

A SZÉRUM PARAOXONÁZ AKTIVITÁSA SZEKUNDER DYSLIPIDAEMIÁKBAN

Dr. Balogh Zoltán

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Debreceni Egyetem OEC I. Belgyógyászati Klinika

Témavezető: Dr. Paragh György egyetemi tanár, PhD, D.Sc.
és Dr. Kovács Péter egyetemi docens, PhD.

Debrecen
2002.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

1.0 BEVEZETÉS

- 1.1. A lipid anyagcsere szerepe az atherosclerosisban**
- 1.2. A humán szérumban paraoxonáz élettani szerepe**
- 1.3. 2-es típusú diabetes mellitusban észlelt dyslipidaemia**
- 1.4. A lipid anyagcsere zavara krónikus vesebetegségekben**
- 1.5. Lipid eltérések vesetranszplantáció után**

2.0 CÉLKITŰZÉSEK

3.0 MÓDSZEREK

4.0 EREDMÉNYEK

- 4.1. A szérumban paraoxonáz aktivitása hemodializált vesebetegekben**
- 4.2 A paraoxonáz aktivitás változása vesetranszplantáció után**
- 4.3. A lipidszint csökkentő kezelés hatása a paraoxonáz aktivitására**
 - 4.3.1. Gemfibrozil hatása 2-es típusú cukorbeteg PON aktivitására**
 - 4.3.2. Gemfibrozil hatása hyperlipidaemiás betegek PON aktivitására**
 - 4.3.3. Mikronizált fenofibrát hatása hyperlipidaemiás coronariabetegekben**
 - 4.3.4. Simvastatin kezelés hatása hyperlipidaemiás betegek PON aktivitására**

5.0. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

6.0. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

7.0. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

8.0. APPENDIX

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC-1 gén	Adenosine-triphosphate-binding cassette transporter-1 gén
AFCAPS/TexCAPS	Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study
Apo A, B, C, E, J	Apolipoprotein A, B, C, E, J
ASPEN	Atorvastatin as Secondary Prevention
BECAIT	Bezafibrate Coronary Angiographic Intervention Trial
BMI	Testtömeg-index
CARDS	Collaborative Atorvastatin Diabetes Study
CARE	Cholesterol and Recurrent Events Trial
CETP	Cholesterol ester transfer protein
DAIS	Diabetes Atherosclerosis Intervention Study
4D tanulmány	Determination of Cardiovascular End-points in Non insulin-Dependent Diabetes mellitus Dialysis Patients
DM ₂	2-es típusú diabetes mellitus
FATS	Familial Atherosclerosis Treatment Study
FIELD	Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes
HbA _{1c}	Hemoglobin A _{1c}
HDL	High-density lipoprotein
HLP	Hyperlipoproteinaemia
HMG-CoA	Hydroxy-methyl-glutaryl Coenzyme A
ICAM	Intercelluláris adhéziós molekula
IDL	Intermediate-density lipoprotein
ISZB	Ischaemiás szívbetegség
LCAT	Lecitin cholesterol acyl transferase
LDL	Low-density lipoprotein
LDS	Lipids in Diabetes Study
LIPID	Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease
Lp (a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoprotein lipáz
LRCP	Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial
MARS	Monitored Atherosclerosis Regression Study
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
NCEP	National Cholesterol Education Program
NO	Nitrogén-monoxid
OGTT	Orális glükóz tolerancia teszt
PAFAH	Platelet-activating factor acetylhydrolase
PAI	Plazminogén-aktivátor inhibitor
PDGF	Platelet derived growth factor
PON	Paraoxonáz
PPAR α	Peroxisoma-proliferated-activated receptor α
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster study
4S	Scandinavian Simvastatin Survival Study
TxA ₂	Thromboxán A ₂
VA-HIT	Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial
VCAM	Vascularis sejtadhéziós molekula
VLDL	Very low density lipoprotein
WOSCOPS	West of Scotland Coronary Prevention Study

1.0. BEVEZETÉS

1.1. A lipid anyagcsere szerepe az atherosclerosisban

Virchow infiltrációs, Rokitansky, majd Duguid thrombogén elméletét, valamint a Ross és Glomset által kidolgozott "response to injury" elméletet követően az utóbbi évtizedek igen intenzív kutatásai nyomán egyértelművé vált, hogy a keringésben levő lipoproteinek, monocyták, vérlemezkék, a fehérvérsejtek által termelt cytokinek, valamint az endothelsejtek, érfali simaizomsejtek, fibroblastok és macrophagok igen bonyolult kölcsönhatásának eredményeként alakul ki az atherosclerosis. A Framingham-tanulmány, majd a nagyobb primer prevenciók (Oslo Primary Prevention Trial, MRFIT, LRCP, Helsinki Heart Study, AFCAPS/TexCAPS, WOSCOPS, CARE) vizsgálatok igazolták, hogy a magas koleszterinszint, a magas LDL-, triglicerid-, illetve az alacsony HDL-szint a coronariabetegségek igen súlyos rizikófaktorai. Egyúttal igazolták azt, hogy a diétás és/vagy gyógyszeres lipidcsökkentő kezelés a cardiovascularis események gyakoriságát csökkenti (24, 30, 48, 63). Az összkoleszterinszint 1 %-os csökkentésével 2 %-kal csökkenthető a koszorúér-betegség gyakorisága (56). A Framingham Heart Study igazolta, hogy a HDL-szint 0,1 mmól/l-nyi csökkenésével a coronariabetegség gyakorisága 10%-kal növekszik (16).

A szekunder prevenciók tanulmányok közül igazi áttörést a 4S vizsgálat jelentett, amelyben 4.444 beteg simvastatin kezelése során az 5,5 éves nyomonkövetés alatt a coronaria események gyakorisága 42%-kal, míg az össz mortalitás 30%-kal csökkent (88). A regressziós vizsgálatok során (FATS, MARS) az atherosclerotikus plakkok méretét vizsgálva igazolódott, hogy a lipidértékek jelentős javulása mellett elérhető az atherosclerotikus plakkok regressziója is, de mindenképpen lassítható a progresszió, egyúttal csökkenthető az akut cardiovascularis történések kialakulása (12, 14). További

kutatások során igazolódott, hogy a macrophagokban és extracellulárisan nagy mennyiségű lipidet, sok gyulladásos sejtet, ugyanakkor kevés kötőszöveti mátrixot, simaizomsejtet és vékony fibrosus sapkát tartalmazó ún. lágy plakkok rupturája felelős az akut coronariatörténések, szívinfarktusok többségéért. Ugyanis a lágy plakkok megrepedésekor a zsírok a keringésbe jutnak, egyúttal a coronaria ágat elzáró thrombocytá-aggregátum alakul ki, következményes necrosissal (15). A lipidcsökkentő statin terápia a plakk-rupturáért felelős mátrix metalloproteináz-9 termelődését gátolva a plakkok stabilizálásához vezet. A statinok az ún. pleiotróp hatásuk révén gátolják a simaizomsejtek proliferációját, az endothel PAI-1 termelését, a macrophagok szöveti faktor termelését, gátolják a vérlemezkék aggregációját és növelik az endothel NO-termelését (57). A statin terápia coronaria protektív hatása valószínűleg ezért múlja felül a lipidszint csökkentő hatástól várható eredményt.

Az érlelmeszesedés kezdeti lépése az ún. **fatty streak laesio**, melyet a monociták makrofágok endothelhez tapadása és érfali infiltrációja hoz létre. A monociták felszínén megjelennek az ún. adhézións molekulák, melyek az endothel felszínén levő adhézións molekulákkal (E-szelektin, ICAM-1, VCAM-1, fibronektin) kapcsolatba lépve a keringő monocitákat lehorgonyozva, elősegítik azok subintimális térbe jutását (18). Számos endothel és simaizomsejt által termelt kemotaktikus faktor képes kiváltani a monociták adhéziónját és penetrációját (19). Az atherosclerosis kezdeti folyamatában az oxidált, acetilált vagy glikált LDL-nek jelentős szerepe van, mivel a subendotheliális térbe bevándorolt macrophagok a scavenger receptorokon keresztül nagy affinitással felveszik a **módosult LDL**-t, ahol intracelluláris negatív feedback hiányában a koleszterin felhalmozódik, így az ún. habos sejtek képződnek.

Ezen kívül az oxidált lipoprotein partikulumok számtalan cytokin, gyulladásos mediátor és növekedési faktor termelődéséhez vezetnek az artériafalban, melyek az érfali sejtek

(endothel, simaizomsejt, macrophag, fibroblast) működését jelentősen módosítják (85).

A small-dense LDL fokozza a macrophagok foszfolipáz A_2 termelését, mely többszörösen telítetlen zsírsavakat szabadít fel a HDL-ből és az LDL-ből, valamint fokozza az oxidált foszfolipidek képződését. Az aktivált macrophagok által termelt myeloperoxidáz reaktív szabad gyökök képződéséhez, az LDL oxidációjához vezet. Az oxidált LDL a macrophagok proliferációját eredményezi, a PDGF és a TxA_2 termelődésének indukálása révén a simaizomsejtek migrációjához és proliferációjához vezet. Végül az oxidált LDL az endothel, simaizomsejtek és a habos sejtek apoptosist indukálva thrombosishoz vezet (62).

