardizáció követelményeit. Esszénk tudomásunk szerint az első standardizált módszer az

irodalomban a HDL antioxidáns kapacitásának meghatározására, mely a fiziológiás prooxidáns alkalmazásának köszönhetően a korábbiaknál jobban közelíti az in vivo HDL-LDL interakciót.

Módszerünkkel tesztelve egészséges önkéntesek 8 különböző sűrűségű HDL frakciójának antioxidáns kapacitását valamennyi védte az LDL-t az oxidációval szemben. E hatás a denzitás növekedésével párhuzamosan a következő sorrendben erősödött: 1. frakció (fr.) < 2. fr. < 3. fr. < 4. fr. < 5. fr. < 6. fr. < 7. fr. < 8. fr. Eredményeink egybevágóak *Kontush és mtsai* által leírtakkal, akik az LDL oxidációja során a különböző denzitású HDL alosztályok propagációs fázist meghosszabbító hatását a $HDL2b < HDL2a < HDL3a < HDL3b < HDL3c$ sorrendben, tehát azok sűrűségével arányosan, növekvőnek találták [88]. Az általunk vizsgált szubfrakciók minimum 6,12%-kal, maximum 94,12%-kal nyújtották meg az LDL oxidációjához szükséges időt, míg az említett munkacsoport eredményei a +15% -+99% intervallumban változtak [94]. A HDL szubfrakciók emelkedő koncentrációi növekvő antioxidáns képességgel rendelkeztek, melyet a linearitás vizsgálat során mi is detektáltunk.

A HDL szubfrakciók LDL oxidációt gátló képessége mellett a szubfrakciókra nem bontott HDL antioxidáns kapacitására is kíváncsiak voltunk, melyet egészséges önkéntesek csoportján tesztelve átlagosan 127,67%-nak mértünk, a legkisebb és legnagyobb értékek között 20%-os eltérést találtunk. Hasonló értékeket kaptak egy egészséges kontroll csoportban, ahol az LDL oxidáció során a HDL az iniciációs fázist átlagosan 35%-kal, míg a propagációs fázist 20%-kal nyújtotta meg [122]. Két DCF esszével végzett kísérletben az egészséges kontroll csoportban az ApoB mentes vérplazma körülbelül 30%-kal csökkentette az LDL oxidáció folyamata során keletkező fluoreszcens szignál mértékét, mely szintén párhuzamba állítható eredményeinkkel, bár a szerzők mindkét esetben kis mennyiségű piHDL jelenlétét is detektálták. [10,12].

Második vizsgálatunkban az SLE-ben megfigyelhető felgyorsult érlelmeszesedés háttérében meghúzódó tradicionális és betegség-specifikus rizikótényezőkre fókuszáltunk. A

hagyományos kockázati tényezők közül a korra, nemre és dohányzási szokásokra a kontroll csoport illesztésével korrigáltunk. Vizsgáltuk az elhízás, magasvérnyomás, emelkedett éhomi vércukor, valamint a diszlipidémia előfordulását az alanyokban. Valamennyi vizsgált paraméter - BMI, vérnyomás, éhomi vércukor szint, TG, TC, LDL-C, HDL-C, nonHDL-C, Lp(a) - értéke mindkét vizsgálati populációban a normál tartományban volt. Nem mutatkozott különbség beteg és kontroll között BMI és vérnyomás értékek tekintetében, így fiatal SLE-s kohorszunkban az obezitás és hipertónia még nem jelent meg a kardiovaszkuláris rizikó tényezők között. A korábbi kutatások eredményei arra utalnak, hogy SLE-ben a metabolikus szindróma, és komponensei közül főként az elhízás, a magasvérnyomás és a diszlipidémia gyakrabban fordulnak elő a betegek körében, mint egészséges kortársaikban [100]. A vizsgált populációk azonban ezekben a tanulmányokban a mienknél jóval idősebbek (38-50 év) voltak, betegségük hosszabb ideje állt fenn, és így kumulatív szteroid dózisuk is magasabb volt a kortikoszteroidok szisztémás mellékhatásainak (elhízás, inzulin rezisztencia, hipertónia) fokozott előfordulása mellett. SLE-s betegeink vércukor szintje is szignifikánsan magasabb volt egészséges társaikénál, melynek hátterében a szteroid terápia mellékhatását feltételezzük.

Pácienseink betegségaktivitása a SLEDAI pontszám alapján viszonylag magas volt. Ennek megfelelően lipoprotein profiljuk emelkedett triglicerid és csökkent HDL-C szinttel a főként az aktív szakra jellemző lupuszos mintát mutatott, miközben össz-koleszterin, LDL-C és Lp(a) szintjük nem tért el a kontrollétól [88,89]. Az SLE-ben megfigyelhető magasabb triglicerid szint a megnövekedett VLDL és kilomikron koncentrációnak köszönhető, melyet a kilomikron csökkent ütemű lipolízise és a kilomikron-maradék részecskék lassult eltávolítása magyaráz, s korábban ennek hátterében a triglicerideket hasító lipoprotein lipáz gyengült aktivitását igazolták. [123]. A csökkent LPL funkció kialakulásában egyaránt szerepet játszhat a TNF- α , IFN- γ , IL-1 és az a-LPL autoantitestek LPL gátló hatása – utóbbi az SLE-sek csoportjában 37,8%-ban volt jelen [124].

Az alacsony HDL-C szint független kardiovaszkuláris rizikófaktor, melyet mi sem hangsúlyoz jobban, minthogy míg az általános népességben a szívinfarktus illetve a halálozás kockázata 33%-kal alacsonyabb a legmagasabb HDL-C negyedben, mint a legalacsonyabban, addig a populáció alacsony LDL koncentrációjú (<1,8 mmol/l) alcsoportjában ez a rizikócsökkenés kétszer ekkora (65%) [1,2]. SLE-ben a HDL-C koncentráció csökkenését elsősorban a gyulladás tehető felelőssé, melyet alátámaszt, hogy hatékony antiinflammatorikus terápia mellett nemcsak a betegség tünetei, hanem a HDL szint is javul, gyakorlatilag normalizálódik [98,99]. Betegeink valamennyi vizsgált gyulladásos markere (We, CRP, IL-6, SAA, MCP-1) jelentősen emelkedett volt, és erős szignifikáns negatív korrelációban állt HDL-C koncentrációjukkal. Az ApoA-I mennyisége is kevesebb volt az SLE-sekben, mely arra utal, hogy az alacsony HDL-C szint részben a szisztémás gyulladás hatására csökkent ApoA-I koncentrációnak köszönhető, mivel emiatt az ABCA1 dependens koleszterin kiáramlás a perifériás sejtekből visszaesik, és így a HDL által szállított koleszterin mennyisége is kevesebb [125]. További HDL-C szint csökkenés forrása lehet a FC észteresítésének zavara, melyet a LCAT végez aktivátorának az ApoA-I-nek jelenlétében, s mely így kisebb HDL méret mellett kevésbé hatékony RCT-t eredményez [71].

