

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Lipoprotein szubfrakciók vizsgálata lipidanyagcsere zavarral  
járó kórképekben**

Lőrincz Hajnalka

Témavezető: Dr. Seres Ildikó



**DEBRECENI EGYETEM**  
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2015

## **Lipoprotein szubfrakciók vizsgálata lipidanyagcsere zavarral járó kórképekben**

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

Írta: Lőrincz Hajnalka, okleveles biológus

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

Témavezető: Dr. Seres Ildikó, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Somogyi Anikó, az MTA doktora  
Dr. Töröcsik Dániel, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, Népegészségügyi Kar, Megelőző Orvostani Intézet  
Tárgyalóterme, 2015. október 6. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Márk László, PhD  
Dr. Oláh László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Somogyi Anikó, az MTA doktora  
Dr. Márk László, PhD  
Dr. Oláh László, PhD  
Dr. Töröcsik Dániel, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Intézet  
„A” épület Tanterme, 2015. október 6. 13:00

## BEVEZETÉS

A plazma lipoproteinek a triglicerid, koleszterin és annak észtereinek szállítását végző bonyolult biokémiai struktúrák, amelyek a szállítási feladatokon kívül rendkívül sokrétű biológiai funkciót töltenek be. A lipoproteinek 5 - >1000 nm átmérőjű gömb alakú struktúrák, amelyek külső amfipatikus tulajdonságú, perifériális és integráns fehérjéket tartalmazó lipid monorétegből, ill. trigliceridből és koleszterin-észterből álló hidrofób magból állnak. Jellemző strukturális fehérjéi az apolipoproteinek, amelyek a lipoproteinek szerkezetének stabilizálásában, a receptor ligandok aktiválásával a metabolikus folyamatok szabályozásában, ill. az enzimátikus folyamatok aktiválásával a lipoproteinek metabolizmusában játszanak szerepet. A lipoproteinek vizsgálatakor a klinikai tanulmányok többsége a különböző lipoproteineket mintegy egy, koleszterintartalom alapján jól jellemezhető egységként tekintik. Azonban a plazma lipoproteinek nem írhatóak le pusztán a koleszterintartalmuk alapján, ugyanis folyamatosan és dinamikusan egymásba alakulnak, a hidrofíl köpenyükhöz asszociált strukturális és funkcionális fehérjék révén pedig állandó kölcsönhatást teremtenek egymással és a testi sejtek receptoraival. Ezért a lipoprotein partikulumokat méretük, denzitásuk, elektroforetikus tulajdonságaik, apolipoprotein tartalmuk alapján heterogén szubfrakciókra lehet osztani. A lipoprotein szubfrakciók elválasztására számos analitikai módszer áll rendelkezésre, amelyek közül a legelterjedtebbek a sűrűséggrádiens ultracentrifugálás, a gélelektroforézis, a nukleáris rezonancia spektroszkópia és a nagy felbontású ion-mobilitás technika. A lipoprotein szubfrakciók nevezéktana jelentősen eltérő annak megfelelően, hogy milyen technikával választották el.

A kis sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein – LDL) 1,019-1,063 g/ml denzitású lipoprotein frakció, amelynek hidrofób magja megközelítőleg 170 triglicerid és 1600 koleszterin-észter molekulát tartalmaz, proteómját pedig egyetlen apolipoprotein B (apoB) molekula alkotja. Az LDL szubfrakciói közül a

kis denz LDL szubfrakció a legkönnyebben oxidálható lipoprotein partikulum, amely oxidálódásával növeli a szervezet oxidatív stressz állapotát, ezáltal elindítva a szabadgyökös folyamatok felgyorsulását, mindezek később fokozott kardiovaszkuláris rizikóhoz, ill. az érlemeszesedés előrehaladásához vezethet. Az érlemeszesedés szempontjából a nagyobb, kevésbé denz LDL szubfrakciók kevésbé károsító hatásúaknak tekinthetők.

A nagy sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein – HDL) védő szerepet tölt be az atherosclerosis folyamatában. A HDL 1,063-1,021 g/ml denzitású lipoprotein frakció, lipidómja főként koleszterin-észterből (14-18%), trigliceridből (3-6%) és szabad koleszterinből (3-5%) áll. A HDL felszínén közel 200 féle különböző fehérjét identifikáltak, amelyek közül a legfontosabb strukturális fehérjék az apolipoprotein A-I (apoAI) és az apolipoprotein AII (apoAII). Az LDL-hez hasonlóan a HDL partikulumok is méretüket, denzitásukat, strukturájukat és funkciójukat tekintve inhomogének, különböző szubfrakciókra oszthatóak. A nagy kevésbé denz HDL szubfrakciók magasabb trigliceridtartalmuknál fogva a reverz koleszterin transzportban vesznek részt, míg a kis denz HDL szubfrakcióknak a hozzájuk asszociáltan keringő antioxidáns enzimeken keresztül fokozott antioxidáns hatása van.