A lipid paraméterek közül az alacsony **HDL** szint mutatja a legszorosabb összefüggést az ISZB-vel és a szívinfarktus bekövetkezését illetően háromszor jobb előrejelzőnek bizonyult, mint a többi lipid paraméter (29). A PROCAM tanulmányban 20.000 egyén 4 éves nyomon követése során a 0,95 mmól/l alatti HDL szintű emberekben alakult ki ISZB (6). A nőkben a menopausa előtti magasabb HDL szintnek szerepe van abban, hogy ilyen korú nőkben 2-4-szer ritkábban alakul ki cardiovascularis megbetegedés, mint a hasonló korú férfiakban.

A HDL három főbb hatása révén gátolja az atherosclerosis folyamatát:

a) **Reverz koleszterin transzport**, melynek során a perifériás sejtekben felhalmozódott koleszterin a perifériáról a májba jutva az epével együtt a szervezetből kiürülhet. A perifériás sejtekből a koleszterin felvétele a HDL-be történhet az ún. aquosus diffúziós elmélet szerint, vagy pedig membránreceptoron keresztüli, intracelluláris calcium mobilizálás révén megvalósuló módon (46, 68). A szabad koleszterin sejtől történő kiáramlásának és a nascens HDL-be kerülésének nemrég leírt módja lehet az ABC-1 gén által mediált forma (96). A LCAT és a CETP segítségével valósul meg a reverz koleszterin transzport indirekt módja. A

reverz koleszterin transzport direkt útja során a HDL₂-partikulum a máj SR-B1 receptorához kötődve leadja koleszterin-észter tartalmát, mely a máj 7 α -hidroxiláz enzimének segítségével epesavvá alakul és így az epével együtt a bélbe ürül (86).

- b) **Lipoproteinek oxidációjának gátlása.** A HDL-hez kötött enzimek közül a PAFAH, a PON1, a LCAT és az apoA₁ antioxidáns hatása bizonyított (84). Az apoA₁ gátolja a small-dense LDL képződését (35). A PON a lipid peroxidok, a koleszterin-linoleát hidroperoxidok és a hidrogén-peroxid hidrolizálásával védi meg az LDL-t az oxidációtól. Ezzel szemben a small-dense LDL gátolja a PON aktivitását. A LCAT enzim gátolja az oxidált lipidek felhalmozódását az LDL-ben, egyúttal a reverz koleszterin transzportban is szerepe van. A PAFAH hidrolizálja a macrophagokat szuperoxid anion termelésre készítő PAF-ot és az LDL-ben levő PAF-szerű aktivitással rendelkező oxidált foszfolipideket. A HDL képes coeruloplasmint és transferrint megkötni és így gátolni a lipid peroxidációt. A HDL-ben levő E-vitamin megelőzi az atherosclerosis korai fázisában észlelhető endothel dysfunkciót. A HDL közvetlenül gátolja az oxidált LDL által az endothelsejtek felszínén indukált fokozott ICAM-1 és VCAM-1 expressziót (62).
- c) **Az érfalra gyakorolt, közvetlen, ún. pleiotróp hatása:** gátolja a monocyták kemotaxisát, a monocyták kitapadását az endothelsejtekhez (a VCAM-1 és az E-szelektin gátlása révén), gátolja az oxidált LDL-indukálta endothel dysfunkciót és apoptosist, fokozza az endothelsejtek és a simaizomsejtek proliferációját, gátolja a vérlemezkék aggregációját, fokozza a macrophagokból és a habos sejtekből a koleszterin kiáramlást, gátolja a X. véralvadási faktor aktiválódását és serkenti a protein C aktiválódását (62, 68).

1.2. A humán szérum paraoxonáz élettani szerepe

A paraoxonáz (PON) (aril-dialkil-foszfataáz) 43 kDa molekulásúlyú, 354 aminosavból és szénhidrát oldalláncokból álló glikoprotein, mely a keringésben szinte kizárólag a HDL felszínén, hidrofób N-terminális végével a HDL-nek az apoA₁-és apoJ tartalmú részéhez kötődve található meg (82). A PON a májban termelődik és a máj szekretálja, aktivitásához, stabilitásához Ca²⁺-ion jelenléte szükséges. A HDL a PON-t bejuttatja az artériás érfalba, ahol antioxidáns hatását kifejtheti, az LDL-t megvédi a lipid peroxidok akkumulációjától, az LDL oxidatív módosulásától (26, 82). Az LDL oxidációjának központi szerepe van az atherosclerosis iniciációjában és progressziójában. A HDL antiatherogén potenciáljában igen jelentős szerepe van a PON-nak, azonban a HDL egyes szubfrakciói különböző mértékben tartalmazzak PON-t. A HDL₂-nek 2-3,5-szer magasabb a PON koncentrációja, mint a HDL₃-nak (97). A PON az LDL-ből eltávolítja az oxidált foszfolipideket, melyek az atherosclerotikus gyulladásban szerepet játszó NFκB-gének aktiválásán keresztül elősegítenék a keringő monocyták endothelhez történő kitapadását (64). A legvalószínűbb mechanizmus, melynek révén a HDL megakadályozza a lipid peroxidok felhalmozódását, a foszfolipid hidroperoxidok enzimatisz hidrolízise (84). A PON1 egyértelműen jóval hatékonyabban gátolja az LDL oxidációját, mint a szintén a HDL-ben levő antioxidáns hatású LCAT és az apoA₁ (4). A PON in vitro gátolja a réz-indukálta LDL-oxidáció mellett a makrofágok oxidáltLDL-felvételét is, valamint az LDL oxidáció gátlása révén csökkenti az erősen vazokonstriktor hatású endothelin szekrécióját is. ApoE deficiens egerekben kimutatták, hogy humán PON1 intraperitonealis injektálása a peritonealis macrophagok lipid peroxid tartalmának 40-65%-os csökkenését, egyúttal az oxidált LDL felvételének és a CD36 scavenger receptorok messenger RNS expressziójának 30-40%-os csökkenését eredményezte, egyúttal a habos sejt képződést csökkentette (31).

Korábbi közleményekben leírták, hogy csökkent PON aktivitást találtak szívinfarktuson átesett egyéneken, az atherosclerosisra fokozottan hajlamosító olyan kórképekben, mint a familiáris hiperkoleszterinémia, a 2-es típusú diabetes mellitus, a krónikus veseelégtelenség, a Tangier- és a "fish eye"- betegség, valamint 1-es típusú diabetes mellitusban (60, 69, 72, 76, 78). Többen összefüggést írtak le az alacsony PON aktivitás és a diabeteses microvascularis szövődmények (polyneuropathia, retinopathia) között (42, 43), valamint ellentmondásos adatok vannak a PON aktivitás és a Parkinson-kór kapcsolatáról (2, 52), ill. szerepét vizsgálják Alzheimer-kórban is (44). Diabetes mellitusban in vitro vizsgálatokkal kimutatták, hogy izolált paraoxonáz 25 mmól/l glükózzal történt inkubációja 40%-os PON enzimaktivitás csökkenést okozott, melyet a glikációval magyaráztak (36).

A PON szubsztrátjai a szerves foszfátok, aromás karbolsavészterek és a karbamátok (72). Az enzim hidrolízis révén képes detoxifikálni az inszekticid parathion metabolitját, a paraoxont és az ideggázként használatos szerves foszfátok sokaságát is (53). A szerves foszfátok elleni védelem nemcsak a PON szérum- és szöveti szintjétől függ, hanem részben az egyes izoenzimek jelenlététől is. A PON1 aktivitás részben genetikailag determinált. A legintenzívebben vizsgált 192-es pozícióban észlelt polimorfizmus hatása szubsztrát dependens. Ugyanis míg a B-típusú (újabbán R-izoenzimnek nevezett) alak a paraoxont és a fenitroxont többszörösen hatékonyabban hidrolizálja, mint az A-típusú (újabbán Q-izoenzim), a fenilacetátot pedig mindkét fenotípus azonos mértékben hidrolizálja, azonban a legtöbb szerves foszfátot, a diazoxont, az ideggázokat (sarint és somant) -éppen ellenkezőleg- a Q-izoenzim hidrolizálja hatékonyabban, mint az R-izoenzim (20). A PON1 gén másik polimorfizmusa, mely az 55-ös aminosav pozícióban Leu/Met cserét jelent, jóval kisebb hatással van a PON1 aktivitására és független a 192-es polimorfizmustól (59).

A PON génje a 7-es kromoszóma hosszú karján, a q21.3 és a q22.1 között helyezkedik el, a gén egy multigén családba tartozik, melynek tagjai a PON 1, PON2 és PON3 gén (38). A PON1 génhez szorosan kapcsolódva található a piruvát dehidrogenáz kinázok egyik génje, ez magyarázhatja a PON genotípusok és a diabetes mellitusban észlelhető glycaemiás kontroll kapcsolatát, melyet több munkacsoport leírt (37, 74). A PON2 gén termékét eddig még nem sikerült azonosítani biológiai szövetben, míg a PON3 gén termékét nemrég azonosították, mely nyulak HDL-jén levő laktonáznak felel meg (25).

A humán PON molekula szerkezetében két polimorfizmusos hely található (a 192-es pozícióban levő Gln/Arg polimorfizmus elsősorban a PON enzim aktivitását, míg az 55-ös pozícióban levő Leu/Met polimorfizmus inkább az enzim mennyiségét befolyásolja). A 42. és 353. pozícióban levő cysteinek között egy belső diszulfid híd található, a 284-es pozícióban egy szabad cystein helyezkedik el, míg a molekula hidrofób N-terminális vége kapcsolódik a HDL felszínének apoA₁ és apoJ tartalmú részéhez **(1. ábra)** (53). A szerves foszfátokkal szembeni hidrolitikus aktivitás erősen Ca-függő, azonban a tisztított PON-1 kalcium jelenléte nélkül is képes a lipid peroxidok felhalmozódásától védeni az LDL-t. A 283-as (mások szerint 284-es) pozícióban levő cystein jelenléte alapvetően fontos az LDL oxidációjának meggátlásához, azonban ez nem fontos a szerves foszfátok hidolíziséhez (8). Ennek megfelelően jelenleg 2 aktív centrumot különítenek el a paraoxonázon belül: a Cys283-dependens antioxidáns, valamint a szerves foszfátokat Ca-függő módon hidrolizáló aktív centrumot (26, 53).