Bár az LDL koleszterin populációs szinten igazolt kardiovaszkuláris rizikófaktor, mennyisége nem minden esetben különbözik a szív-érrendszeri megbetegedésben szenvedő és kontroll csoportokban [126]. Az SLE-s betegeknél észlelt felgyorsult érlemezés ellenére LDL-C szintjük szintén gyakran a normál tartományba esik és nem tér el egészséges társaikétól [9]. Az LDL-C szintje a mi vizsgálati csoportjainkban hasonló volt, a betegek ApoB koncentrációját mégis szignifikánsan emelkedettnek találtuk. Egyes epidemiológiai és klinikai tanulmányok szerint az ApoB a kardiovaszkuláris kockázatbecslésre alkalmasabb, mint az LDL-C. Míg az LDL-C és ApoB értékei jól korrelálnak a fiziológiás triglicerid szinttel rendelkezőkben, addig hiper-trigliceridémiában az ApoB szint lényegesen magasabb, mint az

LDL-C. ISZB-ben szenvedők körében folytatott tanulmányokban az emelkedett ApoB szint nagyobb plakk teherrel és a nem-kalcifikált plakkok nagyobb arányú előfordulásával társult [127]. Az ApoB-100 lerakódása az artériák falában az ateroszklerózis egyik kezdeti lépése, megelőzi a plakk képződést, és mennyisége a plakk progressziójával párhuzamosan nő. [128]. Inaktív SLE-s betegek bevonásával folytatott vizsgálatban az ApoB koncentráció a kor és a szisztolés vérnyomás mellett a pulzushullám terjedési sebesség független prediktorának bizonyult [129]. SLE-s betegek ApoB-100 epitopjaival szemben termelt autoantitestek koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb az egészségesekkel összehasonlítva, és tovább csökken a kardiovaszkuláris megbetegedés vagy szervkárosodás fennállása esetén. Ez arra utal, hogy károsult a sérült LDL részecskék antitest-mediált eltávolítása, aminek szerepe lehet az SLE vaszkuláris komplikációinak és a szervkárosodásoknak a kialakulásában [130]. Betegeink magasabb ApoB szintje tehát a normális LDL-C ellenére is jelzi az érlemezés talaján kialakuló kórképek várható gyakoribb előfordulását.

A HDL minőségének komplex értékelését az ApoA-I és SAA koncentráció, PON1 paraoxonáz és arilészteráz aktivitás, HDL antioxidáns kapacitás és a HDL szubpopulációk meghatározása révén végeztük. Az SLE-sekben a HDL fő strukturális fehérjéjének, az ApoA-I-nek mennyiségét a kontrollnál sokkal alacsonyabbnak, míg az akut fázis HDL (A-HDL) jellegzetes komponensének, az SAA-nak a mennyiségét jóval magasabbnak találtuk. Betegeinkben a SAA átlagos koncentrációja hétszerese, maximális koncentrációja tízszerese volt az egészségeseknek, míg az egységnyi HDL-C-re jutó SAA tartalmuk átlagosan tízszer, maximálisan tizennyolcszor volt magasabb. Mennyisége a kutatások szerint a gyulladást kiváltó stimulustól és a citokin aktivációs kaszkád résztvevőitől függ – termelésének fő induktorai az IL-1, TNF- α és az IL-6, szintje ezek legalább egyikével korrelál [131]. Esetünkben az IL-6 és SAA között igen erős korreláció volt megfigyelhető, így valószínűsíthető a szerepe a SAA termelés kiváltásában. Az akut fázis SAA (A-SAA) fokozza a szekretoros foszfolipáz A-2

aktivitását, miközben az A-SAA-HDL 2-3-szor fogékonyabb a hidrolízisre, s ezáltal akár 30%-kal is csökken a HDL-C szintje. Ez a jelenség is hozzájárulhat az SLE-s betegeinknél észlelt alacsony HDL-C koncentráció kialakulásához. A szabad A-SAA proinflammatorikus citokinek expresszióját váltja ki, ugyanakkor a HDL csökkenti az A-SAA biológiai hozzáférhetőségét, gátolja az endotél sejtekre kifejtett gyulladások keltő hatását [132]. Kardiovaszkuláris megbetegedésben szenvedők HDL-ének proteomikai vizsgálata a hordozott SAA mennyiségének jelentős növekedését fedte fel. Az SAA szintjét az SLE-s betegek, illetve más szisztémás autoimmun megbetegedésben szenvedők és végstádiumú vesebetegek vérében is emelkedettnek találták, mRNS-ét RA-s betegek számos különböző szövetmintájában kimutatták.

Az akut fázis fehérjék közül az IL-6 stimulust jelent az SAA expresszáldására, ami azután pozitív visszacsatolásként fokozza a termelődését. STEMI-n átesett betegekben - a mi SLE-s populációnkhoz hasonlóan - szignifikánsan emelkedett volt a CRP, IL-6 és SAA mennyisége, és a SAA koncentrációja korrelált a HDL csökkent antioxidáns és koleszterin efflux kapacitásával [126]. Humán koronária endotélsejteken igazolták, hogy a MCP-1 gátolja a HDL sejtekhez kötődését, internalizációját, és a koleszterin kiáramlást, így ennek a folyamatnak szerepe lehet a koronáriabetegek érlemezésének kialakulásában [133]. SLE-ben a MCP-1 megkülönböztetett szereppel bír: nemcsak szérumszintje, hanem vizelettel ürülő mennyisége is megnövekedett, és jól korrelál a SLEDAI-val, valamint a lupus nefritisz aktivitásával [134]. Egészséges populációban prospektív vizsgálat során a keringő immunkomplex (IC) szintje direkt kapcsolatban állt az AMI kialakulásával, így az érlemezés kockázati tényezőjének bizonyult [135]. SLE-s betegeink IC koncentrációja és össz-HDL antioxidáns kapacitása között erős negatív korrelációt igazoltunk, ami az IC betegség-specifikus kardiovaszkuláris rizikó tényező szerepére utal.

Az új, standardizált módszerünkkel végzett HDL antioxidáns kapacitás vizsgálat során valamennyi HDL minta védte az LDL-t az oxidációtól, így egyetlen esetben sem detektáltunk proinflammatorikus HDL-t. Meglepő módon a betegek specifikus HDL antioxidáns kapacitás értéke enyhén, de szignifikánsan emelkedett volt, miközben össz-HDL antioxidáns kapacitásukat számottevően csökkentnek találtuk. Eredményeink a betegek megváltozott RCT-jára utalhatnak, melynek következményeként HDL-jük koleszterin tartalma csökkent, és így a részecskék fehérje/koleszterin aránya emelkedett, amit magasabb ApoA-I/HDL-C arányuk is mutat. Hasonló képet kaptunk a PON1 enzim arilészteráz aktivitásának vizsgálata kapcsán, mely a betegek szérumában jóval alacsonyabb, mégis egységnyi HDL-C-re vonatkoztatva meghaladja a kontrollét. Feltételezésünk szerint a kissé magasabb enzim koncentráció a reakcióelegyben nagyobb antioxidáns aktivitással jár ugyan, az alacsony HDL-C koncentráció miatt mégsem jelent nagyobb antioxidáns védelmet a szervezet számára. Vizsgálatunkban a PON1 aktivitását határoztuk meg, nem mértük azonban az enzimfehérje mennyiségét, így a betegeknél észlelt redukált PON1 aktivitás okára csak következtetni tudunk. Ennek hátterében a fehérje koncentrációjának csökkenése mellett aktivitásának gyengülését is feltételezzük, melyben szerepe lehet az enzimet stabilizáló ApoA-I szint csökkenésének, valamint a PON1 oxidatív módosulásának is [71,125]. Bár a PON1 fenotípusok megoszlásában nem találtunk különbséget vizsgálati csoportjaink között, a magasabb aktivitást mutató B allél – hasonlóan munkacsoportunk korábbi eredményeihez – kevésbé volt gyakori a betegek körében, mint kontrolljaikban [66,106]. Több genom szintű asszociációs tanulmány kereste a PON gén SNP (single nucleotide polymorphism) variánsai és a major kardiovaszkuláris események között fennálló kapcsolatot, azonban ilyet nem sikerült igazolni, ugyanakkor megerősítették a korábbi vizsgálatok eredményeit, miszerint a PON1 aktivitása fontos tényezője a koronária-betegség kialakulásának, míg a genotípusa nem [136]. A PON1 csökkent paraoxonáz aktivitását munkacsoportunk már korábban is detektálta SLE-sek és Sjögren-szindrómások csoportjában

[66,106]. Korábban a kissé idősebb, túlsúlyos, inaktív betegségű SLE-sek arilészteráz aktivitása és CRP-je nem különbözött az egészségesekétől, s lipidprofiljuk sem mutatott lupusz mintázatot, ellenben emelkedett LDL-C szinttel rendelkeztek. Paraoxonáz aktivitásuk az aterotrombotikus események előfordulásán kívül más vizsgált paraméterrel (SLEDAI, a-PL, a-oxLDL, CRP) nem korrelált. Jelenlegi fiatalabb, aktivitási tüneteket mutató kohorszunkban a fentiek ellenkezőjét tapasztaltuk, azonban a CRP mindkét vizsgálatban negatívan korrelált a PON1 arilészteráz aktivitásával, mely a gyulladás HDL antioxidáns funkcióra gyakorolt káros hatását támasztja alá. A különbségek ugyanakkor felhívják figyelmünket arra, hogy az érrelmeszesedés rizikótényezőinek szerepe a betegség lefolyása során annak aktivitásától függően változik: inaktív betegségszakaszban a tradicionális, aktív periódusban a betegség-specifikus, gyulladással összefüggő faktorok dominálnak.

