

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A PARAOXONÁZ HATÁSA AZ OXIDATÍV DNS-KÁROSODÁSRA

DR. HARANGI MARIANN

Témavezető: Prof.Dr. Paragh György

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

I.sz. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA

DEBRECEN

2002

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
I. Bevezetés	5
II. Irodalmi áttekintés	8
1. Az LDL oxidáció szerepe az atherosclerosis kialakulásában	8
1.1 LDL oxidáció	8
1.2 A scavenger receptorok szerepe oxidált LDL felvételében	9
1.3 Az oxidált LDL szerepe az atherosclerosis kialakulásában	10
2. A HDL preventív szerepe az atherosclerosis kialakulásában	11
2.1 A HDL szerkezete	11
2.2 A HDL érrelmeszesedést gátló hatása	12
2.3 A HDL antioxidáns hatása	13
3. A paraoxonáz	14
3.1 A humán paraoxonáz-1	14
3.2 Paraoxonáz polimorfizmusok	14
3.3 A PON2 és PON3	15
4. Oxidatív DNS-károsodás	16
4.1 Az oxidatív DNS-károsodás folyamata és következményei	16
4.2 Single cell gel electrophoresis (Comet assay)	17
5. LightCycler	19
III. Célkitűzések	21
IV. Betegek és módszerek	22
V. Eredmények	30
Új eredmények	37
VI. Megbeszélés	38
VII. Összefoglalás	41
VIII. Irodalom	43
Saját közlemények, absztraktok, poszterek, előadások	53
IX. Köszönetnyilvánítás	59
X. Függelék	60

Rövidítések jegyzéke

8-OHdG: 8-hidroxi-6-dezoxiguanozin

8-OHG: 8-hidroxiguanidin

apo A-I: apolipoprotein A-I

apo B: apolipoprotein B

apo J: apolipoprotein J

Aryl: arilészteráz

BMI: body mass index

CETP: koleszterin észter transzfer protein

CRP: C-reaktív protein

EtBr: etidium-bromid

FMLP: formyl-Met-Leu-Phe

FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

GC-MS: gas chromatography- mass spectrometry

HDL: high-density lipoprotein

HPLC: high performance liquid chromatography

ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1

IFN- γ : interferon gamma

LCAT: lecitin koleszterin aciltranszferáz

LDL: low-density lipoprotein

LMP agaróz: alacsony olvadáspontú agaróz

LOX-1: lecitin-like oxidized LDL receptor

MCP-1: monocyte chemotactic protein 1

M-CSF: makrofág kolónia stimuláló faktor

MM-LDL: minimally modified LDL

NCEP: National Cholesterol Education Program

NMP agaróz: normál olvadáspontú agaróz

NO: nitrogén monoxid

NOS: NO szintetáz

PAFAH: platelet-activating factor acetil hidroláz

PCR: polimeráz láncreakció
PDGF: platelet-derived growth factor
PMA: forbolmirisztát acetát
PMNLs: polimorfonukleáris leukociták
PON: paraoxonáz
PPAR- γ : peroxisoma proliferator-activated receptor gamma
PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav
RFLP: restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
SCGE: single cell gel electrophoresis
ssDNA: egyszálú DNS
TBARS: thiobarbitursav reaktív anyagok
TGF- β : transforming growth factor beta
T_m: olvadáspont
VCAM-1: vascular adhesion molecule 1
VLDL: very low-density lipoprotein

I. Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek vezető helyen állnak a morbiditási és mortalitási statisztikákban, ezért az atherosclerosis pathomechanizmusának megismerése kiemelkedő jelentőségű. Az atherosclerosis kialakulásában az egyik legfontosabb rizikótényező a hypercholesterinaemia, ezen belül kiemelkedő jelentősége van az LDL-nek. Az érlemezsedés kezdeti lépése a “fatty streak” laesio kialakulása, melyet az LDL oxidatív módosulása indít el. Az LDL foszfolipidjeinek hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavjai oxidálódnak, melynek következtében a foszfolipáz A2-re érzékenyebbé válnak. A foszfolipáz hatására képződő zsírsavak érzékenyebbek az oxidációra, így az LDL-ben oxidatív láncreakció jön létre, melynek végeredménye az LDL fő apolipoproteinjének, az apoB100-nak a degradációja. Az oxidált LDL-t a macrophagok és macrophag-szerű sejtek az ún. scavenger receptoron keresztül képesek felvenni, így a sejtekben koleszterin felhalmozódását gátló negatív feedback elmarad, melynek következtében a sejtek koleszterin tartalma jelentősen megnő, és ún. foam sejtekké, vagy másnéven habos sejtekké alakulnak. Az oxidált LDL képes a nukleáris transzkripció faktor, az NFκB aktivációjára is, melynek eredményeként a monocyta kemotaktikus peptidek és adhézións molekulák expressziója fokozódik, elősegítve az atherosclerosis folyamatát.

A szervezet számos endothel-védő mechanizmussal rendelkezik. Az NO képes gátolni az LDL oxidációt, a monocyták adhézióját és penetrációját az érfalban. Zsíroidékony antioxidánsok (ubiquinol-10, alfa-tocoferol, béta-karotin, stb.) képesek megvédeni az apoB-t a lipid-peroxidációval szemben.

A lipid peroxidáció során a többszörösen telítetlen zsírsavak reaktív szabadgyökök hatására több lépésen keresztül peroxi, hidroperoxi, alkoxi ill. alkil gyökökké, majd aldehiddé vagy ketonná, és hidroxisavvá alakulnak. Ezek mindegyike képes DNS szál törést, DNS-protein keresztkötést, ill. DNS adduktot létrehozni, ezáltal genotoxikus hatást kifejteni.

A lipoprotein partikulumok közül a HDL képes gátolni az atherosclerosist. Ez a gátló hatás részben a HDL által biztosított reverz koleszterin transzporttal magyarázható, másrészt a HDL-hez kötött antioxidáns hatással. Ezért az antioxidáns hatásért jelentős részben a HDL-hez kötött észter hidroláz, a paraoxonáz (PON) felelős, mely főleg az apolipoprotein A1 és apolipoprotein J komponensekhez kötődik. A PON gátolja a réz-indukálta LDL oxidációt, valamint az oxidált LDL és a lipidek indukálta gyulladásos választ az artériafalban. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a lipidanyagcsere zavarával járó kórképekben, például diabetes mellitusban, krónikus veseelégtelenségben és vesetranszplantációt követően, valamint familiáris hypercholesterinaemiában a HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitás csökken.

Számos PON polimorfizmus ismert, melyek közül a Gln₁₉₂->Arg (Q->R) és a Leu₅₅->Met (L->M) a legfontosabb. Amikor a 192-es helyen glutamin van jelen az enzimből, akkor az aktivitás alacsony, ha ugyanebben a pozícióban arginin van, akkor átlagban nyolcszor nagyobb aktivitás figyelhető meg. Az enzim aktivitását elsősorban a 192-es pozícióban észlelt polymorphizmus határozza meg, míg az 55-ös pozícióban lévő polymorphizmus az enzim mennyiségét befolyásolja.

Nem tisztázott, hogy hyperlipidaemiás betegeknél a csökkent antioxidáns kapacitás és a szérumban nagy mennyiségben jelenlévő lipidek hogyan befolyásolják az oxidatív stressz

hatására kialakuló DNS-károsodást. Korábban nem vizsgálták a paraoxonáz esetleges preventív szerepét az oxidatív DNS-károsodásra. A két leglényegesebb paraoxonáz polimorfizmus meghatározását többnyire PCR, majd restrikciós enzimekkel történő hasítást követően elvégzett restrikciós fragmenthossz analízis segítségével végezték. Bár ezen módszerek széles körben elterjedtek, idő- és munkaigényesek, és számos hibalehetőséget hordoznak a nemspecifikus PCR termékek jelenléte miatt. Ezért szükséges újabb technikák alkalmazása, korszerű, gyors és hatékony módszer kifejlesztése ezen antioxidáns hatással rendelkező enzim leggyakoribb genetikai változatainak meghatározására.

II. Irodalmi áttekintés

1. Az LDL oxidáció szerepe az atherosclerosis kialakulásában

1.1 LDL oxidáció

Az LDL lipidfrakciója a többi lipoprotein részecskéhez hasonlóan két részre osztható: magja koleszterin-észtert és trigliceridet, míg a külső köpeny foszfolipideket, elsősorban lecitint, szfingomyelint és lizolecitint, valamint koleszterint tartalmaz. A fehérje frakció legfontosabb eleme az LDL fő apolipoproteinje, az ApoB-100. Az LDL zsírsav-tartalmának több mint fele többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA), főként linolénsav, valamint arachidonsav. Ezen PUFA-k szabadgyökök általi oxidatív károsodása ellen az LDL partikulumhoz asszociált alfa-tokoferol, karotinoid, ubiquinol, stb. védő hatást fejt ki. Az LDL oxidációjában fémionok, lipoxigenázok, myeloperoxidázok és reaktív nitrogén gyökök játszanak szerepet. A fémionok, pld. a Fe^{2+} és a Cu^{2+} hatására az endogén antioxidánsok kimerülését követően a telítetlen zsírsavak gyors oxidációjával lipid hidroperoxidok, majd reaktív aldehidek képződnek. Ezek a lizin gyökök pozitív töltésű ϵ -amino csoportjával reagálva az LDL töltését negatív irányba tolják el, így az nagyobb affinitással kötődik a scavenger receptorokhoz (1). A lipoxigenázok közül a 15-lipoxigenázt az endotheliális sejtek, valamint monocyták és makrofágok termelik. A többszörösen telítetlen zsírsavakat hidroperoxidokká alakítják, túltermelődésük korai érrelmeszesedéshez vezet LDL-receptor deficiens egerekben (2). A myeloperoxidázokat aktivált makrofágok termelik, melyek reaktív gyököket képeznek, pld. hypoklórossavat (HOCl), klóraminokat, tirozil gyököket, valamint nitrogén-dioxidot (NO_2), melyek oxidálják az LDL lipid- és fehérje-komponenseit (3). A nitrogén-monoxidot (NO), mely gátolja a Cu^{2+} által indukált LDL oxidációt, számos vaszkuláris sejt termeli. Aerob

körülmények között nitritté alakul, mely fiziológiás koncentrációban gátolja a myeloperoxidáz általi LDL oxidációt, az alkoxil és peroxil gyökök megkötésével pedig antioxidáns hatást fejt ki. Szuperoxid anionnal reagálva viszont peroxinitritté alakul (ONOO^-), mely hidroxil gyökökön keresztül oxidálja az LDL-t (4). A peroxinitrit szintén képes oxidálni a tetrahidrobiopterint, mely az NO szintetáz (NOS) fontos kofaktora, ezáltal csökkenti az NO termelést (5).

1.2 A scavenger receptorok szerepe az oxidált LDL felvételében

A módosult, így az oxidált LDL-t a makrofágok és makrofág-szerű sejtek az ún. scavenger receptorokon (SR) keresztül nagy mennyiségben, gyorsan és kontrollálatlanul képesek felvenni. A scavenger receptorok több osztályba sorolhatók. Az *A* osztályba sorolt SR-A az oxidált LDL felvételén keresztül fontos szerepet játszik az atheroszklerotikus plakk kialakulásában. Expresszióját a monocytákban és makrofágokban a M-CSF (makrofág kolónia stimuláló faktor) fokozza, míg az $\text{INF-}\gamma$ (interferon gamma), $\text{TGF-}\beta$ (transforming growth factor beta) és $\text{PPAR-}\gamma$ (peroxisoma proliferator-activated receptor gamma) ligandjai gátolják (6). A *B* osztályba tartozó CD36-ot thrombocyták, monocyták, endotheliális sejtek, valamint adipocyták expresszálják. Az oxidált LDL-hez kb. háromszor nagyobb affinitással kötődnek, mint a natív LDL-hez (7). A CD68, vagy macrosialin egy makrofágok és dendritikus sejtek által expresszált scavenger receptor, melynek pontos szerepe a humán atherosclerosis folyamatában még nem tisztázott, ám egerekben a minimálisan oxidált LDL fokozta a macrosialin expresszióját (8). Az ún. lecitin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) elsősorban az endotheliális sejteken, kisebb mértékben simaizom sejteken és

makrofágokon expresszálódik. A LOX-1-en keresztüli oxidált LDL felvétel a lipidek gyors felhalmozódásához vezet, valamint endothel aktivációt és diszfunkciót indukál (9, 10).

