

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**DISZFUNKCIONÁLIS HDL ÉS EGYÉB KARDIOVASZKULÁRIS
RIZIKÓTÉNYEZŐK VIZSGÁLATA SZISZTÉMÁS LUPUS
ERYTHEMATOSUSBAN**

Dr. Gaál Krisztina

Témavezető: Prof. Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM

Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017

**DISZFUNKCIONÁLIS HDL ÉS EGYÉB KARDIOVASZKULÁRIS
RIZIKÓTÉNYEZŐK VIZSGÁLATA SZISZTÉMÁS LUPUS
ERYTHEMATOSUSBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Egészségtudományok tudományágban

Írta: Dr. Gaál Krisztina, okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája
(Az Anyagcsere és Endokrin Betegségek Megelőzése és Kontrollja programja)
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Hőgye Márta, PhD
Dr. Szántó Sándor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Megelőző Orvostani Intézet tárgyalója
2017. november 28. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora
Prof. Dr. Somogyi Anikó, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora
Prof. Dr. Somogyi Anikó, az MTA doktora
Prof. Dr. Hőgye Márta, PhD
Dr. Szántó Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme [DBA1]
2017. november 28. 13 óra

BEVEZETÉS

Hazánkban a szív-érrendszeri megbetegedések évek óta vezetik a halálloki statisztikákat, 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) *érelmeszesedés* talaján fejlődnek ki. A legújabb elméleti megközelítések szerint az ateroszklerózis kialakulásáért az érfalban fellépő, tartósan fennálló enyhe gyulladás felelős, mely az idők során egyre súlyosabb szerkezeti és funkcionális eltérésekhez vezet. A folyamat főként módosult endogén anyagok hatására kezdődik, melyek a veleszületett és szerzett immunrendszer válaszáat váltják ki, és a vaszkuláris homeosztázis felborulásához vezetnek. Az immunválaszt indukáló módosult endogén anyagok között kiemelt szereppel bír az oxidált low-density lipoprotein (oxLDL), melyben különböző citotoxikus hatású lipid oxidációs termékek – lipid-hidroperoxidok, -aldehidek és -karbonilok – kumulálódnak. Az oxidatív ágensek keletkezésében szerepet játszik az endotél és makrofág sejtek által termelt lipoxigenáz, mely többszörösen telítetlen zsírsavakat konvertál lipid-peroxidokká, az aktivált mononukleáris sejtek által termelt myeloperoxidáz (MPO), ami tirozil gyököket, hipoklórsavat, klóramint és nitritet termel, de az LDL lipid tartalmának oxidációját reaktív szabad gyökök (ROS) és katalitikusan aktív fémionok is kiválthatják. A vas nagy mennyiségben van jelen a keringésben, mint a vörösvértestekben található hem alkotóeleme. Igazolták, hogy 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 indukál. A HO-1 felszabadítja a vasat, melyet a ferritin köt meg, ezáltal védve ki a szabad vas erős oxidatív sajátosságát. Amennyiben a felszabadult vas megkötése nem történik meg, az oxidatív termékek keletkezéséhez vezet. Az ateroszklerotikus plakkokban megnövekedett mennyiségű katalitikusan aktív vas és ferritin jelenlétét észlelték, és előfordulásuk összefüggést mutatott a fennálló kardiovaszkuláris betegségekkel.

Az oxidált LDL az endotél sejtekre a lektin-szerű oxLDL receptor-1-n (LOX-1) és a CD36 scavenger receptoron keresztül fejt ki hatását: fokozza a LOX-1 és a vaszkuláris adhéziós molekulák expresszióját, a monocita kemotaktikus protein (MCP-1) felszabadulását, továbbá az endotél nitrogén monoxid szintáz expresszió gátlása és a ROS termelés fokozása révén csökkenti a nitrogén monoxid biológiai hozzáférhetőségét, emellett endotélsejt apoptózist is kivált. A kemotaktikus és sejtadhéziós molekulák indukálják a keringő monociták és T-limfociták érfali intima rétegbe vándorolását, ahol a limfociták által termelt citokinek hatására a monociták makrofágokká differenciálódnak. A makrofágok, valamint a szintén idevándorló vaszkuláris simaizom sejtek scavenger receptoraikon keresztül oxLDL-t vesznek fel, mely számos aterogén irányba ható folyamatot indukál, köztük a sejtek gyulladásos mediátorainak termelését. Az érlelmesedés korai makroszkópos morfológiai eltérései közé tartozik a „zsíros csíkok” megjelenése az érfalban, melyeket az intima rétegben felszaporodó habos sejtek, azaz az oxLDL-lel zsúfolásig telt makrofágok alkotnak.

Szervezetünk az LDL oxidációja ellen egy másik lipoprotein, a **high-density lipoprotein (HDL)** segítségével védekezik. A HDL a legkisebb méretű, és nagy fehérjetartalmának (35-65%) köszönhetően egyben a legnagyobb sűrűségű lipoprotein, mely foszfolipideket, nem észterifikált koleszterint és fehérjéket tartalmazó egyrétegű külső hidrofíl burokból, és főként koleszterin-észtereket, kisebb mennyiségben triglicerideket (TG) tartalmazó hidrofób magból épül fel. A HDL mai ismereteink szerint legalább 80 féle fehérjét hordoz. A szerkezeti fehérjék mellett megtalálhatók az antioxidáns és a reverz koleszterin transzportban (RCT) résztvevő enzimek és egyes akut fázis fehérjék is. Fő strukturális fehérjéje a csaknem minden HDL alosztályon előforduló, főként a májban és belekben szintetizálódó apolipoprotein A-I (ApoA-I), mely a HDL szintézis és a RCT kiindulási molekulája, antioxidáns, gyulladáscsökkentő és antiaterogén hatással bír. A HDL több antioxidáns enzime közül részben mennyisége, részben aktivitása miatt elsősorban a humán paraoxonáz 1 (PON1) felelős az LDL oxidáció gátlásáért. Ennek