Megelőzően számos tanulmány igazolta az oxLDL koncentráció korrelációját a koronária-betegség jelenlétével és súlyosságával, a szívelégtelenség, perifériás érbetegség, továbbá a magasvérnyomás, elhízás, inzulin rezisztencia, metabolikus szindróma és cukorbetegség előfordulásával [137]. Az oxLDL szintje a hagyományos rizikótényezőktől függetlenül a jövőbeni kardiovaszkuláris esemény magasabb kockázatával asszociált. Jelenléte egyértelmű jelzője a kezdődő ateroszklerózisnak, melynek hátterét a HDL ineffektív antioxidáns védelme biztosítja. Vizsgálati csoportjaink oxLDL szintje között nem találtunk szignifikáns eltérést, mely arra utal, hogy betegeink HDL-e még bizonyos fokú védelmet biztosít az LDL oxidációjával szemben. Ez összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy egyetlen beteg HDL-e sem proinflammatorikus tulajdonságú, a csökkent antioxidáns védelem elsődleges forrása alacsony HDL-C szintjük. A gyulladásos markerek (SAA, We, CRP) és SLEDAI korrelációja az oxLDL mennyiségével azonban mutatja, hogy a betegség fellángolásaitól szenvedők nagyobb oxidatív terhelésnek vannak kitéve.

Gyulladással járó betegségek sorában mutatták már ki a HDL csökkent antioxidáns

aktivitását. STEMI-n frissen átesett betegekben a HDL méret és partikulumszám csökkenése mellett LDL oxidációval szembeni védő hatása is romlik [85]. Crohn-betegekben az akut fellángolás során nemcsak alacsonyabb HDL-C koncentráció, de redukált HDL antioxidáns aktivitás is jelentkezik, miközben a betegek cIMT-je szignifikánsan meghaladja az egészséges kontrollét [86]. *McMahon és mtsai* több tanulmányban is vizsgálták SLE-sek csoportjaiban a piHDL előfordulását és a HDL antioxidáns hatását. A piHDL előfordulási gyakorisága az SLE-s betegekben 29%, 45% illetve 48,2% (plakk+: 86,7%; plakk-: 40,7%) volt [10-12]. A HDL gyulladásos indexe egészségesekben 0,68, SLE-ben 1,02 értéket mutatott, a piHDL azonban a We-n és oxLDL-en kívül nem volt asszociált más gyulladásos marker, sem a SLEDAI, ApoA-I és PON1 aktivitás értékeivel. A vizsgált tényezők közül plakk-asszociáltnak a piHDL-t, hipertóniát, kort, diszlipidémiát, kevert rasszt, leptint, homociszteint és az anamnesztikus diabeteszt (OR 61,8!) találták. Eredményeinket a fentiekkel összevetve elmondható, hogy SLE-ben mi is a HDL antioxidáns kapacitás csökkenését tapasztaltuk, azonban ez nem érte el a prooxidáns aktivitás szintjét, viszont pozitívan korrelált a PON1 arilészteráz aktivitásával és negatívan a gyulladásos markerek és betegségaktivitás szintjével. A különbség forrása lehet az eltérő vizsgáló módszer, de az eltérő vizsgálati populációk is: *McMahon és mtsai* az ApoB mentes vérplazma antioxidáns kapacitását mérték, betegek idősebbek (40-55 év) és alacsonyabb betegségaktivitásúak voltak, a kontrollhoz hasonló lipoprotein koncentrációkkal. Bár vizsgálataink során piHDL-t nem detektáltunk, a lupuszos betegek össz-HDL antioxidáns aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt, és értékét elsősorban a PON1 arilészteráz aktivitása, valamint a We értéke határozta meg, miközben a többi gyulladásos paraméterrel is szorosan korrelált. Tanulmányunkban tehát elsőként mutattunk ki komplex inverz kapcsolatot a gyulladásos markerek valamint a HDL antioxidáns kapacitás és PON1 aktivitás között fiatal aktivitási tüneteket mutató SLE-s betegek csoportjában. Megfigyeléseink a PON1 aktivitás és a gyulladás szerepének jelentőségét hangsúlyozzák az SLE-s betegek HDL antioxidáns

státusának alakulásában. Arra utalnak, hogy SLE-ben a gyulladás jelentős betegség-specifikus kardiovaszkuláris rizikóval jár, mely főként a fiatal, aktivitási tünetektől szenvedő betegcsoportot érinti.

SLE-s csoportunkban valamennyi HDL szubpopuláció mennyiségének egyöntetű, szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, mely korrelált az alacsonyabb össz-HDL antioxidáns kapacitással és arilészteráz aktivitással. Az arilészteráz aktivitás a legerősebb kapcsolatban a kis HDL arányával állt, ami jól mutatja a HDL szubfrakciókon belül a PON1 elsődleges lokalizációját. Ugyanerre utal a specifikus-HDL antioxidáns kapacitás asszociációja a kis HDL/nagy HDL arányával, hangsúlyozva a kisméretű HDL frakciók szerepét az LDL oxidációjával szembeni védelemben. Elsőként mutattuk ki egyidejűleg az oxLDL direkt és a PON1 aktivitás inverz kapcsolatát a csökkent nagy és emelkedett közepes HDL aránnyal SLE-sekben. Az oxLDL korrelációja a fenti szubpopulációkkal szintén a betegek kevésbé hatékony RCT-jára utal, melyben a gyulladás hatására csökkent paraoxonáz aktivitás miatt romló antioxidáns védelemnek is szerepe lehet. Egy korábbi tanulmányban szintén SLE-s betegek HDL frakcióit vizsgálták, és nagyobb átlagos HDL méret mellett a kis HDL csökkent arányát észlelték [138]. Ezzel szemben cukorbeteg nőknél a kis α_3 partikulumok emelkedett mennyisége pozitívan, míg a csökkent mennyiségű nagy HDL negatívan korrelált a betegek magasabb IL-6 koncentrációjával [139]. Hasonló jelenséget több különböző betegcsoportnál is leírtak. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az A-SAA-HDL a denz HDL3 frakció egyik alkotója, de mérete nagyobb az egészséges HDL3-énál, úgymond „belóg” a HDL2 mérettartományába. Így a HDL szubpopulációk elkülönítésére alkalmazott módszer (sűrűség vagy méret szerinti szeparálás) függvényében ez az akut fázis HDL hol a denz, hol a nagyobb méretű frakciók tartományába kerül bemérésre, s így látszólag ellentmondó eredményekhez vezet. Napjainkban igyekeznek megállapítani a HDL szubfrakciók meghatározásának klinikai hasznosságát a koronáriabetegek kockázatbecslésében. A metaanalízis azt mutatta, hogy a

HDL3 a koronária-betegség kialakulásának 24%-kal alacsonyabb kockázatával jár együtt, míg a HDL2 nem mutatott hasonló összefüggést. A TRIUMPH illetve IHCS tanulmányok 36%-kal illetve 35%-kal alacsonyabb mortalitási és AMI kockázatot igazoltak a középső HDL3 ötödbe tartozók számára szemben a legalacsonyabb ötödbe tartozók rizikójával. Ugyanakkor egyik vizsgálat sem talált összefüggést a HDL2 és össz-HDL koncentráció valamint a fenti mortalitási és morbiditási adatok között. A Gofman Livermore Kohorsz - mely a leghosszabb ideje (53 éve) folyó HDL szubfrakciók és kardiovaszkuláris mortalitás kapcsolatát kutató vizsgálat - azt mutatta, hogy a legalacsonyabb HDL3 koncentrációjú csoportnak szignifikánsan alacsonyabb az élettartama a többivel összehasonlítva, akiknek így 70%-kal nagyobb az esélyük a 85. életévük betöltésére [140].