1.3 Az oxidált LDL szerepe az atherosclerosis kialakulásában

Az oxidatív módon módosult LDL az atherosclerosis kezdeti szakaszának több fontos eseményében is lényeges szerepet játszik.

A fatty streak kialakulásának első lépése a makrofágok adhézioja és infiltrációja az érfalba. A makrofágok az oxidált LDL nagy mennyiségű kontrollálatlan felvétele és tárolása következtében habos sejtekké alakulnak át. A mérsékelten oxidált LDL fokozza néhány adhézio molekula, így az intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) és a vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) expresszióját (11, 12). A minimally modified LDL (MM-LDL) elősegíti a monocyta proliferációt és differenciációt is az M-CSF endothel sejtek általi termelésének fokozásával (13). Az oxidált LDL fokozza a monocyta chemotactic protein 1 (MCP-1) endotheliális szekrécióját, ami elősegíti a monocyta infiltrációt az érfalba (14). Mindezek hatására a monocyták motilitása csökken, kitapadásuk és bejutásuk a keringésből a szubendotheliális térbe fokozódik. Az atherosclerosis progressziója során a simaizomsejtek fenotípusa megváltozik, melynek hatására az érfal intima rétegéből a mediába vándorolnak, ahol proliferálnak, növekedési hormonokat, extracelluláris mátrix glycoproteineket és metalloproteázokat termelnek (15). Az oxidált LDL az endothel és simaizomsejtek PDGF (platelet-derived growth factor) expressziójának fokozásával elősegíti a simaizomsejtek migrációját (16). A habos sejtek felhalmozódása és a simaizomsejtek migrációja és proliferációja következtében az intima

elvékonyodik, ami az artériafal vazodilatatív kapacitásának csökkenéséhez vezet. Az oxidált LDL az NO szintézis gátlásával érösszehúzó hatást fejt ki, és fokozza az endotheliális sejtek endothelin expresszióját (17, 18). Az endotheliális és simaizomsejtek apoptózisa az arterioszklerotikus plakk ruptúrájának egyik oka. Ennek hátterében az oxidált LDL oxisztatol-tartalma állhat, mely képes apoptózist indukálni a MAP és Jun/SAP kináz rendszeren keresztül, valamint fokozza a p53 termelést (19). Az endotheliális funkció zavarához fokozott thrombocyta-aggregáció és károsodott fibrinolitikus funkció társul. Az oxidált LDL a NO termelés csökkenésével, a prosztaciklin (PGI₂) termelés gátlásával, valamint egyéb prosztoglandinok termelésének fokozásával hozzájárulnak a thrombocyták fokozott mértékű adhéziójához és aggregációjához (20). Az oxidált LDL fokozza a szöveti faktor termelését, aktiválva ezzel az alvadási kaszkádot, ugyanakkor csökkenti a thrombomodulin transzkripciót, ezáltal prokoaguláns hatású (21, 22).

2. A HDL preventív szerepe az atheroszklerózis kialakulásában

2.1 HDL szerkezete

A HDL 70-100 Å átmérőjű, 50%-ban lipidek, 50%-ban fehérjék által alkotott makromolekuláris komplex, molekulatömege 200-400 kDa. A lipid-frakció 32%-ban koleszterin-észtert, 5%-ban szabad koleszterint, 55%-ban foszfolipidet és 8%-ban trigliceridet tartalmaz. A fehérje-frakciót 70%-ban ApoA1, 20%-ban ApoA2, 10%-ban egyéb fehérjék alkotják. Ultracentrifugálással a HDL legalább két további frakcióra bontható. A “könnyebb” HDL2 relatíve gazdag lipidekben, és kevesebb fehérjét tartalmaz a “nehezebb” HDL3-hoz képest. Az apolipoprotein-tartalom alapján megkülönböztetünk

kizárólag 4 db ApoA1-et (HDL2), 2 ApoA1-et és 2 ApoA2-t tartalmazó (HDL3), valamint apoE-ben gazdag HDL-t. Ez utóbbi HDL frakció “könnyebb”, mint a HDL2. A két fő apolipoprotein, az ApoA1 és az ApoA2 a májban szintetizálódik. Az apoA1-et a vékonybél is szintetizálja kisebb mennyiségben az ApoA4-el együtt (23). A májsejtekben és a bélhámsejtekben az ATP binding cassette transporter ABC1 képes megkötni a szabad apolipoproteineket, pld. az ApoA1-et, és foszfolipid, valamint koleszterin hozzáadásával lapos, korong alakú nascent HDL-t képezni, mely főként apoE-t és apoC-t tartalmaz. A keringésben a perifériás sejtekből a lecitin koleszterol aciltranszferáz (LCAT) hatására a HDL koleszterin észtert vesz fel, ezzel kialakul a még mindig korong alakú HDL3. Ez további koleszterin észter felvételével gömb alakú HDL2-vé alakul, miközben az apoE tartalma apoA1-re cserélődik. A HDL2 egy kisebb része ismét HDL3-má alakul a hepatis lipáz hatására, nagyobb része a koleszterin észter transzfer protein (CETP) segítségével a koleszterin észter tartalmát a VLDL és IDL részecskének adja át, vagy közvetlenül a májba juttatja az SR-BI receptorokon keresztül. (24).

2.2 A HDL érelmeszesedést gátló hatása

Az atherosclerosis kezdeti lépéseként monocyták belépnek a keringésből a szubintimális térbe, majd a makrofággá alakult monocyták felveszik az oxidált LDL-t scavenger receptoraikon keresztül. Az így felvett koleszterin és koleszteril észter felhalmozódásának hatására azok habos sejtekké alakulnak át. A HDL több ponton képes gátolni ezt a folyamatot. Közvetlen hatást fejt ki az érfalra, mivel gátolja a monocyták a VCAM-1 és ICAM-1 által mediált endotheliális adhézioját (25). Gátolja az LDL retencióját és aggregációját az érfalban. Csökkenti az LDL oxidáció mértékét, azaz antioxidáns hatást

fejt ki (26). Fokozza a koleszterin kijutását a habos sejtekből, mely a keringésen át a májba jut (reverz koleszterin transzport) (24). Elősegíti az endothel sejtek által termelt anti-thrombocytá eikozanoid, a poszttaglandin I₂ (prostacyclin) képzését, csökkentve ezzel a thrombocytá aggregációt, így az atheroszklerotikus plakk progresszióját (23).

2.3 A HDL antioxidáns hatása

A szérum HDL koncentráció és az érlemezsedés közötti negatív korrelációt számos multicentrikus vizsgálat bizonyította. A HDL érlemezsedést gátló hatásának tisztázása intenzív kutatási terület a mai napig. Az eddigi eredmények alapján a reverz koleszterin-transzportban játszott központi szerepe, valamint az érfalra gyakorolt direkt atheroprotektív hatása mellett kiemelt jelentőséggel bír a HDL antioxidáns hatása, melyért jelentős részben a HDL-hez kötött enzimek felelősek. Közülük legjelentősebb a humán paraoxonáz-1 (PON1), de jóval kisebb mértékben néhány egyéb HDL-hez kötött enzim pld. platelet-activating factor acetil hidroláz (PAFAH), lecitin-koleszterol aciltranszferáz (LCAT) és az apolipoprotein A1 (ApoA1) is hozzájárul a HDL lipid peroxidációt gátló hatásához. A HDL antioxidáns hatásához hozzájárul a lipid hidroperoxidok eltávolítása az LDL-ből, azok elszállítása a májba a reverz transzportmechanizmus részeként, valamint egyes prooxidáns hatású átmeneti fémek megkötése (27).

3. A paraoxonáz

3.1 A humán paraoxonáz-1

A humán paraoxonáz-1 (PON1) egy 345 aminosavból felépülő, 43 kDa molekulasúlyú fehérje. Szerkezete emlősökben meglehetősen konzervatív, míg madarakban, halakban, és más gerincesekben hiányzik. Génje a 7.kromoszóma hosszú karján helyezkedik el a q21.3 és q22.1 közötti régióban (28, 29).

A PON1 egy kalcium dependens észteráz, mely a májban szintetizálódik. A PON1 a szérumban csaknem kizárólag az apolipoprotein A1-et (apoA1) és clusterint (apoJ) tartalmazó HDL szubpopulációhoz kötött (30). Képes reverzibilis módon megkötni és hidrolizálni az organofoszfátokat, valamint számos egyéb szerves észtert (31). A lipid-peroxidációt gátló hatását, mely gátolja az LDL oxidatív módosulását, in vitro és in vivo tanulmányok igazolták (32, 33, 34).

Csökken PON1 aktivitást észleltek számos olyan kórképben, amelyben az érrelmeszesedésre való hajlam fokozott, például familiáris hiperkoleszterinémiában, 1-es és 2-es típusú diabetes mellitusban (35, 36), veleszületett HDL hiányban (37), miokardiális infarktusbán (38), krónikus vesebetegségben (39), dializált és veseátültetett betegekben (40).

3.2 Paraoxonáz polimorfizmusok

A PON1 aktivitást részben genetikai tényezők határozzák meg. A két leggyakoribb PON1 polimorfizmus a Gln₁₉₂->Arg (Q->R) és a Leu₅₅->Met (L->M). A 192-es lókus polimorfizmusának hatása a PON1 aktivitásra szubsztrátfüggő. Míg a *Q* alloenzim gyorsabban hidrolizálja a diazoxont, a sarint és más ideggázokat, addig az *R* alloenzim

nagyobb affinitást mutat a paraoxon vagy fenitroxon iránt. Más szubsztrátokat, mint például a fenilacetátot mindkét alloenzim hasonló sebességgel bontja (41). Az 55-ös lokusz polimorfizmusa a 192-es locus polimorfizmusától független módon, kevésbé markánsan, de szintén befolyásolja a PON1 aktivitást, elsősorban az enzim koncentrációjának emelésén keresztül (42).

A PON1 promoterének polimorfizmusai közül leggyakoribb a Cys-107->Thr, mely befolyásolja a PON1 gén expresszióját és szérumban koncentrációját, független rizikótényezőnek bizonyult koszorúér-betegségben szenvedő 2-es típusú diabeteses betegekben (43). Számos egyéb PON1 promoter polimorfizmus ismert, ezek hatása a PON1 koncentrációra és aktivitásra egyelőre tisztázatlan (44).

3.3 A *PON2* és *PON3*

A géncsalád másik két ismert tagja a paraoxonáz-2 (PON2) és a paraoxonáz-3 (PON3), melyek biológiai szerepe egyelőre csak részben tisztázott. A PON2-t a máj mellett számos egyéb szerv is expresszálja, például a vesék, a herék és az agy (45). A humán PON3 a PON1-hez hasonlóan a májban szintetizálódik, HDL-hez kötött formában van jelen a szérumban, és gátolja az LDL oxidációt (46). Nyulakban laktonáz-aktivitással rendelkezik (47). A három humán PON gén aminosav szinten 65%-ban mutat azonoságot, így feltételezhető, hogy a géncsalád tagjai duplikáció révén keletkeztek (48).

