

**A PON1 enzim paraoxonáz és laktonáz aktivitásának
változása hemodializált és transzplantált krónikus
veseelégtelen betegekben**

Dr. Sztanek Ferenc

Témavezető: Prof. Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

A PON1 enzim paraoxonáz és laktonáz aktivitásának változása hemodializált és transzplantált krónikus veseelégtelen betegekben

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az
Egészségtudományok tudományágban

Írta: Dr. Sztanek Ferenc okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája
keretében (az „Az anyagcsere és endokrin betegségek megelőzése és
kontrollja” doktori program)

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

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Karádi István, az MTA doktora

Dr. Márk László, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2013. június 26. 12 óra, a DEOEC
Belgyógyászati Intézet „A” épület könyvtára (I. emelet)

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora

Prof. Dr. Nagy Judit, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora

Prof. Dr. Nagy Judit, az MTA doktora

Prof. Dr. Karádi István, az MTA doktora

Dr. Márk László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2013. június 26. 14 óra, a DEOEC
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme (földszint)

Bevezetés

A krónikus veseelégtelenség fokozott oxidatív stresszel, az endothelium diszfunkciójával és felgyorsult érlemezéssel együtt járó kórfolyamat, melyben jelentősen fokozódik a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulása. A HDL-hez kötött paraoxonáz (PON1) enzim gátolja az oxidált LDL képződését, ezáltal lassítja az atherosclerosis folyamatát. Számos tanulmány igazolta, hogy az alacsony PON1 paraoxonáz aktivitás fokozott oxidatív stresszel társul és ezzel együtt a kardiovaszkuláris morbiditás is megnövekszik. A PON1 enzim laktonáz aktivitással is rendelkezik, hidrolizálja a homocisztein metabolizmusa során keletkező homocisztein-tiolaktont és gátolja a fehérjék oxidatív károsodását. Az utóbbi években megjelent kutatási eredmények alapján az oxidatív stressz egyik legmegbízhatóbb markereként jellemzett, a fehérjék metilációja és lebontása során keletkező aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) vesén keresztül történő eliminációja károsodik a hemodializált betegekben, és az emelkedett ADMA koncentráció a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) inhibitoraként hozzájárul az endothelium diszfunkciójához. Munkacsoportunk évek óta foglalkozik a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitásának vizsgálatával hemodializált és vesetranszplantált betegekben és célul tűztük ki, hogy összefüggést találjunk a PON1 laktonáz aktivitás és számos egyéb, a krónikus veseelégtelenségben kiemelkedő fontosságú kardiovaszkuláris rizikófaktor között. Korábbi

eredményeink arra utaltak, hogy krónikus veseelégtelenségben a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitások a tápláltsági állapottól függően is változhatnak, és ez befolyásolhatja az atherosclerosis progresszióját ezekben a betegekben. Munkánk során azt találtuk, hogy a PON1 enzim laktonáz aktivitása új és potenciálisan jól használható paraméter lehet a kardiovaszkuláris rizikó becslésére krónikus veseelégtelenségben. Eredményeink alapján azt is feltételezzük, hogy a PON1 paraoxonáz aktivitás indikátora lehet a veseelégtelenség és az érlemezés progressziójának mind az alultáplált, mind az elhízott hemodializált betegekben.

Irodalmi áttekintés

A krónikus veseelégtelenség (CVE) a vesék strukturális és funkcionális károsodásával jellemezhető heterogén betegségcsoport, a vese vizeletkiválasztó és hormonális funkciójának irreverzibilis és progresszív beszűkülését jelenti. Végstádiumú veseelégtelenségről akkor beszélünk, ha a veseműködés olyan komolyan károsodik, hogy a beteg vesepótló (hemodialízis) kezelésre szorul. A CVE hátterében leggyakrabban hypertonia vagy cukorbetegség okozta vesekárosodás, krónikus glomerulonephritis, krónikus tubulointerstitialis nephritis, vasculáris eredetű károsodás vagy polycystás vesebetegség áll, de az esetek egy részében alapbetegség nem deríthető ki.

Az érlelmeszedés kialakulásában számos tényező játszik szerepet: a vérkeringésben lévő különböző lipoproteinek, a thrombocyták, a monocyták, a fehérvérsejtek által termelt citokinek, az ér-endothelsejtek, az érfal simaizomsejtjei, a fibroblastok és a makrofágok bonyolult kölcsönhatása révén alakul ki az atherosclerotikus plakk. Ezek hatására fokozódik az érfal permeabilitása, a lipidek érfalban történő lerakódása és oxidációja, gyulladásos folyamatok révén az érfal lokális átépülése, „meszesedése” jön létre. A Framingham study, és több nagyobb prevenciós vizsgálat (Helsinki Heart Study, MRFIT, 4S, LIPID) igazolta, hogy a magas koleszterol szint, a magas LDL- és triglicerid-szintek és az alacsony HDL-koncentráció a coronariabetegségek kialakulásának meghatározó rizikófaktorai. Ilyen a lipid eltérésekkel, azaz dyslipidaemiával jár a magasvérnyomás-betegség, a kifejezett elhízás (obezitás), a 2-es típusú cukorbetegség és a krónikus veseelégtelenség is. Ezenkívül a dohányzás, a stresszes életvitel és a mozgásszegény életmód, különböző genetikai tényezők is befolyásolják a dyslipidaemia kialakulását, ezek a tényezők az irodalomban tradicionális rizikófaktorokként szerepelnek. Különböző tanulmányok (pl. MARS, FATS) igazolták, hogy az LDL-koleszterol szintjének jelentős csökkentése által elérhető az atherosclerotikus plakkok regressziója is, de az érlelmeszedés folyamata mindenképpen lassítható, ezáltal a kardiovaszkuláris kockázat is csökkenthető. A lipidcsökkentő sztatin-terápia képes stabilizálni a plakkokat, és a sztatinek

pleiotróp hatásuk révén javítják az endothel-diszfunkciót, csökkentik a thrombocytá aktivációt és aggregációt, gátolják a simaizomsejtek proliferációját, a leukocyták érfalhoz történő kitapadását és migrációját, fokozzák az endothel nitrogén-monoxid termelését és az általános gyulladásos marker (high-sensitivity) C-reakív protein (hsCRP) proinflammatorikus hatását is képesek csökkenteni.