mechanizmusa egyrészt az oxidált lipidek - mint a lipid-hidroperoxidok (LOOH) és lizofoszfatidilkolin - átszállítása az oxLDL-ről a HDL-re, másrészt LOOH-k inaktiválása hidrolizálásuk révén. A PON1 emellett más szubsztátokat is hidrolizál, köztük a szintén aterogén homocisztein-tiolaktont, és a szerves foszfát metabolitok közé tartozó paraoxont. Az enzim működéséhez az intakt szerkezetű HDL nyújtotta makromolekuláris közeg és az ApoA-I jelenléte egyaránt szükséges. Koncentrációja és aktivitása, mely különböző szubsztátokkal szemben eltérő, nagy egyéni különbségeket mutat. Aktivitását főként a Q192R és L55M polimorfizmusok határozzák meg, de a genotípus jelentős variabilitása miatt a mindennapi gyakorlatban a fenotípus meghatározása bír nagyobb jelentőséggel.

A HDL részecskék nem egységesek, szubpopulációra tagolódnak, melyek méretükben, sűrűségükben, elektromos töltésükben, lipid és fehérje összetételükben, és funkcióikban is különböznek, és a HDL érési folyamata során alakulnak át egymásba. Osztályozásuk is heterogén, az elválasztásukra alkalmazott módszertől függ. A leggyakrabban alkalmazott sűrűség-grádiens ultracentrifugálással ill. grádiens gélelektroforézissel méret és sűrűség szerinti sorrendben a $2b > 2a > 3a > 3b > 3c$ frakciók különíthetők el. A PON1 és más antioxidáns enzimek nem egyformán oszlanak meg a HDL szubpopulációkon, hanem elsősorban a denz HDL3, azon belül is a HDL3c részecskéken fordulnak elő.

A populációs tanulmányokból régóta ismert, hogy a HDL koleszterin szint inverz kapcsolatban áll a koronária betegségek kockázatával. Ugyanakkor egyes nagyon alacsony HDL-C koncentrációjú családok kardiovaszkuláris kockázata nem különbözik az átlagnépességétől, mivel HDL-ük sokkal eredményesebben védi ki a foszfolipidek oxidációját. Ezzel szemben familiáris hiper-alfalipoproteinémiában a megnövekedett 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. Koronáriabetegyek körében végzett vizsgálat 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 (piHDL).

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. A HDL lipidom oxidációjával lipid-hidroperoxidok képződnek, az oxHDL koleszterin-észter tartalma a csökkent lecitin-koleszterin acil-transzferáz aktivitásnak köszönhetően alacsonyabb, hasonlóan foszfadilkolin tartalmához, míg a lizofoszfadilkolinok mennyisége nő. Mindez csökkenti a lipid burok fluiditását, és a koleszterin efflux kapacitás romlásával jár. A HDL konstitucionális fehérjéinek mennyisége és aktivitása a diszfunkcionális HDL-ben alacsonyabb. Ennek részben csökkent szintézisük az oka, mivel a gyulladás során előtérbe kerül az akut fázis fehérjék termelése, részben pedig az elszennvedett oxidatív szerkezeti módosulás, mely fiziológiás funkcióik károsodásához vezet. A különböző oxidáns hatások az ApoA-I és ApoA-II más-más gyökeit módosítják, valamint keresztkötések jöhetnek létre a molekulák között. 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, ApoC-III, a hemoglobin és kötőfehérjéi, a haptoglobin és hemopexin, melyek részben saját proinflammatorikus hatásuknál fogva, részben pedig antiinflammatorikus fehérjék HDL-ről való leszorítása révén járulnak hozzá a HDL antiaterogén funkciójának csökkenéséhez.

In vitro kísérletekkel bizonyították, hogy a HDL és lipidtartalma könnyen oxidálható, immunhisztokémiai vizsgálatokkal pedig igazolták az oxidált HDL, ApoA-I és ApoA-II jelenlétét az ateroszklerózisos érfalban. Az oxHDL antiaterogén funkcióinak változó mértékű deficitjét állatkísérletes modellekben és humán betegcsoportokban is kimutatták. A diszfunkcionális HDL képződése szempontjából döntő fontosságú a gyulladásos milió jelenléte. Krónikus gyulladással járó kórképek

közül többek között koszorúér-betegségben, akut koronária szindrómában, akut stroke-ban, 2-es típusú cukorbetegségben, metabolikus szindrómában, krónikus veseelégtelenségben, reumatoid artritiszben, szisztémás szklerózisban, Crohn-betegségben, obstruktív alvási apnoéban észlelték diszfunkcionális HDL jelenlétét. Az egyes kórképekben a HDL mennyiségében és funkciójában bekövetkező változások nem feltétlenül arányosan érintik a különböző HDL frakciókat. Obez nőket vizsgálva szignifikánsan kevesebb volt a nagy, és több a közepes HDL arányuk, mint a normál testsúlyúaké, míg kis HDL szintjükben nem volt eltérés. Metabolikus szindrómában szenvedők HDL_{3c} részecskéinek endotél sejtekre gyakorolt antiapoptotikus aktivitása 35%-kal elmaradt az egészségesekétől, melynek háttérben e részecskék megnövekedett triglicerid és csökkent koleszterin-észter tartalma igazolódott. Ezek a megfigyelések a HDL mennyiségi meghatározása mellett funkcionalitás vizsgálatának jelentőségét hangsúlyozzák.