Az intenzív genetikai vizsgálatok során leírták, hogy ha a 192-es aminosav pozícióban glutamin (Gln) van jelen, akkor a PON aktivitás alacsony, míg az arginin (Arg) kb. nyolcszor nagyobb enzim aktivitással jár (1). Az endonukleáz hasítási helyének megfelelően elnevezett AlwI polimorfizmus a PON1 codon 192-n (Adenin→Guanin;

Gln→Arg) többnyire alacsony szérum PON aktivitással és szinttel, valamint fokozott ISZB rizikóval jár, azonban az eredmények a különböző népességcsoportokban eltérőek (77). A populációs adatok többsége a kaukázusi népcsoportra vonatkozik, valamint a japán népességre, ettől eltérő eredményeket észleltek egyéb ázsiai (dél-koreai, indiai, kínai populációban) (41). A Hsp92II polimorfizmust a PON1 codon 55-n (Timin→Adenin; Leucin→Metionin) 2-es típusú cukorbetegség független rizikófaktoraként értékelték az ISZB-t illetően (61). A PON2 gén DdeI polimorfizmusa a 311-es codonon (Guanin→Citozin; Cystein→Szerin) szintén fokozott ISZB rizikóval járhat familiáris hiperkoleszterinémiás egyéneknél (77). A PON1 és PON2 gén polimorfizmusának kapcsolatát, interakcióját is nagyrészt kaukázusi népcsoportokon vizsgálták (41). Azonban a genetikai tényezők mellett a szérum PON aktivitását és koncentrációját erősen befolyásolja a dohányzás, az étrend, az etnikai háttér, az életkor, a fizikai aktivitás és az inzulinrezisztencia is, melyeket az irodalmi adatok, eredmények kiértékelésekor figyelembe kell venni (79, 95). Meglepő módon a magas zöldség- és rosttartalmú étrend a PON aktivitás csökkenését eredményezte, míg a sütésre használt, "hőkárosodott" olívaolaj fokozta a DM₂ nöbetegek postprandiális PON aktivitását, a mérsékelt alkoholfogyasztás is hasonló hatást fejtett ki (51, 92).

A lipidszintcsökkentő gyógyszerek fogyasztása is hatással lehet a PON aktivitásra, mint azt a későbbiekben részletesebben tárgyaljuk.

A fenti tényezőket is figyelembe kell venni a korrekt véleményalkotáshoz a PON atherosclerosis lassításában betöltött szerepét illetően. Mackness és mtsai mértékadó véleménye szerint a PON1 aktivitásának és mennyiségének lényegesen nagyobb szerepe van az ISZB-t és a carotis stenosiszt illetően, mint a PON1-192 és -55 genotípusnak (59). Az R-allél előfordulását gyakrabban észlelték a coronariabetegek körében, ebből többen arra következtettek, hogy a PON1-192 polimorfizmus rizikófaktora lehet az ISZB-nek

(80). Sajnos a klinikai tanulmányok többségében kizárólag PON genetikai vizsgálatot végeztek, anélkül, hogy megmérték volna a PON1 aktivitását és mennyiségét. Emellett úgy tűnik, hogy a megnőtt apoJ/PON1 arány jobb előrejelzője az atherosclerosisnak, mint az atherogén indexnek nevezett összkolesztein/HDL-C arány (65). Mackness és mtsai szerint a lipidperoxidok hidrolízisének rutinszerű vizsgálatának hiányában a paraoxon és/vagy a diazoxon hidrolízisét és a PON enzim koncentrációját minden vizsgálat során meg kellene határozni (59).

A fenti antioxidáns hatáson kívül a PON képes védelmet nyújtani a különböző sejtmembránoknak a lipid peroxidációval és egyéb toxikus hatásokkal szemben. Ezen kívül a PON a bakteriális endotoxinok, lipopoliszacharidok ellen is védelmet biztosít. Az endotoxinok Gram-negatív baktériumok okozta halálos kimenetelű endotoxinémiát és szeptikus shockot okozhatnak. A legújabb kutatások során felmerült a PON-nak bizonyos prodrug-ok aktiválásában, illetve inaktiválásában betöltött szerepe. Leírták, hogy a PON1 fontos az antibiotikus prodrug prulifloxacinnak aktív antibiotikumká aktiválása során (53).

1.3. 2-es típusú diabetes mellitusban észlelt dyslipidaemia

A cukorbetegség száma világszerte ugrásszerűen növekszik, 2010-re becsült számuk több mint 220 millió ember, akiknek több mint 90%-a 2-es típusú cukorbeteg. A 2-es típusú cukorbetegség többnyire a metabolikus szindróma részeként fordul elő. A 2-es típusú cukorbetegség halálozásáért az esetek 80%-ában a cardio- és cerebrovasculáris betegségek (szívinfarktus, szívelégtelenség, stroke) felelősek (49). A DM₂ betegek között 2-4-szeres az atheroscleroticus érbetegségek kockázata. A 2-es típusú cukorbetegség önmagában akkora szívinfarktus- rizikóval jár, mint a nem-cukorbetegség körében egy már korábban lezajlott szívinfarktus (33). A cukorbetegségben kialakult

szívinfarktusnak igen nagy a mortalitása. Ezért 2-es típusú diabetesesek körében valójában már csak szekunder prevencióról beszélhetünk, és a komplex kezelés (normoglycaemia és normotensio, testsúlycsökkentés, fizikai aktivitás, diéta, a dyslipidaemia, a prothrombotikus állapot, az endothel dysfunctio kezelése) során a jóval szigorúbb célértékek elérésére kell törekedni (66). A terápia sikerét nagymértékben nehezíti, hogy a 2-es típusú cukorbetegség felismeréséig átlagosan 5-7 év telik el, ezért többnyire megkésett a diagnózis és az adekvát terápia (34). Gyakran már a micro-, vagy macrovascularis szövödmények hívják fel a figyelmet a háttérben évek óta meghúzódó szénhidrát (és lipid) anyagcsere-zavarra.

2-es típusú diabetes mellitusban a lipoproteinek minőségi, összetételi változásait és a lipoproteinek metabolizmusának kinetikáját is figyelembe véve az esetek 50-80%-ában megfigyelhető a lipidanyagcsere zavara.

A diabeteses dyslipidaemia főbb jellemzői az emelkedett triglicerid szint, a HDL szint csökkenése, mérsékelten emelkedett LDL-C szint, valamint az oxidációra és glikációra hajlamosabb, az érfali macrophagok és módosult simaizomsejtek scavenger receptorain át az érfali sejtekben felhalmozódó, ún. habos sejtek képződéséhez vezető small-dense LDL arányának megnövekedése. Az LDL a thrombocyta-membrán lipid összetételének megváltoztatásával fokozza a vérlemezkék aggregáció hajlamát. Az inzulinrezisztencia miatt hiányzó perifériás inzulinhatás következtében fokozódik a zsírsejtekben a lipolysis, a megnövekedett szabad zsírsav kínálat a májban fokozott VLDL és apoB szintézishez vezet. Az inzulinhatás hiánya miatt csökkenő LPL aktivitás a trigliceridben gazdag lipoproteinek lebontásának csökkenéséhez, elnyújtott és fokozott mértékű postprandiális hypertrigliceridaemiához, valamint a VLDL, az IDL, az LDL és a HDL triglicerid tartalmának növekedéséhez vezet. A LPL aktivitás csökkenését erősíti az is, hogy a LPL aktivitását fokozó apoCII szintje csökken, míg a LPL-t gátló apoCIII szintje

nő, emiatt az apoCII/apoCIII arány csökken (67). A trigliceridben gazdagabb, nagyobb méretű VLDL₁- és -₂ partikulumok aránya megnő a VLDL₃-mal szemben. A trigliceridben gazdag lipoproteinek gátolják az inzulin receptorhoz kötődését, így a dyslipidaemia az inzulinrezisztencia fokozódásához vezet (21). Így került az utóbbi években előtérbe a glükóztoxicitás mellett a lipotoxicitás fogalma. Az alacsony HDL szint, valamint az összetételében megváltozott HDL részecske a reverz koleszterin transzport zavarára hajlamosít, melyben kulcsszerepe van a LCAT-nak és a CETP-nek. A lipidek közül legfontosabb prediktív értéke az alacsony HDL szintnek van. Gyakran észlelhető az apoA₁ gyorsabb lebomlása is. A nephropathiás- microalbuminuriás cukorbetegekben gyakran emelkedett az erősen atherogén Lp(a) szintje is (45). A 30 mg% fölötti Lp(a) szint önálló cardiovascularis rizikótényező, mert a Lp(a) gátolja a plazminogén→plazmin átalakulást, vagyis a fibrinolízist. A hyperinzulinaemia közvetlen hatással lehet az artériák falára, ahol fokozza a simaizomsejtek proliferációját, a kötőszöveti mátrix szintézisét, lokális növekedési faktorok termelődését, csökkentheti a specifikus LDL-receptorok aktivitását.