A HDL enzimei közül legkifejezettebb antioxidáns hatása a humán paraoxonáz-1 (PON1) enzimnek van, amely az apoAI-en keresztül kapcsolódik a HDL-hez. Két gyakori polimorfizmusa ismert, a PON1-192QR glutamin (Q) és arginin (R) és a PON1-55LM leucin (L) és metionin (M) aminosavcsere, melyek az enzim koncentrációját és aktivitását is befolyásolják. A PON1 enzim főként a kisméretű HDL szubfrakciókon lokalizálódik. Antioxidáns hatása révén gátolja az LDL oxidációját, ezáltal csökkenti az oxidált LDL atherosclerotikus és pro-inflammatorikus hatását. Aktivitása a fokozott oxidatív stresszel járó kórállapotokban jelentős mértékben csökken, de csökkenti a PON1 aktivitást a dohányzás, alkoholfogyasztás, idősebb életkor és a környezeti ártalmak is.

Korábbi tanulmányokban széles körben vizsgálták az elhízás során kialakuló lipid abnormalitásokat, azon belül is a lipoprotein szubfrakciók eloszlását. Leírták a megemelkedett kis denz LDL szubfrakció szintjének magasabb triglicerid szinttel, ill. alacsonyabb HDL-koleszterin (HDL-C) szinttel való kapcsolatát, amely hozzájárul az atherogén lipidprofilhoz. A HDL szubfrakciók aránya elhízás során eltolódik a kisméretű HDL szubfrakciók irányába, a HDL viszont a szerkezetében bekövetkező változások miatt csak korlátozottan képes ellátni feladatát. Továbbá jól ismert, hogy az elhízással felszaporodó zsírszövet nem csupán energiaraktárként funkcionál, hanem aktív hormontermelő szervként működve biológiailag aktív molekulákat, ún. adipokineket termel, amelyek autokrin, parakrin és szisztémás hatásuk révén számos szervben fejtik ki hatásukat. Az adipokinek részt vesznek az adipogenezis mediálásán kívül a lipoprotein metabolizmus, a vérnyomás és a glükóz homeosztázis szabályozásában, de fontos szerepük van a gyulladásban adott válaszreakcióban is.

A chemerin egy nem régiben felfedezett tagja az adipokin családnak, amelyet főleg a fehér zsírszövet, máj és a vesék termelnek. 18 kDa tömegű proproteinként szekretálódik, amely a serin proteázok C-terminális részen való hasítása révén a keringésben 16 kDa tömegű aktív chemerinként jelenik meg. A chemerin számos biológiai funkcióval rendelkezik: részt vesz a veleszületett és szerzett immunrendszer szabályozásában, az éretlen dendritikus sejtek, makrofágok és természetes ölő sejtek számára pedig chemoattraktáns faktort jelent. Humán tanulmányokban a chemerint összefüggésbe hozzák az elhízással és az inzulin rezisztenciával. A chemerin szint szignifikánsan nő az elhízás mértékével, az elhízott betegek szérum chemerin szintje szignifikánsan magasabb a normál testtömegű egyénekhez képest. Korábbi vizsgálatok szoros összefüggést találtak az emelkedett szérum chemerin szint és az atherogén lipidprofil (emelkedett triglicerid, LDL-C szint és csökkent HDL-C szint) között, azonban nincs adatunk a chemerin szint és a lipoprotein szubfrakciók közötti lehetséges összefüggésekkel

kapcsolatban. Ezért ezen összefüggések vizsgálata értékes információkkal szolgálhat a lipoprotein metabolizmusban bekövetkező kvalitatív változásokra.

Nemcsak az elhízás folyamatában, hanem öröklött koleszterin anyagcserezavarral járó megbetegedésekben, szindrómákban lehet kiemelkedő jelentősége a lipoprotein szubfrakcióknak. A Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLOS) egy ritka, autoszomális recesszív módon öröklődő anyagcsere-betegség, amelyet először 1964-ben írtak le. A fenotípusbeli eltérések közül a leg súlyosabbak az idegrendszeri és mentális károsodások, tanulási és táplálási nehézségek, fotoszenzitivitás, agresszió, cataracta, microcephalia, genitáliát érintő rendellenességek és az ujjak összenövése. A betegségért a 11. kromoszómán elhelyezkedő *DHCR7* gén mutációja felelős, amely a 7-dehidrokoleszterin-reduktáz enzimet kódolja. A 7-dehidrokoleszterin-reduktáz enzim aktivitásának részleges vagy teljes hiányának következtében a 7-dehidrokoleszterin (7DHC) nem alakul át koleszterinné, így a koleszterin bioszintézis zavart szenved. Az SLOS gyerekek szérumában ezért extrém magas 7DHC szint és alacsony összkoleszterin szint detektálható. SLO szindrómában a rutin terápia fontos alappillére a koleszterinpótló kezelés, azonban egyre több kutatás irányul a koleszterin-simvastatin és a koleszterin-antioxidáns terápia hatékonyságának vizsgálatára. A 7DHC a lipid peroxidáció szempontjából igen reaktív lipid komponens, amelynek következtében különböző oxidációs termékek (oxiszterolok) keletkeznek. Az endogén antioxidáns mechanizmusok inaktiválódása tovább növelheti az SLOS betegek szervezetében fennálló oxidatív stresszt. Jelenleg SLOS-ban ismereteink hiányosak a lipoproteinek szubfrakciós szintű eloszlásáról és a HDL antioxidáns tulajdonságairól.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. Célkitűzésünk volt, hogy elhízott, diabetes mellitussal nem rendelkező populációban meghatározzuk az LDL és a HDL szubfrakciók mennyiségét és arányát, valamint a szérum chemerin koncentrációt. Adatainkat normál testtömegű, egészséges kontrollokéval hasonlítottuk össze.
2. Tanulmányoztuk a szérum chemerin szint és az LDL és HDL szubfrakciók kapcsolatát, ill. vizsgáltuk a szérum chemerin szinttel leginkább összefüggő lipoprotein szubfrakciót.
3. Vizsgálataink második felében az öröklött koleszterin anyagcserezavarban szenvedő Smith-Lemli-Opitz szindrómás (SLOS) betegekben meghatároztuk az LDL és a HDL szubfrakciók arányának megoszlását.
4. További célkitűzésünk volt, hogy SLOS betegek esetében vizsgáljuk az oxidatív stressz mértékét a citotoxikus 7-dehidrokoleszterin (7DHC) szint és a HDL-hez kötött antioxidáns hatású paraoxonáz-1 (PON1) enzim aktivitásának monitorozásán keresztül. Vizsgáltuk a PON1 aktivitás és a lipoprotein szubfrakciók megoszlása közötti összefüggéseket.

