

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A HDL MINŐSÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ ENDOGÉN ÉS
EXOGEN TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA**

Dr. Zsíros Noémi

Témavezető: Dr. Harangi Mariann, PhD



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017

A HDL minőségét befolyásoló endogén és exogén tényezők vizsgálata

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

Írta: Dr. Zsíros Noémi okleveles általános orvos

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

Témavezető: Dr. Harangi Mariann, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Dr. Magyar Mária Tünde, PhD
Dr. Márk László, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, NK, Megelőző Orvostani Intézet 2. emeleti
tárgyalóterme
2017. március 31. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Barta Judit, PhD
Dr. Reiber István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Dr. Magyar Mária Tünde, PhD
Dr. Márk László, PhD
Dr. Barta Judit, PhD
Dr. Reiber István, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület Tanterme,
2017. március 31. 13 óra

BEVEZETÉS

A nagy sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein, HDL) számos feladatot lát el, ezek közül elsősorban az antioxidáns hatása, illetve a perifériás sejtek koleszterin tartalmának máj felé továbbítása (reverz koleszterin transzport, RCT) révén kiemelkedő szerepet tölt be az érlemezsedéssel szembeni védekezésben. Egyre több epidemiológiai adat és klinikai vizsgálat támasztja alá, hogy a HDL lehet a következő célpont a fennmaradó kardiovaszkuláris kockázat csökkentésében a statinnal kezelt, magas kockázatú betegek esetében.

Több mint három évtized óta a HDL-koleszterin (HDL-C) szint meghatározást alkalmazzák elsődlegesen a HDL vizsgálatára. Ezzel szemben az utóbbi években számos kutatás bizonyította, hogy a keringő HDL-C szint mellett a HDL minőségének vizsgálata még fontosabb, mivel a HDL-C szint nem nyújt érdemi információt a HDL részecskék összetételéről és működéséről. Az is bizonyítást nyert, hogy a kardiovaszkuláris betegségek kezelése során nem elsősorban a HDL-C szint emelése, hanem a keringő HDL funkciójának javítása a fontos.

A HDL fizikokémiai és funkcionális heterogenitása miatt a kutatóknak jelentős kihívás a HDL-C szint meghatározásánál hatékonyabb, és a kardiovaszkuláris kockázatot pontosabban becslő laboratóriumi és klinikai módszer kifejlesztése. A kutatások nagy száma ellenére mindeztidáig még nem találtak erre megbízható, széles körben elfogadott és alkalmazott módszert.

A HDL egy kicsiny, denz, fehérjében gazdag lipoprotein, melynek átlagos mérete 8-10 nm, átlagos sűrűsége pedig 1,063-1,21 g/mL. A HDL részecskék komplex és heterogén makromolekulák, mind fehérjetartalmuk (proteómájuk), mind lipidösszetételük (lipidómájuk) változatos, ami méretbeli, denzitásbeli, struktúrabeli és funkcióbeli inhomogenitást eredményez, ezáltal szubfrakciókra oszthatóak, melyek folyamatosan egymásba alakulnak. A proteómát alkotó fehérjék jelentős részét képezik a lipid transzporthoz vagy a lipoprotein egységéhez

szükséges fehérjék (apolipoproteinek), de sok más fehérje vesz még részt a HDL anti-inflammatorikus, antiatherogén és egyéb pleiotróp hatásában is. A felépítést és működést tekintve az apolipoprotein AI (apoAI) a HDL részecske legfőbb fehérjéje. Az apoAI fő funkciói közé tartozik a HDL részecske szerkezetének stabilizálása, a lecitin koleszterin aciltranszferáz (LCAT) aktivációja. A fentiekén kívül a HDL anti-atherogén és anti-inflammatorikus képességének nagy része is az apoAI-hez köthető, úgymint a lipid hidroxidok hatástalanítása, az ATP-kötő kazetta protein A1 (ABCA1) által mediált koleszterin efflux illetve az ATP-kötő kazetta protein G1 (ABCG1) transzporterrel és a scavenger receptor class B type I (SR-BI)-el való interakció.

A HDL antioxidáns hatása révén képes megvédeni az alacsony sűrűségű lipoproteint (low density lipoprotein, LDL) a szabadgyökök okozta oxidatív károsodástól azáltal, hogy meggátolja a proinflammatorikus hatású oxidált lipidek, elsősorban a lipid hidroxidok, de részben a rövid-láncú oxidált foszfolipidek képződését. A HDL átveszi az oxidált LDL-től a lipid hidroxidokat, miközben a HDL fehérje és lipid komponensei maguk is módosulnak. A HDL, mialatt a máj SR-BI receptoraihoz szállítja a lipid hidroxidokat, redukálja és ezáltal inaktíválja is azokat. Ebben kiemelkedő szerepet játszanak az apoAI metionin oldalláncai. De a HDL antioxidáns hatásához más apolipoproteinek, illetve HDL-hez kapcsolódó enzimek is hozzájárulnak. Számos kutatás bizonyította, hogy az egyes apolipoproteinek és antioxidáns hatású enzimek megoszlása különbözik az egyes HDL szubfrakciókban.

A HDL antioxidáns hatásában szerepet játszó egyik legfontosabb enzim a paraoxonáz 1 (PON1). Rendelkezik arilészteráz, foszfodiészteráz (paraoxonáz) és laktonáz aktivitással is. A PON1 arilészteráz aktivitása erősen korrelál a keringő PON1 fehérje mennyiségével és utal annak antioxidáns hatására, míg a paraoxonáz aktivitást jelentősen befolyásolják a genetikai polimorfizmusok okozta inter-individuális különbségek. Régóta ismert, hogy a HDL a PON1 segítségével az

oxidált foszfolipidek hidrolízisén keresztül képes gátolni az LDL oxidációt, ezen túlmenően feltételezik, hogy a PON1 fokozza a monociták/makrofágok szabadgyökök elleni védekezőképességét és a makrofágokból származó koleszterin eltávolítást, illetve elősegíti a HDL azon képességét, amellyel megakadályozza a makrofágok általi LDL oxidációt. Ezekhez hozzáadódik, hogy a PON1 módosíthatja a mieloperoxidáz (MPO) aktivitását, miközben ez utóbbi gátolja a PON1-et. Az utóbbi évek nagy jelentőségű felfedezése volt, hogy a HDL, az MPO és a PON1 egy hármas egységet alkot, amelyben nemcsak az MPO gátolja a PON1 aktivitását, hanem a PON1 is részlegesen csökkenti az MPO aktivitását. Prospektív vizsgálatok meggyőző bizonyítékokat mutatnak a PON1 kardiovaszkuláris betegségekben játszott szerepével kapcsolatban. Egyértelműen igazolódott, hogy a csökkent PON1 aktivitás a vaszkuláris betegségek rizikófaktor.

A HDL működését számos molekula képes kedvezőtlenül is befolyásolni. Ezek közül kiemelkedik a MPO, mely baktériumölő hatása révén fontos részét képezi a veleszületett immunitásnak. Számos kutatás foglalkozik az érlemezés folyamatában játszott szerepével is: az LDL oxidációja révén elősegíti azok felvételét a makrofágokba, amellyel hozzájárul a habos sejtek képződéséhez. Az MPO oxidatíván módosítja az apoAI-t is, mely révén károsodik az ABCA1-hez történő HDL-kötődés, ami az ABCA1-dependens reverz koleszterin transzport zavarához vezet, illetve gátolja a HDL anti-inflammatorikus és anti-apoptotikus tulajdonságait is. Emellett az MPO közvetlenül károsítja a HDL-hez kötött PON1 működését, illetve az ABCG1-dependens koleszterin transzportot. Ebből adódóan az emelkedett MPO szintet kapcsolatba hozták a fokozott érlemezéssel, sőt számos tanulmány vizsgálja az MPO-t, mint kardiovaszkuláris markert.