A döntően nem-cukorbetegeken végzett primer prevenciók Helsinki Heart Study, AFCAPS/TexCAPS, valamint a szekunder prevenciók CARE, 4S, LIPID és VA-HIT tanulmányok kiértékelésekor diabeteses alcsoport analízist végeztek, melyek szerint a lipidszintek csökkentése cukorbetegben is csökkenti a macrovascularis események számát, azonban a kis diabeteses betegszám erősen korlátozza a fenti tanulmányok kiértékelését (66). A PROCAM és a BECAIT vizsgálatok eredményei alapján a korábbi statin kezelés dominanciáját megingatta a fibrátok előtérbe kerülése (a 2-es típusú diabetes mellitusban észlelhető triglicerid szint emelkedés, a small dense LDL arányának növekedése és a HDL szintjének egyértelmű csökkenése miatt). A DAIS tanulmány adatai szerint a mikronizált fenofibrát kezelés 2-es típusú cukorbetegben

csökkenti a coronarográfiával megítélhető coronaria betegség progressziójának mértékét (22). A "statinok vagy fibrátok diabetesben" kérdésében ma még sok a bizonytalanság (28). A DAIS vizsgáló csoport ajánlása szerint az előtérben álló lipid abnormalitás kezelendő, erélyesen, hatékonyan (22). Ebben a statinok mellett a fibrátoknak is szerepe van. A nemrég elindított, elsődlegesen cukorbetegeken végzett lipidcsökkentő kezelési nagy tanulmányok (a simvastatinnal végzett Heart Protection Study, a fenofibráttal végzett FIELD és LDS, az atorvastatinnal végzett CARDS és ASPEN vizsgálatok) lezárása, kiértékelése adhat a következő években egyértelmű választ a 2-es típusú cukorbetegben választandó antilipémiás kezelési elvekről (11, 22, 70, 75).

1.4. A lipid anyagcsere zavara krónikus vesebetegségekben

A hemodializált krónikus veseelégtelen betegek 50%-a az atherosclerosis okozta szövődményekben hal meg, a szívinfarktus okozta mortalitás 10-17-szer magasabb, mint az egészséges populációban (58). A felgyorsult atherosclerosis háttérében a hypertonia mellett igen fontos szerepe van a lipid anyagcsere zavarának.

Nephrosis szindrómában a jellegzetes hypercholesterinaemia és hypertrigliceridaemia oka a proteinuria eredményezte fehérjevesztés, a plazma kolloid-ozmotikus nyomásának csökkenése, mely a májban az apoB és a VLDL szintézisét nagymértékben fokozza. Egyúttal a HMG CoA redukáz enzim aktivitásának növekedése miatt az intracelluláris koleszterin szintézis fokozódása, valamint a fehérjeürítés miatt a reverz koleszterin transzportban fontos LCAT enzim vizelettel történő veszítése is megfigyelhető.

Urémiás betegekben olyan komplex dyslipidaemia figyelhető meg, mely a lipoproteinek képződésének és metabolizmusának minőségi és mennyiségi zavarát jelenti. Jellemzően a plazma triglicerid szintjének növekedése észlelhető, általában normál összkoleszterin és LDL-C szint mellett, egyúttal a HDL-C szintje csökken (3). A trigliceridek

lebontásában alapvető lipoprotein lipáz aktivitása egyértelműen csökken, melyet részben az apoCII / apoCIII hányados csökkenése, részben a szekunder hyperparathyreosis során a parathormonnak az inzulinszekréciót, közvetve pedig a LPL-t gátló hatása magyaráz (7). A perifériás sejtekből a májba történő reverz koleszterin transzportban szereplő LCAT enzim és a CETP aktivitása is csökken, akárcsak a hepaticus lipázé. A LPL aktivitásának csökkenése a trigliceridben dús VLDL és IDL felszaporodásához vezet. A lipoproteinek minőségi összetétele is megváltozik: a VLDL és az IDL koleszterin tartalma, míg a HDL és az LDL triglicerid tartalma nő meg, a HDL-en belül csökken az apoA₁ és A₂, valamint egyes vizsgálatok szerint az apoE apoproteinek mennyisége. A HDL₂ és HDL₃ szintje egyaránt csökken, elsősorban az antiatherogén hatású HDL₂ szintjének csökkenése dominál, míg a HDL₂-ben az apoCII / apoCIII arány csökken, ami a VLDL→LDL átalakulás lelassulásához vezet. A HDL-ről a VLDL-be és az IDL-be apoB, -C és-E apoproteinek jutnak át. A vizsgálatok többsége szerint az urémiás dyslipidaemiára nincs döntő hatással a krónikus veseelégtelenséghez vezető alapbetegség, és maga a hemodialízis kezelés is csak mérsékelt hatású a lipidszintekre. Urémiában gyakran észlelhető a Lp(a) szintjének, valamint a krónikus gyulladásos állapotnak, az atherosclerosisnak megfelelően az egyéb akut fázis fehérjék, mint a fibrinogén, C-reaktív protein, interleukin-6 szérum szintjének megemelkedése (98). Mindezek a cardiovascularis mortalitást illetően prediktív értékűek lehetnek. Bár az LDL koncentrációja általában nem emelkedett urémiában, de megnőhet az oxidációra hajlamosabb small-dense LDL, mely fokozott coronaria rizikót jelent. Az apoB tartalmú lipoproteinek, főleg az LDL módosulhatnak urémiában, oxidáción, karbamiláción, glikáción és AGE-képződésen eshetnek át. Mindez a specifikus LDL receptorok felől az intracelluláris negatív feedback mechanizmussal nem védett scavenger receptorok irányába tolja el az LDL katabolizmusát, valamint az apoB tartalmú lipoproteinek

keringésben eltöltött időtartama is megnő. Következményesen az ún. habos sejtek alakulnak ki az artériák falában, progresszív atherosclerosist indukálva (71). A prolongált akut fázis reakció következményeként a HDL összetétele is módosulhat, így az antioxidáns HDL-ből prooxidáns lipoprotein alakulhat ki (90). Urémiában a HDL-en belül megnő az apoJ és a szérum amyloid A tartalom, valamint csökkenhet a paraoxonáz aktivitás, akárcsak a plazmában (9). A natív és az oxidált LDL a mezangiális sejtek károsításával a vesebetegség progresszióját fokozza. Az apoB tartalmú lipoproteinek - főleg az LDL és az Lp(a)- a glomerulus bazálmembránhoz kötődve a permeabilitás szelektivitását csökkentve fokozzák a proteinuriát, mely circulus vitiosushoz, a glomerulus további károsodásához vezet. Egyes szerzők szövettani analógiát mutattak ki az atherosclerosis korai fázisa és a glomerulosclerosis között (23). Ma már egyértelmű, hogy a dyslipidaemia a vesebetegség további progressziójához, elsősorban glomerulosclerosishoz vezet. A hemodializált urémiás betegek dyslipidaemiájának kezelését illetően ismertek kedvező adatok különböző statinokról (fluvastatin, simvastatin, atorvastatin), azonban a coronaria mortalitásra kifejtett hatásról csak a nagy, multicentrikus, prospektív tanulmányok lezárása után lehet véleményt alkotni (81, 93), ilyenek pl. a 4D-tanulmány és a CHORUS vizsgálat.

1.5. Lipid eltérések vesetranszplantáció után

A vesetranszplantált betegek között a fő halálokot a cardiovascularis kórképek jelentik, melyet a korábban is meglevő hagyományos rizikófaktorok, mint pl. a hypertonia, a diabetes mellitus és a dyslipidaemia transzplantáció utáni fennmaradása csak részben magyaráz. Norvég kutatók 167 betegen veseátültetés után 10 héttel elvégzett OGTT során a betegek közel 50%-ánál észleltek csökkent glükóz toleranciát, mely gyakoribb

volt idősebb korban, ISZB-re pozitív családi anamnézis, magas szérumszintű triglicerid-, apoB-, és 2 órás inzulinszintek, valamint alacsony HDL szint mellett (39).

Vesetranszplantáció után a cyclosporin és a szteroid tartós adása miatt a szérumszintű koleszterin és az LDL-C szint az első 4-10 hónapban fokozatosan emelkedik, majd a 12-36. hónap között fokozatosan normalizálódik. A triglicerid szint az 1. hónapban csökken, a 4-12. hónap között emelkedve eléri a maximumát, majd ismét csökkenni kezd (50). A HDL szint vesetranszplantáció utáni változását illetően ellentmondásos az irodalom, azonban a kutatók többsége a működő vesék beültetése után a reverz koleszterin transzportban szereplő LCAT enzim aktivitásának a megelőző urémiához viszonyított növekedését, a HDL szint átmeneti emelkedését észlelte (17). Bár a vesetranszplantáció egyértelműen javítja a betegek életminőségét, azonban az immunszuppresszív gyógyszerek ronthatják a dyslipidaemiát és ez a fokozott cardiovascularis mortalitás egyik fő oka.

Az erősen lipofil cyclosporin az LDL-hez kötődve lassítja annak lebontását, így az LDL tovább marad a keringésben. Ezen kívül a cyclosporin a májban a 7 α -hidroxiláz enzim gátlásával csökkenti a koleszterin epesavak formájában történő eliminációját. A szteroidok fokozzák a májban a VLDL szintézist, valamint a zsírszövetben a hormonszenzitív lipáz aktivitását (87). A zsírszövetekből jelentős zsírsav kiáramlás történik, mely a májban az endogén lipoprotein képződés fokozódásához vezet. A szérumban a triglicerid szint emelkedése és a HDL szint csökkenése észlelhető (10).