A HDL számos antiaterogén tulajdonsága közül az antioxidáns hatása az, melynek révén képes megakadályozni a gyulladásos mediátorok által kiváltott LDL oxidációt, semlegesíti a már oxidált lipideket, és saját szerkezeti elemeit is védi az oxidatív módosulásoktól, így gátolja az érlelmeszesedés kiindulási lépését. A HDL antioxidáns tulajdonságának a kutatásokban eddig alkalmazott vizsgálati módszerei sokszínűek, akárcsak az általuk nyert eredmények. A 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. Azonban az alkalmazott módszer típusa (sejtes-sejtmentes, végpontos-kinetikus), az LDL:HDL arány, a HDL szeparálás módja, valamint a prooxidáns típusa és koncentrációja végletesen meghatározhatja az eredményként kapott értékeket. A korábbi tanulmányokban alkalmazott prooxidánsok közt van olyan, ami biztosan nincs jelen a szubendoteliális térben (pl. AAPH - 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropán) dihidroklorid), míg mások kimutathatók, de szerepük még nem kellően tisztázott az érlelmeszesedésben (pl. Cu²⁺). A tesztekben mutatkozó eltérések akár azonos típusú

vizsgálati csoportok vonatkozásában egyszerre vezettek egybevágó és szélsőségesen eltérő adatokhoz. Standardizálás hiányában pedig előfordult, hogy ugyanaz a teszt másik kutatócsoport által alkalmazva lényegesen eltérő mérési eredményekhez és végkövetkeztetésekhez juttatta a felhasználókat. 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 a hemet tudomásunk szerint még nem alkalmazták. Az előzőek miatt láttuk szükségesnek a HDL antioxidáns kapacitás mérésére az in vivo oxidáció körülményeit jobban reprezentáló új módszer kifejlesztését és standardizálását.

A HDL gyulladás okozta funkcionális károsodása legvalószínűbb a kifejezett tartós szisztémás gyulladással jellemzett kórállapotokban. Ez áll fenn a szisztémás autoimmun megbetegedések esetén, melyek közül az egyik leggyakoribb a **szisztémás lupus erythematosus (SLE)**. SLE-ben a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás jelentősen meghaladja az átlagnépességét, 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. A betegek érlemeszesedésének folyamata felgyorsult, melyet a megnövekedett carotis intima-media vastagság, carotis plakkok jelenléte, endotél diszfunkció, és az artéria brachialis megromlott áramlásfüggő dilatációja jelez. Bár a pácienseknél nagyobb arányban fordulnak elő a hagyományos kardiovaszkuláris rizikófaktorok, ezek önmagukban nem nyújtanak kellő magyarázatot a felgyorsult érlemeszesedésre, így annak kialakulásában betegség-specifikus, a gyulladással összefüggő kockázati tényezők szerepe is felmerült.

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 gyulladós citokinek felszabadulása kísér. Szisztémás gyulladás esetén a keringésben jelen levő gyulladós mediátorok az érfalban is gyulladást provokálhatnak, mely az érlemeszesedés „low grade inflammation”elméletével

összhangban hozzájárulhat a betegekben észlelt felgyorsult érlemeszesedés kialakulásához. Az akut fázis fehérjék közül a C-reaktív protein (CRP), SAA megnövekedett szintjét és magasabb vörösvértest süllyedés (We) értékeket írtak le SLE-s betegekben, valamint emelkedett MCP-1 és interleukin-6 (IL-6) koncentrációkat, melyek pozitív korrelációban álltak a koronária kalcifikáció mértékével. 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. 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.

Elsőként *McMahon M. és mtsai* vizsgálták SLE-ben szenvedők körében a HDL antioxidáns tulajdonságát, és meghatározták a piHDL előfordulási gyakoriságát, mely betegeiknél 45-48% volt, és összefüggést találtak ***a piHDL jelenléte*** valamint a koronária-betegség és a szubklinikus ateroszklerózis előfordulása, illetve egyes gyulladásos markerek szintje között. 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* a kis HDL (sHDL) mennyiségét kevesebbnek találta az SLE-s betegekben, mint egészséges társaikban. Ugyanakkor egy 69 SLE-s beteget tartalmazó csoportban a sHDL részecskék pozitív korrelációban álltak a carotis intima-media vastagsággal és a komplement szintekkel. A fentiek jól illusztrálják, hogy bár több tanulmány foglalkozott már az SLE-ben tapasztalható felgyorsult érlemeszesedés hátterének vizsgálatával, a fennálló gyulladásnak és a HDL minőségi változásának, azaz a diszfunkcionális HDL-nek és az esetleges szubpopulációs változásoknak az együttes szerepét még nem sikerült tisztázni a folyamatban.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A HDL antioxidáns kapacitásának vizsgálatára olyan módszer kidolgozása, mely a korábban alkalmazott tesztekkel összehasonlítva jobban megközelíti az in vivo LDL-HDL kölcsönhatást.
2. Az általunk kidolgozott módszerrel - a hem-indukált LDL-oxidáció módszerével - végzett HDL antioxidáns kapacitás mérés standardizálása az érvényes laboratóriumi guideline-ok alapján.
3. Módszerünkkel egészséges személyek HDL-jeinek, illetve azok szubfrakcióinak antioxidáns kapacitás vizsgálata, és a kapott eredmények összevetése korábbi, más tesztekkel nyert eredményekkel.
4. SLE-s betegek és egészséges kontrolljaik lipidprofiljának, HDL antioxidáns kapacitásának, a HDL alosztályok, és egyes HDL asszociált fehérjék (ApoA-I, PON1, SAA) mennyiségének illetve aktivitásának meghatározásával HDL-jük kvantitatív és kvalitatív jellemezése, a csoportok eredményeinek összehasonlítása.
5. Az SLE-s betegekben fennálló szisztémás gyulladás jellemzése a gyulladásos markerek (CRP, We, SAA, IL-6, MCP-1) és betegségaktivitási index (SLEDAI) meghatározása révén.
6. A gyulladásos markerek valamint a HDL mennyiségi és minőségi jellemzői között fennálló kapcsolatok elemzése, különös tekintettel a HDL antioxidáns kapacitását meghatározó tényezőkre.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