A krónikus veseelégtelenségben jelentősen felgyorsul az érlemezésesedés folyamata és nő az ischaemiás szívbetegség kialakulásának kockázata is, emiatt kifejezetten magas a kardiovaszkuláris halálozás ezekben a betegekben. Tehát a CVE önmagában kardiovaszkuláris rizikófaktornak tekintendő és az irodalmi adatok alapján az atherosclerosis progresszióját ebben a betegcsoportban az ún. nem-tradicionális rizikófaktorok, mint az alapbetegségből adódóan állandósult alacsony fokú szisztémás gyulladás és az oxidatív stressz, az endothelium diszfunkciója, a hyperhomocysteinaemia és a dyslipidaemia jelentősebben befolyásolják a hagyományos tényezőkhez képest. Az oxidatív stressz kialakulásában egyrészt a prooxidáns tényezők jelenléte, másrészt a védő hatású, antioxidáns tulajdonságú faktorok csökkent szintje játszik szerepet. A CVE-ben jelenlévő krónikus gyulladás, az anaemia és az alultápláltság reaktív oxigén gyökök képződése révén fokozza az oxidatív stresszt, míg az enzimatis védelem hiánya [kiemelten a paraoxonáz-1 (PON1) és nitrogén monoxid szintetáz (NOS) enzimek]

és az antioxidánsok csökkent szintje a pro-oxidáns és anti-oxidáns egyensúly felborulását vonja magával.

Az elmúlt években megjelent tanulmányok alapján azt mondhatjuk, hogy krónikus veseelégtelenségben a magas homocisztein koncentráció bizonyítottan a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának független rizikófaktora. Különösen a hemodializált vesebetegeknél igazolták, hogy a homocisztein intracellularisan felszaporodva a fehérjeszintézist gátolja, inaktív fehérjék képződéséhez és felhalmozódásához vezet, ezáltal a sejtek apoptózisát indukálja, elősegíti a gyulladásos citokinek képződését és fokozza az oxidatív stresszt. A homocisztein oxidációja révén toxikus szabadgyökök keletkeznek, melyek az endothel diszfunkcióját okozzák, és ennek következtében a nitrogén-monoxid (NO) metabolizmus is károsodik. Az integritását elvesztett endothelium felszínén a thrombocyták könnyen megtapadnak, ez thrombocytá-aggregációhoz vezet. Az érlelmeszesedés folyamatában az endothel diszfunkciója mellett az LDL oxidációja, valamint LDL-homocisztein tiolakon képződése is fontos szerepet játszik. Összefüggést lehet kimutatni a CVE-ben kialakuló atherosclerosis, a trombóziskészség növekedése és a hyperhomociszteinaemia között, sérül az endothel vasomotor regulációja és az antitrombotikus funkciója is.

A HDL többféleképpen képes gátolni az atherosclerosis folyamatát, legfontosabb hatása a reverz koleszterol transzport biztosítása, amely során a perifériás

sejtekben felhalmozódott koleszterolt a májba szállítja és indirekt úton a lecitin koleszterol acil transzferáz (LCAT) és a koleszterol észter transzfer protein (CETP) segítségével a felesleges koleszterol az epével kiürülhet. A HDL-hez kötött enzimek közül a PON1 paraoxonáz, az LCAT, a PAFAH (thrombocyta aktiváló faktor acetilhidroláz) és az apolipoprotein A1 antioxidáns hatását igazolták. A HDL-nek az érfalra kifejtett direkt ún. pleiotróp hatása is protektív tényezőként szerepel az érrelmeszesedés során. Veseelégtelenségben a HDL képződése zavart szenved, az LCAT csökkent és a CETP megnövekedett aktivitása miatt fokozódik a HDL eltávolítása a vérkeringésből. A visszamaradó HDL-t elsősorban a koleszterol-észterben szegény, trigliceridben gazdag HDL₃ szubfrakció alkotja, mely csökkent antioxidáns aktivitással rendelkezik, s valószínűleg az LDL-oxidációt gátló tulajdonsága is károsodik a hemodializált betegekben.

A humán paraoxonáz-1 enzim (PON1) egy kalcium-dependens észteráz, mely aromás karboxilészterek, organofoszfátok hidrolízisét katalizálja. A szérumban a PON1 enzim paraoxonáz aktivitásának mérése az antioxidáns hatás jellemzésére, míg az arilészteráz aktivitás az enzimfehérje mennyiségének kifejezésére alkalmas. Az alacsony PON1 aktivitás elősegíti az érrelmeszesedés progresszióját krónikus veseelégtelenségben. A PON1 enzim elsődlegesen a lipoproteinekben képződő lipidperoxidok hidrolízise által gátolja az LDL oxidációját, így az oxidált LDL atherosclerotikus és proinflammatorikus hatásának csökkentése révén hozzájárul

a HDL érelmeszesedést gátló hatásához. A magas BMI-vel jellemezhető elhízott betegekben csökkent paraoxonáz aktivitást találtak. Több tanulmány igazolta, hogy krónikus veseelégtelenségben - elsősorban a hemodializált, de a vese transzplantáción átesett betegeknél is - csökkent a szérum PON1 enzim aktivitása és szoros összefüggés mutatható ki a kardiovaszkuláris mortalitás és a csökkent PON1 aktivitás között ebben a betegcsoportban. Az igazoltan coronaria betegségben szenvedő, hemodializált krónikus veseelégtelenekben még kifejezettebb, szignifikáns PON1 aktivitáscsökkenést találtak a hemodialízis kezelésben nem részesülő vesebetegekhez képest.