Az utóbbi időben igazolódott, hogy egy másik enzim, a mátrix metalloproteináz -9 (MMP-9), is képes komplexet kialakítani a HDL-lel, főként a HDL2-vel, ezáltal hozzájárulhat a diszfunkcionális HDL képződéséhez. A cink-

függő endopeptidáz családba tartozó MMP-k kulcsszerepet játszanak az extracelluláris mátx lebontásában, így hozzájárulnak a vulnerábilis atheroszklerotikus plakkok képződéséhez és destabilizációjához, ezáltal a kardiovaszkuláris események kialakulásához. A metalloproteináz szöveti inhibitorok (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) az MMP-khez kapcsolódva szabályozzák azok aktivitását. Számos kutatás bizonyítja, hogy kardiovaszkuláris betegségben szenvedőkben a TIMP-1 szint emelkedett, illetve igazolódott az is, hogy a TIMP-1 a kardiovaszkuláris mortalitás független prediktora. Feltételezik, hogy ez a magas TIMP-1 szint az emelkedett MMP aktivitásra kialakuló kompenzatórikus választ tükrözheti.

A HDL másik, kiemelkedően fontos feladata, a reverz koleszterin transzport során a HDL a perifériás szövetektől a májba szállítja a sejtek koleszterin feleslegét, ami ezt követően vagy kiválasztódik az epébe és a széklettel távozik, vagy a mellékvesékbe, herékbe és petefészkekbe kerül szteroidhormon termelés céljából. E folyamat révén a HDL ellensúlyozni tudja az atheroszklerotikus plakk kialakulásához és fejlődéséhez vezető folyamatokat. A különböző HDL szubfrakciók különböző mértékben képesek elősegíteni a koleszterin effluxot.

Az RCT első lépése, a koleszterin efflux során szabad koleszterin jut ki a sejtekből. Ebben egymással párhuzamosan passzív és aktív folyamatok is szerepet játszanak. A reverz koleszterin transzportban lényegesen nagyobb szerepet töltenek be a transzportfehérjéken keresztül zajló, aktív folyamatok. Eddig három lényeges transzportert azonosítottak: ABCA1, ABCG1 és a SR-BI. A legfontosabb szerepet az ABCA1 látja el, mely a nem-észterifikált koleszterin mellett foszfolipideket, főleg foszfatidilkolint szállít a lipid-mentes vagy lipid-szegény apoAI-re, mely révén hozzájárul a pre-béta-HDL képződéséhez is. Míg az ABCA1 elsősorban a lipid-szegény apoAI-re, addig az ABCG1 és a SR-BI főként az érett HDL-re szállít koleszterint. A reverz koleszterin transzport során maga a HDL is strukturális és funkcióbeli változáson megy keresztül. Első lépésként a lipidszegény apoAI a

plazma membránból származó foszfolipidekkel és nem-észterifikált koleszterinnel együtt pre-béta HDL-t képez. A kis pre-béta1-HDL molekulákból koleszterin felvétele után nagyobb, de még mindig korong alakú pre-béta2-HDL alakul, melyekből a koleszterin észterifikációja és további apoA1 felvétel révén már gömb alakú alfa3-HDL, majd alfa2-HDL képződik. A reverz koleszterin transzport zavartalan működését számos enzim biztosítja (koleszterin-észter transzfer protein (CETP), LCAT, foszfolipid transzferfehérje (PLTP), hepatikus lipáz (HL), endoteliális lipáz (EL)). A koleszterin leadása után megmaradó lipidmentes vagy lipid-szegény apoAI részecskék pedig vagy ismételt a HDL képződéséhez járulnak hozzá vagy a vese glomerulusain át filtrálódnak, ami a proximális tubulusokban található cubilin és megalin receptorok által mediált endocitózissal történik.

Az apoAI reverz koleszterin transzportban játszott kulcsszerepét hangsúlyozza, hogy az atheroszklerotikus artéria intimájában megtalálható sejtek számos olyan proteázt választanak ki, melyek módosíthatják a HDL-t, részben a pre-béta-HDL-ben megtalálható apoAI C terminálisának proteolízise révén, ami ezáltal nem tud kapcsolódni az ABCA1-hez, és emiatt csökkenthet az ABCA1 mediálta koleszterin kiáramlást elősegítő képessége és a HDL biogenezise. Sőt egyes kutatások alapján az apoAI proteolízise károsíthatja az ABCG1 mediálta koleszterin effluxot elősegítő képességét is. Közismert az is, hogy az MPO által katalizált nitrálás és klórozás egyik célpontja az apoAI, azt feltételezik, hogy ezáltal az apoAI oxidatív károsodása korlátozza az apoAI-et abban, hogy a HDL-ből egy lipid-mentes formában felszabaduljon, ezáltal károsítja kicserélődését, ami szintén az ABCA1 mediált koleszterin efflux csökkenéséhez járul hozzá.

Ezen túlmenően ismert még a HDL sejt túlélésre, proliferációra és migrációra kifejtett és antithrombotikus hatása, a HDL hozzájárulhat az endothelialis repair folyamatokhoz, közvetlenül stimulálja az endotheliális nitrogén-monoxid-

szintetáz-mediálta (eNOS-mediálta) nitrogén-monoxid (NO) termelést, illetve fontos szerepet tölt be a szervezet védekezőképességében is.

A HDL összetételét és működését endogén módon genetikai tényezők, exogén módon a hozzá kapcsolódó, azzal funkcionális egységet alkotó enzimek/molekulák jelenléte és aktivitása is (pl. PON1, MPO), illetve bizonyos betegségek és gyógyszeres kezelés is befolyásolhatja.

Mindezidáig több mint 40 olyan gént azonosítottak, ami hatással van a HDL koleszterin szintjére. A jejunum epiteliális sejteinek kefeszegélyében elhelyezkedő Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) fehérje akkor került a figyelem központjába, amikor kiderült, hogy az ezetimib ezen fehérjéhez kötődve gátolja a koleszterin felszívódását. A *NPC1L1* gén szekvenálása után igazolódott, hogy egyes *NPC1L1* variánsokat hordozókban szignifikánsabb alacsonyabb a koleszterin felszívódás, mint az azokat nem hordozó emberek esetében. A koleszterin a NPC1L1 fehérjén keresztül jut a vékonybél hámsejtbe, mely során a NPC1L1 meghatározza a keringésbe kerülő koleszterin mennyiségét. A koleszterin a bélhámsejtben észterifikálódik és a sejt bazolaterális oldalán elhelyezkedő ABCA1 transzporter révén bekerül a nyirokrendszerbe, ami a májba szállítja. Ha a sejtek koleszterin tartalma csökken, a NPC1L1 a membránban expresszáldódik, ha pedig a sejtek telítődtek koleszterinnel, a receptor az endoszómákba internalizálódik. Mára több mint 140 egy pontos nukleotid polimorfizmust (single nucleotide polymorphism, SNP) és 5 inszerciót/deléciót azonosítottak a *NPC1L1* génen belül. Ezek közül számos SNP befolyásolja a statin (hidroximetil-glutaril-koenzim-A reduktáz gátló) vagy a statin-ezetimib kombinációs kezelésre adott választ is. Nemrég igazolódott, hogy a c.-133A>G szignifikáns hatást fejt ki a *NPC1L1* promóter aktivitására, és pravastatin kezelés során kezelés során szignifikánsan befolyásolta a statin kezelés lipidcsökkentő hatását. Mindezidáig a vizsgálatok számottevő része az ezetimib hatását csak statinnal való kombinációban vizsgálta, az egyes SNP-ek ezetimib monoterápiára adott válaszra kifejtett hatását még nem vizsgálták.