## **BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

### ***Elhízott betegek kiválasztása***

Vizsgálatainkba 50 elhízott, nem diabeteses beteg (életkoruk:  $44,2 \pm 13,5$  év, 43 nő és 7 férfi, BMI:  $41,96 \pm 8,63$  kg/m<sup>2</sup>) került bevonásra, a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Obesitas szakrendeléséről. Adataikat 38 nembn és korban illesztett, normál testtömegű egészséges önkéntes (életkoruk:  $42,26 \pm 11,36$  év, 33 nő és 5 férfi, BMI:  $24,05 \pm 3,21$  kg/m<sup>2</sup>) adataival hasonlítottuk össze. Az elhízott csoportba BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> feletti betegek kerültek. A vizsgálatból kizártuk az aktív máj vagy endokrin eredetű betegséggel, kardiovaszkuláris megbetegedéssel, veseelégtelenséggel vagy malignitással rendelkező résztvevőket. További kizárási kritérium volt a terhesség és szoptatás, rendszeres dohányzás és alkoholfogyasztás, ill. lipidcsökkentő kezelés. Egyik résztvevő sem részesült antihipertenzív terápiában, kivéve 10 elhízott, nem diabeteses beteget, akik diuretikumot (indapamide) kaptak mérsékelt hipertóniájuk miatt. A vizsgálatba történő bevonás időpontjában a résztvevők részletes beegyező nyilatkozatot írtak alá, amelyet a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága támogatott.

### ***Smith-Lemli-Opitz szindrómás (SLOS) betegek kiválasztása***

Vizsgálataink második részébe 11 korábban diagnosztizált Smith-Lemli-Opitz szindrómás gyermeket (1 hónap és 20 év közötti életkorúak, 4 leány és 7 fiú) valamint 10, a Debreceni Egyetem Gyermekklinikájára egyéb okok miatt szakrendelésre érkezett, egészséges gyermeket (életkoruk 3 hónap és 19 év közötti, 5 leány és 5 fiú) vontunk be. Kizárási kritériumok voltak bármilyen aktív fertőzés illetve visszatérő, klinikailag jelentősebb fertőzés a kezelőorvos megítélése alapján, malignitás, máj- és veseelégtelenség. A gyerekek a vérvétel időpontját megelőző 3 hónapban multivitamin készítményeket nem fogyasztottak. Az SLOS gyerekek esetében a fenotípusos jellemzők alapján meghatároztuk a betegség súlyosságát



Kelley és Hennekam score rendszere alapján: 3 gyerek enyhe (score: <20), 7 gyerek közepes vagy más néven tipikus (score: 20-50) és egy gyerek súlyos (score: >50) fenotípussal rendelkezett. A diagnózis felállítást követően 6 beteg koleszterinpótlásban részesült (Cholesterol Module, 50–250 mg/ttkg/nap, Nutricia; no 18.012), amelyet simvastatin adásával egészítettek ki (0,2-0,4 mg/ttkg/nap dózisban). A vizsgálatba történő bevonásról a szülők részletes beteg beleegyező nyilatkozatot írtak alá, amelyet a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága támogatott.

### ***Vérvétel és laboratóriumi paraméterek mérése***

A vizsgálatba bevont betegektől és a kontrolloktól 12 órás éhezést követően vénás vérvétel történt. A friss szérum mintákból a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében standard laboratóriumi módszerekkel határozták meg a hsCRP, glükóz, fruktózamin, húgysav, haemoglobin A1c, inzulin, szérum összkoleszterin, triglicerid, HDL-C, LDL-C, apoAI, apoB és lipoprotein(a) szintjét. Elhízással és a kontrollok esetében a diabetes mellitus kizárására orális glükóz tolerancia tesztet alkalmaztunk, továbbá meghatároztuk a homeostasis model assessment inzulin rezisztencia (HOMA-IR) értékét.