Újabb irodalmi adatok arra utalnak, hogy a PON1 enzim a paraoxonáz aktivitás mellett laktonáz aktivitással is rendelkezik, ezáltal laktonok, tiolaktonok és ciklikus karbonát-észterek hidrolízisére is képes. A szervezetben a homocisztein oxidációja révén toxikus szabadgyökök (többek között homocisztein-tiolakton) keletkeznek, melyek az endothelium diszfunkciójához és az NO metabolizmus károsodásához vezetnek.

A krónikus veseelégtelenségben, mint egy felgyorsult érelmeszesedéssel és thrombosis hajlammal jellemezhető komplex klinikai állapotban jelentősen módosul az NO endothel által történő termelődési mechanizmusa, s az ezzel összefüggő biokémiai változások is megfelelő markerként szolgálhatnak a kardiovaszkuláris morbiditás jellemzésére ebben a betegcsoportban. Az

aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) endogén inhibitora a nitrogén monoxid szintáznak (NOS) és korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az ADMA koncentrációja emelkedik CVE-ben, és ez szerepet játszik az atherosclerosis folyamatában. Az is igazolódott, hogy a csökkent NO produkció és az endotheliális diszfunkció együttesen fokozza az érlelmeszesedés progresszióját hemodializált veseelégtelenekben. Az irodalmi adatok alapján azt látjuk, hogy homociszteint és az ADMA-t egyre inkább tartják potenciális rizikófaktoroknak a felgyorsult érlelmeszesedéssel jellemezhető kórfolyamatokban, így CVE-ben is a metabolizmusuk során keletkező szubsztrátok révén.

Mivel a tradicionális rizikófaktorok nem tudják magyarázni a krónikus veseelégtelenségben kialakuló igen magas kardiovaszkuláris morbiditást és mortalitást, így az utóbbi években az elhízással összefüggő inzulin rezisztencia, az oxidatív stressz és az endotheliális diszfunkció széles körben vizsgált, úgynevezett nem-tradicionális rizikófaktorokként kerültek a figyelem középpontjába. Ezek közül is kiemelkedő fontosságú a hemodializált és a vesetranszplantált betegek körében eddig még kevésbé vizsgált, a zsírszövet által termelt leptin és adiponektin hormonok szerepe az érlelmeszesedés folyamatában. Szoros összefüggés figyelhető meg a test zsírtömege és szérumban leptin szintje között. A leptin hatása a szervezet energiaháztartásának szabályozása, befolyásolja az éhségérzetet, a tápanyagfelvételt és az abból nyert energia hasznosulását.

Kimutatták, hogy a hyperleptinaemia az NO termelődés zavarát okozza, ezáltal járul hozzá az endothel diszfunkcióhoz az elhízott betegekben. Az előrehaladott veseelégtelenségben szenvedő és a hemodializált betegekben észlelt hyperleptinaemia szorosan korrelált a hsCRP koncentrációjával, mely ismételten a krónikus gyulladás fontosságára hívja fel a figyelmet CVE-ben. Az adiponektin központi szerepet játszik a máj és a vázizom zsírsav- és szénhidrát-anyagcsere szabályozásában, az alacsony adiponektin szint szorosan összefügg az elhízással, az inzulin rezisztenciával, a 2-es típusú diabetes mellitussal és a kardiovaszkuláris megbetegedésekkel. Az adiponektin koncentrációja inverz összefüggést mutat a zsírszövet tömegével, ugyanakkor emelkedik a krónikus veseelégtelenségben. Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy a PON1 paraoxonáz aktivitása pozitívan korrelál a HDL-koleszterol és az adiponektin koncentrációjával és negatívan a testtömeg indexszel (BMI) illetve a derék körfogattal. Az adiponektin az endothelium felszíni adhézis molekulák expresszióját befolyásolja, és potenciális anti-inflammatorikus és anti-atherogén tulajdonságokkal rendelkezik.

A legtöbb veseelégtelen betegnél megtalálható valamilyen szintű fehérje- és kalória-malnutrició, és az ebből adódó aminosav- és energiahány általánosan előfordul ebben a betegcsoportban. Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy az alultápláltság és a generalizált kismértékű krónikus gyulladás markerei (hsCRP, interleukin-6, TNF-alfa) összefüggésben állnak a szív- és érrendszeri betegségek

kialakulásával CVE-ben. Kimutatták, hogy az alultápláltság az ún. malnutríció-inflammáció-atherosclerosis (MIA) komplex részeként megbízható előrejelzője lehet a veseelégtelen betegek kardiovaszkuláris mortalitásának. A korábban használt antropometriai jellemzőkről, a laboratóriumi markerek közül az albuminról és a szérum koleszterol koncentrációjáról az utóbbi időben igazolódott, hogy nem alkalmasak az alultápláltság megbízható jellemzésére CVE-ben, és egyelőre nem is áll rendelkezésünkre megbízható és elfogadott marker.