A résztvevők kiválasztása a HDL antioxidáns kapacitás mérésének standardizálásához illetve az egészségesek HDL-ének és szubfrakcióinak antioxidáns kapacitás vizsgálataihoz

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

SLE-s betegek és kontrolljaik kiválasztása

A Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Immunológia Tanszékén kezelt 51 SLE-s beteget (átlagéletkoruk $31,82 \pm 6,40$ év; 44 nő és 7 férfi; átlagos betegségstartamuk $6,59 \pm 5,26$ év), valamint az egészségügyi dolgozók és helyi lakosok közül 49 egészséges kontrollt (átlagéletkoruk $31,8 \pm 6,81$ év; 41 nő és 8 férfi) választottunk be. Valamennyi SLE-s beteg teljesítette az SLE diagnosztikus kritériumait, azaz Amerikai Reumatológus Kollégium által 1997-ben felülvizsgált diagnosztikai kritériumok közül legalább 4 jelen volt náluk. Az SLE-s betegek betegségaktivitását a Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) alapján értékeltük, átlagértéke a vizsgálat időpontjában 4,0 [2,0 - 6,0] volt. A vizsgálatban való részvétel szempontjából kizáró kritériumának számított a veseelégtelenség ($GFR < 60$ ml/perc/1,73 m²) és a cukorbetegség fennállása, továbbá a statinok szedése, mivel ezek módosítják a HDL antioxidáns funkcióját. A betegeket és kontrollokat korban, nemben és dohányzási szokások tekintetében is illesztettük, mert ezek a tényezők szintén hatással vannak a lipidprofilra és a HDL antioxidáns kapacitására.

Mindkét tanulmány résztvevői a tervezett vizsgálatokra vonatkozóan részletes tájékoztatást kaptak, ezt követően részvételi szándékukat beleegyező nyilatkozat aláírásával rögzítették. A tanulmányokat a Debreceni Egyetem Kutatásaitikai Bizottsága illetve az ETT-TUKEB engedélyezte.

Vérvétel és rutin laboratóriumi vizsgálatok

A tanulmányok résztvevőitől 12 órás éhezést követően vénás vérvétel történt, majd a friss szérumból a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében standard laboratóriumi módszerekkel glükóz, triglicerid, összkoleszterin, LDL-C, HDL-C, ApoA-I, ApoB, hsCRP, We meghatározást végeztek. Az SLE-s betegek autoantitest és immunkomplex koncentrációit kereskedelmi forgalomban kapható enzim-kötött immunoszorbens próbákkal (ELISA) a Regionális Immunológiai Laborban vizsgálták.

Gyulladásos markerek meghatározása

Az SLE-sek és kontrolljaik IL-6, SAA, MCP-1 és oxLDL szintjének meghatározását kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztekkel végeztük.

A HDL antioxidáns kapacitásának vizsgálata

A tesztben használt LDL-t egészséges önkéntestől származó friss vérplazmából, míg a HDL-t a vizsgált személyek szérumából egyaránt sűrűséggrádiens ultracentrifugálással különítettük el. Egyénenként 4 ml HDL-t gyűjtöttünk, melyet a szubfrakciók vizsgálatánál 8 egymást követő 0,5 ml-es frakciókban fogtunk fel, és a begyűjtés sorrendjében számoztuk (a legkisebb sűrűségű lett az 1. frakció, a legnagyobb pedig a 8.), a többi esetben a mintákat nem fracionáltuk. A különböző személyektől származó LDL mintákat elegyítettük és valamennyi mérésénél ugyanazt az elegyet használtuk.

A HDL LDL oxidációt gátló hatását a hem indukált LDL oxidáció során vizsgáltuk oly módon, hogy meghatároztuk az LDL oxidációja során a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges időt a propagációs fázisban ($\Delta T_{V_{max}}$) és összehasonlítottuk a HDL jelenlétében mért értékkel. A reakcióelegy HEPES-puffert (6 mmol/l; pH 7,4; Sigma), hem oldatot (5 μ mol/l; Sigma) és LDL-C-t (570 μ mol/l), valamint fiziológiás sóoldatot vagy HDL-C-t (57 μ mol/l) tartalmazott. A különböző antioxidáns kapacitású HDL-ek vizsgálatához az 1:10 HDL-C:LDL-C arány bizonyult optimálisnak. A reakcióelegyet 15 percig 37 °C fokon inkubáltuk,

majd az oxidációt hidrogén-peroxid (75 $\mu\text{mol/l}$; 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 % a $\Delta T_{V_{\max}}$ értéke az LDL és HDL együttes jelenlétében. Az egységnyi HDL koleszterin antioxidáns hatását jellemző értéket specifikus HDL antioxidáns kapacitásnak neveztük el. Az össz-HDL antioxidáns kapacitást a szérum HDL koncentráció és a specifikus HDL antioxidáns kapacitás szorzataként számoltuk. Az egészséges személyek HDL antioxidáns kapacitásának meghatározásánál 41, míg a HDL frakciók vizsgálatánál 8 önkéntes mintáit teszteltük. SLE-s tanulmányunkban 51 beteg és 49 kontroll HDL-ét vizsgáltuk.