### ***Az LDL és HDL szubfrakciók elválasztása***

A lipoprotein szubfrakciók méret szerinti elválasztását csöves akrilamid gélelektroforézis rendszerrel (Lipoprint rendszer, Quantimetrix Corp., Redondo Beach, CA) végeztük. A szérum mintákban lévő lipoproteineket szudán feketével festettük, majd az elektroforézist követően Lipoware szoftverrel (Quantimetrix Corp.) elemeztük a minták lipoprotein eloszlását. A Lipoprint LDL teszt során elválasztott szubfrakciók nagy (LDL1-2) és kis LDL (LDL3-7) szubfrakciókra különíthetők el. A Lipoprint HDL teszt során elválasztott szubfrakciók nagy (HDL1-3), közepes (HDL4-7) és kis (HDL8-10) szubfrakciókra oszthatóak. Az egyes lipoprotein sávok koleszterin szintjét a minta összkoleszterin szintjének

megadásával a denzitogramon lévő görbe alatti terület figyelembevételével határoztuk meg.

### ***Szérum chemerin szint meghatározása***

A teljes szérum chemerin koncentráció meghatározása szendvics ELISA kit (USCN Life Science Inc, Wuhan, Kína) segítségével történt.

### ***7-dehidrokoleszterin (7DHC) szint és paraoxonáz-1 (PON1) aktivitás meghatározása***

A 7DHC koncentráció mérése UV spektrometriás módszerrel, 282 nm-en történt. A minták PON1 paraoxonáz aktivitását paraoxon (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát, Sigma) szubsztráttal mértük 405 nm-en, az enzimaktivitást U/l egységben fejeztük ki, ahol 1 unit 1  $\mu$ mol szubsztrát elbomlását jelenti egy perc alatt. A PON1 arilészteráz aktivitást fenilacetát szubsztrát hidrolízisével, spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. Az enzimaktivitást U/l egységben adtuk meg. 1 unit az arilészteráz aktivitás, ha 1 perc alatt az enzim 1  $\mu$ mol fenilacetátot hidrolizál.

### ***Statisztikai elemzés***

Az adatok statisztikai elemzésére STATISTICA (ver: 8.0; StatSoft Inc., Tulsa, OK) programot használtunk. Az adatok eloszlásának vizsgálatát a Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük. A csoportok összehasonlítása során normál eloszlás esetében Student-féle kétmintás t-próbát, nem normál eloszlás esetében Mann-Whitney u-próbát alkalmaztunk. Többszörös regressziós analízis (backward-stepwise módszer) során meghatároztuk a szérum chemerin szinttel legjobban összefüggő lipoprotein szubfrakciót. Szignifikancia szintnek a  $p < 0,05$  értéket választottuk.

## **EREDMÉNYEK**

### ***A szérum chemerin koncentráció és a lipoprotein szubfrakciók eloszlása elhízott, nem diabetese és normál testtömegű egyéneknél***

Az elhízott, nem diabetese betegek vizsgálatakor a triglicerid, lipoprotein(a), húgysav, haemoglobin A1c és éhomi glükóz szintek szignifikánsan magasabbak, míg a HDL-C és apoAI koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak voltak a normál testtömegű kontrollokhoz viszonyítva, azonban az értékek a normál fiziológiás tartományon belülre estek. Az éhomi inzulin szint és a HOMA-IR nem különbözött a két vizsgálati csoportban. A szérum chemerin koncentráció szignifikánsan magasabb volt az elhízott, nem diabetese csoportban a normál testtömegű kontrollokhoz képest (elhízott  $590,08 \pm 90,29$  ng/ml vs. kontroll  $404,99 \pm 127,07$  ng/ml;  $p < 0,001$ ). Az emelkedett hsCRP szint alapján a betegekben az elhízással összefüggésben alacsony szintű, szisztémás gyulladás igazolódott.

Az LDL szubfrakciók eloszlását tekintve az LDL-C értékhez hasonlóan nem volt szignifikáns különbség a két vizsgálati csoportban a nagy LDL szubfrakció arányát illetően. Ezzel ellentétben a kis LDL szubfrakció aránya ( $p < 0,001$ ), továbbá mind a nagy, mind a kis LDL szubfrakció abszolút mennyisége szignifikánsan nagyobb volt elhízott nem diabetese egyéneknél a kontroll csoporthoz képest ( $p < 0,001$ ). Elhízottakban az átlagos LDL méret szignifikánsan alacsonyabb volt ( $p < 0,001$ ). Bár a HDL-C koncentrációk mindkét csoportban a szintén normál tartományba estek, a HDL szubfrakciók esetében mind a szubfrakciók mennyiségét mind pedig az arányukat tekintve szignifikáns mértékű eltolódást tapasztaltunk a kisméretű HDL szubfrakció irányába az elhízott csoportban a normál testtömegű kontrollokhoz képest ( $p < 0,001$ ).