Érdekes és izgalmas megfigyelés, hogy korábbi vizsgálatok az elhízott hemodializált betegek alacsonyabb mortalitását találták az alultápláltakhoz képest, mely azt sugallja, hogy a zsírszövet jelenléte az alacsony testtömeghez képest védő szereppel bírhat CVE-ben, és ennek háttérében az zsírsejtek által termelt adipokinek, s ezek közül kifejezetten az adiponektin protektív szerepét is feltételezik. Ez az ellentmondásos megfigyelés „obezitás paradoxon” vagy „reverz epidemiológia” néven ismert az irodalomban és a nagyobb testzsír mennyiségileg kedvező hatását feltételezi a kardiovaszkuláris mortalitással szemben. Több lehetséges magyarázat létezhet erre a jelenségre, úgy tűnik, hogy a csökkent tápanyagraktárral rendelkező hemodializált betegek esetén a krónikus gyulladásos folyamatok, a csökkent protein-kalória bevitel, a krónikus acidosis és az állandó hospitalizációs igény miatt növekszik meg a korai elhalálozások száma.

Célkitűzések

1. Célkitűzésünk volt, hogy meghatározzuk a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitásokat a hemodializált és transzplantált betegekben.
2. Továbbá összefüggéseket keressünk a PON1 laktonáz aktivitás és számos egyéb, a krónikus veseelégtelenségben kiemelkedő fontosságú kardiovaszkuláris rizikófaktor között.
3. Munkahipotézisünk alapján a PON1 laktonáz aktivitása különbözik az érrelmeszesedés szempontjából hátrányosabb helyzetű hemodializált betegekben a vesetranszplantáltakhoz képest. Ezenkívül az oxidatív stressz markereként szolgáló ADMA emelkedett szintjét feltételeztük alacsonyabb PON1 paraoxonáz aktivitással együtt a vizsgált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegeinknél.
4. Korábbi eredményeink alapján azt is feltételezzük, hogy a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitások a tápláltsági állapottól függően is változhatnak krónikus veseelégtelenségben, és ez befolyásolhatja az atherosclerosis progresszióját a CVE betegekben.
5. További célkitűzésünk, hogy összehasonlítsuk a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitásokat, az ADMA, az adiponektin és a leptin koncentrációkat a tápláltsági állapot függvényében és ezek között összefüggéseket keressünk az elhízott és az alultáplált hemodializált veseelégtelen betegekben.

Betegek és módszerek

A PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitások méréséhez 78 vesetranszplantált, 108 hemodializált beteg és 63 egészséges kontroll személyt vontunk be. A tápláltsági állapot hatásának vizsgálatához 114 hemodializált beteg klinikai adatait és vérmintákból meghatározott enzimértékeit hasonlítottuk össze.

12 óra éhezést követően 10 ml vénás vért vettünk reggel 7:30 és 8:00 között a kontroll és a transzplantált betegeinktől, illetve a hemodializáltaktól a dialízis napján, azt megelőzően. A mintákból a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében standard laboratóriumi módszerekkel határozták meg a koleszterol, triglicerid, HDL-C, LDL-C, glükóz, hsCRP, kreatinin, albumin szinteket. A DEOEC Belgyógyászati Intézet I. sz. Belklinika Kutató Laboratóriumában fotometriás módszerrel határoztuk meg a szérum PON1 paraoxonáz és arilészteráz aktivitást. A PON1 paraoxonáz aktivitás meghatározásakor szubsztrátként paraoxont alkalmaztunk és spektrofotometriás módszerrel meghatároztuk a képződő 4-nitrofenol mennyiségét. A PON1 arilészteráz aktivitást meghatározása során fenilacetátot tartalmazó oldatot használtunk, szérum hozzáadását követően végeztük az adszorbanciamérést. A PON1 laktonáz aktivitás meghatározására kereskedelmi fogalomban kapható „HTLase activity assay kit” segítségével történt, thiobutírolakton szubsztrátot használtunk. A hemodializált és transzplantált betegek szérum ADMA, adiponektin és leptin koncentrációját kereskedelmi

forgalomban kapható ELISA kit segítségével vizsgáltuk. A PON1 fenotípus-megoszlását kettős szubsztrát módszerrel végeztük. A PON1-55 és a PON1-192 polimorfizmusok meghatározására fluoreszcens rezonancia-energiatranszfert (FRET) és olvadáspont-analízist kombináló módszert (Light Cycler Real-Time Technology) alkalmaztunk. A homociszteint és a cisztatin C-t a DEOEC Laboratóriumi Medicina Intézetében, valamint a Kenézy Kórház Laboratóriumában határozták meg. A homociszteint fluoreszcens polarizációs módszerrel (FPIA, Abbott) mérték. A cisztatin C meghatározását immun-turbidimetriás módszerrel (PETIA) végezték.

A vizsgálatok során SAS for Windows 6.12 számítógépes programot használtunk statisztikai analízis céljából. Az adatok normális eloszlását, ezáltal az összehasonlíthatóságukat Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük. A különböző csoportok összehasonlítása során kétmintás t-próbát (Student-féle t-teszt) alkalmaztunk, szignifikánsnak tekintettük a $p < 0.05$ értéket. Azon paramétereknél, amelyek nem mutattak normál eloszlást, ANOVA (varianciaanalízis) helyett a non-parametrikus Kruskal-Wallis-próbát alkalmaztuk.

Eredmények

A hemodializált és vesetranszplantált betegek PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitásának meghatározása

A vizsgálatunkba 78 vesetranszplantált (TRX), 108 hemodializált (HD) és 63 egészséges kontroll személyt vontunk be. A triglicerid és összkoleszterol szintek szignifikánsan magasabbak, a HDL-koleszterol mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a hemodializált betegekben a transzplantáltakhoz képest, ugyanakkor az LDL-koleszterol szintben nem volt különbség a két csoport között. A szérum glükóz, hsCRP, cystatin C és kreatinin koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak a HD csoportban a TRX betegekhez képest. Szignifikánsan magasabb ADMA koncentrációkat találtunk a HD betegekben a transzplantált populációhoz képest. A kreatinin, hsCRP, glükóz, homocisztein, koleszterol, triglicerid és ADMA szintek mindkét betegcsoportban jelentősen nagyobbak voltak a kontrollokhoz képest. A HD és TRX betegekben a PON1 laktonáz és paraoxonáz aktivitások szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollokhoz képest. Jelentősen alacsonyabb paraoxonáz és laktonáz aktivitásokat mértünk a hemodializáltakban a TRX csoporthoz képest.

Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitások között a HD betegekben ($r=0.3064$, $p<0.01$). Hasonló, de statisztikailag nem szignifikáns összefüggést észleltünk a TRX csoportban ($r=0.1492$, $p=0.2816$).

Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a PON1 laktonáz és paraoxonáz aktivitásokban a teljes vizsgált populációban ($r=0.5163$, $p<0.001$). Az ADMA szintek negatív összefüggést mutattak a PON1 laktonáz aktivitással mindkét betegcsoportban (HD: $r=-0.3240$, $p<0.05$; TRX: $r=-0.3178$, $p<0.05$) és a teljes vizsgált populációban ($r=-0.4412$, $p<0.001$). Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a PON1 paraxonáz és laktonáz aktivitások között a kontroll csoportban ($r=0.6111$, $p<0.001$). Negatív, de statisztikailag nem szignifikáns összefüggést észleltünk az ADMA koncentráció és a PON1 laktonáz aktivitások között ($r=-0.1511$, $p=0.21$). A teljes populációban szignifikáns negatív korrelációkat figyeltünk meg a PON1 laktonáz aktivitás és a BMI ($r=-0.2819$, $p<0.01$), az életkor ($r=-0.414$, $p<0.001$), a homocisztein koncentráció ($r=-0.3421$, $p<0.001$) és hsCRP szint ($r=-0.3231$, $p<0.001$) között.

Annak vizsgálatára, hogy az egyváltozós analízis során számított összefüggések, melyeket a PON1 laktonáz aktivitás, PON1 paraoxonáz aktivitás, a homocisztein koncentráció és ADMA szintek között találtunk, függetlenek-e az életkortól, a BMI-től, hsCRP és HDL-C szintektől, többszörös regressziós analízist végeztünk. Ennek eredményeként azt találtuk, hogy a PON1 paraoxonáz aktivitás és a homocisztein koncentráció független előrejelzői a PON1 laktonáz aktivitásnak az életkorra, a BMI-re, a hsCRP-re, ADMA-ra és HDL-C-re vonatkoztatva a modellben.

A hemodializált betegek PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitásának összefüggése a tápláltsági állapottal

Összesen 114 krónikus veseelégtelen beteget vontunk be a tanulmányba, akik több mint hat hónapja hemodialízis kezelésben részesülnek és a BMI alapján 3 csoportba osztottuk őket. Alultápláltnak tekintettük a $BMI < 20 \text{ kg/m}^2$ ($N=21$, 11 férfi/10 nő), normális és mérsékelten túlsúlyosnak (továbbiakban normál súlyúak csoportja) a $20 \leq BMI \leq 30 \text{ kg/m}^2$ ($N=51$, 24 férfi/27 nő) és elhízottnak $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$ ($N=42$, 20 férfi/22 nő). Nem volt szignifikáns eltérés a különböző csoportok között nemben, életkorban, a hemodialízis kezelés idejében, dohányzás és cukorbetegség szempontjából.

A leptin szintek szignifikánsan magasabbak és a PON1 paraoxonáz aktivitások szignifikánsan alacsonyabbak voltak az elhízott betegekben mind a normál súlyúakhoz, mind az alultápláltakhoz képest. A plazma adiponektin koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt az elhízottakban az alultápláltakhoz viszonyítva. Nem találtunk különbséget a betegcsoportok között az ADMA szint és a homocisztein koncentráció tekintetében. A PON1 laktonáz aktivitások magasabbak voltak az alultápláltakban az elhízott és a normál súlyú csoportokhoz képest, de ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Nem volt jelentős különbség a szérumban az HDL-koleszterol koncentrációk, a vércukor és a hsCRP szintekben az egyes csoportok között. Az alultápláltakban alacsonyabb triglicerid és alacsonyabb össz-

koleszterol és LDL-koleszterol koncentrációkat mértünk a normál súlyú és az elhízott hemodializált betegekhez képest. A kreatinin szintek között nem volt jelentős eltérés a három vizsgált csoportban, és a plazma albumin szintek is hasonlóak voltak az elhízott, az alultáplált és a normál súlyú betegeknek.

PON1 paraoxonáz aktivitás negatívan korrelált a hsCRP szinttel az összes hemodializált beteg esetén ($r=-0.344$, $p<0.01$) és különválasztva az alultáplált csoportban ($r=-0.519$, $p<0.01$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a szérum PON1 paraoxonáz aktivitás és a hsCRP között az elhízott és a normál súlyú hemodializált csoportban. Szignifikáns pozitív korreláció volt a BMI és a hsCRP között az összes hemodializáltnál ($r=0.586$, $p<0.01$), külön vizsgálva az alultápláltakban ($r=0.402$, $p<0.01$) és külön az elhízott csoportban is ($r=0.485$, $p<0.01$). Ezenkívül szignifikáns inverz korrelációt figyeltünk meg a PON1 paraoxonáz aktivitás és a BMI között az összes hemodializáltnál ($r=-0.314$, $p<0.05$) és a teljes vizsgált (hemodializált és kontroll) populációban ($r=-0.303$, $p<0.05$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a szérum PON1 paraoxonáz aktivitás és az adiponektin szintek között a hemodializált betegekben; azonban pozitívan korreláltak ezek a paraméterek a normál súlyú hemodializáltakban ($r=0.326$, $p<0.05$). Pozitív összefüggést találtunk az adiponektin és a PON1 laktonáz aktivitás között ($r=0.303$, $p<0.05$) és szignifikáns negatív korrelációt a PON1 laktonáz aktivitás és a hsCRP között ($r=-0.318$, $p<0.05$) az összes hemodializált betegben.