A HDL antioxidáns kapacitás mérés 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. A módszer *pontoságát* a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 148 Wayne, PA) EP5-A2 guideline-ja alapján ellenőriztük, 20 napig teszteltük duplikátumban ugyanazt a két HDL mintát. Az eredmények *linearitását* egyazon HDL minta három különböző frakciójának hét

eltérő koleszterin koncentrációjú hígításával tanulmányoztuk változatlan LDL-C koncentráció mellett. A *módszerek összehasonlítása* során a tesztünkkel nyert eredményeket az irodalomban az LDL oxidáció követésére legáltalánosabban használt, ezért általunk „gold standard”-nak tekintett konjugált dién képződés monitorozásával kapott értékekkel vetettük össze. 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. Mindkét reakció esetén a $\Delta T_{V_{max}}$ -t a Multimode Analysis Software kalkulálta. A HDL antioxidáns kapacitást mindkét reakciónál a HDL jelenlétében és hiányában mért $\Delta T_{V_{max}}$ értékek százalékban kifejezett arányával jellemeztük.

Az SLE-s betegek és kontrolljaik HDL szubfrakcióinak elválasztása

A HDL frakciókat a sérumból egy csöves poliakrilamid gélelektroforézisen alapuló módszerrel (Lipoprint Rendszer, Quantimetrix Corp., CA, USA) méretük alapján különítettük el. Az elektroforézist követően a minták szudánfeketével megfestett HDL szubfrakcióinak eloszlását a Lipoware szoftverrel (Quantimetrix Corp.) elemeztük. A teszt során elválasztott 10 HDL frakció három nagyobb csoportba: nagy (HDL1-HDL3), közepes (HDL4- HDL7) és kis (HDL8-HDL10) HDL-ek szubpopulációjába sorolható. Az egyes szubfrakciók koleszterin koncentrációját a megfelelő relatív görbe alatti terület és a minták össz-koleszterin koncentrációjának szorzataként határoztuk meg.

A paraoxonáz-1 (PON1) aktivitásának és fenotípus eloszlásának meghatározása

A PON1 *paraoxonáz* aktivitását paraoxon (O,O-dieil-O-p-nitrofenilfoszfát, Sigma), *arilészteráz* aktivitását pedig fenilacetát szubsztrát hidrolízise révén spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. Az enzim aktivitását U/l-ben fejeztük ki, ahol 1 egységnyi aktivitás percenként 1 μ mol szubsztrát hidrolízisének felelt meg. Az enzim *Q192R fenotípus megoszlását* a kettős szubsztrát módszerrel vizsgáltuk. Az 1 mólos NaCl jelenlétében hidrolizált paraoxonnak (só-stimulált aktivitás) a hidrolizált fenilacetáthoz viszonyított aránya alapján az embereket a

három lehetséges fenotípus (AA-alacsony, AB-közepes, BB-magas aktivitású) egyikébe soroltuk. AA fenotípust állapítottunk meg, ha a hányados < 3 , AB fenotípust ha ≥ 3 de < 7 , BB fenotípust ha > 7 .

Statisztikai elemzés

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 mérés linearitását lineáris regressziós analízissel, a hem és a hidrogén-peroxid koncentráció változtatásának HDL antioxidáns kapacitásra gyakorolt hatását többszörös regressziós analízissel határoztuk meg. Szintén többszörös regressziós analízist (backward-stepwise módszert) alkalmaztunk az össz-HDL antioxidáns kapacitást legjobban befolyásoló tényezők vizsgálatánál. 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.

EREDMÉNYEK

A HDL antioxidáns kapacitás mérés optimalizálása és standardizálása

Tesztünk *optimalizálása* során a reakcióelegyben alkalmazott hem és hidrogén-peroxid koncentrációjának növelése egyaránt rövidítette a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges időt, azonban míg a hem a HDL antioxidáns kapacitás értékeket is csökkentette ($r=-0,71$; $p<0,0001$), addig a hidrogén-peroxid nem volt hatással rá ($p=0,55$). A módszer *reprodukálhatóságának* vizsgálata során az egyes minták esetében az optimális hiba 1,87% és 1,72% volt, míg a rutin hiba 4,09% és 4,93%. Az esszé *linearitását* tesztelve erős pozitív korrelációt találtunk a HDL koncentrációja és antioxidáns aktivitása között ($r\geq 0,98$; $p<0,0001$). A hem indukált LDL oxidáció és a konjugált dién mérés *módszereivel* nyert HDL antioxidáns kapacitás értékek *összehasonlítása* során nem találtunk szignifikáns különbséget az eltérő módszerekkel nyert eredmények között ($p=0,73$).

HDL frakciók és egészséges személyek antioxidáns kapacitása

Egészséges önkéntesek valamennyi HDL frakciója 6,12%-94,12%-kal nyújtotta az LDL oxidáció maximális reakciósebességének eléréséhez szükséges időt ($p<0,05$). A növekvő denzitású HDL frakciók sűrűségükkel párhuzamosan (1.frakció: $115,26\pm 6,86$ % \rightarrow 8.frakció: $174,05\pm 13,38$ %) emelkedő antioxidáns kapacitást mutattak. Az egészséges önkéntesek HDL antioxidáns kapacitásának értékei 120% és 140,23% között alakultak, átlaguk $127,67\pm 4,88\%$ volt.