Az érlemeszesedés rizikótényezőinek meghatározása azt a célt szolgálja, hogy hatékonyabb kockázatbecsléssel azonosítsuk a veszélyeztetett csoportokat, és megfelelő stratégiát dolgozzunk ki a kardiovaszkuláris események előfordulásának csökkentésére. A szisztémás autoimmun megbetegedésben szenvedők esetében a gyulladás jelentős betegség-specifikus kardiovaszkuláris kockázattal jár, melyre a gondozó orvosoknak külön figyelemmel kell lenni. A hagyományosan alkalmazott LDL és triglicerid szint csökkentő szerek kisebb vagy nagyobb mértékű HDL-C szint emelő hatással is rendelkeznek (1-30%), és ígéretes kísérletek folynak ApoA-I mimetikus peptidek terápiás alkalmazásával is. Az érlemeszesedés progressziójának lassítása azonban nem lehet sikeres a fennálló gyulladás szoros kontrollja nélkül, melyet szerencsére egyre szélesedő gyógyszeres paletta támogat. Az egyes készítmények gyulladáscsökkentő potenciálja mellett lipoproteinekre kifejtett hatásuk sem egységes, s ez is szempont lehet a gyógyszer megválasztásánál. Eredményeink arra is rámutatnak, hogy más megközelítést igényelnek a fiatal, aktív betegség lefolyású páciensek, akiknél a fennálló gyulladás és a lupuszos mintát követő diszlipidémia áll a középpontban, mint az idősebb, túlsúlyos, többnyire menopauza után levő, hagyományos diszlipidémia mintázatot

mutató betegek. Ezért a hagyományos lipoprotein osztályok vizsgálata mellett a HDL minőségét jellemző új biomarkerek, azaz a HDL antioxidáns kapacitás, a HDL szubpopulációk megoszlása és a PON1 aktivitás fontos kiegészítő információkkal szolgálhatnak az SLE-s betegek kardiovaszkuláris rizikójára vonatkozóan, és a gyulladáscsökkentő kezelés hatékonyságának követésében is szerepük lehet. Az időben megkezdett és személyre szabott kezelés pedig tovább javíthatja az SLE-s betegek morbiditási és mortalitási mutatóit.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A HDL antioxidáns tulajdonságának mérésére számos nem standardizált módszer létezik, de a használatukkal nyert eredmények a reakciók eltérései miatt gyakran ellentmondásosak. Az általunk kidolgozott módszer a HDL antioxidáns kapacitás mérése a hem indukált LDL oxidáció során alkalmas nagyszámú, nagymértékben eltérő antioxidáns aktivitású HDL minta vizsgálatára, beleértve az egészséges és diszfunkcionális HDL-t valamint a HDL szubpopulációkat is. A fiziológias prooxidáns alkalmazásának köszönhetően a teszt körülményei a korábbiaknál jobban hasonlítanak az in vivo lejátszódó folyamatra, és a módszer standardizálása miatt az eredmények jól reprodukálhatók.

Vizsgáltuk továbbá SLE-s betegek megnövekedett kardiovaszkuláris mortalitásának hagyományos és betegség-specifikus rizikófaktorait. Érdeklődésünk középpontjában a gyulladás és a HDL antioxidáns kapacitása, illetve a HDL szubpopulációk között fennálló kapcsolat állt. Fiatal SLE-s betegeink esetében a betegség-specifikus rizikótényezők jelenléte dominált. Valamennyi vizsgált gyulladásos marker (We, CRP, SAA, IL-6, MCP-1, IC) szintje és a betegségaktivitás (SLEDAI) is emelkedett volt, és kapcsolatot mutatott a magasabb oxLDL szinttel, a csökkent össz-HDL antioxidáns kapacitással illetve HDL-C szinttel, mely egyaránt érintette valamennyi HDL frakciót. A HDL antioxidáns kapacitása és a kis denz HDL koncentrációja pozitívan korrelált a HDL fő antioxidáns enzimének, a PON1-nek arilészteráz aktivitásával. Az össz-HDL antioxidáns kapacitás független prediktorai az arilészteráz aktivitás és a We voltak. Eredményeink arra utalnak, hogy SLE-ben a szisztémás gyulladás a HDL mennyiségének csökkentése mellett antioxidáns funkcióját is rontja, gyengítve antiaterogén hatását, és ezáltal hozzájárul az SLE-s betegek fokozott kardiovaszkuláris rizikójához. Így a HDL antioxidáns kapacitás, a szubpopulációk megoszlása és a PON1 aktivitás a betegek kardiovaszkuláris rizikóbecslését pontosító új biomarkerekként szolgálhatnak.

8. SUMMARY

There are several non-standardized tests for the measurement of HDL antioxidant property, but because of alterations of reactions the results gained by their use are diverse, sometimes contradictory. The method, we developed for testing HDL antioxidant capacity during the hem-induced LDL oxidation is suitable for evaluation of a number of HDL samples with highly different antioxidant activity, healthy and dysfunctional HDLs and their subpopulations included. With the use of hemin, a physiological pro-oxidant, the test conditions approximate better *in vivo* reactions than previous techniques, and since our method is standardized the results are reproducible.

Henceforth we studied the traditional and disease specific risk factors of increased cardiovascular mortality in patients with SLE. The centre of our interest was the relationship between inflammation and HDL antioxidant capacity and HDL subpopulations. In our young patients with SLE, presence of disease specific risk agents was predominant. Concentrations of all the examined disease markers and disease activity (SLEDAI) were elevated and were related with higher oxLDL level, decreased total HDL antioxidant capacity and HDL-C level, the latter affected equally all HDL subfractions. HDL antioxidant capacity and concentration of small dens HDL correlated positively with arylesterase activity of PON1, main antioxidant enzyme of HDL. Independent predictors of total-HDL antioxidant capacity were PON1 arylesterase activity and erythrocyte sedimentation rate. Our results suggest that systemic inflammation present in SLE not just decrease the amount of HDL, but damages its antioxidant function, impairing its anti-atherogenic effect, thus contribute to the elevated cardiovascular risk of patients. Therefore HDL antioxidant capacity, subpopulation distribution and PON1 activity can serve as new biomarkers of more specified cardiovascular risk estimation in patients with SLE.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Hivatkozott közlemények:

- [1] Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, and Kannel WB: **Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study.** *JAMA* 1986, **256**:2835-2838.
- [2] Acharjee S, Boden WE, Hartigan PM, Teo KK, Maron DJ, Sedlis SP, Kostuk W, Spertus JA, Dada M, Chaitman BR, Mancini GB, Weintraub WS: **Low levels of high-density lipoprotein cholesterol and increased risk of cardiovascular events in stable ischemic heart disease patients: A post-hoc analysis from the COURAGE Trial (Clinical Outcomes Utilizing Revascularization and Aggressive Drug Evaluation).** *J Am Coll Cardiol* 2013, **62**:1826-1833.
- [3] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK: **Foam cells in atherosclerosis.** *Clin Chim Acta* 2013, **424**:245-252.
- [4] Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM: **Antiinflammatory properties of HDL.** *Circ Res* 2004, **95**:764-772.
- [5] Rosenson RS, Brewer HB Jr, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, Kontush A, Tall AR, Webb NR: **Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease.** *Nat Rev Cardiol* 2016, **13**:48-60.
- [6] Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, and Fogelman AM: **A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids.** *J Lipid Res* 2001, **42**:1308-1317.
- [7] Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklósi J, Méhes G, Csonka T, Smith A, Vercellotti GM, Balla G, Balla J: **Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**:1347-1353.
- [8] Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM: **Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment.** *Circulation* 2003, **108**:2751-2756.