Annak eldöntésére, hogy a PON1 paraoxonáz aktivitás és hsCRP szint közötti összefüggés az egyváltozós vizsgálat során független-e az életkortól, a BMI-től és egyéb paraméterektől, többszörös regressziós analízis végeztünk. A modellben a PON1 laktonáz aktivitás, a hsCRP és a leptin koncentrációk a PON1 paraoxonáz aktivitás független előrejelzőinek bizonyultak az életkorra, a BMI-re, az ADMA és az adiponektin koncentrációkhoz viszonyítva.

Megbeszélés

Korábban már több tanulmány igazolta, hogy jelentősen csökken a PON1 paraoxonáz aktivitás a krónikus veseelégtelen betegekben, és ezzel összefüggésben fokozódik az érlemeszesedés és nő a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás, viszont a PON1 laktonáz aktivitás változását rajtunk kívül még nem vizsgálták ebben a betegcsoportban. Az eredményeink alátámasztották a kiindulási hipotézist, miszerint a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitások csökkenése, s ezáltal az antiatherogén hatásuk redukciója összefüggést mutat a végstádiumú veseelégtelen betegekben észlelt fokozott érlemeszesedéssel, különösen a hemodializált betegekben, míg a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitások részlegesen javulnak a vesetranszplantációt követően. A vesetranszplantált betegekben észlelt magasabb PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitások magasabb HDL-koleszterol szinttel is jártak a hemodializált

vesebetegekhez viszonyítva, mely jobb antioxidáns védelemre utal a veseátültetést követően.

Az utóbbi években különböző eredetű vesebetegségek esetén igazolták a vazoaktív mediátor NO központi szerepét az urémiás eredetű angiopathia kialakulásában. Az emelkedett ADMA koncentráció és az ezzel összefüggő oxidatív stressz, a csökkent NO produkció fokozza a veseelégtelenség progresszióját, és különböző vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az ADMA ugyanolyan "urémiás toxinnak" tekinthető a krónikus vesebetegekben, mint a kreatinin vagy a parathormon. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az ADMA az oxidatív stressz megbízható markere CVE-ben és emelkedett koncentrációja fontos rizikófaktor a krónikus veseelégtelen betegekben kialakuló kardiovaszkuláris megbetegedések szempontjából. A mi munkánk szintén megerősíti ezeket a megfigyeléseket; jelentősen magasabb ADMA szinteket észleltünk a hemodializált betegekben, mint a transzplantált csoportban. Szignifikáns inverz korrelációt találtunk a szérum ADMA koncentráció és PON1 laktonáz aktivitás között, és hasonló, de statisztikailag nem szignifikáns tendencia volt megfigyelhető az ADMA szintek és a PON1 paraoxonáz aktivitások között a hemodializáltakban és a transzplantáltakban egyaránt. Az általunk talált összefüggések alapján szoros kapcsolatot feltételezhetünk az oxidatív stressz, az emelkedett ADMA koncentrációk és a csökkent antioxidáns aktivitás között krónikus

veseelégtelenségben, mely felelős lehet a fokozott reaktív oxigén gyökök (ROS) termeléséért, és a fokozott érlelmeszesedésért ebben a betegcsoportban.

Mind a hemodializált, mint a vesetranszplantált betegekben jelentős hyperhomociszteinaemia figyelhető meg és ez is fokozza az atherosclerosis folyamatát. Eredményeink alapján nem találtunk jelentős különbséget a két betegcsoport között a szérum homocisztein szintek között, viszont mind a két csoportban mintegy kétszer magasabb homocisztein koncentrációt mértünk a normál értékekhez képest. Korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy a magasabb szérum homocisztein szintek alacsonyabb PON1 paraoxonáz aktivitással járnak a koszorúsér betegségben szenvedő betegeknél, s ez az eltérés szorosan összefügg a kardiovaszkuláris megbetegedés súlyosságával. Más szerzők azt találták, hogy a szérum homocisztein koncentráció inverzen korrelál a PON1 laktonáz aktivitással coronaria betegségben, továbbá az emelkedett homocisztein szint és a csökkent PON1 laktonáz aktivitás is független rizikófaktoroknak bizonyultak a kardiovaszkuláris eredetű betegségek szempontjából az átlag populációban. Krónikus veseelégtelenségben ezt az összefüggést korábban még nem vizsgálták, mi szignifikáns negatív korrelációt mutattunk ki a PON1 laktonáz aktivitás és a szérum homocisztein koncentráció között.

Eredményeink alapján felvetődött a kérdés, hogy krónikus veseelégtelenségben a tápláltsági állapot hogyan befolyásolja az érlelmeszesedés folyamatát és a vizsgált

paraméterek alkalmasak lehetnek-e a kardiovaszkuláris rizikó becslésére az elhízott és az alultáplált hemodializált betegekben. Jelen vizsgálatunkban jelentősen magasabb PON1 paraoxonáz aktivitást mértünk az alultáplált hemodializáltaknál az elhízott csoporthoz képest, és hasonló eltérést észleltünk a PON1 laktonáz aktivitásban is, azonban ez utóbbi nem bizonyult statisztikailag szignifikáns különbségnek. Pozitív korrelációt találtunk a szérum adiponektin és PON1 laktonáz aktivitás között és szignifikáns negatív összefüggést a PON1 laktonáz aktivitás és a hsCRP szintek között az egész hemodializált csoportban. Ezen eredmények elégtelen antioxidáns státuszra utalnak a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben, és kifejezetten az elhízottakban növekszik meg az érlelmeszedés folyamatát gyorsító oxidatív stressz az alultápláltakhoz képest. Eredményeink alátámasztják a kiindulási hipotézisünket, miszerint a csökkent szérum PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitás fokozhatja a krónikus veseelégtelenségre jellemző felgyorsult atherosclerosist, különösen az elhízott hemodializált betegeknél.