Számos betegségben (úgy mint szívkoroszorúér-betegség, 2-es típusú cukorbetegség, metabolikus szindróma, szisztémás lupusz eritematózus, reumatoid arthritis, Crohn betegség, antifoszfolipid-szindróma, pszoriázis, krónikus vesebetegség, illetve bizonyos környezetszennyezések) igazolódott egy úgynevezett diszfunkcionális HDL-nek a jelenléte, mely már inkább prooxidáns és proinflammatorikus hatású. A diszfunkcionális HDL-ben csökken az atheroprotektív molekulák és fokozódik a proatherogén molekulák szintje, ugyanakkor magasabb oxidált zsírsav és malonaldehid tartalom és – részben az MPO által okozott klórozást vagy nitrálást követően – az apoAI oxidatív módosulása, illetve a PON1 aktivitásban is változás mutatható ki. A diszfunkcionális HDL nem képes megelőzni az LDL oxidációját, károsodik a reverz koleszterin transzport, csökken a fehérvérsejtek aktivált endothel sejtekhez történő adhéziója, nem képes az endothelialis nitrogén-monoxid (NO) képzés serkentésére, illetve károsodik az endothelialis repair funkció is.

A HDL-C és a kardiovaszkuláris események közötti fordított kapcsolat alapján a HDL-C szint-emelkedés vonzó terápiás célpontnak tűnhet, emiatt sok gyógyszert fejlesztenek és vizsgálnak. Mégis számos, koszorúérbetegek körében végzett klinikai vizsgálat során a HDL-C szint emelkedése ellenére sem sikerült a kardiovaszkuláris kockázat jelentős csökkenését elérni. A statinnal kezelt betegek egy jelentős részében valamilyen mértékben intolerancia alakul ki az alkalmazott gyógyszerrel szemben. Habár a statin okozta mellékhatások gyakorisága nem nagyobb, mint más gyógyszereké, a statinnal kezelt betegek nagy száma miatt ennek jelentősége mégis megnőtt. A statin intoleráns betegek kardiovaszkuláris kockázat csökkentése a proroprotein konvertáz-szubtilizin/kexin típus-9 (PCSK9) gátlók széleskörű elterjedése előtti éraban nem teljesen megoldott. Az ezetimib kardiovaszkuláris kockázatot csökkentő hatása a statinokénál mérsékeltebb, de a jelenleg hozzáférhető gyógyszerek közül a statin intoleráns betegek esetében ez az egyik leggyakrabban javasolt terápia, éppen emiatt ezen betegek körében elterjedt

az ezetimib monoterápia alkalmazása. Az ezetimib jól tolerálható gyógyszer, átlagosan 15-20%-os LDL-koleszterin (LDL-C)-szint csökkenést és körülbelül 3%-os HDL-C-szint emelkedést eredményez. Az ezetimib csökkenti a máj felé haladó koleszterin mennyiségét, az LDL receptorok száma fokozódik, ami az LDL katabolizmusának fokozódásához, ezáltal vezet az LDL-C szint csökkentéséhez. Ezen túlmenően bizonyítást nyert, hogy az ezetimib a reverz koleszterin transzport számos részfolyamatát is fokozza.

Egyre több a bizonyíték, hogy egyetlen HDL alkotóelem (mint a koleszterin tartalom) mérése nem elég ahhoz, hogy megbecsüljük a HDL kardioprotektív szerepét. A HDL-C szint kifejezheti ezen részecskék számát, de nem ad információt arról az alcsopotról, aminek a legnagyobb mértékben van szerepe a kardiovaszkuláris betegségekkel szembeni védekezésben. Ezért a csupán HDL-C szint (a HDL-beli koleszterin tartalom) mérés nem tűnik a HDL funkció legmegbízhatóbb prediktorának. Ezen túlmenően számos kísérleti és klinikai adat felveti annak a lehetőségét, hogy a HDL részecske összetétele megváltozhat különböző betegségekben és terápiás beavatkozások hatására, amely nem biztos, hogy tükröződik a HDL-C szintben. Mindezek alapján világosan látszik, hogy a jövőben olyan vizsgálatokra van szükség, amelyek a HDL szerkezete és működése közötti kapcsolatot vizsgálja, ezáltal pedig pontosabban mérhetnénk fel a kardiovaszkuláris kockázatot és a terápiás hatást, illetve ezek akár új terápiás lehetőségeket is nyújthatnak.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Tanulmányoztuk 3, 6 és 12 hónap alatt, naponta 10 mg dózisban alkalmazott ezetimib monoterápia hatását a lipid, a hsCRP és a kreatinin-kináz szintekre statin intoleráns hyperlipidaemiás betegekben.
2. További célkitűzésünk volt, hogy tanulmányozzuk a *NPC1L1* c.-133A>G polimorfizmus genotípus eloszlását az általunk választott betegpopulációban.
3. Vizsgáltuk a *NPC1L1* c.-133A>G ennek a polimorfizmusnak a lipid szintekre kifejtett hatását ezetimib monoterápia során.
4. Vizsgálataink második felében a HDL-hez kapcsolódó két enzim, a PON1 aktivitás és az MPO szint, illetve az érrelmeszesedés folyamatában szerepet játszó két biomarker, az MMP-9 és a TIMP-1 szintjét határoztuk meg és hasonlítottuk össze vaszkuláris szövődménnyel rendelkező és nem rendelkező hyperlipidaemiás, lipidcsökkentővel nem kezelt túlsúlyos betegekben. Mivel a lipidcsökkentő kezelés hatással van a MPO és a MMP-9 szintjére, illetve a PON1 aktivitására, vizsgálatunkba lipidcsökkentővel nem kezelt betegeket vontunk be.
5. További célkitűzésünk volt, hogy az MPO-PON1, illetve az MPO-MMP-9 és MPO-TIMP1 közötti kapcsolatot tanulmányozzuk ugyanezen betegcsoportban.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Statin intoleráns betegek kiválasztása

Vizsgálatunkba 101 statin intoleráns, Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiás beteg (átlagéletkor: $61,23 \pm 9,87$ év; 69 nő és 32 férfi; BMI: $28,18 \pm 4,29$ kg/m²) került bevonásra a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Lipid Szakrendelésének beteganyagából. 42 esetben statin indukálta miopátia, 28 esetben statin indukálta hepatopátia, 15 esetben statin indukálta súlyos gyomor-bélrendszeri tünet igazolódott. 16 beteg esetében egynél több tünet jelentkezett: 2 beteg esetében miopátia, hepatopátia és gyomor-bélrendszeri tünetek is, 7 betegnél miopátia és hepatopátia, 5 beteg esetében miopátia és gyomor-bélrendszeri tünetek, másik 2 betegnél hepatopátia és gyomor-bélrendszeri tünetek igazolódtak. Kizárásra kerültek a rendszeres alkohol-, illetve drogfogyasztók, malignus alapteregségben szenvedő betegek. Kizártuk továbbá a terheseket, szoptató anyákat, antikoaguláns vagy lipidcsökkentő kezelésben részesülő betegeket. A betegek 6 hétig az Országos Koleszterin Oktatási Program által meghatározott étrend alapján étkeztek, majd ezt követően 12 hónapon keresztül naponta 10 mg ezetimibet (Ezetrolt) szedtek. Minden beteg a kutatás természetéről és céljáról való részletes felvilágosítás után írásban beleegyezését adta a vizsgálatba, melyet a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága és az Országos Gyógyszerészeti Intézet jóváhagyott. A vizsgálatot regisztrálta az Európai Klinikai Vizsgálatok Adatbázisa (EudraCT number 2009–017732–40).