SLE-s betegek és egészséges kontrolljaik hagyományos kardiovaszkuláris rizikótényezői és gyulladási markerei

A csoportok között nem mutatkozott különbség testtömeg-index, vérnyomásértékek, össz-koleszterin, LDL-C és Lp(a) értékek tekintetében. A betegek vércukor ($p<0,001$), triglicerid ($p=0,005$) és ApoB ($p<0,05$) koncentrációja szignifikánsan magasabb, míg HDL-C ($1,26\pm 0,47$ mmol/l vs. $1,70\pm 0,45$; $p<0,001$)

és ApoA-I ($1,39\pm 0,35$ g/l vs. $1,66\pm 0,41$; $p<0,001$) szintje alacsonyabb volt a kontrollnál. Az SLE-s betegek hsCRP ($p=0,002$), We ($p<0,001$), SAA ($p<0,001$), IL-6 ($p=0,002$) és MCP-1 ($p<0,001$) szintje egyaránt szignifikánsan emelkedett volt, azonban oxLDL koncentrációjuk nem tért el a kontrollétól.

HDL antioxidáns kapacitás, PON1 aktivitás és fenotípus, valamint HDL szubfrakciók megoszlása SLE-s betegekben és kontrolljaikban

A HDL oxidációval szembeni védő hatását vizsgálva jelentős szignifikáns össz-HDL antioxidáns kapacitás csökkenést tapasztaltunk az SLE-s csoportban ($165,82\pm 58,28\%$ vs. $217,71\pm 54,36$; $p<0,001$), miközben a betegek specifikus HDL antioxidáns kapacitása jelzetten, mégis szignifikánsan magasabb volt egészséges társaikénál ($132,42\pm 8,56\%$ vs. $127,67\pm 4,88$; $p=0,002$).

Az SLE-szek PON1 arilészteráz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollé ($125,65\pm 26,87$ U/l vs. $148,35\pm 39,34$; $p=0,001$), míg paraoxonáz aktivitásuk nem különbözött. Hogy tisztázzuk, az alacsonyabb arilészteráz aktivitás háttérében 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 betegekben kismértékben, de szignifikánsan magasabb volt a kontrolloknál mértnél ($p<0,05$).

A PON1 Q192R 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 csoportban sem volt kimutatható. A PON1 magasabb enzimaktivitásáért felelős B allél kétszer olyan gyakori volt az egészséges kontrollok, mint az SLE-s betegek között ($6,38\%$ vs. 3%).

A HDL szubfrakciók analízise mennyiségük egyöntetű szignifikáns csökkenését mutatta az SLE-szek mintáiban ($p\leq 0,01$), s nem találtunk eltérést az egyes frakciók megoszlásában a csoportok között, bár a betegekben a kis HDL mennyisége a nagy HDL-hez viszonyítva (kisHDL/nagyHDL) csökkenő tendenciát

mutatott.

Korrelációk a gyulladás és az oxidatív stressz markerei között SLE-s betegekben és kontrolljaikban

Az SLE-s betegekben mind a HDL-C, mind az össz-HDL antioxidáns kapacitás pozitív korrelációt mutatott a PON1 arilészteráz ($r=0,38$ ill. $r=0,43$; $p<0,01$) és paraoxonáz aktivitásával. A specifikus-HDL antioxidáns kapacitás a kisHDL/nagyHDL aránnyal korrelált ($r=0,38$, $p<0,01$), míg a PON1 arilészteráz aktivitása valamennyi HDL szubpopulációval pozitív asszociációt mutatott, mely a legkifejezettebb a kis HDL esetében volt ($r=0,40$; $p<0,01$). Ugyancsak az SLE-sekben a paraoxonáz aktivitás pozitívan korrelált a nagy HDL százalékos arányával ($r=0,35$; $p=0,01$), míg negatívan a közepes HDL arányával ($r=-0,38$; $p<0,01$).

Nemcsak a HDL-C, hanem az össz-HDL antioxidáns kapacitás is inverz kapcsolatban állt a vizsgált gyulladásos markerek szintjével, beleértve a We ($r=-0,42$; $p<0,01$), hsCRP ($r=-0,35$; $p<0,01$), IL-6 ($r=-0,50$; $p<0,0001$), MCP-1 ($r=-0,41$; $p<0,0001$), és SAA ($r=-0,28$; $p<0,01$) értékeit. Emellett az össz-HDL antioxidáns kapacitás az immun-komplex szinttel is negatívan korrelált ($r=-0,47$, $p<0,001$), de ennek ellenére nem találtunk kapcsolatot a betegség aktivitási index és az ApoA-I, HDL-C illetve össz-HDL antioxidáns kapacitás között.

A SLEDAI-val értékelt betegségaktivitás pozitívan korrelált az oxLDL koncentrációval ($p=0,01$). Emellett a betegek oxLDL szintje az SAA ($p<0,05$) és fibrinogén koncentrációjával, valamint a We, hsCRP és ApoB szintjeivel is pozitív kapcsolatban állt. A magasabb oxLDL szint alacsonyabb nagy HDL ($p=0,06$) és megnövekedett közepes HDL aránnyal párosult ($p<0,01$).

Hogy megtudjuk, vajon az egyváltozós analízis során észlelt kapcsolatok függetlenek-e más laboratóriumi paramétereiktől, 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.