Az immunszuppresszív hatású tacrolimus (FK506) és cyclosporin A plazma lipoprotein szintekre kifejtett hatását vesetranszplantált betegeken vizsgálva azt találták, hogy a tacrolimussal kezeltékben enyhébb volt a hyperlipidaemia és az LDL kevésbé volt oxidációra hajlamos (91). A veseátültetés nyújtotta jobb minőségű élet esélyének megőrzéséhez az atherosclerosis rizikófaktorainak felkutatása, megfelelő kezelése

alapvetően fontos. A vesetranszplantáltak statin kezelésével kapcsolatban korábban felvetették, hogy az akut rejekeiós epizódok száma csökkent a statinok hatására (94), azonban ezt nem igazolta egy randomizált multicentrikus norvég tanulmány (40). Az atorvastatinról újabban leírták, hogy veseátültetés után a hatékony koleszterinszint csökkentés mellett képes növelni a plazma NO szintjét, javítani az endothel dysfunción (5). Ennek is lehet szerepe az érlemeszesedés lassításában.

2.0. CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben részletezett okok miatt célom volt a szérumban paraoxonáz aktivitásának vizsgálata az olyan gyakori, szekunder dyslipidaemiát és felgyorsult atherosclerosisot okozó kórképekben, mint a 2-es típusú cukorbetegség, a krónikus veseelégtelenség, valamint az immunszuppresszív kezelés és a veseátültetés hatásának felmérésére a vesetranszplantált betegekben. A fentiekben kívül dolgozatomban egyes lipidszintcsökkentő gyógyszerek PON aktivitásra kifejtett hatását vizsgáltam részletesebben, mert ezen eredmények újabb adatokat nyújthatnak a kiterjedten alkalmazott lipidszintcsökkentő gyógyszerek pontosabb hatásmechanizmusának megértéséhez, valamint a nagy, többéves, kemény-végpontú, multicentrikus klinikai tanulmányok által nagyrészt igazolt jótékony, primer és szekunder prevenciós hatások mellett némi járulékos támpontot nyújthatnak a konkrét gyógyszer kiválasztásban a szekunder hyperlipidaemiás betegek kezelése során.

3.0. MÓDSZEREK

A szérumban koleszterin- és triglicerid szint meghatározása Boehringer diagnosztikai enzim kittel, a HDL-cholesterin meghatározása foszfor-wolframát-magnézium precipitációt követően történt. Az LDL-C meghatározását a Friedewald formula szerint

végeztük (4,5 mmól/l alatti szérumszint esetén). Az apolipoprotein vizsgálatok immun-nefelometriás módszerrel, Orion Diagnosztika kit használatával történtek a DE OEC KBMP Intézetében.

Paraoxonáz aktivitás mérése

5 ml vénás vért vettünk a vizsgált személyektől, majd a vért lecentrifugálva a szérumszintet - 20°C-on tároltuk a paraoxonáz enzim aktivitásának meghatározásáig.

Paraoxon (O,O-dietyl-O-p-nitrofenilfoszfát; Sigma Chemical Co.) szubsztráttal történt, amely a szérumban levő paraoxonáz enzim hatására 4-nitrofenollá alakul át, abszorpciónövekedést okozva 412 nm-en (54). Méréskor 50 µl szérumszinthez 1 ml Tris/HCl puffert (100 mmól/l, pH 8,0) adtunk, amely 2 mmól/l CaCl₂-t és 5,5 mmól/l paraoxont tartalmazott. A 4-nitrofenol keletkezését 412 nm-en, 25°C-on követtük Hewlett-Packard 8453 UV-Visible spektrofotométer segítségével. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens 17100 M⁻¹cm⁻¹ alapján történt. Az enzimaktivitást U /ml egységben adtuk meg. 1 U az enzimaktivitás, ha 1 perc alatt 1 nmól 4-nitrofenol keletkezik. A paraoxonáz aktivitást megmértük 1 M NaCl jelenlétében is, amely az enzim aktív helyének konformációs változását okozva stimulálja az enzim aktivitását.

Arilészteráz aktivitás mérése

Fenilacetát szubsztrát hidrolízisével spektrofotometriásan történt. 1 mM fenilacetátot 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) tartalmazó pufferhez adva a szérumszintet, 270 nm-en mértük az abszorpciónövekedést. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens 1310 M⁻¹cm⁻¹ alapján történt. Az enzimaktivitást U /ml egységben adtuk meg. 1 U az arilészteráz aktivitás, ha 1 perc alatt az enzim 1 µmól fenilacetátot hidrolizál.

A paraoxonáz fenotípus megoszlás meghatározása

Kettős szubsztrát módszerrel történt (32). Paraoxont és fenilacetátot használtunk szubsztrátként, a paraoxonáz, az arilészteráz, valamint a NaCl stimulált enzimaktivitásokból számítottuk a fenotípus megoszlást a következő módon: az 1 M NaCl indukálta paraoxonáz /arilészteráz aktivitások aránya 1-3 között: AA (homozigóta alacsony aktivitású); paraoxonáz/arilészteráz aktivitások aránya 3-6 között: AB (heterozigóta közepes aktivitású); míg a paraoxonáz / arilészteráz aktivitások aránya 6 fölött: BB (homozigóta magas aktivitású).

A paraoxonáz szérum koncentrációjának mérése

A hyperlipidaemiás coronariabetegeknek adott mikronizált fenofibrát hatásának vizsgálata során (a 4.3.3.-ban leírt eredménnyel) már volt lehetőségünk a PON szérum koncentrációjának ELISA módszerrel (WAK-Chemie Medical GmbH, Germany) történő meghatározására. A tisztított PON segítségével felvett standard görbe alapján határoztuk meg a PON szérum koncentrációját.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízist SAS™ for Windows™ 6.12 programmal végeztük. A paramétereket leíró analízissel jellemeztük (esetszám, középérték, standard deviáció, medián, kvartilis). Adott betegcsoporton belüli időbeli változás vizsgálatára párosított t-próbát, illetve ismétléses mérésű ANOVA tesztet végeztünk. Ferde eloszlású paraméter esetén a statisztikai teszt elvégzése előtt logaritmikus transzformációt alkalmaztunk. A különböző csoportok adatainak összehasonlításakor oneway ANOVA tesztet alkalmaztunk. A paraméterek közti összefüggések vizsgálatára regressziós és korrelációs analízist végeztünk. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ valószínűségi értékeket tekintettük.

4.0. EREDMÉNYEK

4.1. A szérum paraoxonáz aktivitása hemodializált vesebetegekben

119 krónikus urémiában szenvedő, heti háromszori hemodialízis kezelés alatt álló beteget, 107 primer hyperlipoproteinaemiás (HLP) egyént és 110 egészséges kontroll egyént vizsgáltunk. A fenti 336 személy stabil anyagcsere-állapotban volt a vizsgálat alatt. A koleszterin-, triglicerid- és LDL-C szintek szignifikánsan magasabbak, míg a HDL-C és az apoA₁ szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az urémiás csoportban, mint az egészséges kontroll személyekben.

A PON aktivitása mind a primer HLP, mind az urémiás csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges kontroll csoportban ($p < 0,01$, illetve $p < 0,001$). A két betegcsoportot egymáshoz viszonyítva, a PON aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt az urémiások körében, mint a primer HLP csoportban ($p < 0,001$).

(2.ábra)

Mivel a PON enzim 90%-a HDL-hez kötött állapotban fordul elő, ezért annak eldöntésére, hogy a paraoxonáz aktivitás csökkenésének hátterében a HDL vagy az apoA₁ szintjének csökkenése áll-e, standardizáltuk a mért enzimaktivitásokat a HDL és az apoA₁ koncentrációra (a PON/HDL, ill. PON/apoA₁ arányokat képezve). Azt találtuk, hogy a standardizált PON aktivitás az urémiás betegekben volt a legalacsonyabb (a PON/HDL hányados az urémiásokban $103,3 \pm 69,5$), a HLP csoport mintegy közti állapotot tükrözött ($146,7 \pm 63,3$), míg az egészséges kontroll csoportban volt legmagasabb a PON/HDL arány: $194,45 \pm 91,45$. Mindhárom csoport között szignifikáns volt a különbség (urémiás vs. kontroll: $p = 0,000022$; HLP vs. kontroll: $p = 0,000683$; urémiás vs. HLP csoport: $p = 0,00095$) (3.ábra). Az apoA₁ koncentrációra korrigált PON aktivitása hasonló tendenciát mutatott: a PON/apoA₁ hányadost szintén

legalacsonyabbnak az urémiás csoportban találtuk, ezt követték a HLP betegek, míg a kontroll csoportban volt legmagasabb a PON/apoA₁ arány. Sorrendben: 89,64±47,8; 129,66 ±48,85; illetve 161,40±47,35. A szignifikancia értékek: urémiás vs. kontroll: p=0,000022; HLP vs. kontroll: p=0,0008015; urémiás vs. HLP csoport: p=0,00001. **(4.ábra)**

Mivel a genetikailag előre meghatározott fenotípusok eltérő aktivitásokat jelenthetnek, ezért meghatároztuk a három csoport fenotípus megoszlását, melynek különbségei magyarázhatnák az eltérő paraoxonáz aktivitásokat. A fenotípus megoszlásból kiemelendő, hogy az alacsony aktivitású AA fenotípus aránya azonos volt az urémiás és az egészséges kontroll csoportban (egyenként 66,67%), míg a nagy aktivitású BB fenotípus leggyakoribb a HLP csoportban volt (9,57%), ezt követte a kontroll csoport (6,67%), legkevésbé az urémiás csoportban fordult elő (1,71%). A BB fenotípus mindhárom csoportban 10% alatti gyakoriságú volt. **(1.táblázat)**

A dialízis programba vétel óta eltelt időtartam és a szérum PON aktivitása közötti kapcsolatot vizsgálva nem találtunk korrelációt e két paraméter között.