4.Oxidatív DNS-károsodás

4.1 Az oxidatív DNS-károsodás folyamata és következményei

A DNS szerkezetének károsodása, legyen az bázispár-mutáció, delécio, inzercio vagy egyéb változás, a karcinogenezis első lépését jelenti. A DNS-károsodás többnyire oxidáció, ritkábban metiláció, depurináció, vagy dezamináció eredménye. A DNS oxidatív károsodásáért részben a reaktív oxigéngyökök felelősek: a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil- ($OH\cdot$), peroxil- ($RO_2\cdot$) és alkoxil-gyökök ($RO\cdot$), részben azok az ágensek, melyek hajlamosak reaktív oxigéngyökké konvertálódni, mint a HOCL, peroxinitrit ($ONOO^-$), szinglet oxigén (1O_2) és hidrogén-peroxid (H_2O_2). A metiláció, depurináció, vagy dezamináció hátterében a reaktív nitrogéngyökök, mint a nitrogén-oxid gyök ($NO\cdot$), nitrogén-dioxid gyök ($NO_2\cdot$) és a már említett peroxinitrit állnak (49).

A lipid-peroxidáció a DNS-károsodás másik, ritkábban tárgyalt útja. A lipid-peroxidáció során a többszörösen telítetlen zsírsavak a már említett reaktív oxigéngyökök hatására több lépésen keresztül számos olyan köztes reaktív terméké alakulnak át, melyek a DNS-károsodását okozzák. A láncreakció kezdeti szakaszában a PUFA metilén csoportja reagál a reaktív oxigéngyökökkel, a propagációs szakaszban peroxi-, hidroperoxi-, alkoxi, illetve alkilgyökké, a terminációs szakaszban aldehiddé, ketonná vagy hidroxisavvá alakul. Ezek bármelyike képes DNS száltörést, DNS-protein keresztkötést, illetve DNS adduktot létrehozni azokon a pontokon, melyeket 'nuclear membrane-chromatin attachment site'-nak neveznek. A sejtmag ezen területein a DNS fizikailag is olyan közelségbe kerül a sejtmag membránjának lipidjeihez, mely lehetővé teszi a fent ismertetett reakciókat (50).

A különböző ágensek eltérő hatást fejtenek ki a DNS szerkezetére. A leggyakoribb az oxidatív báziskárosodás a 8-hidroxiguanidin (8-OHG), amit kezdetben használtak az oxidatív DNS-károsodás mértékének jellemzésére is. A vizeletben mért 8-OHG szintjét azonban táplálkozási tényezők befolyásolják, ezért a gyakorlatban a 8-hidroxi-6-dezoxiguanozin (8-OHdG) szintet mérik HPLC (high pressure liquid chromatography) vagy GC-MS (gas chromatography- mass spectrometry) technikával (49). Számos egyéb módszert is említ az irodalom az oxidatív DNS-károsodás mérésére, ezek egyike az ún. single cell gel electrophoresis.

4.2 Single cell gel electrophoresis (Comet assay)

A comet assay (single cell gel electrophoresis) egy, a DNS-károsodás meghatározására kifejlesztett módszer, amit széles körben használnak a karcinogenezis és a geriátriai kutatásban, valamint a toxikológiában a különböző környezeti ágensek genotoxikus hatásának vizsgálatára. Elsőként a svéd Rydberg és Johanson alkalmazta a DNS-károsodás detektálására az agaróz gélbe ágyazott sejtek elektroforézisét 1978-ban (51), majd 1998-ban Singh alkalmazta a módszert alkalikus puffert használva (52), mely megfelelően szenzitívvé tette a comet-assay-t genotoxicitási vizsgálatok elvégzéséhez. A módszer lényege, hogy az izolált sejteket tárgylemezre öntött agaróz gélbe ágyazzák, detergenssek és magas koncentrációjú sók tartalmazó oldat segítségével lizálják, majd alkalikus pufferbe helyezve elektroforézist alkalmaznak. A negatív töltésű DNS az elektroforézis során az anód felé vándorol. A DNS jelölésére etidium-bromidot (EtBr) alkalmaznak. Fluoreszcens mikroszkóppal értékelve a lemezeket a nukleuszokból elvándorló DNS-száltörések miatt képződő fragmentumok vagy hurkok üstököshöz

hasonló csóvát alkotnak, melyről a módszer a nevét kapta. A csóva nagysága a DNS-károsodás mértékével arányos (52). A módszer előnye, hogy individuálisan értékelhetőek a sejtek, ezért a genotoxicitás szempontjából eltérően viselkedő sejtpopulációk felismerhetőek, bármely eukarióta sejten alkalmazható, ezenkívül gyors, kevésbé műszerigényes, viszonylag olcsó, így széles körben alkalmazható. Az ismertetett módszer DNS egyesszál-törések kimutatására alkalmas már egészen kis mértékű károsodás esetén, mivel az egyesszál-törések relaxációt okoznak a DNS többszörösen csavart szerkezetében, így a sérült DNS-lánc hosszabb-rövidebb hurkokat képez. A különböző DNS-t érintő reakciók, legyen az bázis vagy nukleotid excíziós repair, direkt száltörés, interkaláló ágensek, DNS adduktok miatti excízió, endonukleáz, lizoszómális DNS hidroláz vagy topoizomeráz hatás, végül egyesszál-töréshez vezetnek, így comet-assay segítségével kimutathatóak. A különböző antioxidánsok DNS-károsodás szempontjából kifejtett preventív hatásának megítélésére a sejteket oxidatív hatásnak teszik ki, például H_2O_2 alkalmazásával. A H_2O_2 egyrészt reaktív OH. gyököt képezve fejt ki károsító hatását, mely a Fenton-reakció során képződik átmeneti fémek, például Fe^{2+} jelenlétében, másrészt nukleázokat aktivál, melyek hasítják a DNS-láncot (53).

A comet-assay-t egyre elterjedtebben alkalmazták az antioxidánsok hatékonyságának megítélésére. Jenkinson és mtsai az E-vitamin és a magas PUFA tartalmú diéta hatását vizsgálták a DNS-károsodásra (54). Collins és mtsai a szérumban karotinoidok preventív hatását írták le (55). Korábban nem vizsgálták azonban a paraoxonáz esetleges szerepét az oxidatív DNS-károsodás prevenciójában.

5. LightCycler

Különböző gének polimorfizmusainak detektálására évtizedeken keresztül a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) analízist alkalmazták. Ez a módszer idő- és munkaigényes, nem automatizálható, mivel az amplifikációt követően további lépésekre, mint például restrikciós enzimekkel történő hasításra és gélelektroforézisre van szükség, így a hibák, például a kontamináció lehetősége nem elhanyagolható. Az utóbbi években fluoreszcens technikára épülő ún. real-time PCR készülékeket fejlesztettek ki nagy létszámú populáción elvégzendő gyors génpolimorfizmus-vizsgálatokhoz, ezek egyike a LightCycler (Roche Molecular Biochemicals).

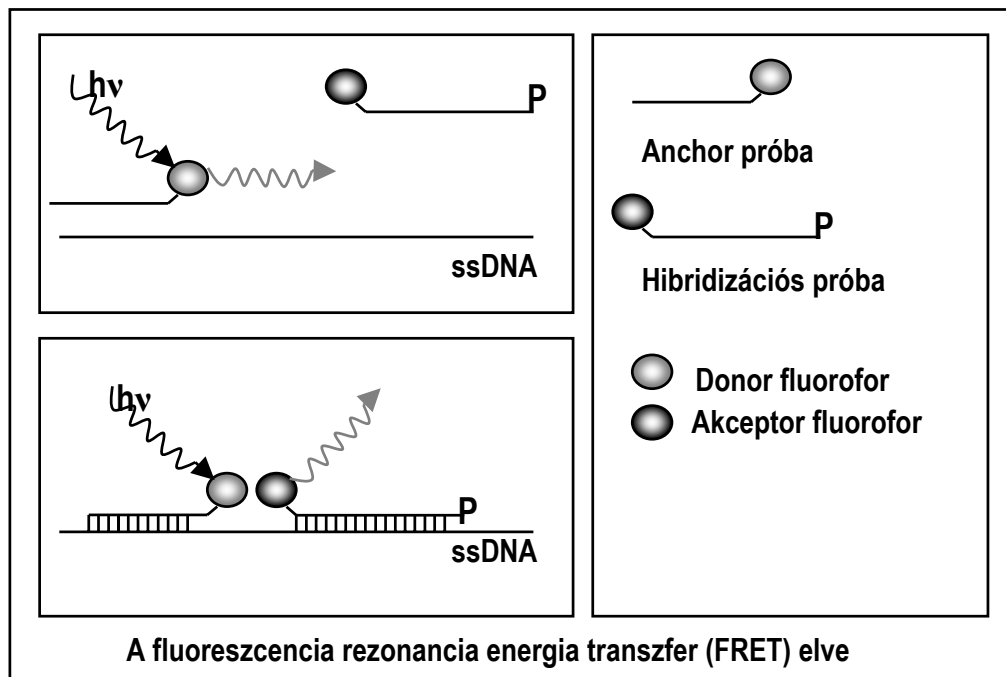
A LightCycler egy mikrovolumen fluorométerrel kombinált gyors ciklusú PCR készülék. A polimorfizmus detektálásához szekvenciaspecifikus, fluoreszcens jelöléssel ellátott detektáló próbák szükségesek, ezek alkalmazásával nincs szükség a PCR-t követő lépésekre, így a módszer rendkívül effektív, gyors, és a termék mennyisége is meghatározható. Az alkalmazott üvegkapillárisok gyors hőmérsékletváltozása, a reakcióelegy kis mennyisége miatt a ciklushossz erősen lerövidült. A vizsgálni kívánt génszakasz PCR-ral történő amplifikációjának monitorozására az ún. fluorescence resonance energy transfer (FRET) jelenséget használják (1.ábra). Detektáló próbát terveznek a vizsgált génszakasszal komplementer módon úgy, hogy a variábilis nukleotid a próba közepére essen. A két hibridizációs próba tervezése oly módon történik, hogy azok fluoroforral történő jelölése egymáshoz közel, 1-3 nukleotidnyi távolságra kerüljön. A detektáló próba 3' végén elhelyezkedő ún. donor fluorofor emissziós spektruma átfed a másik hibridizációs próba 5' végén elhelyezkedő ún. akceptor fluorofor excitációs spektrumával. Ez az előbbit gerjesztve az energiát közvetít az akceptor fluoroforra,

melynek emittált fluoreszcenciája detektálható, és a PCR termék mennyiségének követésére alkalmas, mégpedig ciklusról ciklusra, így a PCR hatékonysága folyamatosan monitorozható.

A mutáció-analízishez ún. olvadási görbéket alkalmaznak. A PCR-t követően a reakcióelegyet kb. 45 °C-ról lassan kb. 75 °C-ra hevítik, így a donor fluoroforral jelölt detektáló próba fokozatosan levál a vizsgált génszakasztól, mely az akceptor fluoroforral jelölt próba által kibocsátott fluoreszcencia intenzitásának csökkenésével követhető. Ha a komplementer génszakasz eltér a detektáló próba szekvenciájától, az olvadás alacsonyabb hőmérsékleten következik be, így a fluoreszcencia időbeli változása megváltozik. Az olvadási görbéket matematikai eszközökkel olvadási csúcsokká konvertálják, melynek segítségével a génvariációk egymástól biztonságosan és könnyedén elkülöníthetők (56).

A módszert számos gén esetében már sikerrel alkalmazták, például apolipoprotein B3500 mutáció, apolipoprotein E izoformok, prothrombin G20210A mutáció, metiléntetrahidrofolát reduktáz C677T mutáció, és az α 1-antitripszin Z és S allél kimutatására (57, 58, 59).

1.ábra



III. Célkitűzések

1. Az egészséges kontrollok és a hyperlipidaemiás betegek lymphocytaiban a hidrogén-peroxid által indukált oxidatív DNS-károsodás meghatározása comet-assay alkalmazásával.
2. Ezen betegek granulocytái szuperoxid anion termelésének meghatározása nyugalmi és stimulált állapotokban, és összevetése a DNS-károsodás mértékével.
3. A szérum lipidszintek, a lipid-peroxidációt jellemző plazma TBARS, valamint NO, és egy másik nem enzimatis antioxiidáns, az alfa-tokoferol szintjének meghatározása, és összevetése a DNS-károsodás mértékével.
4. A HDL-hez kötött antioxiidáns hatású paraoxonáz aktivitásának meghatározása, és összevetése a DNS-károsodás mértékével.
5. Egy korábban paraoxonáz polimorfizmus detektálásra még nem alkalmazott, real-time PCR módszer kifejlesztése a két leggyakoribb paraoxonáz polimorfizmus, a Leu₅₅→Met és a Gln₁₉₂→Arg genotipizálására.