MEGBESZÉLÉS

A HDL antioxidáns kapacitásának vizsgálatára nagy mintaszámú csoportok analizálására alkalmas tesztre volt szükségünk, ezért sejtmentes esszét fejlesztettünk, és kinetikus mérési módot választottunk, mellyel az LDL oxidáció folyamata lépésről-lépésre követhető. Hemet választottunk prooxidánsnak, mivel korábban már igazolták a vörösvértestek lízise során felszabaduló hem, illetve a belőle kijutó katalitikusan aktív vas szerepét az LDL oxidációban. A hem gyűré felhasítására és a vas kiszabadítására hidrogén-peroxidot alkalmaztuk, melyet a fagocita sejtek NADPH-dependens oxidáza is szintetizál, így megtalálható az érfali gyulladásos milióben. A reakció során a hem mennyiségét monitoroztuk, mert abszorbanciája a látható fény spektrumában 405 nm-en követhető. A vizsgált HDL-t a minta tisztaságának érdekében sűrűség-grádiens ultracentrifugálással különítettük el.

A módszer optimalizálása során megállapítottuk, hogy a hidrogén-peroxid koncentráció növelése, bár csökkenti a maximális reakciósebesség eléréséhez szükséges időt, nincs szignifikáns hatással a HDL antioxidáns kapacitás értékekre. Így koncentrációja szükség szerint változtatható a reakcióelegyen anélkül, hogy az befolyásolná a végeredményt, aminek főként erős antioxidáns tulajdonsággal rendelkező HDL frakciók vizsgálata során vehetjük hasznát. Ezzel szemben a hem koncentrációjának növelése nemcsak a $\Delta T_{V_{max}}-t$ rövidítette, hanem szignifikánsan csökkentette a HDL antioxidáns kapacitás értékeket is, így mennyisége a reakció-elegyen nem módosítható.

Tesztünk standardizálása során a guideline által megkívánt módon bizonyítottuk reprodukálhatóságát, linearitását, és a referencia módszernek tekintett konjugált dién méréssel való összevethetőségét. Esszénk tudomásunk szerint az első standardizált módszer a HDL antioxidáns kapacitásának meghatározására, mely a fiziológiás prooxidáns hem alkalmazásának köszönhetően a korábbiaknál jobban közelíti az in vivo HDL-LDL interakciót is.

Módszerünkkel tesztelve egészséges önkéntesek HDL frakcióinak antioxidáns kapacitását, az a denzitással párhuzamosan növekvő értékeket mutatott. Eredményeink megfelelnek a *Kontush és mtsai* által leírtaknak, akik az LDL oxidációja során a különböző denzitású HDL alostályok propagációs fázist meghosszabbító hatását a $HDL2b < HDL2a < HDL3a < HDL3b < HDL3c$ sorrendben, tehát azok sűrűségével arányosan növekvőnek találták. A vizsgált szubpopulációk 15%-99%-kal, míg esetünkben 6%-94%-kal nyújtották meg az LDL oxidációhoz szükséges időt.

Egészséges önkénteseink HDL antioxidáns kapacitása, melyet átlagosan 127,67%-nak mértünk, szintén párhuzamba állítható az irodalmi adatokkal. Egy egészséges kontroll csoportban az LDL oxidáció során a HDL a propagációs fázist 20%-kal nyújtotta meg, míg két fluoreszcens esszével végzett kísérletben 30%-kal csökkentette a keletkező fluoreszcens szignál mértékét.

Második vizsgálatunkban az SLE-ben megfigyelhető felgyorsult érlemzesedés kialakulásában szerepet játszó hagyományos és betegség-specifikus rizikótényezőkre fókuszáltunk. Nem mutatkozott különbség beteg és kontroll között BMI és vérnyomás értékek tekintetében, így fiatal SLE-s betegekben az obezitás és hipertónia még nem jelent meg a kardiovaszkuláris rizikótényezők között. Pácienseink magasabb vércukor szintjének hátterében a steroid terápia mellékhatását feltételeztük. A korábbi kutatások eredményei arra utalnak, hogy a metabolikus szindróma, és komponensei közül az elhízás, a magasvérnyomás és a diszlipidémia gyakrabban fordulnak elő az SLE-s betegekben, mint egészséges társaikban. A tanulmányozott populációk azonban idősebbek (38-50 év) voltak, hosszabb betegség-tartammal és magasabb kumulatív steroid dózissal, mellékhatásainak (elhízás, inzulin rezisztencia, hipertónia) gyakoribb előfordulása mellett. Pácienseink betegség-aktivitása a SLEDAI pontszám alapján viszonylag magas volt. Ennek megfelelően lipoprotein profiljuk a főként az aktív szakra jellemző lupuszos mintát mutatott emelkedett TG és csökkent HDL-C szinttel, miközben összkoleszterin, LDL-C és Lp(a) szintjük nem tért el a kontrollétól. 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.

Az alacsony HDL-C szint független kardiovaszkuláris rizikófaktor. SLE-ben a HDL-C koncentráció csökkenésért elsősorban a gyulladás tehető felelőssé, melyet alátámaszt, hogy hatékony gyulladáscsökkentő terápia mellett nemcsak a betegség tünetei, hanem a HDL-C szintje is javul, gyakorlatilag normalizálódik. Betegeink valamennyi vizsgált gyulladással járó markere (We, CRP, IL-6, SAA, MCP-1, IC) 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 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. További HDL-C szint csökkenés forrása lehet a szabad koleszterin észterezésének zavara, melyet a lecitin-koleszterin acil-transzferáz végező aktivátorának az ApoA-I-nek jelenlétében, s mely így kisebb HDL méret mellett kevésbé hatékony RCT-t eredményez.