4.2. A paraoxonáz aktivitás változása vesetranszplantáció után

115 vesetranszplantált és 110 egészséges kontrollt vizsgáltunk. A vesetranszplantált betegek szérum koleszterin, triglicerid, LDL-koleszterin és apo B szintje szignifikánsan magasabb (p<0,001), míg az apo A₁ szintje szignifikánsan alacsonyabb volt (p<0,001), mint az egészséges kontrollok hasonló paraméterei. A HDL-koleszterin szint különbsége nem volt szignifikáns.

A különböző PON (paraoxonáz, só-indukálta PON, arilészteráz) aktivitásokat vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a betegcsoport között. **(5.ábra)** Azonban a HDL-re standardizált PON aktivitást vizsgálva (PON/HDL arány) a

vesetranszplantáltakban szignifikánsan alacsonyabb értéket találtunk ($p<0,001$) **(6.ábra)**, akárcsak a PON/apoA₁ hányadost illetően ($p<0,001$) **(7.ábra)**. A kettős szubsztrát módszerrel meghatározott PON fenotípusokat illetően nem volt jelentős különbség a két csoportban észlelt megoszlásban. A fenotípusok százalékos megoszlása a vesetranszplantált és a kontroll csoportban sorrendben a következő volt: AA fenotípus 56.48% vs. 66.67%, AB fenotípus 33.3% vs. 26.67%, BB fenotípus: 10.19% vs. 6.67%. **(8.ábra)**

A vesetranszplantációt követően alkalmazott immunszuppresszív szerek különböző kombinációinak hatását a PON (paraoxonáz, só-indukálta PON, arilészteráz) aktivitásokra vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget a cyclosporin + metilprednisolon + azathioprin, illetve a cyclosporin + metilprednisolon kombináció között. **(2.táblázat)** Azonban a hármas kombinációt kapó betegek összkoleszterin-, LDL-C, triglicerid- és apoB szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a kettős immunszuppresszív kombinációt szedő betegek értékei ($p<0,01$).

A 119 krónikus urémiás, hemodializált beteg hasonló adataival összevetve a fentieket, azt találtuk, hogy a HDL-re és az apoA₁-re standardizált PON aktivitás az urémiás betegcsoportban volt a legalacsonyabb ($p<0,001$). A magas aktivitású BB fenotípus pedig leggyakoribb a vesetranszplantált csoportban volt (10,19%), míg legritkább az urémiás hemodializált csoportban (1,71%).

4.3. A lipidszint csökkentő kezelés hatása a paraoxonáz aktivitására

4.3.1. Gemfibrozil hatása 2-es típusú cukorbeteg PON aktivitására

Klinikánk Diabetes Szakrendelésén 56 (átlag életkor: $56,26\pm 8,91$ év, BMI: $28,87\pm 4,65$ kg/m², a diabetes ismert fennállásának időtartama: $5,4\pm 3,2$ év) a WHO kritériumok szerint 2-es típusú cukorbetegnek 3 hónapig adtunk napi 2x600 mg gemfibrozilt a

National Cholesterol Education Program (NCEP) Step 1 diéta 6 hetes periódusát követően, a diéta változatlan folytatása mellett. Beválasztási kritériumai 18-70 év közötti életkor, korábban nem kezelt hyperlipidaemia (szérum triglicerid $>2,4$ mmól/l, koleszterin $<7,0$ mmól/l) voltak. Kizárási kritériumok voltak: máj- vagy vesebetegség (szérum kreatinin szint >130 μ mol/l), alkoholizmus, gyógyszerfüggőség, epekövesség, alkoholizmus, terhesség vagy szoptatás, malignus alapbetegség, antikoaguláns- vagy statin-kezelés voltak. Betegeinknek nem volt kimutatható diabeteses polyneuropathiájuk, microalbuminuriájuk, korábban lezajlott stroke-juk illetve alsóvégtagi érszűkületük. 9 betegnek nem-proliferatív diabeteses retinopathiája volt, 22 beteg kapott inzulint, 6 beteg metformint, 24-en szedtek ACE-gátlót, heten Ca-antagonistát, nyolcan kardioszelektív β -blokkolót. A relatíve kis esetszám miatt az eltérő gyógyszeresedés alapján nem képeztünk külön összehasonlítható alcsoportokat. 44, korban illeszkedő egészséges, normolipidaemiás egyén szerepelt kontrollként. 8 betegnél $4,5$ mmól/l fölötti triglicerid szint miatt nem tudtuk alkalmazni a Friedewald-formulát az LDL-C számításához.

A 3 hónapos gemfibrozil kezelés hatására a szérum koleszterin, az LDL-C és az apoB, a Lp(a), a HbA_{1c}, a fibrinogén szintje és a BMI nem változott szignifikánsan, míg a HDL-C és az apoA₁ szintje szignifikánsan emelkedett ($p<0,05$, illetve $p<0,01$) **(3.táblázat)**. Az egészséges kontrollokhoz képest szignifikánsan alacsonyabb ($p<0,001$) PON aktivitás a 3 hónapos gemfibrozil kezelés hatására szignifikánsan nőtt (medián: $100,2$ U/ml, quartilis: $q_1=60,1$, $q_3=152,7$ vs. $118,7$ U/ml, quartilis $q_1=80,1$, $q_3=171$; $p<0,001$), de nem érte el az egészséges kontroll személyek PON aktivitását. **(9.ábra)** A PON/HDL-C és a PON/apoA₁ arány nem változott szignifikánsan ($p=0,19$, illetve $p=0,93$). A PON aktivitás nem korrelált a diabetes fennállásának időtartamával ($r=0,18$) és a vércukor-háztartást jellemző HbA_{1c} értékkel ($r=0,13$).

4.3.2. Gemfibrozil hatása hyperlipidaemiás betegek PON aktivitására

Klinikánk Lipid Szakrendelésén 57 hyperlipidaemiás beteget (átlag életkoruk $60,88 \pm 12$ év, BMI $26,17 \pm 6,17$ kg/m² volt) vizsgáltunk a NCEP Step 1 diéta 6 hetes periódusát követően, a diéta változatlan folytatásának kiegészítéseként napi 2x600 mg gemfibrozil 3 hónapos adása mellett. Beválasztási kritériumai 18-70 év közötti életkor, korábban nem kezelt, Fredrickson II.B. típusú hyperlipidaemia (szérum triglicerid $>2,4$ mmól/l, koleszterin $<8,0$ mmól/l) voltak. Kizárási kritériumok voltak: máj- vagy vesebetegség (szérum kreatinin szint >130 μmól/l), alkoholizmus, gyógyszerfüggőség, epekövesség, alkoholizmus, terhesség vagy szoptatás, malignus alapbetegség, antikoaguláns- vagy statin-kezelés voltak. A 3 hónapos gemfibrozil kezelés hatására a szérum koleszterin, az apoB, az LDL-C és triglicerid szintje szignifikánsan csökkent (koleszterin: $p<0,05$, triglicerid: $p<0,003$), a HDL-C és az apoA₁ szintje nem változott szignifikánsan. A szérum PON aktivitása szignifikánsan nőtt a 3 hónapos kezelés után (220 ± 98 vs. 253 ± 100 U/ml, $p<0,001$). A PON/HDL arány szignifikánsan emelkedett ($p<0,006$).

(4.táblázat)

4.3.3. Mikronizált fenofibrát hatása hyperlipidaemiás coronariabetegekben

52 definitív coronariabeteget (lezajlott szívinfarktus, coronarográfiával szignifikáns stenosis, stabil effort angina, pozitív terheléses EKG-lelet és kóros terheléses szívizomszcintigráfias lelet) vontunk be a vizsgálatba, akik Fredrickson II./B típusú hyperlipoproteinaemiások voltak, triglicerid értékük $2,3-4,6$ mmól/l közötti tartományban volt. 6 hetes NCEP Step 1 diétás periódust követően a diéta folytatása mellett 3 hónapig napi 200 mg mikronizált fenofibrátot adtunk a betegeknek. A 3

hónapos fenofibrát kezelés hatására a szérum triglicerid szint ($3,25 \pm 0,66$ mmól/l vs. $1,86 \pm 0,89$ mmól/l; $p < 0,001$), a koleszterin ($6,70 \pm 1,88$ mmól/l vs. $5,83 \pm 1,4$ mmól/l; $p < 0,001$), az LDL-C ($4,22 \pm 1,83$ mmól/l vs. $3,70 \pm 1,31$ mmól/l; $p < 0,05$) és az apoB₁₀₀ ($1,44 \pm 0,44$ g/l vs. $1,26 \pm 0,40$ g/l; $p < 0,01$) szintje szignifikánsan csökkent, míg a HDL-C ($1,05 \pm 0,23$ mmól/l vs. $1,29 \pm 0,51$ mmól/l; $p < 0,001$) és az apoA_I ($1,49 \pm 0,23$ g/l vs. $1,60 \pm 0,26$ g/l; $p < 0,05$) szignifikánsan növekedett. A paraoxonáz aktivitása szignifikánsan nőtt a harmadik generációs fibrát, a fenofibrát hatására (189 ± 104 U/ml vs. 260 ± 64 U/ml; $p < 0,05$). **(10.ábra)** Az egységnyi HDL-re jutó PON aktivitást vizsgálva azt találtuk, hogy a PON/HDL arány (162 ± 75 vs. 191 ± 78 ; $p < 0,05$) szignifikánsan növekedett **(11.ábra)**, míg a PON/apoA_I arány nem emelkedett szignifikánsan (131 ± 73 vs. 161 ± 64 ; $p = 0,39$) **(12.ábra)**. Az arilészteráz aktivitás szignifikánsan fokozódott (103 ± 30 vs. 142 ± 28 U/ml; $p < 0,01$), míg a NaCl stimulálta enzimaktivitás változása nem volt szignifikáns (454 ± 225 vs. 457 ± 166 U/ml; $p = 0,48$). A PON enzim szérum koncentrációja nem változott szignifikánsan a 3 hónapos kezelés során ($48,8 \pm 10,2$ µg/ml vs. $45,0 \pm 12,3$ µg/ml).