Túlsúlyos, lipidcsökkentővel nem kezelt betegek kiválasztása lipidcsökkentővel

Vizsgálataink második részébe 167 túlsúlyos, felnőtt, kaukázusi, Fredrickson IIa és IIb típusú hyperlipidaemiás beteget (átlagéletkor: 50,0 (41-61); 89 nő és 78 férfi; BMI: $28,49 \pm 5,56$ kg/m²) vontunk be a vizsgálatba. A résztvevőket a

Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Lipid Szakrendelésének beteganyagából választottuk ki. A túlsúlyos betegeket a BMI alapján definiáltuk ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$).

Minden beteg esetében végeztünk fizikális vizsgálatot és készült carotis ultrahang. Kiegészítő képalkotó vizsgálat a beteg panaszai alapján, illetve a normálistól eltérő fizikális, illetve elektrokardiográfia (EKG) vizsgálat esetén történt (alsóvégtagi artériás Doppler ultrahang, szívultrahang vagy komputer tomográfia (CT)).

Minden betegnél felmértük a magas vérnyomás, a 2-es típusú cukorbetegség és a dohányzás fennállását. Magas vérnyomást a vérnyomáscsökkentő gyógyszerek szedése, $\geq 140 \text{ Hgmm}$ szisztolés vagy ≥ 90 feletti diasztolés vérnyomás esetén diagnosztizáltunk. 2-es típusú cukorbetegséget a rendszeres vércukorszint-csökkentő gyógyszer szedése, illetve inzulin rendszeres alkalmazása vagy $\geq 7 \text{ mmol/L}$ éhomi vércukor-szint esetén állapítottunk meg. A dohányzást korábbi (az elmúlt 10 évben legalább fél évig tartó) vagy jelenlegi rendszeres dohányzás alapján határoztuk meg. A betegeket két, nemben illesztett alcsoportra osztottuk a meglévő, illetve jelen nem lévő vaszkuláris szövődmények alapján (Vaszkuláris szövődménnyel rendelkező alcsoport: átlagéletkor: $60,49 \pm 10,05$; 22 nő és 19 férfi; BMI: $29,34 \pm 3,94 \text{ kg/m}^2$, Vaszkuláris szövődménnyel nem rendelkező alcsoport: átlagéletkor: $46,93 \pm 12,40$; 67 nő és 59 férfi; BMI: $28,18 \pm 6,00 \text{ kg/m}^2$). A vaszkuláris szövődményeket ismert iszkémiás szívbetegség (miokardiális infarktus vagy koronária szklerózis), iszkémiás cerebrovaszkuláris betegség (iszkémiás agyi infarktus, tranziens iszkémiás attack vagy az artéria carotis sztenózing/eltűrése), illetve perifériás artériás betegség esetén diagnosztizáltuk. A vaszkuláris szövődményeket a beteg kórelőzménye vagy a képalkotó eljárások eredményei alapján határoztuk meg. A vaszkuláris szövődménnyel rendelkező csoportba soroltuk a már egyetlen szövődménnyel rendelkező betegeket is. Bevonáskor a betegeknek akut panaszuk nem volt. Kizárásra kerültek azok a betegek, akik a bevonás előtt legalább 6 héttel vagy a bevonáskor lipidcsökkentő gyógyszert

szedtek, autoimmun betegségben, krónikus gyulladásos kórképben, aktív máj vagy endokrin betegségben, 1-es típusú cukorbetegségben, tumoros alapbetegségben vagy végstádiumú vesebetegségben szenvedtek. A vizsgálatot a Helsinki Deklaráció szerint végeztük, minden beteg a vizsgálatba való bevonás időpontjában a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott beegyező nyilatkozatot írt alá.

Statin intoleráns betegek esetében a vérvétel és a laboratóriumi paraméterek mérése

A betegek bevonásakor, illetve 3, 6 és 12 hónapos ezetimib kezelés után, 12 órás éhezést követően reggel 07:30 és 08:00 óra között 10 ml vénás vér levétele történt. Az összkoleszterin, LDL-C, HDL-C, triglicerid, apoAI, apolipoprotein B (apoB), high-sensitivity (magas szenzitivitású) C-reaktív protein (hsCRP) értékek és a kreatinin-kináz (CK) aktivitás meghatározása a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében, standard laboratóriumi módszerekkel friss szérumból történt.

NPC1L1 genotípus meghatározás

A genomiális dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálása etiléndiamintetraecetsavval (EDTA) vagy citráttal antikoagulált vérből történt a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben. A c.-133A>G polimorfizmus (rs17655652) jelenlétének vizsgálata a polimeráz amplifikált szakaszok segítségével végzett enzimemésztéssel történt.

Statin intoleráns betegek eredményeinek statisztikai elemzése

Az adatok statisztikai analízisére a STATISTICA (Windows 6) és az IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 19. verzió) számítógépes

programokat használtuk. Az adatok eloszlásának vizsgálatára Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. Normál eloszlás esetében a paraméterek közötti különbségek vizsgálata egyszempontos varianciaanalízissel történt, amit Newman-Keuls teszt használata segítségével post hoc összehasonlítás követett. Nem-normál eloszlás esetén a különbségek összehasonlítására Kruskal-Wallis és Mann-Whitney féle U próbát használtunk. A $p < 0,05$ értéket választottuk szignifikancia szintnek. A változók genotípus függésének vizsgálatára Welch-féle próbát alkalmaztunk. A különböző genotípussal és alléllal rendelkező személyek paramétereinek összehasonlítása Khí-négyzet és Fisher-féle egzakt próbával történt.

Túlsúlyos és elhízott, lipidcsökkentővel nem kezelt betegek esetében a vérvétel és a laboratóriumi paraméterek mérése

A vénás vér levétele reggel 08:00 és 10:00 között, 12 órás éhezést követően történt. A szérum azonnal feldolgozásra került. A rutin laboratóriumi vizsgálatok (hsCRP, triglicerid, összkoleszterin, LDL-C, HDL-C, apoAI, apoB, lipoprotein (a) (Lp(a)), hemoglobin A1C (HbA1C), húgysav, ultraszenzitív pajzsmirigy stimuláló hormon (sTSH)) meghatározás standard laboratóriumi módszerekkel történt a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében. Az MPO, MMP-9, TIMP-1 és a PON1 paraoxonáz és arilészteráz vizsgálatok elvégzéséig a szérumot - 70°C-on tároltuk, és a minták 2 hónapon belül felhasználásra kerültek. Az MPO, MMP-9 és a TIMP-1 koncentráció szendvics ELISA vizsgálattal került meghatározásra

Paraoxonáz-1 aktivitás mérés

A PON1 paraoxonáz és arilészteráz aktivitás mérése spektrofotometriás módszerrel történt. A minták paraoxonáz aktivitását paraoxon szubsztráttal határoztuk meg 405 nm-en. A paraoxonáz aktivitás kifejezésére U/L

mértékegységet használtunk, ahol egy egység $1\text{ }\mu\text{mol}$ szubsztrát elbomlását jelenti egy perc alatt. Az arilészteráz aktivitást a fenilacetát szubsztrát hidrolíziével határoztuk meg. Mértékegysége U/L volt, ahol egy egység $1\text{ }\mu\text{mol}$ fenilacetát elbomlását jelenti egy perc alatt.