- [9] de Leeuw K, Smit AJ, de Groot E, van Roon AM, Kallenberg CG, Bijl M: **Longitudinal study on premature atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus.** *Atherosclerosis* 2009, **206**:546-550.
- [10] McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, Badsha H, Kalunian K, Charles C, Navab M, Fogelman AM, Hahn BH: **Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:2541-2549.
- [11] McMahon M, Grossman J, Skaggs B, Fitzgerald J, Sahakian L, Ragavendra N, Charles-Schoeman C, Watson K, Wong WK, Volkmann E, Chen W, Gorn A, Karpouzas G, Weisman M, Wallace DJ, Hahn BH: **Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**:2428-2437.
- [12] McMahon M, Skaggs BJ, Grossman JM, Sahakian L, Fitzgerald J, Wong WK, Lourenco EV, Ragavendra N, Charles-Schoeman C, Gorn A, Karpouzas GA, Taylor MB, Watson KE, Weisman MH, Wallace DJ, Hahn BH: **A panel of biomarkers is associated with increased risk of the presence and progression of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**:130-139.
- [13] Kontush A, Chapman MJ: **Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis.** *Pharmacol Rev* 2006, **58**:342-374.
- [14] Birner-Gruenberger R, Schittmayer M, Holzer M, Marsche G: **Review: Understanding high-density lipoprotein function in disease: Recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology.** *Progress in Lipid Research* 2014, **56**:36-46.
- [15] Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, Krauss RM, Otvos JD, Remaley AT, Schaefer EJ: **HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events.** *Clin Chem* 2011, **57**:392-410.
- [16] Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C and Lindahl M: **Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Proteomics* 2005, **5**:1431-1445.
- [17] Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, Kluckman KD, Brunham LR, Mulya A, Gebre AK,

Coutinho JM, Colvin PL, Smith TL, Hayden MR, Maeda N, Parks JS: **Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I.** *J Clin Invest* 2005, **115**:1333-1342.

[18] Clay MA, Newnham HH, Forte TM and Barter PJ: **Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL.** *Biochim Biophys Acta* 1992, **1124**:52-58.

[19] Marques-Vidal P, Jauhiainen M, Metso J and Ehnholm C: **Transformation of high density lipoprotein 2 particles by hepatic lipase and phospholipid transfer protein.** *Atherosclerosis* 1997, **133**:87-95.

[20] Therond P, Abella A, Laurent D, Couturier M, Chalas J, Legrand A, Lindenbaum A: **In vitro study of the cytotoxicity of isolated oxidized lipid low density lipoprotein fractions in human endothelial cells: relationship with the glutathione status and cell morphology.** *Free Radic Biol Med* 2000, **28**:585-596.

[21] Carr AC, McCall MR, Frei B: **Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**:1716-1723.

[22] Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E: **Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**:2100-2105.

[23] Garner B, Witting PK, Waldeck A R, Christison JK, Raftery M, and Stocker R: **Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol.** *J Biol Chem* 1998, **273**:6080-6087.

[24] Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM: **Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury.** *Arterioscler Thromb* 1991, **11**:1700-1711.

[25] Ishikawa K, Navab M, Lusis AJ: **Vasculitis, atherosclerosis, and altered HDL composition in heme-oxygenase-1-knockout mice.** *Int J Hypertens* 2012, **2012**:948203.

[26] Rajapurkar MM, Shah SV, Lele SS, Hegde UN, Lensing SY, Gohel K, Mukhopadhyay B,

Gang S, Eigenbrodt ML: **Association of catalytic iron with cardiovascular disease.** *Am J Cardiol* 2012, **109**:438-442.

[27] Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, Halliwell B: **Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions.** *Biochem J* 1992, **286**:901-905.

[28] Pirillo A, Norata GD, Catapano AL: **LOX-1, oxLDL, and atherosclerosis.** *Mediat Inflamm* 2013, **2013**:152786.

[29] Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Davoli A, Campagnola M, Contessi GB, Pastorino AM, Lo Cascio V: **Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells.** *Free Radic Biol Med* 1997, **22**:117-127.

[30] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ: **Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice.** *Mol Cell* 1998, **2**:275-281.

[31] Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T: **The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide.** *J Biol Chem* 2001, **276**:13750-13755.

[32] Ghosh S, Zhao B, Bie J, Song J: **Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis.** *Vasc Pharmacol* 2010, **52**:1-10.

[33] Ramji DP, Davies TS: **Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2015, **26**:673-685.

[34] Park YM, Drazba JA, Vasanji A, Egelhoff T, Febbraio M, Silverstein RL: **Oxidized LDL/CD36 interaction induces loss of cell polarity and inhibits macrophage locomotion.** *Mol Biol Cell* 2012, **23**:3057-3068.

[35] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P: **Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.** *J Clin Invest* 1994, **94**:2493-2503.

[36] Yan P, Xia C, Duan C, Li S, Mei Z: **Biological characteristics of foam cell formation in smooth muscle cells derived from bone marrow stem cells.** *Int J Biol Sci* 2011, **7**:937-946.

- [37] Rader DJ: **Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies.** *J Clin Invest* 2006, **116**:3090-3100.
- [38] Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F and Tall AR: **LXR induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**:1310-1316.
- [39] Rosenblat M, Karry R and Aviram M: **Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes.** *Atherosclerosis* 2006, **187**:74-81.
- [40] Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R and La Du BN: **Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities.** *J Lipid Res* 2005, **46**:1239-1247.
- [41] Mackness MI, Arrol S and Durrington PN: **Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein.** *FEBS Lett* 1991, **286**:152-154.
- [42] Mackness MI, Arrol S, Mackness B and Durrington PN: **Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation.** *Lancet* 1997, **349**:851-852.
- [43] Smolen A, Eckerson HW, Gan KN, Hailat N, La Du BN: **Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase.** *Drug Metab Dispos* 1991, **19**:107-112.
- [44] Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ: **Unraveling the complexities of the HDL lipidome.** *J Lipid Res* 2013, **54**:2950-2963.
- [45] Witting PK, Song C, Hsu K, Hua S, Parry SN, Geczy C, Freedman SB: **The acute-phase protein serum amyloid A induces endothelial dysfunction that is inhibited by high-density lipoprotein.** *Free Radic Biol Med* 2011, **51**:1390-1398.
- [46] Tölle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, Levkau B, van der Giet M, Nofer J-R: **HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, **28**:1542-1548.
- [47] Poti F, Simoni M, Nofer JR: **Atheroprotective role of high-density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine-1-phosphate (S1P).** *Cardiovasc Res* 2014, **103**:395-404.