4.3.4. Simvastatin kezelés hatása hyperlipidaemiás betegek PON aktivitására

Az 1 hónapos vizsgálat során 112, Fredrickson beosztás szerinti II/A és II/B típusú hyperlipoproteinaemiás betegnek (52 férfi és 60 nő, átlagéletkor: $52,2 \pm 8,0$ év, BMI: $27,5 \pm 4,3$ kg/m²) adtunk napi 20 mg simvastatint. A lipid paraméterek kedvezően alakultak: a szérum koleszterin ($10,25 \pm 6,72$ mmól/l vs. $8,85 \pm 6,02$ mmól/l; $p < 0,01$), a triglicerid ($3,95 \pm 2,51$ mmól/l vs. $3,15 \pm 1,47$ mmól/l; $p < 0,01$), az LDL-C ($6,36 \pm 1,70$ mmól/l vs. $4,97 \pm 1,48$ mmól/l; $p < 0,05$), az apoB ($1,93 \pm 0,41$ g/l vs. $1,56 \pm 0,35$ g/l;

$p < 0,05$) szérumszintjei szignifikánsan csökkentek, azonban a HDL-C ($1,19 \pm 0,34$ vs. $1,22 \pm 0,39$ mmól/l) és az apoA₁ ($1,56 \pm 0,19$ g/l vs. $1,64 \pm 0,24$ g/l) szintjének változása nem volt szignifikáns. A HDL-asszociált PON aktivitás kismértékben, de nem szignifikánsan csökkent ($182,25 \pm 37,21$ U/ml vs. $166,49 \pm 35,01$ U/ml; $p < 0,1$), az arilészteráz aktivitás nem szignifikáns mértékben fokozódott ($129 \pm 31,2$ U/ml vs. $153 \pm 29,4$ U/ml), míg az aktív centrum konformáció változásához vezető NaCl jelenlétében mért PON aktivitás nem szignifikáns mértékben csökkent ($411 \pm 71,2$ U/ml vs. $367 \pm 67,4$ U/ml). **(13.ábra)** Az 1 hónapos simvastatin kezelés nem változtatta meg alapvetően a PON fenotípusok megoszlását. A fenotípusok kezelés előtti és utáni értékei, sorrendben: AA: 70,3 % vs. 73,3 %, AB: 24,2 % vs. 22,6 %, BB: 5,5 % vs. 4,1 %. **(14.ábra)** Megemlítendő, hogy a fenti betegcsoportban igen alacsony volt a magas antioxidáns kapacitású BB fenotípus aránya.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Ad 4.1. Schiavon és mtsai 60 urémiás hemodializált beteget vizsgálva a PON aktivitás szignifikáns csökkenését találták egészséges kontrollokhoz viszonyítva (78). A saját eredményeink is megerősítik ezt a megfigyelést. Ezen kívül a HDL-re, illetve az apoA₁-re standardizált PON aktivitás egyaránt szignifikánsan alacsonyabb volt az urémiás csoportban, mint az egészséges kontrollokban. Mindez azt jelzi, hogy az enzimaktivitás csökkenését nem önmagában a HDL szint csökkenése magyarázza, hanem egyéb tényezők is szerepet játszhatnak a paraoxonáz aktivitás csökkenésében. Ennek hátterében az általunk vizsgált májenzimek normál tartományban voltak, akut gyulladás, lázas állapot sem volt kimutatható, ezért az urémiás betegek májkárosodása okként

elvethető. A PON fenotípus megoszlásában nem észleltünk olyan mértékű különbséget, amely a csökkent enzimaktivitás genetikai hátterét önmagában megmagyarázná. Az urémiában felszaporodó ún. urémiás toxinok közvetlen PON enzimaktivitást gátló hatása, valamint a HDL apolipoprotein- és lipid összetételének az enzim aktivitásához kedvezőtlen mértékű létrehozó módosulása egyaránt szerepet játszhatnak az urémiában észlelt csökkent PON aktivitás kialakulásában. Mindez az LDL oxidációjának fokozódásával az atherogenesis felgyorsulásának egyik összetevője lehet. Eredményeinkhez hasonló adatokat észleltek a későbbiekben horvát szerzők is (47).

Ad 4.2. Vesetranszplantációt követően a vesefunkció normalizálódik, a transzplantációt megelőzően jelenlévő kóros metabolikus eltérések helyreállhatnak. A tartós immunszuppresszív kezelés viszont károsítja a lipidanyagcserét és újabb atherosclerosisra hajlamosító tényezőt jelenthet (50).

Az irodalomban az elsők között vizsgáltuk a vesetranszplantáció és a különböző immunszuppresszív gyógyszerek hatását az antioxidáns hatású PON aktivitásra. Az egységnyi HDL-re és apo A₁-re vonatkoztatott PON aktivitás általunk észlelt szignifikáns csökkenése szintén elősegítője lehet a transzplantációt követő fokozott érlelmeszesedésnek. Azonban a standardizált PON aktivitás szignifikánsan magasabb volt a vesetranszplantáltak körében, mint a hemodializált urémiások között, valamint az előző csoportban gyakoribb volt a magas aktivitású BB fenotípus előfordulása is. Adataink szerint mindez mintegy köztes állapotot jelenthet az egészséges kontroll egyének és a hemodializált urémiás betegek között.

Ad 4.3.1. A 2-es típusú cukorbetegség 3 hónapos, napi 2x600 mg-os gemfibrozil kezelése során a lipid profil előnyös változása mellett a PON aktivitás szignifikáns

növekedését észleltük. Ez a növekedés megközelítette, de nem érte el az egészséges kontroll személyek PON aktivitását. A fibrátok jól ismert, és az utóbbi években igen intenzíven vizsgált hatása a májbeli PPAR α -rendszer aktiválása, és az a megfigyelésünk, hogy a standardizált PON aktivitás nem növekedett szignifikánsan a gemfibrozil kezelés hatására, felveti annak a lehetőségét, hogy a PON aktivitás észlelt növekedése valójában a májbeli PPAR α -rendszer aktiválásának, vagyis a HDL és az apoA₁ szintézisfokozódásának a következménye. Az irodalomban ellentmondásos a gemfibrozil szérumszintre gyakorolt hatása, egy korábbi tanulmánnyal ellentétben (13) jelen vizsgálatban nem változott szignifikánsan az atherogén hatású fibrinogén és lipoprotein (a) szérumszintje. Többen leírták, hogy a diabetes mellitusban észlelt csökkent PON aktivitás összefüggést mutatott a diabetes microvascularis szövődményeinek (microalbuminuria, retinopathia, polyneuropathia (42, 43) gyakoriságával, azonban ellentmondásos az irodalom. Jelen vizsgálatban - talán a kevés retinopathiás betegnek is köszönhetően - nem volt statisztikailag kiértékelhető ez az összefüggés.

Míg Sozmen és mtsai a rosszul beállított szénhidrát-háztartás és az antioxidáns enzimek (döntően a kataláz) aktivitásának csökkenése, valamint az oxidatív stressz fokozódása között egyértelmű összefüggést találtak (83), jelen vizsgálatban a PON aktivitás nem korrelált a diabetes fennállásának időtartamával és a vércukor-háztartást jellemző HbA_{1c} értékkel. Továbbra is kérdéses, hogy a 2-es típusú diabetes mellitusban észlelt PON aktivitás csökkenés a genetikai polimorfizmus és a krónikus hyperglykaemia direkt hatása mellett egyéb tényezőkkel magyarázható-e. Erre a megnyugtató választ a jövőben elvégzendő további vizsgálatok adhatják meg. Az LDL oxidációját gátló, antioxidáns hatású PON enzim aktivitásának gyógyszeres növelése új terápiás távlatokat nyithat meg mind a diabeteses macro-, mind a microvascularis szövődmények

megelőzésében, jóllehet jelen vizsgálat - a kis betegszám, a rövid követési idő, és a további antioxidáns enzimek részletes kutatásának igénye miatt- mindenképpen további, nagyobb tanulmányokat követel meg (73). Csak ezek után mondható végleges vélemény a fibrátok ez irányú hatásáról és annak tényleges klinikai jelentőségéről.