Korábbi irodalmi adatok alapján közvetlen összefüggés igazolódott a testtömeg index (BMI) és a krónikus veseelégtelenség kialakulása között, illetve összefüggést találtak a BMI és a krónikus vesebetegségek növekvő prevalenciája között túlsúlyos és elhízott egyéneknél. A vizsgálat során mérsékelten emelkedett szérum kreatinin szintet észleltünk betegeinknél a BMI függvényében. Korábban azt

feltételezték, hogy ez az emelkedés kapcsolatban lehet a krónikus veseelégtelenség progressziójával hemodializált betegeknél, azonban mi nem találtunk szignifikáns eltérést az elhízott és az alultáplált betegcsoportok között a vesefunkció tekintetében.

A leptin fiziológiás szerepe a vesefunkció kialakításában egyelőre még tisztázatlan. Azt gondoljuk, hogy potenciális szabályozó szereppel bír az elektrolit kiválasztásban és szerepet játszik olyan kórfolyamatok, mint az elhízás és az azzal összefüggésben kialakuló magasvérnyomás betegség közötti kapcsolat kialakításában. A leptint részben a vese választja ki és ezzel összefüggésben a veseelégtelenségben szenvedőknél magasabb leptin koncentrációkat találtak, korábbi tanulmányunk azt igazolta, hogy nem a hiperleptinémia felelős a csökkent PON1 paraoxonáz aktivitásért a hemodializált betegekben. Ezáltal a hiperleptinémia független előrejelzője lehet a veseelégtelenség progressziójának és fokozott kardiovaszkuláris kockázattal járhat az elhízott hemodializált betegekben. Az alacsonyabb adiponektin szint szorosan korrelált a krónikus gyulladással és az érlemezéssel vesetranszplantáción átesett betegeknél; azonban mi nem találtunk összefüggést a szérumban lévő adiponektin szint és a PON1 paraoxonáz aktivitás között a hemodializált veseelégteleneknél, tápláltsági állapotuktól függetlenül. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a PON1

paraoxonáz aktivitás indikátora lehet a veseelégtelenség progressziójának mind az alultáplált, mind az elhízott hemodializált betegekben.

Ellentmondásos megfigyelésként egyes szerzők azt találták, hogy a magasabb BMI kedvezőbb túléléssel társul a túlsúlyos és az elhízott krónikus hemodializált veseelégtelen betegekben a normál súlyúakkal és az alultápláltakkal szemben. A reverz epidemiológia tehát a magasabb BMI jótékony hatását feltételezi a kardiovaszkuláris mortalitás szempontjából ezekben a betegekben. Ezt a jelenséget „reverz epidemiológiának” nevezik és az egyik leginkább vitatott kérdés a hemodializált betegek mortalitásának vizsgálata szempontjából. Különböző vizsgálatok azt a következtetést vonták le, hogy a malnutríció és a gyulladás jelenléte (malnutríció-inflammáció-atherosclerosis komplex) megmagyarázhatja a reverz epidemiológia jelenségét a hemodializált betegekben.

Összefoglalás

Vizsgálatunk alapján az antiatherogén PON1 enzim aktivitásának jelentős csökkenését észleltük krónikus veseelégtelenségben, ez a változás kifejezetten az elhízott hemodializált betegeknél volt megfigyelhető az alultápláltakhoz képest. Tekintettel arra, hogy ez ellentmond a reverz epidemiológia által észlelt kedvező mortalitási adatoknak, további vizsgálatok szükségesek a tápláltsági állapot valódi hatásának tisztázására az elhízott és alultáplált vesebetegek kardiovaszkuláris rizikója szempontjából. Egyre több irodalmi adat támasztja alá a kiindulási

hipotézisünket, miszerint a PON1 enzim antioxidáns tulajdonságai a paraoxonáz aktivitással s nem a laktonáz aktivitással állnak kapcsolatban. Ezért vizsgáltuk elsődlegesen a PON1 paraoxonáz aktivitás és a krónikus veseelégtelen betegek antioxidáns státuszának összefüggéseit a tápláltsági állapot függvényében. Célunk volt, hogy igazoljuk a PON1 paraoxonáz és laktonáz aktivitásainak változását és összefüggését az alultáplált, normál súlyú és elhízott hemodializált betegekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a PON1 paraoxonáz aktivitás megbízható markere lehet a veseelégtelenség progressziójának az érelmeszesedés szempontjából. A legjobb tudomásunk szerint nem ismert specifikus szubsztrát vagy enzim, mely befolyásolná a PON1 laktonáz aktivitását, viszont igazoltuk, hogy a PON1 enzim laktonáz aktivitása nem független a PON1 paraoxonáz aktivitásától krónikus veseelégtelen betegekben. Vizsgálataink során az találtuk, hogy a PON1 enzim laktonáz aktivitása egy új és potenciálisan jól használható faktor lehet a kardiovaszkuláris rizikó becslésére krónikus veseelégtelenségben, de további vizsgálatok szükségesek még ezen enzimaktivitás jelentőségének megítélésére mind a hemodializált, mind a vesetranszplantált betegeknél. Az eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a magas homocisztein szint, az emelkedett ADMA koncentráció, a csökkent PON1 laktonáz aktivitás, ezáltal a homocisztein-tiolakton hidrolízisének csökkenése az homociszteinilált és oxidatív módon módosult fehérjék

szintjének emelkedéséhez vezet a szervezetben, mely elősegíti a hemodializált és vesetranszplantált betegekben az érlelmeszesedés progresszióját.