- [48] Suc I, Escargueil-Blanc I, Trolly M, Salvayre R, Nègre-Salvayre A: **HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, **17**:2158-2166.
- [49] Sugano M, Tsuchida K, Makino N: **High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **272**:872-876.
- [50] Nofer J-R, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Gödecke A, Ishii I, Kleuser B, Schäfers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B: **HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3.** *J Clin Invest* 2004, **113**:569-581.
- [51] Norata GD, Callegari E, Inoue H, Catapano AL: **HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, **24**:871-877.
- [52] Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA: **High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C.** *J Clin Invest* 1999, **103**:219-227.
- [53] Nofer JR, van Eck M: **HDL scavenger receptor class B type I and platelet function.** *Curr Opin Lipidol* 2011, **22**:277-282.
- [54] Bowry VW, Stanley KK, and Stocker R: **High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**:10316-10320.
- [55] Nakajima T, Origuchi N, Matsunaga T, Kawai S, Hokari S, Nakamura H, Inoue I, Katayama S, Nagata A, Komoda T: **Localization of oxidized HDL in atheromatous plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cells.** *Ann Clin Biochem* 2000, **37**:179-186.
- [56] Marsche G, Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, and Malle E: **Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I, impairs high density lipoprotein-dependent selective lipid uptake and reverse cholesterol transport.** *J Biol Chem* 2002, **277**:32172-32179.

- [57] Matsunaga T, Nakajima T, Sonoda M, Sonoda M, Koyama I, Kawai S, Inoue I, Katayama S, Hirano K, Hokari S, Komoda T: **Modulation of reactive oxygen species in endothelial cells by peroxynitrite-treated lipoproteins.** *J Biochem* 2001, **130**:285-293.
- [58] Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW: **Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor.** *J Biol Chem* 2001, **276**:24473-24481.
- [59] Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, Green PS, McDonald TO, Brunzell J, Chait A, Oram JF, O'brien K, Geary RL, Heinecke JW: **Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species.** *J Biol Chem* 2004, **279**:42977-42983.
- [60] Artl A, Marsche G, Lestavel S, Sattler W, Malle E: **Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**:763-772.
- [61] Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ: **Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes.** *J Exp Med* 1994, **180**:203–209.
- [62] Zewinger S, Drechsler C, Kleber ME, Dressel A, Riffel J, Triem S, Lehmann M, Kopecky C, Säemann MD, Lepper PM, Silbernagel G, Scharnagl H, Ritsch A, Thorand B, de las Heras Gala T, Wagenpfeil S, Koenig W, Peters A, Laufs U, Wanner C, Fliser D, Speer T, März W: **Serum amyloid A: high-density lipoproteins interaction and cardiovascular risk.** *Eur Heart J* 2015, **36**:3007-3016.
- [63] Shukla N, Maher J, Masters J, Angelini GD, Jeremy JY: **Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?** *Atherosclerosis* 2006, **187**:238-250.
- [64] Grammer TB, Kleber ME, Silbernagel G, Pilz S, Scharnagl H, Lerchbaum E, Tomaschitz A, Koenig W, März W: **Copper, ceruloplasmin, and long-term cardiovascular and total mortality (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study).** *Free Radic Res* 2014, **48**:706-715.
- [65] Watanabe J, Grijalva V, Hama S, Barbour K, Berger FG, Navab M, Fogelman AM, Reddy

ST: Hemoglobin and its scavenger protein haptoglobin associate with ApoA-1-containing particles and influence the inflammatory properties and function of high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2009, **284**:18292-18301.

[66] 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**:605-609.

[67] Nagano Y, Arai H, and Kita T: **High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88**:6457-6461.

[68] Annema W, Nijstad N, Tölle M, de Boer JF, Buijs RV, Heeringa P, van der Giet M, Tietge UJ. **Myeloperoxidase and serum amyloid A contribute to impaired in vivo reverse cholesterol transport during the acute phase response but not group IIA secretory phospholipase A(2).** *J Lipid Res* 2010, **51**:743-754.

[69] McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP: **Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo.** *Circulation* 2009, **119**:1135-1145.

[70] Morel DW: **Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **200**:408-416.

[71] McCall MR, Tang JY, Bielicki JK, Forte TM: **Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, **15**:1599-1606.

[72] Feingold KR, Grunfeld C: **Effect of inflammation on HDL structure and function.** *Curr Opin Lipidol* 2016, **27**:521-530.

[73] Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M: **Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study.** *Circulation* 2003, **107**:2775-2779.

[74] Tan Y, Liu TR, Hu SW, Tian D, Li C, Zhong JK, Sun HG, Luo TT, Lai WY, Guo ZG: **Acute coronary syndrome remodels the protein cargo and functions of high-density lipoprotein subfractions.** *PLoS One* 2014, **9**:e94264.

[75] Ivanišević J, Kotur-Stevuljević J, Stefanović A, Spasić S, Vučinić Mihailović V, Videnović Ivanov J, Jelić-Ivanović Z: **Association of serum amyloid A and oxidative stress**

with paraoxonase 1 in sarcoidosis patients. *Eur J Clin Invest* 2016, **46**:418-424.

[76] Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, Sopic M, Gulan B, Janac J, Milosevic S: **Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients.** *Atherosclerosis* 2015, **241**:192-198

[77] Matsunaga T, Nakajima T, Miyazaki T, Koyama I, Hokari S, Inoue I, Kawai S, Shimomura H, Katayama S, Hara A, Komoda T: **Glycated high-density lipoprotein regulates reactive oxygen species and reactive nitrogen species in endothelial cells.** *Metabolism* 2003, **52**:42-49.

[78] Chin JH, Azhar S, Hoffman BB: **Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins.** *J Clin Invest* 1992, **89**:10-18.

[79] Norata GD, Banfi C, Pirillo A, Tremoli E, Hamsten A, Catapano AL, Eriksson P: **Oxidised-HDL3 induces the expression of PAI-1 in human endothelial cells. Role of p38MAPK activation and mRNA stabilization.** *Br J Haematol* 2004, **127**:97-104.

[80] Sharma N, Desigan B, Ghosh S, Sanyal SN, Ganguly NK, Majumdar S: **The role of oxidized HDL in monocyte/macrophage functions in the pathogenesis of atherosclerosis in Rhesus monkeys.** *Scand J Clin Lab Invest* 1999, **59**:215-225.

[81] Weichhart T, Kopecky C, Kubicek M, Haidinger M, Döller D, Katholnig K, Suarna C, Eller P, Tölle M, Gerner C, Zlabinger GJ, van der Giet M, Hörl WH, Stocker R, Säemann MD: **Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation.** *J Am Soc Nephrol* 2012, **23**:934–947.

[82] Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, Hama S, Navab M, Fogelman AM: **High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection.** *Circulation* 2001, **103**:2283-2288.

[83] Kumon Y, Nakauchi Y, Kidawara K, Fukushima M, Kobayashi S, Suehiro T, Hashimoto K, Sipe JD: **A longitudinal analysis of alteration in lecithin-cholesterol acyltransferase and paraoxonase activities following laparoscopic cholecystectomy relative to other parameters of HDL function and the acute phase response.** *Scand J Immunol* 1998, **48**:419-424.

[84] Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Anantharamaiah GM, Fogelman AM: **The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis.** *J Lipid Res* 2009, **50**:S145–149.

- [85] Carvalho LS, Panzoldo N, Santos SN, Modolo R, Almeida B, Quinaglia E Silva JC, Nadruz-Jr W, de Faria EC, Sposito AC; Brasilia Heart Study Group: **HDL levels and oxidizability during myocardial infarction are associated with reduced endothelial-mediated vasodilation and nitric oxide bioavailability.** *Atherosclerosis* 2014, **237**:840-846.
- [86] van Leuven SI, Hezemans R, Levels JH, Snoek S, Stokkers PC, Hovingh GK, Kastelein JJ, Stroes ES, de Groot E, Hommes DW: **Enhanced atherogenesis and altered high density lipoprotein in patients with Crohn's disease.** *J Lipid Res* 2007, **48**:2640-2646.
- [87] Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A: **Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**:870-876.
- [88] 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**:1881-1888.
- [89] Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Nègre-Salvayre A, de Souza JA, Chantepie S, Chapman MJ: **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**:1843-1849.
- [90] 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.
- [91] Oravec S, Demuth K, Myara I, Hornyach A: **The effect of high density lipoprotein subfractions on endothelial eicosanoid secretion.** *Thromb Res* 1998, **92**:65-71.
- [92] Nofer JR, Brodde MF, Kehrel BE: **High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010, **37**:726-735.
- [93] Woudberg NJ, Goedecke JH, Blackhurst D, Frias M, James R, Opie LH, Lecour S: **Association between ethnicity and obesity with high-density lipoprotein (HDL) function and subclass distribution.** *Lipids Health Dis* 2016, **15**:92.
- [94] de Souza JA, Vindis C, Hansel B, Nègre-Salvayre A, Therond P, Serrano CV Jr, Chantepie S, Salvayre R, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A: **Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity.** *Atherosclerosis* 2008, **197**:84-94.