### ***A szérum chemerin koncentráció és a lipoprotein szubfrakciók közötti összefüggések vizsgálata***

Az elhízott és normál testtömegű csoportot együtt tekintve a szérumban a chemerin szint pozitívan korrelált az LDL-C szintjével ( $r=0,34$ ;  $p=0,0009$ ). Pozitív, bár nem szignifikáns trend mutatkozott a chemerin szint és a nagy LDL szubfrakció arányát tekintve ( $r=0,20$ ; n.s.), míg szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a chemerin koncentráció és a kis denz LDL szubfrakció között ( $r=0,39$ ;  $p=0,0003$ ). Inverz korrelációt mutattunk ki a chemerin szint és az átlagos LDL méret között ( $r=-0,37$ ;  $p=0,0008$ ).

Minden résztvevőt együtt véve a chemerin szint és a HDL szubfrakciók közötti kapcsolat vizsgálatakor a chemerin szint negatívan korrelált a HDL-C szintjével ( $r=-0,24$ ;  $p=0,02$ ), hasonlóan a nagy HDL szubfrakció arányával ( $r=-0,47$ ;  $p=0,00001$ ). Ezzel ellentétben, a közepes és a kis HDL szubfrakciók aránya pozitív összefüggést mutatott a szérumban a chemerin koncentrációval ( $r=0,23$ ;  $p=0,04$  és  $r=0,47$ ;  $p=0,000008$ ).

A BMI hatásának tisztázására többszörös regressziós analízist alkalmaztunk, ahol függő változóként a chemerint jelöltük meg. Az analízis eredménye alapján a szérumban a chemerin koncentrációval legszorosabban összefüggő faktorok a hsCRP ( $p<0,001$ ) és a kis HDL szubfrakció voltak ( $p<0,001$ ). Vizsgálataink alapján a BMI a szérumban a chemerin koncentrációnak nem volt független előrejelzője ( $p=0,895$ ).

### ***Lipoprotein szubfrakciók eloszlása Smith-Lemli-Opitz szindrómás és kontroll gyerekekben***

Az SLOS gyerekeket Kelley és Hennekam score rendszere alapján klinikai súlyosság szerint tipizáltuk. Az átlagos klinikai súlyossági score az SLOS csoportban  $30,9 \pm 15,1$  volt. A 7DHC szintje a betegcsoportban 205 (85-274) mg/l volt, míg az egészséges gyerekekben a detektálási határ alá esett ( $<0,15$  mg/l). A lipidparaméterek tekintetében az összkoleszterin, LDL-C és HDL-C szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban a kontrollhoz képest. Szignifikáns negatív korrelációt mutattunk ki a klinikai súlyossági score és a HDL-C szintje között ( $r=-0,804$ ;  $p=0,003$ ).

Az LDL szubfrakciók vizsgálatakor a kontrollokhöz képest a nagy LDL szubfrakció aránya szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,001$ ), míg a kisméretű denz LDL szubfrakció aránya szignifikánsan magasabb ( $p < 0,01$ ) volt az SLOS csoportban. Továbbá az átlagos LDL méret szignifikánsan kisebb volt a betegcsoportban a kontrollokhöz viszonyítva ( $p < 0,001$ ). A HDL szubfrakciók monitorozása során kapott eredmények alapján az SLOS betegekben eltolódást mutattunk ki a nagyméretű HDL szubfrakció irányába. A nagy HDL szubfrakció aránya markánsan magasabb ( $p < 0,001$ ), míg a közepes és a kis HDL szubfrakció aránya szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,001$  és  $p < 0,01$ ) volt az SLOS csoportban az egészséges gyerekekhez viszonyítva.

### ***Szérum PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein paraméterek közötti összefüggések Smith-Lemli-Opitz szindrómás és kontroll gyerekekben***

A HDL-hez asszociált PON1 enzim paraoxonáz aktivitása ugyan alacsonyabb volt az SLOS csoportban, viszont a különbség nem volt szignifikáns. Azonban a PON1 arilészteráz aktivitás a betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb volt (SLOS:  $64,30 \pm 52,69$  U/l vs. kontroll:  $107,93 \pm 26,83$  U/l;  $p = 0,022$ ).

A szérum PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein paraméterek közötti összefüggéseket vizsgálva szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a PON1 arilészteráz aktivitás és az összkoleszterin szint között ( $r = 0,543$ ;  $p = 0,045$ ). Továbbá a PON1 arilészteráz aktivitás szignifikáns negatív összefüggést mutatott a kis denz LDL szubfrakció arányával ( $r = -0,578$ ;  $p = 0,031$ ), ill. pozitívan korrelált az átlagos LDL mérettel ( $r = 0,610$ ;  $p = 0,021$ ). Bár nem volt szignifikáns kapcsolat a PON1 arilészteráz aktivitás és a HDL-C között, szubfrakciós szinten számos összefüggést mutattunk ki. A nagy HDL szubfrakció aránya negatív összefüggést mutatott a PON1 arilészteráz aktivitással ( $r = -0,798$ ;  $p = 0,001$ ), a közepes és a kis HDL szubfrakció pedig pozitívan korrelált PON1 arilészteráz aktivitással ( $r = 0,652$ ;  $p = 0,012$  és  $r = 0,663$ ;  $p = 0,010$ ).