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 alacsonyabbnak, míg az akut fázis HDL (A-HDL) jellegzetes komponensének, a SAA-nak a szintjét jóval magasabbnak találtuk. Az SAA koncentráció a kutatások szerint a gyulladást kiváltó stimulustól és a citokin aktivációs kaskád résztvevőitől függ, termelésének fő induktorai az IL-1, TNF- α és az IL-6. Esetünkben az IL-6 és SAA között igen erős korreláció volt megfigyelhető, így valószínűsíthető a szerepe a SAA termelés kiváltásában. 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. STEMI-n átesett betegekben - a mi SLE-s populációkhoz hasonlóan - szignifikánsan emelkedett volt a CRP, IL-6 és SAA mennyisége, és a SAA koncentrációjuk korrelált a HDL csökkent antioxidáns és koleszterin efflux kapacitásával. Egészséges populációban prospektív vizsgálat során a keringő immunkomplex (IC) szintje direkt kapcsolatban állt az akut miokardiális infarktus kialakulásával, így az érlemeszesedés kockázati tényezőjének bizonyult. SLE-s pácienseink 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, nem detektáltunk piHDL-t. Meglepő módon, bár a betegek össz-HDL antioxidáns kapacitása számottevően csökkent volt, specifikus HDL antioxidáns kapacitásukat enyhén, de szignifikánsan emelkedettnek találtuk. Eredményeink a betegek megváltozott RCT-jára utalhatnak, mely miatt HDL-jük koleszterin tartalma csökkent, és így a részecskék fehérje/koleszterin aránya megnövekedett, amit magasabb ApoA-I/HDL-C arányuk is mutat. Hasonló képet kaptunk a PON1 arilészteráz aktivitásának vizsgálata kapcsán, mely a betegek szérumában jóval alacsonyabb, mégis egységnyi HDL-C-re vonatkoztatva meghaladja a kontrollét. A kissé megnövekedett enzim koncentráció a reakcióelegyben nagyobb antioxidáns aktivitással jár ugyan, az alacsony HDL-C koncentráció miatt mégsem jelent nagyobb antioxidáns védelmet a szervezet számára. 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. A PON1 csökkent paraoxonáz aktivitását munkacsoportunk már korábban is detektálta SLE-sek csoportjában, azonban a kissé idősebb, túlsúlyos, inaktív betegségű páciensek arilészteráz aktivitása és CRP-je nem különbözött az egészségesekétől, s lipidprofiljuk sem mutatott lupus 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 betegeinknél 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 érlelmeszesedés rizikótényezőinek szerepe a betegség lefolyása során annak aktivitásától függően változik: inaktív betegségszakaszban a tradicionális, aktív periódusban a betegség-specifikus, gyulladással összefüggő faktorok dominálnak.

McMahon és mtsai több tanulmányban is vizsgálták SLE-sek csoportjaiban a piHDL előfordulását és a HDL antioxidáns hatását. A piHDL előfordulási gyakorisága a SLE-s betegekben 29%, 45% illetve 48,2% (plakk+: 86,7%; plakk-: 40,7%) volt. A HDL gyulladási indexe egészségesekben 0,68, SLE-ben 1,02 értéket mutatott, a piHDL azonban a We-n és oxLDL-en kívül nem volt asszociált más gyulladási marker, sem a SLEDAI, ApoA-I és PON1 aktivitás értékeivel. 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 aktivitásával és negatívan a gyulladási markerek és betegségaktivitás szintjével. Az eredmények különbségének forrása lehet az eltérő vizsgálati 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. Vizsgálatunkban tehát elsőként mutattunk ki komplex inverz kapcsolatot a gyulladási markerek valamint a HDL antioxidáns kapacitás és PON1 aktivitás között fiatal aktivitási tüneteket mutató SLE-s betegek csoportjában.

Az oxLDL koncentráció hagyományos rizikótényezőktől független korrelációja a koronária-betegség jelenlétével és súlyosságával már ismert. Vizsgálati csoportjaink oxLDL szintje között nem találtunk szignifikáns eltérést,

mely arra utal, hogy SLE-seink HDL-e még bizonyos fokú védelmet biztosít az LDL oxidációjával szemben. A gyulladásos markerek (SAA, We, CRP) és SLEDAI korrelációja az oxLDL mennyiségével azonban mutatja, hogy a betegség fellángolásaitól szenvedők nagyobb oxidatív terhelésnek vannak kitéve.

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 kisHDL/nagyHDL 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 megnövekedett 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. 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 vörösvértest süllyedés értéke határozta meg, miközben a többi gyulladásos paraméterrel is szorosan korrelált. 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. Így 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.

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, lényegesen eltérő antioxidáns aktivitású HDL minta vizsgálatára, beleértve az egészséges és diszfunkcionális HDL-t valamint a HDL szubpopulációkat is. A fiziológiás 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 kockázatának hagyományos és betegség-specifikus faktorait. 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 rizikó tényezők jelenléte dominált. Valamennyi általunk vizsgálat gyulladásos marker (We, CRP, SAA, IL-6, MCP-1, IC) koncentrációja, valamint a betegségaktivitás (SLEDAI) is emelkedett volt, és kapcsolatot mutatott a megnövekedett 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 a PON1 arilészteráz aktivitás és a We voltak. Eredményeink arra utalnak, hogy SLE-ben a szisztémás gyulladás nemcsak a HDL mennyiségét csökkenti, hanem antioxidáns funkcióját is rontja, gyengítve antiaterogén hatását, és ezáltal hozzájárul a betegek megnövekedett kardiovaszkuláris rizikójához. Ennek köszönhetően a HDL antioxidáns kapacitás, a HDL szubpopulációk megoszlása és a PON1 aktivitás az SLE-s betegek kardiovaszkuláris rizikóbecslését pontosító új biomarkerekként szolgálhatnak.

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 kezét.

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.



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.**, Szekaneecz, Z., Balogh, Z.: Lipid és HDL paradoxon gyulladásoos reumatológiai kórképekben.
Metabolizmus. 12, 172-177, 2014.
4. Lórinicz, 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.