VI. Betegek és módszerek

Betegek

A beválasztási kritériumok az alábbiak voltak: 21-70 év közötti életkor, korábban nem kezelt II/a típusú hypercholesterinaemia (szérum triglicerid $<2,2$ mmol/l, LDL koleszterin $>4,2$ mmol/l). Kizárási kritériumok voltak: máj-, endocrin- vagy vesebetegség (szérum kreatinin szint >130 μ mol/l), alkoholizmus, gyógyszerfüggőség, epekövesség, malignus alapbetegség, terhesség vagy szoptatás, antikoaguláns- vagy lipidcsökkentő kezelés, dohányzás. Valamennyien a National Cholesterol Education Program (NCEP) step 1 diétáját követték.

A vizsgálat ideje alatt a betegek fizikai aktivitása lényegesen nem változott. A bakteriális vagy vírusos fertőzésre utaló laboratóriumi markerek (CRP, leukocytaszám, Westergreen) normál tartományban voltak. A kontroll csoportot a klinika járóbeteg szakrendelésén megjelenő, rutin belgyógyászati fizikális vizsgálat, laboratóriumi vizsgálatok, EKG alapján egészségesnek bizonyult, nem dohányzó, gyógyszeres kezelésben nem részesülő egyének alkották.

A betegek felvilágosítást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá a vizsgálatba való bevonásukhoz. A vizsgálat a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottságának szabályzata szerint történt.

Laboratóriumi vizsgálatok

Minimum 12 órás éhezést követően reggel éhgyomorra történt a vérvétel. A vérmintákból hemoglobin, hematokrit, fehérvérsejt-szám, májenzimek, urea, kreatinin, CK, fibrinogén, C-reaktív protein, bilirubin, húgysav, vércukor, összkoleszterin, HDL-C, triglicerid,

apoA₁ és apoB₁₀₀, lipoprotein(a), szérumból paraoxonáz aktivitás meghatározást végeztünk. A lipidparaméterek meghatározása friss szérumból történt. A paraoxonáz aktivitás mérése –20°C-on tárolt szérumból történt.

Szérumból lipidszintek meghatározása

A szérumból koleszterin- és triglicerid-szintet Boehringer-Mannheim enzim kittel, a HDL-koleszterint foszfor wolframát-magnézium kicsapós módszerrel határoztuk meg. Az LDL-C értékét a Friedewald-formula alapján számítottuk ki. Az apolipoproteinek mérése immun-nefelometriás módszerrel történt (Orion Diagnostica kit).

Alfa-tokoferol meghatározása

Az alfa-tokoferol extrakciója 500 µg fehérje/ml koncentrációjú LDL-ből történt etanol és metanol 1:1 arányú keverékének hozzáadásával, n-hexánnal. A szerves réteget N₂ alatt bepároltuk, metanolban oldottuk, majd HPLC (Hitachi-Merck) –hez csatolt fluoreszcens detektort alkalmaztunk 292 nm-es excitációs, valamint 325 nm-es emissziós hullámhosszon.

Paraoxonáz aktivitás meghatározása

A szérumból paraoxonáz aktivitás mérésekor paraoxont (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát; Sigma) alkalmaztunk szubsztrátként, amely a szérumban levő paraoxonáz enzim hatására 4-nitrofenollá alakul át, abszorpciónövekedést okozva 412 nm-en. Méréskor 50 µl szérumból 1 ml Tris/HCl puffert (100 mmol/l, pH:8,0) adtunk, mely 2 mmol/l CaCl₂-t és 5,5 mmol/l paraoxont tartalmazott. A 4-nitrofenol keletkezését 412 nm-en, 25°C-on

köveltük Hewlett-Packard 8453 UV-Visible spektrofotométerrel. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens ($17100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segítségével történt. 1M NaCl jelenlétében az enzim aktív helyének konformációs állapota megváltozik, amely a paraoxon könnyebb kötődését és gyorsabb átalakulását eredményezi.

Arilészteráz aktivitás meghatározása

Az arilészteráz aktivitás meghatározása fenilacetát szubsztrát hidrolízisével spektrofotometriás módszerrel történt. Az enzimaktivitást U/ml egységben fejeztük ki. 1 U az arilészteráz aktivitás, ha 1 perc alatt az enzim 1 μmol fenilacetátot hidrolizál.

NO meghatározása

A meghatározás friss plazmából Griess-reakcióval történt (60). A friss plazmát ZnSO_4 – tal ill. Cd-szuszpenzióval kezeltük. Centrifugálás után a felülúszót 1%-os szulfanilamid és 0,1%-os naftil-etilén-diaminnal inkubáltuk 10 percig 60°C -on. A keletkező színt 546 nm-en fotometráltuk.

TBARS meghatározás

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

Polymorphonuclearis granulocyták szeparálása

A polymorphonuclearis granulocyták szeparálása sűrűséggradiens centrifugálással történt Boyum módszere szerint (61). A sejtek 96%-a tripánkék festés alapján életképes volt.

A szuperoxid anion termelés mérése

A szuperoxid anion termelést ferri-citokróm-C redukált mennyiségének mérésével határoztuk meg spektrofotometriás módszerrel 550 nm-en. A nyugvó sejtek szuperoxid anion termelése mellett 10^{-8} M formyl-Met-Leu-Phe-vel (FMLP) és 10^{-8} M forbol-mirisztát-acetáttal (PMA) történő stimulációt követően is meghatároztuk a szuperoxid anion termelést. Az eredményeket nmol/ 10^6 sejt/perc egységben fejeztük ki.

Lymphocyták szeparálása perifériás vérből

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

Single cell gel electrophoresis (comet-assay)

A szeparált humán lymphocytákat 600 μ l, 1%-os LMP agarózban (pH 7,4) szuszpendálva 37 °C-on érdesített felszínű üveg tárgylemezre pipettáztuk, melyet előzőleg 1% NMP agarózzal fedtünk. Az agarózt 10 percig 4 °C-on tartottuk, majd a tárgylemezeket 50 μ l H₂O₂-t tartalmazó 100 ml PBS-ben inkubáltuk 35 percig. Ezután a tárgylemezeket 4°C-os lizáló pufferbe (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂ EDTA, NaOH, 1%, Triton X-100, pH=10,0) helyeztük 60 percre, eltávolítva ezzel a sejtfehérjéket. A lizist követően a

tárgylemezeket 30 percre horizontális elektroforézis tartályba helyeztük, mely 1 mM Na₂EDTA, 0,3 M NaOH, pH=2,7 puffert tartalmazott, majd futtattuk (25 V, 300 mA, 20 perc, 15°C). A tárgylemezeket háromszor 3 percig mostuk 4°C-os neutralizáló pufferrel (0,4 M Tris-HCl, pH=7,5), 50 µl Ethidium bromiddal (EtBr) jelöltük, majd fedőlemezzel fedtük.

A comet-assay értékelése vizuális módszerrel történt. Az EtBr-al megjelölt nukleuszokat Zeiss fluorescens mikroszkóp segítségével értékeltük. Összesen 100 cometet értékeltünk vizuálisan tárgylemezenként, öt osztályba sorolva őket a csóva intenzitása alapján, így 0,1,2,3 vagy 4 értéket kaptak az éptől a maximálisan károsodottig, ezért az összérték lemezenként 0 és 400 között volt.

Genomiális DNS preparálás

A genomiális DNS preparálását egészséges egyének EDTA-val alvadásgátolt perifériás vénás véréből végeztük QIAamp Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) segítségével.

A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált primerek és hibridizációs próbák

A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált primereket és hibridizációs próbákat az 1. táblázat tartalmazza. A PON1-55 antisense primert Akhmedova *et al.* (Akhmedova), a PON1-192 sense primert Mackness *et al.* (Mackness) tervezte. A PON1-55 detektáló próbát a kevésbé gyakori “Met” variánsra terveztük. A primereket és hibridizációs próbákat a TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) szintetizálta.

1. Táblázat. PCR primerek és hibridizációs próbák

Primerek	Szekvencia ^a	Orientáció	PCR termék
PCR primerek			
PON1-55F	ATTCTGAACCTATTAAAGAAGAGTGATG	Sense	240 bp
PON1-55R	CTTAAACTGCCAGTCCTAGAAAACG	Antisense	
PON1-192F	TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG	Sense	199 bp
PON1-192R	GACATACTTGCCATCGGGTGAA	Antisense	
Detektáló próbák			
PON1-55DA	GCTCTGAAGACA <u>T</u> GGAGATA-F ^b		
PON1-192DA	TGACCCCTACTTACA <u>A</u> TCCT-F		
Anchor próbák			
PON1-55A	LCRed 640-GCCTAATGGACTGGCTTTCATTAGCTCTGT-ph ^b		
PON1-192A	LCRed 640-GAGATGTATTTGGGTTTAGCGTGGTCGTAT-ph		

^aA szekvenciákat 5' - 3' irányban tüntettük fel (accession number: AC004022). A PON1-55 detektáló próbát a kevésbé gyakori, A allélra terveztük. A polimorfizmusok helyét aláhúzással jelöltük.

^bF: fluorescein, ph: phosphoryl csoport.

Real-time polimeráz láncreakció és olvadáspont-analízis

A PCR-t és az olvadáspont-analízist LightCycler real time PCR (Roche) készüléken végeztük, 20µl térfogatú üvegkapillárisban (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). A 20µl-es reakcióelegy összetétele a következő volt: 9µl of H₂O, 1µl 25 mmol/l koncentrációjú MgCl₂, 2 µl 5 pmol/µl koncentrációjú PON1-55F és PON1-55R, illetve PON1-192F és PON1-192R primerek, 1 µl 4 pmol/µl koncentrációjú PON1-55DA és PON1-55A, illetve PON1-192DA és PON1-192A hibridizációs próbák, és 2 µl DNA-

Master Hybridization Probes (Roche Molecular Biochemicals), amely Taq polimerázt, reakció puffert, dNTP elegyet, és 10 mmol/l MgCl_2 -ot tartalmazott 10× koncentrációban. Az amplifikációhoz genomiális DNS-t (2 μl , 50-200 ng) használtunk.

A PON1-55 genotipizáláshoz a következő programot alkalmaztuk: kezdeti denaturációt (94°C, 600 s) követően, 50 ciklust alkalmaztunk a következő paraméterekkel: denaturáció 94°C-on 0 s, hibridizálás 50°C-on 5 s, és szintézis 72°C-on 2 s, 20°C/s-os lépéssel. A fluoreszcenciát a hibridizáció minden 5. másodpercében detektáltuk. Az amplifikációt követően olvadási görbét képeztünk, 150 s-os denaturációt (94°C), majd 30 s-os 45°C-on történő inkubációt követően a mintákat lassan 75°C-ig melegítettük 0.2°C/s sebességgel, közben folyamatosan monitoroztuk a fluoreszcencia-intenzitás csökkenését. Az olvadási görbéhez az x tengelyen a hőmérsékletet, az y tengelyen a $(-dF/dT)$ -t jelöltük.

A PON1-192 genotipizálás programja a következő volt: kezdeti denaturációt (94°C, 600 s) követően 50 ciklust alkalmaztunk az alábbiak szerint: 94°C-on 600 s, hibridizálás 57°C-on 5 s, és szintézis 72°C-on 2 s, 20°C/s-os lépéssel. A fluoreszcenciát a hibridizáció minden 5. másodpercében detektáltuk. Az amplifikációt követően olvadási görbét képeztünk: 180 s-os 45°C-on történő inkubációt követően a mintákat lassan 75°C-ig melegítettük 0.2°C/s sebességgel, közben folyamatosan monitoroztuk a fluoreszcencia-intenzitás csökkenését. Az olvadási görbéhez az x tengelyen a hőmérsékletet, az y tengelyen a $(-dF/dT)$ -t jelöltük.