Köszönetnyilvánítás:

Köszönetemet szeretném kifejezni dr. Paragh György Professzor Úrnak, témavezetőmnek, aki lehetővé tette számomra, hogy doktori dolgozatomat a DEOEC Belgyógyászati Intézet Anyagcsere Tanszékén végezhessem. Kiemelkedően hálás köszönetemet szeretném kifejezni dr. Seres Ildikó Tudományos Főmunkatársnőnek, aki laboratóriumi és tudományos munkámat irányította, felügyelte és szüntelen támogatta. Köszönetet szeretnék mondani dr. Lőcsey Lajos Tanár Úrnak a betegek kiválasztásában és az adatok összegyűjtésében nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért és a sok hasznos észrevételéért. Köszönetemet szeretném kifejezni dr. Harangi Mariann Adjunktusnőnek a hasznos tanácsokért és segítségért. Szeretnék köszönetet mondani a DEOEC Belgyógyászati Intézet és Anyagcsere Tanszék Kutató Laboratóriumának minden dolgozójának, a megjelent tudományos közleményeim társszerzőinek, akik segítettek és támogatták munkámat.

Vizsgálatainkat az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K84196), a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV/2010-0007 számú, a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Iktatószám: DEENKÉTK/77/2013.
Tetelszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Sztanek Ferenc

Neptun kód: HN630D

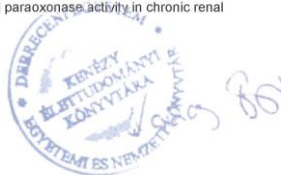
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sztanek, F.**, Seres, I., Harangi, M., Lőcsey, L., Padra, J.T., Jr. Paragh, G., Asztalos, L., Paragh, G.:
Decreased human paraoxonase-1 (PON1) lactonase activity in hemodialyzed and renal
transplanted patients. A novel cardiovascular biomarker in end-stage renal disease.
Nephrol. Dial. Transplant. 27 (7), 2866-2872, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr753>
IF:3.396 (2011)
2. **Sztanek, F.**, Seres, I., Harangi, M., Lőcsey, L., Koncsos, P., Paragh, G.: Effect of nutritional status on
human paraoxonase-1 activity in patients with chronic kidney disease.
Kidney Blood Press. Res. 36 (1), 310-319, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000343383>
IF:1.464 (2011)

További Közlemények

3. Varga, É., Seres, I., Harangi, M., Kárpáti, I., Koncsos, P., **Sztanek, F.**, Paragh, G.: Low high-density
lipoprotein cholesterol is not responsible for decreased paraoxonase activity in chronic renal
failure.
Kidney Blood Press. Res. 35 (4), 265-272, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000334650>
IF:1.464 (2011)



4. Paragh G., **Sztanek F.**, Harangi M.: A triglicérid metabolizmus.
Metabolizmus. 9 (4), 214-217, 2011.
5. Seres, I., Bajnok, L., Harangi, M., **Sztanek, F.**, Koncsos, P., Paragh, G.: Alteration of PON1 activity in adult and childhood obesity and its relation to adipokine levels.
Adv. Exp. Med. Biol. 660, 129-142, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-350-3_12
IF:1.379
6. Harangi, M., Mirdamadi, H.Z., Seres, I., **Sztanek, F.**, Molnár, M., Kassai, A., Derdák, Z., Illyés, L., Paragh, G.: Atorvastatin effect on the distribution of high-density lipoprotein subfractions and human paraoxonase activity.
Transl. Res. 153 (4), 190-198, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2009.01.007>
IF:2.062
7. Paragh G., **Sztanek F.**, Márk L.: Reziiduális rizikó és optimális lipidértékek.
Metabolizmus 7 (2), 86-92, 2009.
8. Varga, É., Seres, I., Harangi, M., **Sztanek, F.**, Asztalos, L., Lőcsey, L., Borbás, B., Szegedi, J., Kárpáti, I., Paragh, G.: Serum cystatin C is a determinant of paraoxonase activity in hemodialyzed and renal transplanted patients.
Dis. Markers. 26 (3), 141-148, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/DMA-2009-0624>
IF:2.026
9. Lőcsey, L., Seres, I., **Sztanek, F.**, Szabó, L., Asztalos, L., Paragh, G.: Relationship between serum paraoxonase activity and adipokines levels in renal transplanted patients.
In: XXII. International Congress of the Transplantation Society 10-14 August 2008, Sydney, Australia. [S.n.], Sydney, 5, 2008.
10. Mirdamadi, H.Z., **Sztanek, F.**, Derdák, Z., Seres, I., Harangi, M., Paragh, G.: The human paraoxonase-1 phenotype modifies the effect of statins on paraoxonase activity and lipid parameters.
Br. J. Clin. Pharmacol. 66 (3), 366-374, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03213.x>
IF:3.128
11. Paragh G., **Sztanek F.**, Harangi M.: A statinok Janus-arca.
Diabetol. Hung. 16 (1), 35-41, 2008.



12. Harangi M., **Sztanek F.**, Paragh G.: A sztatínok és a proteinuria.
Hyperton. Nephrol. 11 (5), 237-243, 2007.
13. Paragh G., **Sztanek F.**, Harangi M.: A lipidcsökkentő kezelés mai gyakorlata: Fókuszban a vesebetegségek.
Metabolizmus 4, 201-205, 2007.

Összesített impakt faktor: 14.919

Összesített impakt faktor: (értekezés alapján szolgáló közlemények esetén): 4.86

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.02.22