A PON1 (Q192R) fenotípus meghatározására duál szubsztrát módszert alkalmaztunk. R allél esetén a paraoxon hidrolízise gyorsabb, mint Q allél esetén, míg az R és Q allélek ugyanolyan arilészteráz aktivitással rendelkeznek. A só stimulálta (1 mol/l NaCl jelenlétében) paraoxon hidrolízisének és a fenilacetát hidrolízisének egymáshoz viszonyított aránya alapján az emberek három PON1 fenotípusba oszthatóak: alacsony, közepes és magas aktivitásúak.

Túlsúlyos és elhízott, lipidcsökkentővel nem kezelt betegek eredményeinek statisztikai elemzése

A statisztikai analízist a SASTM for WindowsTM 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programmal végeztük. A kapott adatok eloszlásának vizsgálata Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. Normális eloszlás esetén a vizsgált csoportok adatainak összehasonlítása Student-féle kétmintás t-próbával történt, míg nem-normál eloszlás esetén Mann-Whitney-féle u-próbát alkalmaztunk. A vizsgált paraméterek közötti összefüggés vizsgálata Pearson korrelációs analízissel történt; a fentebb említett nem-normál eloszlású paramétereket logaritmizáltuk annak érdekében, hogy korrigálni tudjuk az aszimmetrikus eloszlásukat. Multivariációs analízis (backward-stepwise módszer) segítségével meghatároztuk, hogy az MPO szinttel legszorosabb összefüggésben álló változókat mind az egész betegcsoportban, mind a VSZ és NVSZ alcsoportokban is. A szignifikancia szintjének $p < 0,05$ értéket választottuk.

EREDMÉNYEK

A Niemann–Pick C1-Like 1 c.-133A>G polimorfizmus hatása az ezetimib monoterápia hatékonyságára

Az egész betegcsoportot vizsgálva három hónapos ezetimib kezelés után az összkoleszterin ($p<0,001$), az LDL-C ($p<0,001$) és a hsCRP ($p<0,01$) szintje szignifikánsan csökkent, miközben a többi vizsgált paraméter (triglicerid, HDL-C, apoB, apoAI és CK) szintje nem változott szignifikánsan. Hat hónapos kezelés után az összkoleszterin ($p<0,001$), az LDL-C ($p<0,001$), és a hsCRP szint ($p<0,01$) mellett a triglicerid ($p<0,01$) és az apoB szintje ($p<0,01$) is szignifikánsan csökkent a kezdeti értékekhez képest. Tizenkét hónapos kezelést követően pedig szignifikánsan csökkent az összkoleszterin ($p<0,001$), az LDL-C ($p<0,001$), a triglicerid ($p<0,05$), és az apoB ($p<0,01$) szint. Az egész betegcsoportot vizsgálva a 12 hónapos kezelés során nem változott szignifikánsan a HDL-C és az apoAI szintje.

A vizsgált populációban a *NPC1L1* c.-133A>G genotípus eloszlás a következő: 57,42% volt az AA, 34,65% volt az AG és 7,92% volt a GG genotípus aránya. Mivel a GG betegek aránya alacsony volt, a vizsgált betegeket két csoportra osztottuk: AA (G-t nem hordozók) és AG+GG (G hordozók) alcsoportra. A kezdeti lipid szintekben nem volt szignifikáns különbség az AA és az AG+GG betegcsoport között. Nem volt szignifikáns különbség az életkor, a BMI és a haskörfogat esetében sem a két csoport között.

3, 6 és 12 hónapos ezetimib kezelés során az AA betegcsoportban nem találtunk szignifikáns változást az apoAI szintben (1,96; 3,39 és 2,74%), miközben az AG+GG betegcsoportban egy szignifikáns emelkedés igazolódott a kezelés során (9,15; 8,54 és 13,58%). A *NPC1L1* c.-133A>G hatása az ezetimib monoterápiára bekövetkező apoAI válaszra szignifikáns volt ($p < 0,05$). A HDL-C

szint változatlan maradt mindkét betegcsoportban, és a két csoport között sem találtunk szignifikáns különbséget.

Az ezetimib monoterápia során 3, 6 és 12 hónap után a két csoportot összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget a többi lipid paramétert illetően. 3 és 12 hónapos ezetimib kezelés után az LDL-C és az összkoleszterin szint szignifikánsan csökkent mind az AA, mind az AG+GG csoportban ($p < 0,05$). 6 és 12 hónapos kezelés után az apoB szint szignifikánsan csökkent az AA csoportban.

Az ezetimib tolerálhatósága kitűnő volt. Egy beteg esetében sem volt szükség a gyógyszer szedésének felfüggesztésére mellékhatás miatt. A CK szintben sem volt szignifikáns változás a 12 hónapos kezelés során.

A paraoxonáz-1 aktivitás, a mieloperoxidáz szint és más vaszkuláris biomarkerek közötti kapcsolat kezeletlen hyperlipidaemiás betegekben

A vaszkuláris szövődménnyel nem rendelkező (NVSZ) alcsoporthoz képest a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező (VSZ) alcsoportba tartozó betegek életkora szignifikánsan magasabb volt (NVSZ: $46,93 \pm 12,40$ év vs. VSZ: $60,49 \pm 10,05$, $p < 0,001$). A BMI és a haskőrfogat esetében nem volt szignifikáns különbség a két alcsoport között. Nem volt szignifikáns különbség az éhomi vércukorszint és a HbA1C szintekben a két alcsoport között. A VSZ alcsoport esetében atherogén lipid profilt találtunk: szignifikánsan magasabb volt az összkoleszterin ($p < 0,01$), az LDL-C és a triglicerid szintje ($p < 0,05$). Ennek ellenére a HDL-C, az apoAI, az apoB és a Lp(a) szintek esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két alcsoport között. A két alcsoport között nem volt szignifikáns különbség a hsCRP szintekben sem.

Vizsgáltuk a PON1 Q192R fenotípus eloszlást és allél frekvencia gyakoriságot is. Az egész betegcsoportot tekintve a PON1 fenotípus eloszlás a következő: 80% ($n=134$) volt az AA, 20% ($n=33$) volt az AB fenotípus aránya, és

nem volt BB fenotípusú beteg. A fenotípus megoszlás (AA-AB) 83% (n=104) - 17% (n=22) volt a vaszkuláris szövődménnyel nem rendelkező alcsoportban és 73% (n=30) - 27% (n=11) volt a vaszkuláris szövődménnyel rendelkezők körében. Az allél frekvenciák relatív gyakorisága követte a Hardy-Weinberg szabályt és nem volt szignifikáns különbség a két alcsoport között.

Nem volt szignifikáns különbség az MMP-9 szintekben a két vizsgált alcsoport között, de az MPO és a TIMP-1 szintje szignifikánsan magasabb volt (MPO: 728 (367,25-1177,90) mg/ml vs. 315,9 (176,05-687,40) mg/ml; $p<0,001$; és TIMP-1: 172,7 (157,7-197,7) ng/ml vs. 152,6 (129,3-172,3) ng/ml; $p<0,0001$, illetve az MMP-9/TIMP-1 arány szignifikánsan alacsonyabb volt a VSZ alcsoportban a NVSZ alcsoportéhoz képest (3,02 (1,95-4,22) vs. 3,50 (2,34-5,20), $p<0,0001$). A két alcsoport között nem találtunk szignifikáns különbséget a PON1 aktivitásban, ezzel szemben az MPO/PON1 arány szignifikánsan magasabb volt a vaszkuláris szövődménnyel rendelkezők esetében, mint a szövődménnyel nem rendelkező betegek körében ($p<0,05$).