## MEGBESZÉLÉS

Korábbi tanulmányok alapján jól ismert, hogy az LDL és HDL lipoproteineknek fontos szerepük van az atherosclerotikus ill. fokozott oxidatív stresszel járó kórfolyamatokban. Patológias körülmények között az LDL és HDL szubfrakciók mennyisége és aránya eltolódhat, lipidómjukban és proteómjukban kedvezőtlen változások állhatnak be, amelyek normál működésüket jelentősen befolyásolhatják.

Vizsgálataink első felében normál lipid paraméterekkel rendelkező elhízott, nem diabetes csoportban vizsgáltuk a lipoprotein szubfrakciók eloszlását. Bár az elhízott populációban az LDL-C szintje a normál tartományban volt, a kis denz LDL szubfrakció aránya és abszolút mennyisége szignifikánsan magasabb volt a normál testtömegű kontrollokhoz képest. Mivel a kisméretű denzebb LDL partikulumok szoros kapcsolatban állnak a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatával, ezért elmondható, hogy az elhízott betegek normál LDL-C szint ellenére magasabb rizikóval rendelkezhetnek a kardiovaszkuláris betegségek tekintetében. Míg a kis denz LDL szubfrakció mennyisége egyértelmű pozitív összefüggést mutat a kardiovaszkuláris rizikóval, addig a különböző HDL szubfrakciók eltérő antiatherogén tulajdonsággal rendelkeznek. Jelen vizsgálatunkban az elhízott betegcsoport esetében normál tartományban lévő HDL-C szint ellenére szignifikáns mértékű eltolódást figyeltünk meg a kisméretű HDL szubfrakció irányába. Az LDL és HDL szubfrakciók szintjén bekövetkező változások az elhízott betegek korai szűrésére hívják fel a figyelmet a későbbi kardiovaszkuláris komplikációk kialakulásának megelőzése érdekében. Továbbá az LDL és a HDL szubfrakciók mennyiségi eloszlásában bekövetkező változások számos minőségi eltérést vonhatnak maguk után, mint pl. a csökkent antioxidáns képességű, diszfunkcionális HDL vagy az enzimatikusan módosult LDL.

Korábban emelkedett szérum chemerin szintről számoltak be számos elhízással és emelkedett kardiovaszkuláris kockázattal járó megbetegedésben.

Továbbá megfigyelték, hogy a szérum chemerin szint szoros kapcsolatban áll a gyulladással összefüggő markerekkel. Az említett adatokkal összhangban mintegy 30%-kal magasabb szérum chemerin koncentrációt mutattunk ki az elhízott csoportban a vékony kontrollokhoz képest, amely az emelkedett hsCRP szint mellett alátámasztja az elhízás során fennálló krónikus gyulladás jelenlétét.

Az elhízott és normál testtömegű, nem diabeteses betegek adatainak elemzése során a chemerin szint az LDL-C szinttel pozitívan, míg a HDL-C szinttel negatívan korrelált, amely összecseng a korábbi publikációk eredményeivel. Mindemellett munkánk során az irodalomban elsőként vizsgáltuk a lipoprotein szubfrakciók szérum chemerin szinttel való kapcsolatát. Megállapítottuk, hogy a chemerin szint szorosan összefügg az atherogén, kis denz LDL szubfrakcióval, továbbá negatívan korrelál az átlagos LDL mérettel. Korábbi vizsgálatokban a chemerin akkumulációját figyelték meg az atherosclerotikus léziókban, továbbá szoros kapcsolatot találtak az aorta érlemeszesedés mértéke, ill. a vaszkuláris simaizomsejtek és a habos sejtek chemerin expressziója között. Ezért a fenti adatokból kiindulva feltételezhetjük, hogy a chemerin parakrin hatása révén módosíthatja az LDL összetételét, kisméretű könnyebben oxidálható LDL partikulumokat hozva létre, amelyek hozzájárulhatnak az atherosclerosis progressiójához.

Az LDL szubfrakciókkal ellentétben a HDL szubfrakciók és a szérum chemerin szint közötti összefüggések nem voltak ilyen egyöntetűek. A chemerin szint és a nagy HDL szubfrakció arányával negatívan, míg a közepes és a kis HDL szubfrakció arányával pozitívan korrelált. Többszörös regressziós analízis során megállapítottuk, hogy a hsCRP mellett a kis HDL szubfrakció bizonyult a szérum chemerin koncentráció független előrejelzőjének. Számos szerző beszámolt a HDL patológiás környezetben történő lipid és protein szerkezetének megváltozásáról, ill. több vizsgálatban elemezték a HDL partikulum méretének és koncentrációjának változását gyulladással körülmények között. Úgy tűnik tehát, hogy az elhízással járó, alacsony fokú gyulladás kedvezőtlen változásokat idézhet elő a HDL lipid és

fehérje szerkezetében, beleértve a szabad koleszterin és koleszterin-észter tartalom csökkenését, amely hozzájárulhat a HDL méretének csökkenéséhez. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy vizsgálatunkban a szérum chemerin szint szorosan összefügg a valószínűleg csökkent antioxidáns hatású, kisméretű HDL szubfrakcióval.

