

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

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 más néven 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. Zsíroldékony antioxidánsok (ubiquinol-10, alfa-tokoferol, 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 száltörést, DNS-protein

keresztkötést, ill. DNS adduktot létrehozni, ezáltal genotoxikus hatást kifejteni.

A lipoprotein partikulumok közül a HDL képes gátolni az atherosclerosis. 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 enzimben, 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 betegeknel 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 nem-specifikus PCR termékek jelenléte miatt. Ezért szükséges újabb technikák alkalmazása, korszerű, gyors és hatékony módszer kifejlesztése ezen antioxidáns hatással rendelkező enzim leggyakoribb genetikai változatainak meghatározására.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az egészséges kontrollok és a hyperlipidaemiás betegek lymphocytáiban 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 antioxiáns, az alfa-tokoferol szintjének meghatározása, és összevetése a DNS-károsodás mértékével.
4. A HDL-hez kötött antioxiáns 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.

ANYAG ÉS MÓDSZER

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-, endokrin- vagy vesebetegség (szérum kreatinin szint >130 $\mu\text{mol/l}$), 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), szérum paraoxonáz aktivitás meghatározást végeztünk. A lipidparaméterek meghatározása friss szérumból történt. A paraoxonáz aktivitás mérése -20°C -on tárolt szérumból történt.

Szérum lipidszintek meghatározása

A szérum 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 szérum 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 szérumhoz 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 követtük Hewlett-Packard 8453 UV-Visible spektrofotométerrel. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens (17100 M⁻¹cm⁻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 ZuSO₄ –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 (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-citokró-m-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 lysist 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 véreből 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	GCTCTGAAGACATGGAGATA-F ^b		
PON1-192DA	TGACCCCTACTTACAATCCT-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 allélre 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, 20 µl térfogatú üvegkapillárisban (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). A 20 µl-es reakcióelegy összetétele a következő volt: 9 µl of H₂O, 1 µl 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 MgCl₂ -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±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.

EREDMÉNYEK

A 7 kontroll és a 15 hyperlipidaemiás beteg adatait a 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 értékei

	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 ; 72.63 ± 0.92 nmol/ 10^6 sejt/perc; $p < 0.001$) szignifikánsan alacsonyabb szuperoxid anion termelés találtunk.

TBARS és NO értékek

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

Szérum paraoxonáz aktivitás

A paraoxonáz aktivitás a hyperlipidaemiás betegek szérumában szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz képest (186.4 ± 44.7 ; 108.0 ± 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 ± 71.2 ; 220.33 ± 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; $p < 0.001$). Az egységnyi HDL-re jutó paraoxonáz aktivitás (PON/HDL) a hyperlipidaemiás csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz képest ($182.4 \pm 64,4$; 77.8 ± 43.08 U/mmol; $p < 0.001$).

Oxidatív DNS-károsodás

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

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 ($r = 0.38$). Nem találtunk összefüggést a plazma NO és TBARS koncentrációja, illetve a DNS-károsodás mértéke között.

Paraoxonáz (PON1) Leu₅₅ → Met és Gln₁₉₂ → Arg polimorfizmus

meghatározás real-time fluorescence PCR és olvadási görbék

alkalmazásával

A PON1-192 és PON1-55 izotípusokra tervezett hibridizációs próbák alkalmazása DNS hozzáadása esetén a fluoreszcencia intenzitás a PCR reakció végéig folyamatosan növekedő tendenciát mutat, míg a H₂O kontroll esetén a fluoreszcencia intenzitása változatlan marad. A PON1-55 Met homozigóta típusának olvasási pontja (T_m) 60.5°C volt, a heterozigóta típus bifázisos görbét hozott létre, míg a PON1-55 Leu homozigóta olvadási pontja 54.7°C volt. A PON1-192 Gln homozigóta típusának

olvasási pontját (T_m) 60.4 °C –nak határoztuk meg, a heterozigóta típus ez esetben is bifázisos görbét mutatott, míg a PON1-192 Arg homozigóta olvadási pontja 53.9 °C volt. A PCR termékek mérete a vártnak megfelelően agaróz gélelektroforézissel meghatározva 240, illetve 199 bp volt.

MEGBESZÉLÉS

Korábbi tanulmányok alapján ismert, hogy a lipoproteinek oxidációja az atherosclerosis kialakulását elősegítő folyamat. A szuperoxid anion és a H_2O_2 redox reakciókon keresztül lipid-peroxidációhoz vezet. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai során azt találta, hogy idősokban és hypercholesterinaemiás egyénekben a nyugvó granulocyták szuperoxid anion termelése növekedett. 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. 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.

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 atherosclerosisban és daganatos megbetegedésekben. 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 érlelmeszesedés fokozódását hozhatja létre. Az NO mind antioxidáns, mind oxidáns hatást kifejt, mivel scavenger hatású a lipid-peroxidokra, ugyanakkor szuperoxid anionnal reagálva peroxi-nitritté alakul, mely kifejezett endothel-károsító hatással rendelkezik. 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. 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. 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. Az általunk leírt real-time fluoreszcens PCR és olvadási görbe alkalmazása kevésbé időigényes, pontosabb és költséghatékonyabb a tradicionális PCR technikákhoz 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.

ÚJ EREDMÉNYEK

1. A hyperlipidaemiás betegek lymphocytaiban 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.

Az értekezéshez felhasznált 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 haj szeléntartalmának változása hiperkoleszterinémiás betegekben. *Magyar Belorvosi Archívum* 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 Archívum* 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 Archívum* 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 Archívum* 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 infarktust 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 egyéneknél. *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 Archivum* 2002; 55:83-88

Összesített impact factor: 8.195

Nemzetközi folyóiratban megjelent idézhető absztraktok

1. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lőcsey 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. Istanbul, 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.