Az MPO szint szignifikáns negatív korrelációt mutatott a PON1 arilészteráz aktivitással mind a teljes betegcsoportot ($r=0,42$, $p<0,0001$), mind pedig a két alcsoportot külön vizsgálva (VSZ: $r=0,44$, $p=0,01$; NVSZ: $r=0,39$, $p<0,0001$). Az MPO szint és a PON1 paraoxonáz aktivitás közötti összefüggést vizsgálva nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az egyes betegcsoportokban. Az MPO szint szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az MMP-9 szinttel ($r=0,37$, $p<0,0001$) mind az egész betegcsoportban, mind a NVSZ alcsoportban ($r=0,42$, $p<0,0001$). Habár nem érte el a szignifikancia szintjét, feltételezhetően az alcsoportokban található alacsonyabb betegszám miatt, az MPO szint pozitív korrelációs tendenciát mutatott az MMP-9 szintjével a VSZ alcsoportban ($r=0,29$, $p=0,07$). Az MPO és a TIMP-1 szintek szignifikáns pozitív korrelációt mutattak mind az egész betegcsoportban ($r=0,42$, $p<0,0001$), mind pedig a két alcsoportban (NVSZ: $r=0,41$, $p<0,0001$; VSZ: $r=0,33$, $p<0,05$). A PON1 arilészteráz aktivitás is

szignifikáns negatív korrelációt mutatott a TIMP-1 szinttel mind az egész betegcsoportban ($r=-0,24$, $p<0,01$), mind a NVSZ alcsoportban ($r=-0,26$, $p<0,01$).

Vizsgálataink további részében többszörös regressziós analízist alkalmaztunk, mely során az MPO szintet választottuk függő változónak. A PON1 aktivitás, az MMP-9 és a TIMP-1 szint az MPO szint független prediktorának bizonyult mind az egész betegcsoportban (PON1 arilészteráz aktivitás: $\beta=-0,350$; MMP-9: $\beta=0,315$; TIMP-1: $\beta=0,292$; $p<0,0001$), mind a NVSZ alcsoportban (PON1 arilészteráz aktivitás: $\beta=-0,330$; MMP-9: $\beta=0,351$; TIMP-1: $\beta=0,262$; $p<0,0001$). Ezzel szemben a VSZ alcsoportban csak a PON1 arilészteráz aktivitás igazolódott az MPO szint független előrejelzőjének ($\beta=-0,570$, $p<0,05$).

MEGBESZÉLÉS

Vizsgálatunk első felében statin intoleráns, hyperlipidaemiás betegekben ezetimib monoterápia során vizsgáltuk a *NPC1L1* c.-133A>G SNP lipid paraméterekre, azon belül az apoAI-et tartalmazó HDL-C-re kifejtett hatását. A nemzetközi irodalom áttekintése során a korábbi tanulmányok az ezetimib különböző mértékű HDL-C szint-emelő hatásáról számoltak be. Míg egyes kutatók szignifikáns HDL-C emelkedést tapasztaltak az ezetimib kezelés során, addig egy egészséges emberek körében végzett vizsgálat során nem igazolódott szignifikáns különbség a HDL-C szintben a placebo csoport és az ezetimib monoterápiában részesülő csoport adatainak összehasonlításakor. Mindemellett a *NPC1L1* polimorfizmusok hatását a HDL-C válaszra ezetimib monoterápia során még nem vizsgálták.

Kutatásunk során nem találtunk szignifikáns különbséget az ezetimib kezelés során kialakult HDL-C válaszban a *NPC1L1* c.-133 AA és AG+GG betegek között. Ezzel szemben 3, 6 és 12 hónapos ezetimib kezelés során az apoAI szint szignifikáns emelkedett az AG+GG betegekben, miközben az AA betegcsoportban nem csökkent szignifikánsan. Ezen eredmények alapján munkacsoportunk számolt be először arról, hogy a *NPC1L1* c.-133A>G SNP befolyásolja az ezetimib monoterápiára adott apoAI választ, ezáltal befolyásolhatja az ezetimib a HDL részecskék szerkezetére és funkciójára kifejtett hatását.

Vizsgálatunk során meg tudtuk erősíteni, hogy az ezetimib monoterápia javítja a lipid paramétereket statin intoleráns hyperlipidaemiás betegekben. Az ezetimib monoterápia szignifikánsan csökkentette az összkoleszterin (-11,70%), az LDL-C (-8,52%) és a triglicerid szinteket (-3,70%). A HDL-C szint nem emelkedett szignifikánsan (1,45%). Egy korábbi meta-analízis során az ezetimib monoterápia a placebo csoporthoz képest az LDL-C szintet -18,58%-kal csökkentette, míg az összkoleszterin és a triglicerid szinteket -13,46%-kal, illetve -8,06%-kal csökkentette. A HDL-C szint 3%-kal szignifikánsan nőtt. A vizsgálatunk során

tapasztalt, az ezetimib által a lipid paraméterekre kifejtett mérsékeltebb hatás – legalábbis részben – az általunk vizsgált betegpopulációval magyarázható. Más vizsgálatokban az ezetimib hatását különböző lipoprotein rendellenességgel rendelkező betegek (például 2-es típusú cukorbetegség, kevert hyperlipidaemia) körében vizsgálták, míg mi egy sajátos, statin-intoleráns hyperlipidaemiás betegcsoportot vontunk be a vizsgálatba. Ezenkívül feltételezhetően az általunk vizsgált betegpopuláció Apolipoprotein E allélmegoszlása is különbözhetett a korábban vizsgált betegcsoportok megoszlásától.

Korábbi tanulmányokban az ezetimib monoterápia csökkentette a hsCRP szintjét a placebohoz képest, de ezek a különbségek többnyire nem voltak statisztikailag szignifikánsak. Az egész betegcsoportot vizsgálva 3 és 6 hónapos ezetimib terápia során szignifikánsan csökkent a hsCRP szint, míg ez a különbség 12 hónap elteltével már nem volt szignifikáns. A vizsgált *NPC1L1* polimorfizmus nem változtatta meg szignifikánsan az ezetimib hsCRP szintre gyakorolt hatását.

Kevés adat áll rendelkezésre a *NPC1L1* c.-133A>G SNP genotípus eloszlásával kapcsolatban. Az általunk vizsgált betegek genotípus eloszlása hasonló volt, mint az irodalomban szereplő, 2010-ben megjelent, 271 hyperlipidaemiás és 272 kontroll bevonásával végzett vizsgálatban szereplő betegeké. Ebben a kutatásban az autoszómális domináns hyperlipidaemiás csoportban az AA allélt hordozók aránya 48%, az AG és GG allélt hordozók aránya pedig 46% és 6% volt. Míg a kontroll csoportban a genotípus eloszlás a következő: 58% volt az AA, 35% volt az AG és 7% volt a GG genotípusúak aránya.

Jól ismert, hogy az ezetimib koleszterin-csökkentő hatásának maximuma 2 hetes kezelés után alakul ki, és a hatás mértéke ezt követően lényegesen nem változik. Valószínűleg éppen emiatt a legtöbb vizsgálat csupán 12 hétig vizsgálta az ezetimib hatékonyságát. Habár ezen rövid távú vizsgálatok (12 hét) során úgy tűnik, hogy az ezetimib monoterápia a placebohoz hasonló biztonsági profillal rendelkezik, az ezetimib monoterápia hosszú távú alkalmazásának

biztonságosságáról korlátozott információ áll rendelkezésre. Vizsgálatunk során az egyéves ezetimib kezelés során a betegek a gyógyszert jól tolerálták. Egy beteg esetében sem volt szükség a gyógyszer szedésének felfüggesztésére mellékhatás miatt. Az egyéves ezetimib kezelés alatt nem tapasztaltunk súlyos mellékhatást, illetve a CK szintben sem volt szignifikáns változás.