Az amplifikáció és a fluoreszcencia detektálás ugyanabban a zárt kapillárisban történt, kevesebb mint 40 perc alatt.

Statisztikai módszerek

Statisztikai analízishez a PC SAS (6.12) rendszert használtuk (SAS Institute, Cary NC 275313 USA), leíró statisztikát alkalmaztunk a vizsgált paraméterekre (átlag $\pm$ SD), míg a paraméterek időbeli változását ANOVA teszttel, ill. kétmintás t-próbával vizsgáltuk. A $p < 0,05$ valószínűségi szintet tekintettük szignifikánsnak. Az egyes paraméterek között korrelációs számítást végeztünk, t-próbát végezve $p < 0,05$ korrelációt tekintettünk szignifikánsnak.

V. Eredmények

A 7 kontroll és a 15 hyperlipidaemiás beteg adatait az 2.táblázatban foglaltuk össze. Nem találtunk szignifikáns eltérést a hyperlipidaemiás és a kontroll csoport alfa-tokoferol szintjében (30.9 ± 5.2 ; $36.77 \pm 6.8 \mu\text{M}$; $p > 0.05$).

2.Táblázat. A kontroll csoport és a hyperlipidaemiás betegek demográfiai adatai, lipid paramétereit, és alfa-tokoferol értékeit

	Kontroll (n= 7)	Hyperlipidaemiás (n= 15)
Nem	2 férfi, 5 nő	4 férfi, 11 nő
Életkor (év)	53.4 ± 8.07	54.6 ± 10.25
BMI (kg/m^2) ^a	25.7 ± 2.15	26.3 ± 3.26
Koleszterin (mmol/l)	4.71 ± 0.89	$7.63 \pm 0.90^*$
Triglicerid (mmol/l)	1.06 ± 0.52	$2.09 \pm 0.11^*$
HDL (mmol/l)	1.43 ± 0.31	1.48 ± 0.25
LDL (mmol/l)	2.60 ± 0.60	$5.20 \pm 0.85^*$
Alfa-tokoferol (μM)	30.90 ± 5.2	36.77 ± 6.8

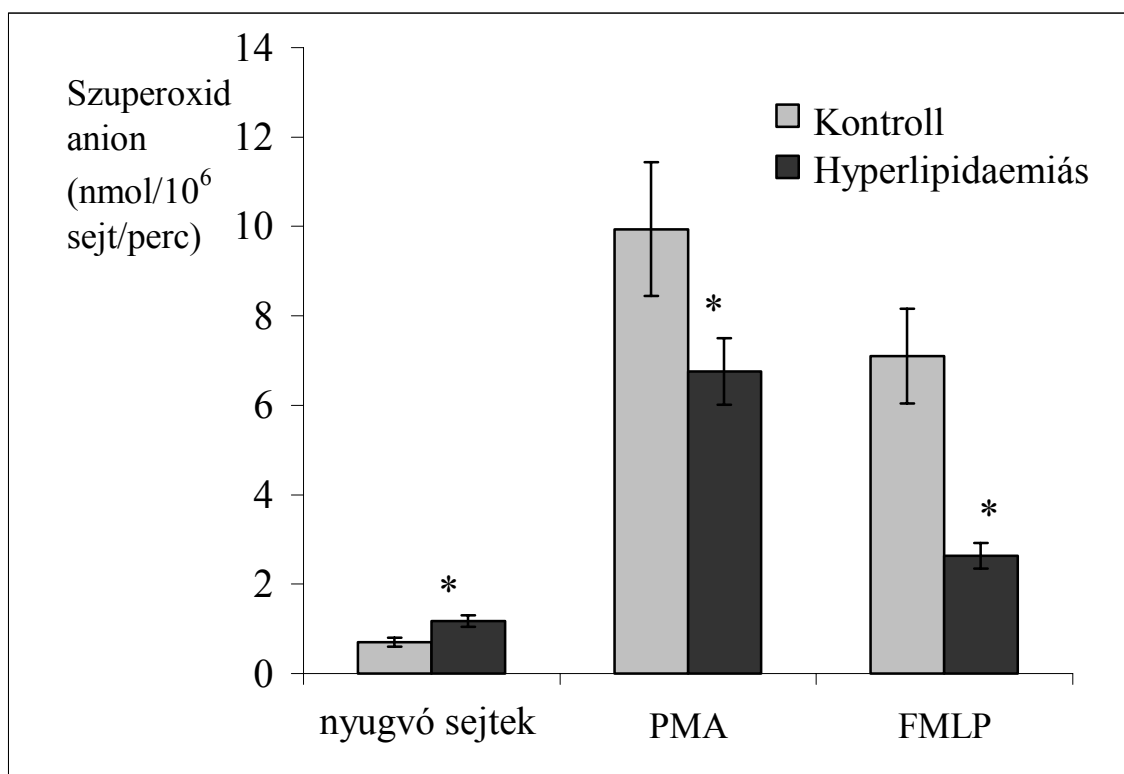
^a BMI= body mass index

* $p < 0.05$

Szuperoxid anion termelés

A nyugvó granulocyták alapoxidációs szintje a kontroll csoportban $0.7 \pm 0.13 \text{ nmol}/10^6 \text{ sejt/perc}$, hyperlipidaemiás csoportban $1.17 \pm 0.47 \text{ nmol}/10^6 \text{ sejt/perc}$ volt. Az FMLP-vel történt stimulációt követően szignifikánsan emelkedett a szuperoxid anion termelés mind a kontroll ($7.1 \pm 1.67 \text{ nmol}/10^6 \text{ sejt/perc}$; $p < 0.001$), mind a hyperlipidaemiás csoportban ($2.63 \pm 0.92 \text{ nmol}/10^6 \text{ sejt/perc}$; $p < 0.001$). A PMA az FMLP-nél jelentősebb, a nyugvó sejtekhez képest szignifikánsan emelkedett szuperoxid anion termelést váltott ki mind a kontroll ($9.94 \pm 1.58 \text{ nmol}/10^6 \text{ sejt/perc}$, $p < 0.001$), mind a hyperlipidaemiás

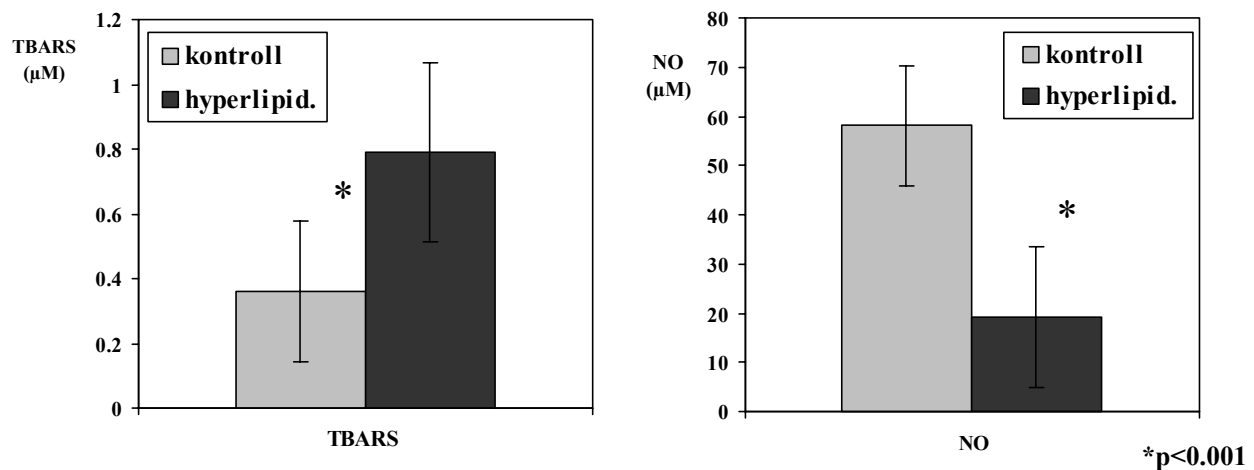
csoportban (6.76 ± 2.46 nmol/ 10^6 sejt/perc, $p < 0.001$). A hyperlipidaemiás csoportban a nyugvó sejtek szuperoxid anion termelése szignifikánsan magasabb volt a kontrollokhoz képest, míg a hyperlipidaemiás betegek granulocytaiban mind a PMA-val (9.94 ± 1.58 ; 6.76 ± 2.46 nmol/ 10^6 sejt/perc, $p < 0.001$), mind az FMLP-vel történt stimulációt követően (7.1 ± 1.6 ; 2.63 ± 0.92 nmol/ 10^6 sejt/perc; $p < 0.001$) szignifikánsan alacsonyabb szuperoxid anion termelés találtunk (2.ábra).



2.ábra. A polymorhonuclearis granulocyta szuperoxid anion termelése (átlag $\pm$ SD) nyugvó sejteken, PMA-val, ill. FMLP-vel történt stimulációt követően, * $p < 0.001$

TBARS és NO értékek

A hyperlipidaemiás egyének plazmájában a lipid-peroxidációt jellemző TBARS az egészséges kontrollokhöz képest szignifikánsan magasabb volt ($0,36 \pm 0,25$; $0,79 \pm 0,31$ μM , $p < 0,001$). Az NO szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a hyperlipidaemiás csoportban a kontroll csoporthoz képest ($58,1 \pm 12,7$; $19,2 \pm 14,9$ μM , $p < 0,001$) (3.ábra).

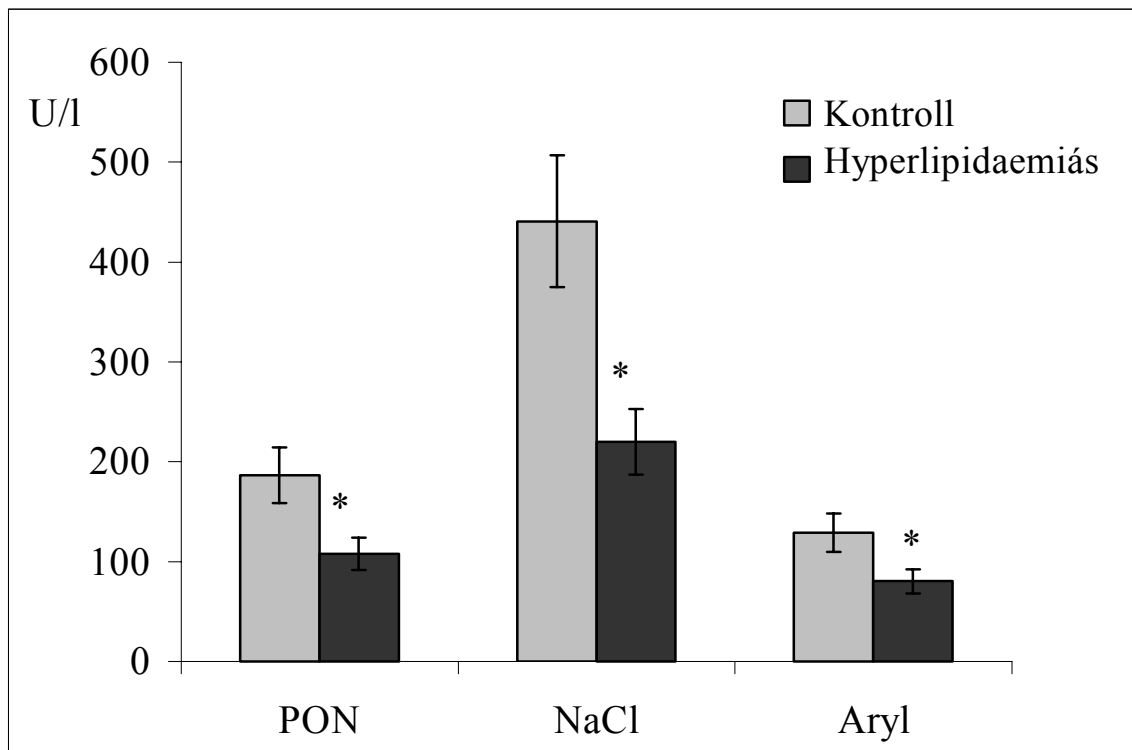


3.ábra. A plazma TBARS és NO koncentrációja (átlag $\pm$ SD) a hyperlipidaemiás ill. a kontroll csoportban, * $p < 0,001$

Szérum paraoxonáz aktivitás

A paraoxonáz aktivitás a hyperlipidaemiás betegek szérumában szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhöz képest ($186,4 \pm 44,7$; $108,0 \pm 49,0$ U/l; $p < 0,001$). A sóstimulálta PON aktivitás, amely az enzim maximális aktivitását jelzi, szintén szignifikánsan alacsonyabb volt a hyperlipidaemiás betegekben a normolipidaemiás egyénekéhez képest ($441 \pm 71,2$; $220,33 \pm 136,06$ U/l; $p < 0,001$). Az

elsősorban az enzim mennyiségéről információt adó arilészteráz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz képest (129 ± 31.2 ; 80.34 ± 42.1 U/l; $p < 0.001$) (4.ábra). Az egységni HDL-re jutó paraoxonáz aktivitás (PON/HDL) a hyperlipidaemiás csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz képest (182.4 ± 64.4 ; 77.8 ± 43.08 U/mmol; $p < 0.001$).