- [95] Kiss Emese: **Szisztémás lupus erythematosus – könyvrészlet in Tulassay Zsolt: A belgyógyászat alapjai 2.**, 1267-1271.
- [96] Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jansen-McWilliams L, D'Agostino RB, Kuller LH: **Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study.** *Am J Epidemiol* 1997, **145**:408-415.
- [97] El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, Bernstein RM, Bruce IN: **Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women.** *Circulation* 2004, **110**:399-404.
- [98] Ilowite NT, Samuel P, Ginzler E, Jacobson MS: **Dyslipoproteinemia in pediatric systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**:859-863.
- [99] Borba EF, Bonfá E: **Dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus: influence of disease, activity, and anticardiolipin antibodies.** *Lupus* 1997, **6**:533-539.
- [100] Parker B, Ahmad Y, Shelmerdine J, Edlin H, Yates AP, Teh L-S and Bruce IN: **An analysis of the metabolic syndrome phenotype in systemic lupus erythematosus.** *Lupus* 2011, **20**:1459–1465.
- [101] Nuttall SL, Heaton S, Piper MK, Martin U, Gordon C: **Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus--evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia.** *Rheumatology (Oxford)* 2003, **42**:758-762.
- [102] Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, Shintani A, Stanley E, Raggi P, Stein CM: **Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors.** *J Rheumatol* 2006, **33**:539-545.
- [103] Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM: **Novel cardiovascular risk factors in premature coronary atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 2008, **35**:1789-1794.
- [104] Meyer O: **Anti-CRP antibodies in systemic lupus erythematosus.** *Joint Bone Spine* 2010, **77**:384–389.
- [105] Tölle M, Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prüfer N, Jankowski J, Tietge UJ, Zidek W, van der Giet M: **High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A.** *Cardiovasc Res* 2012, **94**:154-162.

- [106] 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.
- [107] Batuca JR, Ames PRJ, Amaral M, Favas C, Isenberg DA and Alves JD: **Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein are affected by specific antibodies in systemic lupus erythematosus.** *Rheumatology* 2009, **48**:26–31.
- [108] Batuca JR, Ames PR, Isenberg DA, Alves JD: **Antibodies toward high-density lipoprotein components inhibit paraoxonase activity in patients with systemic lupus erythematosus.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1108**:137-146.
- [109] Hua X, Su J, Svenungsson E, Hurt-Camejo E, Jensen-Urstad K, Angelin B, Båvenholm P, Frostegård J: **Dyslipidaemia and lipoprotein pattern in systemic lupus erythematosus (SLE) and SLE-related cardiovascular disease.** *Scand J Rheumatol* 2009, **38**:184-189.
- [110] Parra S, Vives G, Ferré R, González M, Guardiola M, Ribalta J, Castro A: **Complement system and small HDL particles are associated with subclinical atherosclerosis in SLE patients.** *Atherosclerosis* 2012, **225**:224-230.
- [111] Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP: **Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor.** *J Lipid Res* 1980, **21**:284-291.
- [112] Spranger T, Finckh B, Fingerhut R, Kohlschütter A, Beisiegel U, Kontush A: **How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper.** *Chem Phys Lipids* 1998, **91**:39-52.
- [113] Halvorsen B, Brude I, Drevon CA, Nysom J, Ose L, Christiansen EN, Nenseter MS: **Effect of homocysteine on copper ion-catalyzed, azo compound-initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein.** *J Lipid Res* 1996, **37**:1591–1600.
- [114] Solakivi T, Jaakkola O, Salomäki A, Peltonen N, Metso S, Lehtimäki T, Jokela H, Nikkari ST: **HDL enhances oxidation of LDL in vitro in both men and women.** *Lipids Health Dis* 2005, **4**:25.
- [115] Tsunoda F, Lamon-Fava S, Horvath KV, Schaefer EJ, Asztalos BF: **Comparing fluorescence-based cell-free assays for the assessment of antioxidative capacity of high-**

density lipoproteins. *Lipids Health Dis* 2016, **15**:163.

[116] Hochberg MC: **Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**:1725.

[117] Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Kamranpour N, Fogelman AM, Navab M: **HDL inflammatory index correlates with poor outcome in hemodialysis patients.** *Kidney Int* 2007, **72**:1149-1156.

[118] Solak ZA, Kabaroğlu C, Cok G, Parildar Z, Bayindir U, Ozmen D, Bayindir O: **Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people.** *Clin Exp Med* 2005, **5**:99-105.

[119] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: **The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1982, **25**:1271-1277.

[120] Ujhelyi L, Balla J, Muszbek L, Kakuk G, Belcher J, Jacob HS, Vercellotti GM, Balla G: **A microassay to assess the oxidative resistance of low-density lipoproteins.** *Clin Chem* 1998, **44**:1762-1764.

[121] Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M: **Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein.** *Free Radic Res Commun* 1989, **6**:67–75.

[122] Rosso LG, Lhomme M, Meroño T, Sorroche P, Catoggio L, Soriano E, Saucedo C, Malah V, Dauteuille C, Boero L, Lesnik P, Robillard P, Chapman MJ, Brites F, Kontush A: **Altered lipidome and antioxidative activity of small, dense HDL in normolipidemic rheumatoid arthritis: relevance of inflammation.** *Atherosclerosis* 2014, **237**:652-660.

[123] Borba EF, Bonfá E, Vinagre CG, Ramires JA, Maranhão RC: **Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**:1033-1040.

[124] de Carvalho JF, Borba EF, Viana VS, Bueno C, Leon EP, Bonfá E: **Anti-lipoprotein lipase antibodies: a new player in the complex atherosclerotic process in systemic lupus erythematosus?** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:3610-3615.

[125] Zheng L, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD, Kinter M: **Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages.** *J Biol Chem* 2005, **280**:38-47.