Vizsgálataink második felében öröklött koleszterin anyagcserezavarban szenvedő, csökkent szérum összkoleszterin szinttel rendelkező SLOS gyerekekben határoztuk meg a lipoprotein szubfrakciók eloszlását. Korábbi tanulmányokban széles körben vizsgálták a lipid paraméterek szintjét és a koleszterin bioszintézis folyamatát SLOS-ban, azonban eddig nem született publikáció szubfrakciós szintű vizsgálatokról. Tanulmányunkban az irodalmi adatokkal megegyezően, mind az LDL-C, mind a HDL-C szint markánsan alacsonyabb volt SLOS-ban az egészséges gyerekekhez képest, továbbá negatív összefüggést mutattunk ki a klinikai súlyossági score és a szérum HDL-C szint között. Eredményeink hangsúlyozzák a HDL lehetséges központi szerepét az SLOS pathomechanizmusában.

Az LDL szubfrakciók vizsgálatakor SLOS gyerekek esetében nem várt módon magasabb volt a kis denz LDL szubfrakció aránya a kontroll gyerekekhez képest. Mivel az LDL szubfrakciók közül a kisméretű denz LDL szubfrakció hajlamos leginkább az oxidatív degradációra, ezért a kis denz LDL szubfrakció nagyarányú előfordulása jelentősen hozzájárulhat az SLOS-ban fellépő oxidatív stresszhez. A HDL szubfrakciók tekintetében szignifikáns mértékű eltolódást tapasztaltunk a nagy HDL szubfrakció irányába SLOS gyerekekben a kontrollhoz képest. Feltételezésünk szerint ennek a markáns eltolódásnak a hátterében fokozott reverz koleszterin transzport állhat, amellyel a szervezet megpróbálja kompenzálni a keringésben fellépő rendkívül alacsony koleszterin szintet, bár ennek tisztázására további vizsgálatok tervezése szükséges.

A PON1 a legfontosabb HDL-hez asszociált antioxidáns és anti-inflammatorikus hatású enzim, amely főleg a kis HDL szubfrakciókon lokalizálódik. Ismert továbbá, hogy fokozott oxidatív stresszel jár



kórállapotokban a PON1 enzim aktivitása csökken. Az SLOS gyerekek körében tapasztalt alacsony kis HDL szubfrakció arány és PON1 arilészteráz aktivitás alapján feltételezhető a májban történő csökkent termelődésük, amely szintén hozzájárulhat a szervezet csökkent antioxidáns kapacitásához. Fontos megjegyezni, hogy a PON1 enzim különféle szubsztrátspecifitással, pl. paraoxonáz és arilészteráz aktivitással rendelkezik. A PON1 paraoxonáz aktivitás nagyban függ a PON1-192QR polimorfizmustól és nagy interindividuális változatossággal rendelkezik, míg a PON1 arilészteráz aktivitás független a 192QR polimorfizmustól és arányos az enzim fehérjekoncentrációjával és antioxidáns képességével. Az SLOS gyerekek körében ugyan alacsonyabb PON1 paraoxonáz aktivitást észleltünk az egészséges gyerekekhez képest, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns, amely valószínűleg a paraoxonáz aktivitás trimodális eloszlásával, valamint a SLOS szindróma jellegéből adódó alacsony betegszámmal hozható kapcsolatba. Ugyanakkor a PON1 arilészteráz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a betegcsoportban a kontrollhoz viszonyítva és számos lipoprotein szubfrakcióval összefüggést mutatott. Ezek a korrelációk támogatják azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint a kisméretű HDL szubfrakció rendelkezik a legmagasabb PON1 aktivitással. Egyúttal úgy látszik, a csökkent PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein szubfrakciók eltolódása SLOS-ban új biomarkerként szolgálhatnak a kedvezőtlen oxidatív változások becslésére.

A csökkent PON1 arilészteráz aktivitással egyidejűleg magas 7DHC szintet mutattunk ki az SLOS betegek szérumában, amely szintén hozzájárulhat a betegségben fennálló fokozott oxidatív stresszhez. A 7DHC rendkívül gyorsan reagál a molekuláris oxigénnel citotoxikus hatású oxiszterolok képződése közben. Mivel a 7DHC és a 7DHC-ből származtatott oxiszterolok potenciális prooxidáns ágensek, ezért ezek a molekulák fontos szerepet játszhatnak a megnövekedett lipid peroxidációban, ill. a lipoproteinek felszínén található fehérjék, így a PON1 enzim degradációjában is.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A plazma lipoproteinek struktúrájuk, funkciójuk, méretük és denzitásuk alapján szubfrakciókra osztható partikulumok, amelyeknek eloszlása számos lipidanyagcsere zavarral járó kórképben megváltozhat. A lipoprotein szubfrakciók kapcsolatban vannak a gyulladáshoz és oxidatív folyamatokban szerepet játszó markerekkel is. A chemerin egy nemrégiben leírt adipokin, amelyet döntően a vizszerális zsírszövet expresszál és pozitívan korrelál a gyulladással, valamint az elhízással összefüggő metabolikus rizikófaktorokkal. A humán paraoxonáz-1 (PON1) a HDL-hez kötődő antioxidáns hatású enzim, amelynek aktivitása az oxidatív stresszel járó kórfolyamatokban csökken. Munkánk célja volt a lipoprotein szubfrakciók és a szérumban a chemerin közötti kapcsolat vizsgálata elhízott nem diabeteses betegekben. Továbbá öröklött koleszterin anyagcserezavarban szenvedő Smith-Lemli-Opitz szindrómás (SLOS) gyerekekben vizsgáltuk az LDL és a HDL szubfrakciók eloszlását és a PON1 enzimmel való kapcsolatát.