Vizsgálataink második felében lipidcsökkentővel nem kezelt, túlsúlyos, hyperlipidaemiás betegekben vizsgáltuk a HDL-hez kapcsolódó két enzim, a PON1 aktivitás és az MPO, illetve két, az érlemlésesedés folyamatában szerepet játszó biomarker (MMP-9 és TIMP-1) kapcsolatát. Jól ismert a szoros kapcsolat az MPO - MMP-9 - TIMP-1 szintek, és az MPO szint - PON1 aktivitás között, illetve hogy a krónikus gyulladás az érlemlésesedés, az elhízás és a kardiovaszkuláris betegségek jellemzője, de az ezek közötti összefüggés még nem teljesen tisztázott. Az irodalomban ez az első vizsgálat, melyben a PON1 aktivitást, az MPO, az MMP-9 és a TIMP-1 szinteket párhuzamosan vizsgáltuk.

Vizsgálatunkban a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező betegeknél szignifikánsan magasabb MPO szint igazolódott, mint a vaszkuláris szövődménnyel nem rendelkezők körében, ami arra utal, hogy ezekben a betegekben fokozottabb az oxidatív stressz és atherogén állapot áll fenn.

Elsőként mutattuk ki, hogy szignifikáns pozitív összefüggés van az MPO és az MMP-9 szintek, illetve az MPO és a TIMP-1 szintek között kezeletlen, túlsúlyos hyperlipidaemiás betegekben. Ezek a korrelációk a vaszkuláris szövődménnyel rendelkezők és az azzal nem rendelkezők között is igazolódtak. Habár a vaszkuláris szövődménnyel nem rendelkező betegek esetében nem lehetett kimutatni az érlemlésesedés jeleit, de feltételezzük, hogy egy korai aszimptomatikus érlemlésesedés már kialakult bennük az elhízáshoz társuló alacsony fokú krónikus gyulladás miatt, de ezt a korai érlemlésesedéses folyamatot a fiatalabb életkoruk miatt az elvégzett vizsgálatok segítségével még nem lehetett diagnosztizálni.

A 2-es típusú cukorbeteg és koszorúér-betegségben szenvedők körében végzett tanulmányok eredményeivel megegyezően, kezeletlen hyperlipidaemiás betegekben az MPO szint szignifikáns negatív korrelációt mutatott a PON1 arilészteráz aktivitással mind az egész betegcsoportban, mind pedig a két vizsgált alcsoportban. Többszörös regressziós analízissel pedig a PON1 arilészteráz aktivitás az MPO szint független prediktorának bizonyult mind az egész betegcsoportban, mind a két alcsoportban. Ez az in vivo eredményünk összhangban áll Huang és munkatársai in vitro eredményeivel, melyek azt mutatják, hogy az MPO és a PON1 kölcsönös gátló hatást fejt ki egymásra.

Betegeink körében az MPO/PON1 arány szignifikánsan nagyobb volt a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező betegek esetében, mint a szövődménnyel nem rendelkezők körében, ezáltal ennek a paraméternek a vizsgálata összefüggésbe volt hozható az érlemezésedés súlyosságával. Adataink összhangban van egy 2014-ben publikált tanulmány eredményeivel, mely ezen túlmenően felvetette annak a lehetőségét is, hogy az MPO/PON1 arány a diszfunkcionális HDL egyik lehetséges mutatója, ezáltal a koszorúérbetegség szekunder prevenciójának hasznos markere lehet.

Vizsgálatunk során nem találtunk szignifikáns korrelációt a PON1 paraoxonáz aktivitás és az MPO szint között, aminek hátterében a paraoxonáz aktivitás magas inter-individuális variabilitása állhatott. Nem találtunk szignifikáns különbséget a PON1 aktivitásban (arilészteráz és paraoxonáz) a két alcsoport összehasonlításakor sem.

Igazolódott, hogy a PON1 arilészteráz aktivitás, az MMP-9 és a TIMP-1 szintek az MPO szint szignifikáns prediktorai mind az egész betegcsoportban, mind a NVSZ alcsoportban. Ezen belül a PON1 és az MPO közötti kapcsolat bizonyult a legerősebbnek, mivel csupán a PON1 arilészteráz aktivitás volt az MPO szint független prediktora a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező csoportban. A túlsúlyos, hyperlipidaemiás betegekben talált kapcsolatok

halmozódó és szinergikus atherogen hatásokra utalnak, amelyben az oxidatív stressz direkt fokozásán és az anti-atherogenikus hatású PON1 funkciójának károsításán keresztül az MPO emelkedett szintje hozzájárul a vaszkuláris események kialakulásához. Az MPO és az MMP-9, illetve az MPO és a TIMP-1 közötti szignifikáns korreláción kívül a PON1 arilészteráz aktivitás szignifikáns negatív korrelációt mutatott a TIMP-1 szinttel is, ami arra utalhat, hogy a gyulladásoos faktorok az enzim inaktivációja révén befolyásolhatják a PON1 aktivitást.

Kapott eredményeink megerősítik, hogy az MPO és a PON1 a HDL-lel együtt egy komplex rendszert képez, ezáltal a HDL és a hozzá kapcsolódó biomarkerek (PON1 és MPO) együttes vizsgálata a diszfunkcionális HDL jelenlétének egyik lehetséges markere lehet, és ezek párhuzamos vizsgálata, kiegészítve más - az atheroszklerózisban szerepet játszó – markerrel, az érlelmeszesedés súlyosságának pontosabb indikátorai lehetnek túlsúlyos betegek esetében. E paraméterek együttes meghatározása hasznos lehet a magas kardiovaszkuláris kockázatú betegek azonosításában, ami hozzájárulhat a korai, hatékony kezeléshez, továbbá elősegítheti a kezelés hatékonyságának nyomon követését.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi években számos kutatás számolt be a HDL kiemelkedő antiatherogén hatásáról. Egyre több a bizonyíték, hogy egyetlen HDL alkotóelem (mint a koleszterin tartalom) mérése nem elég ahhoz, hogy megbecsüljük a HDL kardioprotektív szerepét. Mindezek alapján világosan látszik, hogy a jövőben olyan vizsgálatokra van szükség, amelyek a HDL szerkezete és működése közötti kapcsolatot vizsgálják.

Mint szervezetünk szinte minden részecskéjével kapcsolatban, a HDL-lel kapcsolatosan is, számos olyan gént azonosítottak, ami hatással van – egy úgynevezett endogén módon - annak szintjére és szerkezetére. Ezen túlmenően a HDL működését a hozzá kapcsolódó, azzal funkcionális egységet alkotó enzimek/molekulák is – exogén módon – befolyásolhatják.

Munkánk célja volt, hogy vizsgáljuk ezetimib monoterápia során a *NPC1L1* c.-133A>G polimorfizmus lipid szintekre kifejtett hatását statin intoleráns hiperlipidaemiás betegekben. Továbbá vizsgáltuk a HDL-hez kapcsolódó két enzim, a PON1 aktivitás és az MPO szint, illetve az érlelmeszesedés folyamatában szerepet játszó két biomarker, az MMP-9 és a TIMP-1 szintjét vaszkuláris szövődménnyel rendelkező és azzal nem rendelkező hiperlipidaemiás, lipidsökkentővel nem kezelt túlsúlyos betegekben.

Ezetimib monoterápia során a HDL-C szintben nem volt szignifikáns változás sem az AA, sem az AG+GG betegcsoportban, és a két csoportot összehasonlítva sem találtunk szignifikáns különbséget. Miközben az apoA1 szintet vizsgálva a 3, 6 és 12 hónapos ezetimib kezelés során az AA betegcsoportban sem találtunk szignifikáns változást, ezzel szemben az AG+GG betegcsoportban egy szignifikáns emelkedés igazolódott. Így a *NPC1L1* c.-133A>G hatása az ezetimib monoterápiára bekövetkező apoA1 válasza szignifikáns volt ($p < 0,05$).