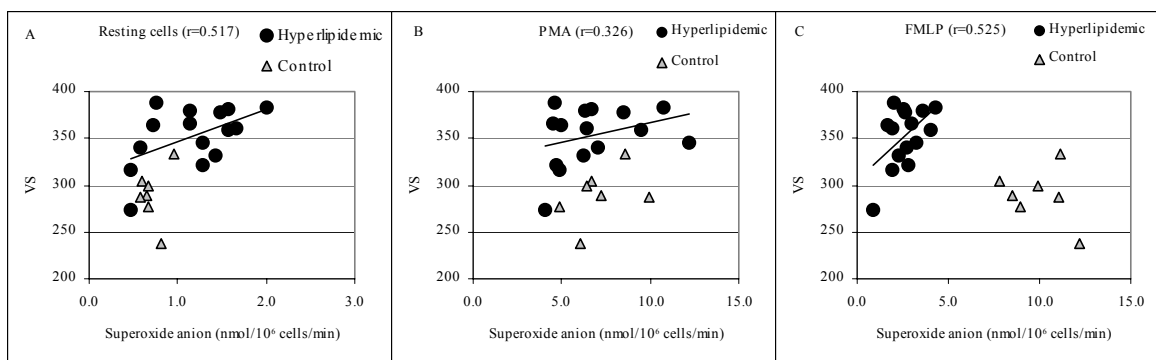
4.ábra. Szérum paraoxonáz aktivitás (PON), sóstimulált PON aktivitás (NaCl), és arilészteráz aktivitás (Aryl) (átlag $\pm$ SD) a hyperlipidaemiás és a kontroll csoportban, * $p < 0.001$

Oxidatív DNS-károsodás

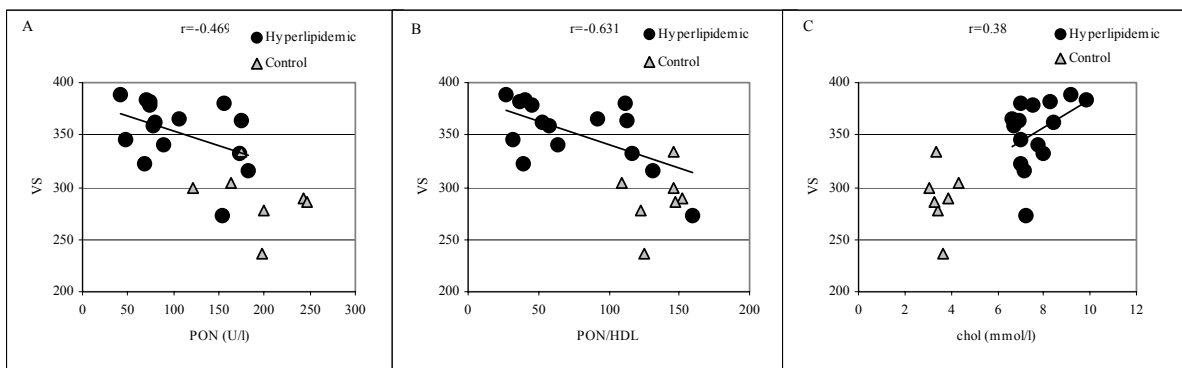
A hidrogén-peroxiddal indukált, comet-assay-vel detektált oxidatív DNS-károsodás szignifikánsan nagyobb mértékű volt a hyperlipidaemiás betegekben a kontrollokhoz

képest (visual score 289.5 ± 29.49 ; 350.97 ± 31.31 ; $p < 0.001$). A hidrogén peroxid alkalmazását megelőzően a két vizsgált csoportban nem találtunk eltérést (97.6 ± 19.11 ; 107.24 ± 20.67 ; n.s.). A hyperlipidaemiás betegekben a nyugvó granulocyták szuperoxid anion termelése és a comet-assay-vel detektált DNS-károsodás mértéke között pozitív korrelációt figyeltünk meg ($r=0.517$). A neutrophil granulocyták PMA-val és FMLP-vel történő stimulációját követő szuperoxid anion termelésével szintén pozitív korrelációt mutatott a visual score ($r=0.326$; 0.525) (5.ábra).

Negatív korrelációt találtunk a PON ($r=-0.469$), a PON/HDL ($r=-0.631$), és a DNS-károsodás mértéke között, míg pozitív korreláció igazolódott a szérum koleszterin szint és a DNS-károsodás mértéke között ($r=0.38$) (6.ábra). Nem találtunk összefüggést a plazma NO és TBARS koncentrációja, illetve a DNS-károsodás mértéke között.



5.ábra. A polymorhonuclearis granulocyták szuperoxid anion termelésének összefüggése a DNS-károsodás mértékét jelző visual score-ral nyugvó sejteken (A), PMA-val (B), ill. FMLP-vel (C) történt stimulációt követően, VS=visual score

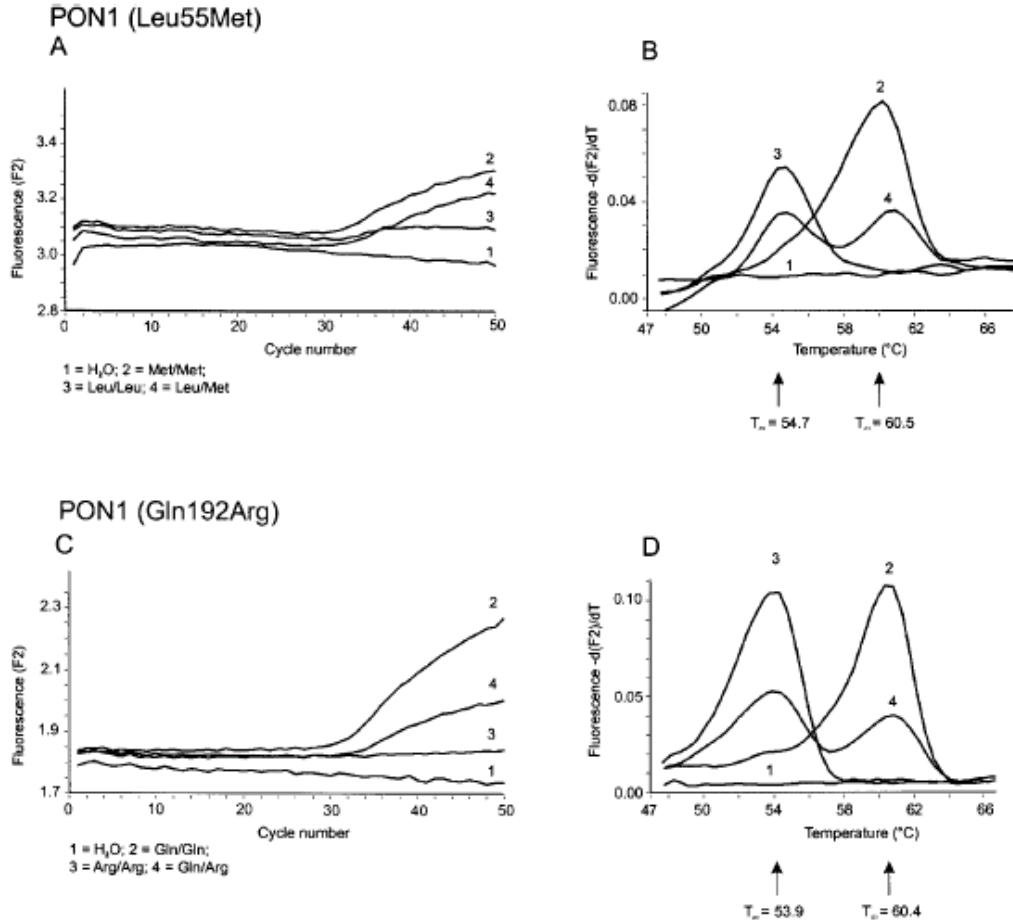


6.ábra. A szérumban paraoxonáz aktivitás ($r=-0.469$) (A), az egységnyi HDL-re vonatkoztatott PON aktivitás ($r=-0.631$) (B) és a szérumban koleszterin szint ($r=0.38$) (C) összefüggése a DNS-károsodás mértékét jelző visual score-val. A PON aktivitás U/l-ben, a szérumban koleszterin szint mmol/l-ben van feltüntetve, VS=visual score

Paraoxonáz (PON1) Leu₅₅ →Met és Gln₁₉₂→Arg polimorfizmus meghatározás real-time fluorescence PCR és olvadási görbék alkalmazásával

A detektált fluoreszcencia görbéket a 7. ábra mutatja. A PON1-192 és PON1-55 izotípusokra tervezett hibridizációs próbák alkalmazása DNS hozzáadása esetén (2, 3 és 4 minták) a fluoreszcencia intenzitás a PCR reakció végéig folyamatosan növekedő tendenciát mutat, míg a H₂O kontroll esetén (1 minta) a fluoreszcencia intenzitása változatlan marad (7/A és 7/C ábra). A 7/B és 7/D ábrán az x tengelyen az alkalmazott hőmérséklet, az y tengelyen pedig a fluoreszcencia intenzitásnak a hőmérséklet szerinti negatív deriváltja van feltüntetve. A PON1-55 Met homozigóta típusának olvasási pontja (T_m) 60.5 °C volt (2 görbe), a heterozigóta típus bifázisos görbét hozott létre (4 görbe), míg a PON1-55 Leu homozigóta olvadási pontja 54.7 °C volt (3 görbe) (7/B ábra). A PON1-192 Gln homozigóta típusának olvasási pontját (T_m) 60.4 °C -nak határoztuk meg (2 görbe), a heterozigóta típus ez esetben is bifázisos görbét mutatott (4 görbe), míg a PON1-192 Arg homozigóta olvadási pontja 53.9 °C volt (3 görbe) (7/D ábra). A PCR

termékek mérete a vártak megfelelően agaróz gélelektroforézissel meghatározva 240, illetve 199 bp volt.



7.ábra. A fluoreszcencia intenzitás változása a cikluszámnak megfelelően (A, C) és oladási csúcsok (B, D) PON1-55 és PON1-192 polimorfizmus meghatározására. Az oladási görbéket oladási csúcsokká konvertáltuk a $-dF/dT$ hőmérséklet szerinti deriváltak alkalmazásával. Az egyes görbék oladáspontjait nyíllal jelöltük.