A szérumban a chemerin koncentráció szignifikánsan magasabb volt az elhízott csoportban és pozitívan korrelált az atherogén kis denz LDL szubfrakcióval. Elhízottakban a HDL szubfrakciók aránya és mennyisége a kisméretű HDL szubfrakciók irányába tolódott el. A nagy HDL szubfrakció a chemerin szinttel negatív, míg a közepes és a kis HDL szubfrakcióval pozitív összefüggést mutatott. Többszörös regressziós analízis alapján a chemerin szint független előrejelzője a hsCRP és a kis HDL szubfrakció.

Az SLOS gyerekek körében szignifikánsan magasabb volt a citotoxikus 7-dehidrokoleszterin koncentrációja az egészséges gyerekekhez képest. Az LDL szubfrakciók eloszlása a kis denz LDL szubfrakció felé, ill. a HDL szubfrakciók esetében a nagy HDL szubfrakció irányába tolódott el. A PON1 arilészteráz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt SLOS-ban, és negatív összefüggést mutatott a kis denz LDL szubfrakció, valamint a nagy HDL szubfrakció arányával.

Ugyanakkor a PON1 arilészteráz aktivitás a közepes és kis HDL szubfrakcióval pozitív kapcsolatban állt.

Eredményeink alapján a chemerinnek szerepe lehet a lipoprotein metabolizmus szabályozásában. Elhízás során megváltozik a lipoprotein szubfrakciók eloszlása, amely hozzájárulhat az érlelmeszesedés progressziójához fokozva a kardiovaszkuláris kockázatot. SLOS-ban a csökkent PON1 arilészteráz aktivitás és a lipoprotein szubfrakciók kedvezőtlen irányú megváltozása erősítheti a betegek szervezetében fennálló oxidatív stresszt. A PON1 arilészteráz aktivitás monitorozása fontos kiegészítő biomarker lehet az SLOS pathomechanizmusának pontosabb megértésében.

Vizsgálatainkat az Országos Tudományos Kutatási alap (OKTA 84196), a TÁMOP-4.2.1./B-09/KONV/2010-0007, a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 számú projektek támogatták. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Seres Ildikó tudományos főmunkatársnőnek, aki biológushallgató korom óta támogatott laboratóriumi és tudományos munkám során, valamint a kísérletek megtervezésében és a felmerülő kérdések megválaszolásában mindig a segítségemre volt. Köszönetemet fejezem ki Dr. Paragh György professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy tudományos munkámat a DE Belgyógyászati Intézetében végezhessem.

Hálával tartozom Dr. Vargáné Dr. Oláh Anna tudományos főmunkatársnőnek, Dr. Harangi Mariann és Dr. Fülöp Péter egyetemi adjunktusoknak, valamint Dr. P. Szabó Gabriella klinikai genetikus szakorvosnak, akik a kutatási eredmények megvitatásában és a publikációjában nélkülözhetetlen segítségemre voltak. Továbbá szeretnék köszönetet mondani tudományos közleményeim társszerzőinek, Dr. Gaál Krisztinának, Katkó Mónikának és Dr. Somodi Sándornak.

Köszönöm a DE Belgyógyászati Intézet A épület minden dolgozójának kedves és őszinte barátságát.



Nyilvántartási szám: DEENK/43/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lőrincz Hajnalka  
Neptun kód: G3XUPQ  
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10037740

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lőrincz, H.**, Harangi, M., Oláh, A.V., Szabó, G.P., Fülöp, P., Somodi, S., Paragh, G., Seres, I.:  
Altered lipid subfraction profile and impaired antioxidant defense of high-density lipoprotein in  
Smith-Lemli-Opitz syndrome.  
*Pediatr. Res.* 77, 703-709, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2015.33>  
IF:2.84 (2013)
2. **Lőrincz, H.**, Katkó, M., Harangi, M., Somodi, S., Gaál, K., Fülöp, P., Paragh, G., Seres, I.: Strong  
correlations between circulating chemerin levels and lipoprotein subfractions in nondiabetic  
obese and nonobese subjects.  
*Clin. Endocrinol.* 81 (3), 370-377, 2014.  
IF:3.353 (2013)





---

### További Közlemények

3. Fülöp, P., Seres, I., **Lőrincz, H.**, Harangi, M., Somodi, S., Paragh, G.: Association of chemerin with oxidative stress, inflammation and classical adipokines in non-diabetic obese patients.  
*J. Cell. Mol. Med.* 18 (7), 1313-1320, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12282>  
IF:3.698 (2013)
4. Gaál, K., **Lőrincz, H.**, Seres, I., Harangi, M., Oláh, A.V., Paragh, G.: Characterization of a novel high-density lipoprotein antioxidant capacity assay and its application to high-density lipoprotein fractions.  
*Clin. Biochem.* 46 (9), 825-827, 2013.  
IF:2.229

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 12,12**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 6,193**

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

Debrecen, 2015.05.06.