Lipidcsökkentővel nem kezelt, túlsúlyos betegeinket vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget a vaszkuláris szövődménnyel rendelkező és azzal nem rendelkező csoport HDL-C szintje között. A biomarkereket vizsgálva az MPO szint szignifikáns negatív korrelációt mutatott a PON1 arilészteráz aktivitással mind a teljes betegcsoportot, mind pedig a két alcsoportot külön vizsgálva, miközben szignifikáns pozitív összefüggés igazolódott az MPO és az MMP-9 szintek, illetve az MPO és a TIMP-1 szintek között. Az MPO/PON1 arány szignifikánsan nagyobb volt a vaszkuláris szövődménnyel rendelkezők esetében, mint a szövődménnyel nem rendelkező betegek körében. Többszörös regressziós analízis során pedig a PON1 aktivitás, az MMP-9 és a TIMP-1 szint is az MPO szint független prediktorának bizonyult, ezen belül a PON1 és az MPO közötti kapcsolat bizonyult a legerősebbnek.

Vizsgálataink során a HDL-C szintjében nem találtunk szignifikáns változást. Ennek ellenére a *NPC1L1* c.-133A>G SNP befolyásolta az ezetimib monoterápiára adott apoAI választ, ezáltal – endogén módon - befolyásolhatta az ezetimib HDL részecskék szerkezetére és funkciójára kifejtett hatását. E mellett - a HDL funkciójának módosításán keresztül - a HDL-hez kapcsolódó PON1 és MPO együttes vizsgálata érzékenyebb markere volt az érlelmeszesedés súlyosságának, és felmerül annak a lehetősége is, hogy a diszfunkcionális HDL egyik lehetséges mutatója lehet. Eredményeink így alátámasztják, hogy a HDL minőségét befolyásoló tényezők vizsgálata segíthet a HDL kardioprotektív szerepének becslésében, ezáltal fontosabb szerepet tölthet be, mint a csupán HDL-C mennyiség mérése.



Nyilvántartási szám: DEENK/293/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Zsíros Noémi
Neptun kód: DQUOC2
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Zsíros, N.**, Koncsos, P., Lőrincz, H., Seres, I., Katkó, M., Szentpéteri, A., Varga, V. E., Fülöp, P., Paragh, G., Harangi, M.: Paraoxonase-1 arylesterase activity is an independent predictor of myeloperoxidase levels in overweight patients with or without cardiovascular complications. *Clin. Biochem.* 49 (12), 862-867, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.03.011>.
IF: 2.382 (2015)
2. **Zsíros, N.**, Bodor, M., Varga, V., Berta, E., Balogh, I., Seres, I., Paragh, G., Harangi, M.: The c.-133A >G polymorphism in NPC1L1 gene influences the efficacy of ezetimibe monotherapy on apolipoprotein A1 in hyperlipidemic patients. *Pharmazie.* 69, 1-6, 2014.
IF: 1.052

További közlemények

3. Harangi, M., **Zsíros, N.**, Paragh, G.: Dyslipidaemiák kezelése: új lipidsökkentő szerek. *Metabolizmus.* 14 (3), 160-163, 2016.
4. Varga, V. E., Lőrincz, H., **Zsíros, N.**, Fülöp, P., Seres, I., Paragh, G., Balla, J., Harangi, M.: Impact of selective LDL apheresis on serum chemerin levels in patients with hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* 15 (182), 1-7, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/DOI 10.1186/s12944-016-0353-x>
IF: 2.137 (2015)





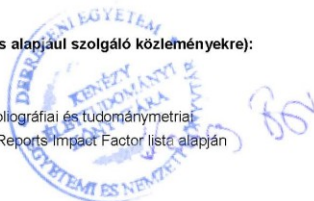
5. Varga, O., **Zsiros, N.**, Olsson, I. A.: Estimating the predictive validity of diabetic animal models in rosiglitazone studies.
Obes. Rev. 16 (6), 498-507, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/obr.12278>
IF: 7.51
6. **Zsiros, N.**, Paragh, G., Harangi, M.: Az emelkedett lipoprotein(a)-szint klinikai jelentősége és kezelési lehetőségei.
Orv. Hetil. 155 (16), 607-614, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29877>
7. Berta, E., Harangi, M., **Zsiros, N.**, Nagy, E., Paragh, G., Bodor, M.: Effect of thyroid hormone status and concomitant medication on statin induced adverse effects in hyperlipidemic patients.
Pharmazie 69, 420-423, 2014.
IF: 1.052
8. **Zsiros, N.**, Juhász, L., Paragh, G., Harangi, M.: Statin okozta mellékhatások kockázati tényezői hyperlipidaemiás betegeinkben.
Metabolizmus 12 (3), 178-182, 2014.
9. Harangi, M., **Zsiros, N.**, Balla, J., Paragh, G.: Tapasztalataink a szelektív LDL-aferezis kezeléssel.
Metabolizmus 12 (1), 19-23, 2014.
10. Harangi, M., **Zsiros, N.**, Paragh, G.: A myeloperoxidáz szerepe a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában.
Metabolizmus 11 (1), 3-10, 2013.
11. Harangi, M., **Zsiros, N.**, Juhász, L., Paragh, G.: Statin okozta mellékhatások: tények és gének.
Orv. Hetil. 154 (3), 83-92, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2013.29530>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,133

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,434

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

Debrecen, 2016.11.03.



Vizsgálatainkat a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 “Nemzeti Kiválóság Program”, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 számú projektek, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA 115723) és a DEOEC Mec-7/2008 támogatták. A munkánkat támogatta továbbá a Debreceni Egyetem Orvos-, és Egészségtudományi Centrum Áthidaló Alapja (IB). A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg. Készült a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 „A magyar gazdaság versenyképességének növelése a lakosság egészségi állapotát javító népegészségügyi intervenciók célcsoportjainak és tartalmának azonosítása révén” című projekt támogatásával.

Köszönettel tartozom Dr. Paragh György Professzor Úrnak, aki biztosította számomra a lehetőséget, hogy az általa vezetett DE Belgyógyászati Intézetben végezhessem tudományos munkámat. Ezúton köszönöm témavezetőm, Dr. Harangi Mariann egyetemi docens szakmai irányítását és hasznos tanácsait tudományos munkám során, továbbá a vizsgálatok során nyújtott sokoldalú és áldozatkész segítségét. Köszönetemet fejezem ki Dr. Seres Ildikó Tudományos Főmunkatársnőnek, aki a kutatási eredmények megvitatásában és statisztikai analizésében segítségemre volt. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Balogh Istvánnak, aki a *NPC1L1* genotípus meghatározást végezte, illetve Dr. Lőrincz Hajnalkának, aki a laboratóriumi munka során nyújtott sokoldalú segítséget. Köszönöm Dr. Bodor Miklós és Dr. Fülöp Péter egyetemi docensek, illetve Dr. Koncsos Péter a közlemények írásában nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Mozga Mária Gyöngyikének, Lénárt Ferencnének és Pap Magdolnának a vérvételek kivitelezéséért és az alapvető laboratóriumi módszerekben nyújtott segítségükért. Továbbá köszönetemet fejezem ki tudományos közleményeim társszerzőinek és a DE Belgyógyászati Intézet Kutatólaboratóriumában dolgozóknak és a Laboratóriumi Medicina Intézet Molekuláris Biológiai Részlegének munkatársainak, akik segítették és támogatták munkámat.