Új eredmények

1. A hyperlipidaemiás betegek lymphocytáiban a comet-assay-vel vizsgált hidrogén-peroxid indukálta oxidatív DNS-károsodás szignifikánsan nagyobb mértékűnek bizonyult a kontroll csoporthoz képest.
2. A hyperlipidaemiás betegek granulocytái szuperoxid anion termelése szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva mind nyugalmi állapotban, mind PMA-val és FMLP-vel történt stimulációt követően, és pozitív korrelációt mutatott az oxidatív DNS-károsodás mértékével.
3. Az alfa-tokoferol szintjében nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll és a betegcsoport között. A szérum koleszterin szintje és az oxidatív DNS-károsodás mértéke között pozitív korrelációt találtunk, azonban nem volt kimutatható összefüggés a TBARS, valamint NO és az oxidatív DNS-károsodás mértéke között.
4. A betegek szérum paraoxonáz aktivitása, sóstimulált paraoxonáz aktivitása, valamint arilesztéráz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest. Negatív korrelációt találtunk a paraoxonáz aktivitás és az oxidatív DNS-károsodás mértéke között.
5. Az általunk kifejlesztett real-time PCR és olvadási görbe analízis alkalmas a két legfontosabb PON1 polimorfizmus gyors, pontos és könnyen kivitelezhető detektálására.

VI. Megbeszélés

Korábbi tanulmányok alapján ismert, hogy a lipoproteinek oxidációja az atheroszklerózis kialakulását elősegítő folyamat. A szuperoxidanion és a H_2O_2 redox reakciókon keresztül lipid-peroxidációhoz vezet. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai során azt találta, hogy idősekben és hypercholesterinaemiás egyénekben a nyugvó granulocyták szuperoxid anion termelése növekedett (62). Jelen vizsgálatunkban a korábbi eredményekhez hasonlóan a hyperlipidaemiás betegekben a nyugalmi szuperoxid anion termelés fokozott, míg az FMLP-vel és a PMA-val való stimulálhatóság csökkent az egészséges kontrollokhoz képest. *Bonneau és mtsai* egy in vitro kísérletben azt tapasztalták, hogy LDL hozzáadását követően a polymorphonuclearis sejtek FMLP indukálta szuperoxid anion termelése fokozódott, ennek hátterében az FMLP receptoron keresztül végbemenő jelátviteli rendszer működésében bekövetkező változás állhat (63). Az emelkedett LDL szint a hyperlipidaemiás betegek szérumában megváltoztatja a PMN sejtek membránjának összetételét, fluiditását, és hatással van számos membránhoz kötött sejtfunkcióra is, így az FMLP receptoron keresztül megvalósuló jelátviteli mechanizmusra és a PKC aktivitásra (64).

A lipid-peroxidációt a sejtet érő oxidatív stressz markerének tartják, fokozott lipid-peroxidációt találtak számos olyan krónikus megbetegedésben, melyeknek pathogenezisében fontos szerephez jut a sejtek oxidatív károsodása, így atheroszklerózisban és daganatos megbetegedésekben (65). Hyperlipidaemiás betegeinkben a lipid-peroxidáció mértékére jellemző TBARS mennyisége emelkedett, míg a HDL-hez kötött antioxidáns, a PON aktivitása szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest. Adataink arra utalnak, hogy a hypercholesterinaemiás

betegcsoportban a fokozott oxidáció mellett csökkent a természetes HDL-hez kötött antioxidáns aktivitás, mely az érlemezésedés fokozódását hozhatja létre. Az NO mind antioxidáns, mind oxidáns hatást kifejezhet, mivel scavenger hatású a lipidperoxidokra, ugyanakkor szuperoxid anionnal reagálva peroxi-nitritté alakul, mely kifejezett endothel-károsító hatással rendelkezik (4). Ezért is voltunk kíváncsiak arra, hogy az endothel által termelt NO szintje hogyan változik, és azt találtuk, hogy a betegcsoportban az NO szint csökkenése volt megfigyelhető. Az E-vitamin képes megakadályozni a lipid-peroxidációt a sejtmembránban és protektív hatású a többszörösen telítetlen zsírsavak kedvezőtlen hatásával szemben (54). A csökkent antioxidáns kapacitás mellett az oxidatív folyamatok fokozódása vezethet a hyperlipidaemiás betegekben comet-assay-vel detektált oxidatív DNS-károsodás fokozódásához. A PON inverz kapcsolata a DNS-károsodás mértékével arra utal, hogy a természetes HDL-hez kötött antioxidáns rendszer jelentős szerepet játszhat nemcsak az atherogenezis, hanem a DNS-károsodás kialakulásának gátlásában is. Természetesen továbbra is kérdés, hogy egy keringésben található antioxidáns rendszer hogyan képes befolyásolni az intracelluláris oxidatív DNS-károsodást. Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a szabadgyökök az elektrontranszfer révén a sejtekkel történő érintkezés során egy oxidációs láncreakciót hoznak létre, melynek eredményeként a DNS-károsodás létrejöhet (49). Feltételezésünk szerint a keringésben lévő szabadgyökök, melyeket részben a granulocyta termelnek oxidálják a zsírsavakat, így konjugált diének, lipid-hidroperoxidok képződnek, melyek további oxidációs folyamatokat eredményeznek. A PON azzal, hogy hidrolizálja ezen lipid-hidroperoxidokat, gyakorlatilag meggátolja a további oxidációs folyamatok kialakulását, így csökkenti a sejteket érő oxidatív stressz mértékét, megakadályozva ezzel a DNS-károsodás kialakulását.

Az utóbbi évtizedekben számos laboratórium végzett vizsgálatokat a PON1 polimorfizmusok kardiovaszkuláris kórképekben játszott szerepének tisztázása céljából, többnyire RFLP analízist alkalmazva (66, 67). Az általunk leírt real-time fluoreszcens PCR és oladási görbe alkalmazása kevésbé időigényes, pontosabb és költséghatékonyabb a tradicionális PCR technikához képest, és lehetővé teszi 32 minta egyidejű vizsgálatát. A módszer kettős fluorofor jelöléssel (LC Red640 és LC Red705) alkalmazásával alkalmas a két polimorfizmus egyidejű detektálására is, ami időben még kedvezőbb, és csökkenti a laboratóriumi és reagens költségeket.

VII. Összefoglalás

A humán paraoxonáz (PON1) egy kalcium-dependens észteráz, mely az ApoA-t és ApoJ-t tartalmazó high-density lipoproteinhez (HDL) kötődik, és organofoszfátokat és arylésztereket hidrolizál. Számos tanulmány bizonyította, hogy a PON1 képes megvédeni az oxidációtól a low-density lipoproteint (LDL), mely az atherogenezis első kulcslépése. A PON1 aktivitás csökkenését igazolák hypercholesterinaemiában és egyéb, fokozott atherogenezissel járó kórképekben. A paraoxonáz-1 két gyakori polimorfizmusa a Leu₅₅→Met és a Gln₁₉₂→Arg. Mindkét polimorfizmus a kardiovaszkuláris betegségek független rizikófaktorai.

Jelen munkánkban normolipidaemiás és II/a típusú hyperlipidaemiás betegek véréből szeparált lymphocytákon vizsgáltuk a hidrogén-peroxid indukált DNS-károsodást comet-assay segítségével, valamint a DNS-károsodás mértékét összevetettük a betegek szérumának paraoxonáz aktivitásával, ill. egyéb, a szervezet oxidatív statusát jellemző paraméterrel. Valamint kifejlesztettünk egy LightCycler technológiára és olvadási görbe analízisre épülő PON1-55 és 192 polimorfizmust detektáló módszert. Vizsgálatainkba 15 hyperlipidaemiás beteget vontunk be, kontrollként 7 korban és nemben illesztett egészséges egyént vizsgáltunk. A két vizsgált csoportban szignifikáns különbséget tapasztaltunk a Comet-assay-vel detektált hidrogén-peroxid indukálta DNS-károsodás mértékében. A DNS-károsodás mértékét jellemző visual score a hyperlipidaemiás csoportban $351 \pm 31,3$, míg a kontroll csoportban $290 \pm 29,5$ volt ($p < 0,001$). A hyperlipidaemiás betegcsoportban pozitív korrelációt találtunk a DNS-károsodás mértéke és a betegek véréből szeparált nyugvó polymorphonuclearis granulocyták szuperoxid

anion termelése ($r=0,517$), valamint a PMA-val stimulált ($r=0,326$) és az FMLP-vel stimulált sejtek szuperoxid anion termelése ($r=0,525$) között. Negatív korrelációt észleltünk a visual score és a PON1 ($r=-0,469$), illetve a PON1/HDL ($r=-0,631$) között. Nem találtunk összefüggést a plazma NO ($r=0,098$) és TBARS ($r=0,061$) koncentrációja és a DNS-károsodás mértéke között.

Eredményeink azt mutatják, hogy hyperlipidaemiás betegek lymphocytáiban az oxidatív stressz hatására nagyobb mértékű DNS-károsodás mutatható ki, melyben szerepet játszhat az antioxidáns kapacitás, ezen belül a PON1 aktivitás csökkenése. A munkám során kifejlesztett real-time PCR és olvadási görbe analízis lehetővé teszi a két legfontosabb PON1 polimorfizmus gyors, pontos és könnyen kivitelezhető detektálását.

VIII. Irodalom

1. Heinecke JW: Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:268-274
2. 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
3. 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
4. Patel RP, Levonen A, Crawford JH, Darley-Usmar VM: Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2000; 47:465-474
5. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG: Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103:1282-1288
6. Mertens A, Holvoet P: oxidized LDL and HDL: antagonists in atherosclerosis. *FASEB J* 2001; 15:2073-2084
7. Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA: Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 1998; 39:777-788

8. Yoshida H, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D: Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor CD36 and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:794-802
9. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T: An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature (London)* 1997; 386:73-77
10. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T: Inducible expression of lecithin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998; 83:322-327
11. Navab M, Imes SS, Hough GP, Hama SY, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drintwater DC, Laks H, Fogelman AM: Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein I synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88:2039-2046
12. Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Davoli A, Campagnola M, Contessi GB, Pastorino AM, Lo CV: 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
13. Rajavashitsh TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature (London)* 1990; 344:254-257

14. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5134-5138
15. Newby AC, Zaltsman AB: Fibrous cap formation or destruction – the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 1999; 41:345-360
16. Stiko-Rahm A, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Hamsten A, Nilsson J: Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:1099-1109
17. Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L: Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1998; 252:378-384
18. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF: Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; 70:1191-1197
19. Napoli C, Quehenberger O, de Nigris F, Abete P, Glass CK, Palinski W: Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J* 2000; 14:1996-2007
20. Holvoet P, Collen D: Thrombosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:320-328

21. Penn MS, Cui MZ, Winkour AL, Bethea J, Hamilton TA, DiCorleto PE, Chisolm GM: Smooth muscle cell surface tissue factor pathway activation by oxidized low-density lipoprotein requires cellular lipid peroxidation. *Blood* 2000; 96:3056-3063
22. Ishii H, Kizaki K, Horie S, Kazama M: Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through degradation of lipoprotein in lysosomes. *J Biol Chem* 1996; 271:8458-8465
23. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001; p 2915-2931
24. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G: High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:13-27
- Primo-Parma SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498-509
25. Tall AR: Plasma high density lipoproteins – Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990; 86:376-384
26. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG: High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044:275-283
27. Mertens A, Holvoet P: Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis.. *FASEB J* 2001; 15:2073-2084
28. Primo-Parma SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN: The human paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498-507

29. Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Wood C, Traver D, Furlong CE: Structural organisation of the human PON1 gene. *Genomics* 1996; 35:586-589
30. Kelso GJ, Suart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA: Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33:832-839
31. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA: Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:69-76
32. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN: Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286:152-154
33. Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN: Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104:129-135
34. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelmann AM, Navab M: Protective effect of high-density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidised low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891
35. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN: Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86:193-199
36. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJM, Durrington PN: Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192

- polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998; 139:341-349
37. Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M: Absence of "A"-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem* 1989; 22:475-478
 38. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH: Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem* 1986; 32:671-673
 39. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Varga Zs, Kárpáti I, Mátyus J, Újhelyi L, Kakuk Gy: The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 1998; 80:166-170
 40. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lócsey L, Kárpáti I, Mátyus J, Katona E, Harangi M, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. *Nephron* 1999; 83:126-131
 41. La Du BN: Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W, ed. *Pharmacogenetics of drug metabolism*. New York: Pergamon Press; 1992; p 51-91
 42. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, Ruiz J: paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99:62-66
 43. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Blatter-Garin MC: Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 49:1390-1393

44. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE: Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001; 11:77-84
45. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M: Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998; 213:149-157
46. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng Carey, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman: Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:542-547
47. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN: Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275:33435-33442
48. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498-507
49. Wiseman H, Halliwell B: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313:17-29
50. Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M: Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutat Res* 1988; 195:137-149
51. Rydberg B, Johanson KJ. in DNA repair mechanism (Hanawalt PC, Friedberg EC, eds), Academic Press, New York, 1978; p 465-468

52. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988; 175:184-191
53. Horvathova E, Slamenova D, Hlincikova L, Mandal TP, Gabelova A, Collins AR: The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutat Res* 1998; 409:163-171
54. Jenkinson AMcE, Collins AR, Duthie SJ, Wahle KWJ, Duthie GG: The effect of increased intakes of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on DNA damage in human lymphocytes. *FASEB J* 1999; 13:2138-2142
55. Collins AR, Olmedilla B, Southon S, Granado F, Duthie SJ: Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1998; 19:2159-2162
56. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques* 1997; 22:176-181
57. Aslanidis C, Schmitz G: High-speed apolipoprotein E genotyping and apolipoprotein B3500 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. *Clin Chem* 1999; 45:1094-1097
58. Aslanidis C, Nauck M, Schmitz G: High-speed prothrombin G→A 20210 and methylenetetrahydrofolate reductase C→T 677 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. *BioTechniques* 1997; 27:234-238
59. Aslanidis C, Nauck M, Schmitz G: High-speed detection of the two common α 1-antitrypsin deficiency alleles *Pi**Z and *Pi**S by real-time fluorescence PCR and melting curves. *Clin Chem* 1999; 45:1872-1875

60. Griess P: Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Wesley and Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Ber Deutsch Chem Gen* 1879; 12:426
61. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J.Clin.Lab.Invest.*1968; Suppl.97:77-108
62. FülöpT, Varga Z, Csongor J, Leövey A, Fóris G: Age related impairment in phosphatidylinositol breakdown in polymorphonuclear granulocytes. *FEBS Lett* 1989; 245:249-252
63. Bonneau C, Rémy C, Tissot M, Athias A, Roch-Arveiller M, Giroud JP: Effects of human low density lipoproteins on superoxide production by Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenilalanine activated polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Chem Clin Biochem* 1997; 35:73-80
64. Paragh Gy, Kovács É, Seres I, Keresztes T, Balogh Z, Szabó J, Teichmann F, Fóris G: Altered signal pathway in granulocytes from patients with hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1999; 40:1728-1733
65. Vergnani L, Hatric S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T: Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation* 2000; 101:1261-1266
66. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI: Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:473-480
67. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI: Paraoxonase status in coronary heart disease. *Are*

activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1451-1457

Az értekezéshez fehasznált saját közlemények

1. **Harangi M**, Remenyik É, Seres I, Varga Z, Katona E, Paragh G: Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Mutat Res* 2002; 513:17-25 IF: **1.624**
2. **Harangi M**, Remenyik É, Seres I, Varga Zs, Balogh Z, Kakuk Gy, Paragh Gy: Oxidatív stressz hatására kialakuló DNS-károsodás meghatározása Comet-assay-vel hyperlipidaemiás betegekben. *Magyar Belorvosi Archivum* 2001; 53:393-396
3. **Harangi M**, Aslanidis C, Paragh G, Schmitz G: High-speed detection of the two common paraoxonase polymorphisms Leu₅₅→Met and Gln₁₉₂→Arg by real-time fluorescence PCR and melting curves. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:337-340 IF: **1.595**

Egyéb közlemények

1. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lócsey L, Kárpáti I, Mátyus J, Katona E, **Harangi M**, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. *Nephron* 1999; 83:126-131 IF: **1.696**
2. Paragh G, Balogh Z, Seres I, **Harangi M**, Boda J, Kovacs P: Effect of gemfibrozil on HDL-associated serum paraoxonase activity and lipoprotein profile in patients with hyperlipidemia. *Clin Drug Invest* 2000; 19:277-282 IF: **0.888**
3. Balogh Z, Seres I, **Harangi M**, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G: Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of beneficial action of fibrates? *Diab Met* 2001; 27:604-610 IF: **1.624**

4. Balogh Z, Fülöp P, Seres I, **Harangi M**, Katona E, Kosztáczky B, Paragh G: Effects of simvastatin on serum paraoxonase activity. *Clin Drug Invest* 2001; 21:505-510
IF: **0.846**
5. Paragh Gy, Balogh Z, Seres I, **Harangi M**, Boda J: Gemfibrozil hatása a HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitására és a lipoprotein szintek alakulására. *Háziorvosi Továbbképző Szemle* 1999; 4:73-77
6. Balogh Z, Bacsó J, Seres I, Brúgós B, **Harangi M**, Paragh Gy: A hajszeléntartalmának változása hiperkoleszterinémiás betegekben. *Magyar Belorvosi Archivum* 2000; 53:209-213
7. Seres I, Varga Zs, Balogh Z, **Harangi M**, Fülöp P, Paragh Gy: Hiperkoleszterinémiás betegek szérum paraoxonáz aktivitása, fenotípus megoszlása és E vitamin szintjei. *Magyar Belorvosi Archivum* 2000; 53:115-117
8. Balogh Z, Paragh Gy, Seres I, **Harangi M**, Kovács P, Kakuk Gy: Gemfibrozil hatása 2-es típusú cukorbetegség szérum paraoxonáz aktivitására. *Magyar Belorvosi Archivum* 1999; 3:347-352
9. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Lőcsey L, Asztalos L, **Harangi M**, Kárpáti I, Mátyus J, Kakuk Gy: A serum paraoxonáz aktivitás változása vesetranszplantáció után. *Hypertonia és Nephrológia* 2000; 4:31-36
10. Paragh Gy, Balogh Z, Seres I, **Harangi M**, Katona E, Fülöp P, Kakuk Gy: A szimvasztatin hatása a szérum lipidszintekre és a paraoxonáz aktivitására. *Magyar Belorvosi Archivum* 1999; 52:255-258

11. Paragh Gy, Balogh Z, Kovács P, Wórum F, **Harangi M**, Czuriga I, Illyés L, Kakuk Gy: A szekunder prevenció szerepe korai myocardialis infarctust követően. *Cardiologia Hungarica* 2000; 28:115-121
12. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, **Harangi M**, Ilyés L, Boda J, Varga Zs, Kovács P: A mikronizált fenofibrát hatása a szérum paraoxonáz aktivitására coronaria betegségben szenvedő hyperlipidaemiás egyénekben. *Magyar Belorvosi Archívum* 2000; 53:227-232
13. Paragh Gy, **Harangi M**: A HDL szerepe a kardiovaszkuláris események megelőzésében. *Orvosi Hetilap* 2001; 142:121-126
14. Paragh Gy, **Harangi M**: A lipidek szerepe az atherogenesisben a primer, szekunder és regressziós tanulmányok alapján. *Családorvosi Fórum* 2001; 2:43-51
15. Paragh Gy, **Harangi M**, Balogh Z: Diabetes mellitus és paraoxonáz. *Diabetologia Hungarica* 2001; 9:221-228
16. Paragh Gy, **Harangi M**, Balogh Z: Multimetabolikus syndroma és hypertonia. *Granum* 2001; 1:26-28
17. **Harangi M**, Katona E, Remenyik É, Paragh Gy: Sclerosis tuberosa. *Hypertonia és Nephrológia* 2001; 5:144-149
18. **Harangi M**, Seres I, Varga Zs, Remenyik É, Emri Gabriella, Paragh Gy: Az atorvastatin-kezelés hatása a paraoxonáz aktivitásra és az oxidatív DNS-károsodásra. *Magyar Belorvosi Archívum* 2002; 55:83-88

Összesített impact factor: 8.195

Nemzetközi folyóiratban megjelent idézhető absztraktok

1. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lócsey L, Kárpáti I, Mátyus J, Katona E, **Harangi M**, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. *Atherosclerosis*, 1998. 144(1):117
2. Paragh Gy, Balogh Z, Seres I, **Harangi M**, Boda J: Gemfibrozil effect on HDL-associated serum paraoxonase activity and lipoprotein profile in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, 1999. Sept., 146 (Suppl.) 28.
3. Seres I, Varga Zs, Balogh Z, **Harangi M**, Fülöp P, Kakuk Gy, Paragh Gy: Paraoxonase activity and α -tocopherol levels in hypercholesterinemic patients. *Atherosclerosis*, 1999. Sept., 146 (Suppl.) 35.
4. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, **Harangi M**, Illyés L, Boda J, Varga Zs, Kovács P: Micronised fenofibrate effect on serum paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 2000; 151(1):263

Előadások

1. European Atherosclerosis Society, 2000 EAS Workshop, „Low HDL in Cardiovascular Diseases”. Gemfibrozil effect on HDL-associated serum paraoxonase activity and lipoprotein profile in patients with hyperlipidemia. Istambul, Turkey 2000.04.7-8.
2. Debreceni Nephrológiai Napok. A HDL-hez kötött paraoxonáz szerepe vesebetegségekben. Debrecen, 1999.05.12.
3. DE OEC ÁOK Ph.D. és TDK Tudományos diáktalálkozója 1999/2000. Gemfibrozil hatása a HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitásra és a lipoprotein szintek alakulására. Debrecen, 2000.04.3-6.
4. Magyar Atherosclerosis Társaság XIII. Kongresszusa. DNS-károsodás meghatározása oxidatív stressz hatására hyperlipidaemiás betegekben Comet-assay-vel. Sopron, 2000.10.12-14.
5. A MNT Gyermeknephrológiai Szekció Tudományos ülése. A leptin klinikai jelentősége. Budapest, SOTE I.sz. Gyermekklinika, 2000.11.10.
6. DE OEC ÁOK Ph.D. és TDK Tudományos diáktalálkozója 2000/2001. Oxidatív stressz hatására kialakuló DNS károsodás meghatározása Comet-assay-vel hyperlipidaemiás betegekben. Debrecen, 2000.02.19-22.

7. A Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 51. Nagygyűlése 2002. Időskori lipidabnormalitások. Gyula, 2002.08.28-31.
8. A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Tudományos Ülése. Az atorvastatin kezelés hatása az oxidatív DNS-károsodásra és a HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitásra. Eger, 2002.10.3-5.

IX. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Paragh György professzor úrnak, hogy csatlakozhattam az általa vezetett tudományos munkacsoporthoz, hogy négy éven át töretlen bizalommal és lelkesedéssel irányította tudományos tevékenységemet, tanácsai és hasznos útmutatásai nélkül ez a munka nem született volna meg.

Köszönettel tartozom Dr. Kakuk György professzor úrnak, az I. Belgyógyászati Klinika igazgatójának, hogy tudományos munkámat mindenben támogatta.

Köszönöm Dr. Gerd Schmitz professzor úrnak, a Regensburgi Egyetem Klinikai Kémia Intézet igazgatójának, hogy az ott eltöltött egy év alatt magas szintű szakmai irányítása mellett folytathattam tudományos munkámat.

Köszönet Dr. Remenyik Évának, a Bőrgyógyászati Klinika docensének, akinek az irányításával számos laboratóriumi módszert sajátítottam el, köszönöm, hogy munkám egy részét az általa vezetett laboratóriumban végezhettem.

Köszönöm az I. Belklinika Kutató Laboratóriumában dolgozó Dr. Seres Ildikónak és Dr. Varga Zsuzsának a kísérleti munkában nyújtott segítségét.

Külön köszönöm Dr. Ádány Róza professzornőnek, a Megelőző Orvostani Intézet igazgatójának a comet assay elsajátításában nyújtott segítségét.

Hálával tartozom Kovács Évának az adminisztratív munkában nyújtott sok-sok segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Szüleimnek, akiktől a legtöbbet kaptam.

X. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények másolatai