- [126] Rached F, Lhomme M, Camont L, Gomes F, Dauteuille C, Robillard P, Santos RD, Lesnik P, Serrano CV Jr, Chapman MJ, Kontush A: **Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1851**:1254-1261.
- [127] Voros S, Joshi P, Qian Z, Rinehart S, Vazquez-Figueroa JG, Anderson H, Elashoff M, Murrieta L, Karmaliotis D, Kalynych A, Brown C 3rd, Schaefer E, Asztalos B: **Apoprotein B, small-dense LDL and impaired HDL remodeling is associated with larger plaque burden and more noncalcified plaque as assessed by coronary CT angiography and intravascular ultrasound with radiofrequency backscatter: results from the ATLANTA I study.** *J Am Heart Assoc* 2013, **2**:e000344.
- [128] Hiruta N, Uchida Y, Maezawa Y, Shimoyama E: **Molecular imaging of apolipoprotein B-100 in human coronary plaques by color fluorescent angioscopy and microscopy.** *Int Heart J* 2013, **54**:68-74.
- [129] Kwankaew J, Leelawattana R, Saignam A, Siripaitoon B, Uea-Areewongsa P, Juthong S: **Apolipoprotein B as an independent predictor of arterial stiffness in systemic lupus erythematosus patients.** *Int J Rheum Dis* 2015, **18**:447-451.
- [130] Svenungsson E, Engelbertsen D, Wigren M, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Elvin K, Jensen-Urstad K, Fredrikson GN, Nilsson J: **Decreased levels of autoantibodies against apolipoprotein B-100 antigens are associated with cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus.** *Clin Exp Immunol* 2015, **181**:417-426.
- [131] Uhlar CM, Whitehead AS: **Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant.** *Eur J Biochem* 1999, **265**:501-523.
- [132] Chami B, Barrie N, Cai X, Wang X, Paul M, Morton-Chandra R, Sharland A, Dennis JM, Freedman SB, Witting PK: **Serum amyloid A receptor blockade and incorporation into high-density lipoprotein modulates its pro-inflammatory and pro-thrombotic activities on vascular endothelial cells.** *Int J Mol Sci* 2015, **16**:11101-11124.
- [133] Sun RL, Huang CX, Bao JL, Jiang JY, Zhang B, Zhou SX, Cai WB, Wang H, Wang JF, Zhang YL: **CC-chemokine ligand 2 (CCL2) suppresses high density lipoprotein (HDL) internalization and cholesterol efflux via CC-chemokine receptor 2 (CCR2) induction and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in human endothelial cells.** *J*

Biol Chem 2016, **291**:19532-19544.

[134] Gupta R, Yadav A, Aggarwal A: **Longitudinal assessment of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus nephritis as a biomarker of disease activity.** *Clin Rheumatol* 2016, **35**:2707-2714.

[135] Hahn BH, Grossman J, Ansell BJ, Skaggs BJ, McMahon M: **Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:213.

[136] Mackness M, Mackness B: **Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles.** *Gene* 2015, **567**:12-21.

[137] Trpkovic A, Resanovic I, Stanimirovic J, Radak D, Mousa SA, Cenic-Milosevic D, Jevremovic D, Isenovic ER: **Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015, **52**:70-85.

[138] Hua X, Su J, Svenungsson E, Hurt-Camejo E, Jensen-Urstad K, Angelin B, Båvenholm P, Frostegård J: **Dyslipidaemia and lipoprotein pattern in systemic lupus erythematosus (SLE) and SLE-related cardiovascular disease.** *Scand J Rheumatol* 2009, **38**:184-189.

[139] Russo GT, Giandalia A, Romeo EL, Alibrandi A, Horvath KV, Asztalos BF, Cucinotta D: **Markers of systemic inflammation and Apo-AI containing HDL subpopulations in women with and without diabetes.** *Int J Endocrinol* 2014, **2014**:607924.

[140] Martin SS, Jones SR, Toth PP: **High-density lipoprotein subfractions: current views and clinical practice applications.** *Trends Endocrinol Metab* 2014, **25**:329-336.



Nyilvántartási szám: DEENK/104/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gaál Krisztina
Neptun kód: AUXCJM
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gaál, K.**, Tarr, T., Lőrincz, H., Borbás, V., Seres, I., Harangi, M., Fülöp, P., Paragh, G.: High-density lipoprotein antioxidant capacity, subpopulation distribution and paraoxonase-1 activity in patients with systemic lupus erythematosus.
Lipids Health Dis. 15 (60), 1-8, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-016-0229-0>
IF: 2.137 (2015)
2. **Gaál, K.**, Lőrincz, H., Seres, I., Harangi, M., Oláh, A., 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





További közlemények

3. Paragh, G., **Gaál, K.**, Szekanecz, Z., Balogh, Z.: Lipid és HDL paradoxon gyulladásos reumatológiai kórképekben.
Metabolizmus. 12, 172-177, 2014.
4. 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: 3.457
5. Szegedi, A., Simics, E., Aleksza, M., Horkay, I., **Gaál, K.**, Sipka, S., Hunyadi, J., Kiss, E.: Ultraviolet-A1 phototherapy modulates Th1/Th2 and Tc1/Tc2 balance in patients with systemic lupus erythematosus.
Rheumatology (Oxford). 44 (7), 925-931, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/keh643>
IF: 4.226

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,049

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,366

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, 2017.04.19.



10. TÁRGYSZAVAK

érelmeszesedés, kardiovaszkuláris rizikó, HDL antioxidáns kapacitás, diszfunkcionális HDL, paraoxonáz, HDL szubpopulációk, SLE, gyulladásos markerek, szérum amyloid A, interleukin-6, monocita kemotaktikus protein-1, oxLDL

atherosclerosis, cardiovascular risk, HDL antioxidant capacity, dysfunctional HDL, paraoxonase, HDL subpopulations, SLE, inflammatory markers, serum amyloid A, interleukine-6, monocyte chemotactic protein-1, oxLDL

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni hálámat Paragh György Professzor Úrnak, témavezetőmnek, aki nemcsak lehetővé tette, hogy a Belgyógyászati Intézet Anyagcsere Betegségek Tanszékén dolgozzak, de irányításával bekapcsolódhattam az ott folyó tudományos kutatásba is. Köszönettel tartozom Szegedi Gyula Professzor Úrnak jelen kutatás alapötletéért, valamint Zeher Margit Professzornőnek és Tarr Tünde Adjunktusnőnek az Immunológia Tanszékkal való együttműködés lehetővé tételéért.

A laboratóriumi munka mindennapos problémáinak leküzdésében mindig számíthattam dr. Seres Ildikó támogatására és türelmére, amiért nagyon hálás vagyok. Cikkeim, előadásaim társszerzőinek, valamint az anyagcsere munkacsoport minden tagjának, különösképpen Harangi Mariann Docensnőnek és dr. Lőrincz Hajnalkánnak köszönöm a kutatásaimhoz és azok publikálásához nyújtott segítséget. Köszönöm Muszbek László Professzor Úrnak a módszerbeállítás kivitelezésére vonatkozó értékes tanácsait, Balla József Professzor Úrnak, hogy munkám során használhattam az irányítása alatt álló kutatólabor eszközeit, valamint dr. Nagy Emőkének és Barna Erikának az ahhoz nyújtott technikai segítséget. Hálás vagyok továbbá Karányi Zsoltnak, aki a statisztikai számításokhoz nyújtott segítő kezet.

Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak.

Az értekezés a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA 115723), valamint a GINOP-2.3.3-15-2016-00005 számú projektek támogatásával készült. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

12. FÜGGELÉK

A PhD értekezés alapját képező kutatásokban és publikációkban végzett saját munka

A tanulmányok alapötlete, valamint az SLE-s betegek vizsgálatának tervezete témavezetőm, Szegedi Gyula Professzor Úr, illetve Harangi Mariann docensnő és dr. Seres Ildikó munkája. A módszerbeállítás és standardizálás kísérleteit és azok statisztikai elemzését (a Deming és Passing-Bablok regresszió kivételével) egyedül végeztem, a publikáció első változatát én írtam, végleges formájának kialakításában szerzőtársaim is segítségemre voltak. A második tanulmány SLE-s betegeit Tarr Tünde Adjunktusnő választotta be, míg illesztett egészséges kontrolljaikat részben Borbás Viktor Doktor Úr, részben magam választottam. Az SLE-s betegek és kontrolljaik adatait magam gyűjtöttem és dolgoztam fel, HDL antioxidáns kapacitását illetve egyes gyulladásos markerek szintjét szintén én mértem, (másokat dr. Lőrincz Hajnalka illetve az anyagcserelabor munkatársai) a HDL szubfrakciók eloszlását és a PON aktivitást dr. Lőrincz Hajnalka határozta meg, az adatok statisztikai elemzését segítséggel végeztem (Karányi Zsolt, dr. Seres Ildikó), a publikáció első változatát én írtam, végleges formájának kialakításában szerzőtársaim segítettek.