Ad 4.3.2. A hyperlipidaemiás egyének 3 hónapos gemfibrozil kezelésének hatására a szérum PON aktivitás szignifikánsan nőtt (220 ± 98 vs. 253 ± 100 U/ml, $p < 0,001$). A PON aktivitás növekedése szignifikánsan nagyobb volt (PON/HDL arány; $p < 0,006$), mint ami a HDL szint (nem szignifikáns) emelkedéséből várható lett volna. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a gemfibrozil esetleg direkt módon fokozza a PON termelődését, esetleg a PON enzimnek is van egy ún. peroxisoma proliferated respont elementje, amelyen keresztül a gemfibrozil képes a PON enzim aktivitását fokozni. További lehetőség, hogy a PON enzim mennyisége nem növekszik, azonban a gemfibrozil hatására létrejött HDL strukturális változása kedvező feltételt teremt a PON aktivitásának fokozódásához. Vizsgálatunk elvégzésének idején még nem volt lehetőségünk a PON mennyiségének mérésére.

Ad 4.3.3. Míg Durrington és mtsai II/B típusú hyperlipoproteinaemiás egyéneknek adott bezafibrát és gemfibrozil hatására nem észleltek szignifikáns változást a paraoxonáz aktivitásában (27), jelen vizsgálatunkban a PON aktivitás szignifikáns növekedését észleltük a 3. generációs fibrát, a mikronizált fenofibrát 3 hónapos alkalmazása során a fenti betegcsoportban. A mikronizált fenofibrátnak az apoA₁-re és LP lipázra gyakorolt aktiváló hatása révén a HDL összetétele és szerkezete módosulhat, mely a PON enzim számára optimális feltételt nyújtva fokozza a paraoxonáz aktivitását. A HDL antioxidáns kapacitásának javulása fontos szerepet játszhat az atherosclerosis

lassításában. Végleges vélemény azonban a fibrátok éveken keresztüli szedésének hatékonyságáról és biztonságosságáról egyelőre még nem adható (11).

Ad 4.3.4. Bár az 1 hónapig napi 20 mg-os dózisban alkalmazott simvastatin a Fredrickson II/A és II/B típusú hyperlipoproteinaemiás betegekben szignifikánsan csökkentette a koleszterin-, LDL-C, apoB- és a trigliceridszintet, azonban a HDL-C és az apoA₁ szintje nem változott szignifikánsan. Várakozásainkkal ellentétben a HDL-hez kötött PON aktivitás nem növekedett, hanem- bár nem szignifikáns mértékben- csökkent. Sem az arilészteráz-, sem a NaCl-stimulált PON aktivitás nem változott szignifikáns mértékben, egyúttal nem változott meg a PON fenotípus megoszlása sem. Eredményeink értékelésekor az igen rövid kezelési idő is figyelembe veendő. Vizsgálatunkkal ellentétes adatok is ismertek. Leviev és mtsai átlagosan 6,3 hetes simvastatin alkalmazást követően HepG2 sejtekben a PON aktivitás transcriptionalis szinten történő növekedését észlelték, 2,5-szeres PON1 gén promoter aktiválódás útján (55). Tomas és mtsai 64 familiáris hypercholesterinaemiás betegnek 4 hónapig adtak napi 20 mg simvastatint és a PON aktivitásának szignifikáns növekedését észlelték, az arilészteráz aktivitás növekedése nem volt szignifikáns, a HDL-C és az apoA₁ szintje nem változott, míg a lipid peroxidok koncentrációja csökkent. A PON aktivitásának növekedése független volt a PON1-192 és a PON1-55 polimorfizmustól (89). Azonban jelenleg nem ismert kellően, ezért további vizsgálatokat igényel a simvastatin (és egyéb statin) kezelésnek a PON aktivitásra kifejtett hatása.

A klinikai gyakorlat számára jóval fontosabb, hogy a simvastatin volt az első lipidcsökkentő szer, amelyről a 4S vizsgálatban bizonyították, hogy nemcsak a lipid szintekre és a coronaria események gyakoriságára van kedvező hatással, hanem egyúttal az összmortalitást is csökkentette (70, 88).

További vizsgálatokat tervezünk a különböző fibrátok, statinok, a metformin, az inzulinérzékenyítő glitazonok PON aktivitásra és PON koncentrációra gyakorolt hosszabb távú hatásának tanulmányozására, valamint 2-es típusú cukorbetegekben a PON enzimnek az inzulinrezisztenciával való kapcsolatáról szeretnénk újabb adatokat nyerni.

6.0. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Paragh György professzor úrnak, hogy tanácsaival, javaslaival, segítő kritikájával közvetlenül is segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Kakuk György professzor úrnak, hogy az általa vezetett I. sz. Belklinikán ideális feltételeket teremtett a mindennapi gyógyító munka mellett a kutatómunkámhoz, mely kapcsolódik a betegellátáshoz is.

Köszönettel tartozom az I. Belklinika Kutató Laboratóriumában dolgozó Dr. Seres Ildikónak a kísérleti munkában nyújtott segítségéért.

A kísérleti eredmények statisztikai elemzésében és feldolgozásában való aktív közreműködésért Karányi Zsoltnak fejezem ki köszönetemet.

Az adminisztrációban, szövegszerkesztésben nyújtott segítségéért Kovács Évának fejezem ki köszönetemet.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm feleségemnek, hogy megértéssel és türelemmel segítette munkámat, biztosította a családi háttér nyugalmát.

7.0. IRODALMI HIVATKOZÁSOK:

1. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN: Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 598-608.
2. Akhmedova SN, Yakimovsky AK, Schwartz EI: Paraoxonase 1 Met--Leu 54 polymorphism is associated with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2001; 184: 179-182.
3. Appel G: Lipid abnormalities in renal disease. *Kidney Int* 1991; 39: 169-183.
4. Arrol S, Mackness MI, Durrington PN: High-density lipoprotein associated enzymes and the prevention of low-density lipoprotein oxidation. *Eur J Lab Med* 1996; 4: 33-38.
5. Asberg A, Hartmann A, Fjeldsa E, Holdaas H: Atorvastatin improves endothelial function in renal-transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1920-1924.
6. Assmann G, Schulte H: Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70: 733-737.
7. Attman PO, Alaupovic P: Lipid abnormalities in chronic renal insufficiency. *Kidney Int* 1991; 39 (Suppl 31): S16-S23.
8. Aviram M, Billecke S, Sorenson R et al: Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective active of human paraoxonase alloenzymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 10: 1617-1624.

9. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL et al: Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.
10. Bagdade JD, Yee E, Albers J, Pykalisto OS: Glucocorticoids and triglyceride transport effects on triglyceride secretion rates, lipoprotein lipase and plasma lipoproteins in the rat. *Metabolism* 1976; 25: 533-537.
11. Betteridge DJ, Calhoun H, Armitage J: Status report of lipid-lowering trials in diabetes. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 621-626.
12. Blankenhorn DH, Azen SP, Karmach DM et al: Coronary angiographic changes with lovastatin therapy. The Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). *Ann Intern Med* 1993; 119: 969-976.
13. Branchi A, Rovellini A, Sommariva D et al: Effect of three fibrate derivatives and of two HMG-CoA reductase inhibitors on plasma fibrinogen level in patients with primary hypercholesterolemia. *Thromb Haemost* 1993; 70: 241-243.
14. Brown BG, Albers J, Fischer LD et al: Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990; 323: 1289-1298.
15. Brown BG, Albers JJ, Fischer LD et al: Lipid lowering and plaque regression: New insights in the prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993; 87: 1781-1791.
16. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW et al: Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835-2838.
17. Chan MK, Ramdial L, Varghese Z et al.: Plasma LCAT activities in renal allograft recipients. *Clin Chim Acta* 1982; 124:187-193.

18. Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-791.
19. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H et al: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-1262.
20. Davies HG, Richter RJ, Keifer M et al: The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996; 14: 334-336.
21. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-194.
22. Diabetes Atherosclerosis Intervention Study investigators: Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomized study. *Lancet* 2001; 357: 905-910.
23. Diamond JR: Analogous pathobiologic mechanisms in glomerulosclerosis and atherosclerosis. *Kidney Int* 1991; 31 (Suppl 1): S29-S34.
24. Downs JR, Clearfield M, Weis S et al: Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279: 1615-1622.
25. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE et al: Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275: 33435-33442.
26. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI: Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-481.

27. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D et al: Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesterol ester transfer protein, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type II B hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998; 138: 217-225.
28. Farnier M, Picard S: Diabetes: statin, fibrate or both? *Current Atherosclerosis Reports* 2001; 3: 19-28.
29. Franceschini G: Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2001; 88 (Suppl 1): S9-S13.
30. Frick MH, Elo O, Haapa K et al: The Helsinki Heart Study: primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidaemia. Safety of treatment, changes in risk factors and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987; 317: 1237-1245.
31. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M: Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 2002; 161: 307-316.
32. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL et al: Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Annal Biochem* 1989; 180: 242-247.
33. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T et al: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New Engl J Med* 1998; 339: 229-234.
34. Harris MI: Undiagnosed NIDDM- Clinical and public health issues. *Diabetes Care* 1993; 16: 642-652.

35. Hayek T, Oiknine J, Dankner G et al: HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 721-725.
36. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX et al: Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000; 43: 312-320.
37. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW et al: Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3373-3377.
38. Hegele RA: Paraoxonase genes and disease. *Ann Med* 1999; 31: 217-224.
39. Hjelmestaeth J, Hartmann A, Midtvedt K et al: Metabolic cardiovascular syndrome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1047-1052.
40. Holdaas H, Jardine AG, Wheeler DC et al: Effect of fluvastatin on acute renal allograft rejection: a randomized multicenter trial. *Kidney Int* 2001; 60: 1990-1997.
41. Hong SH, Song J, Min WK et al: Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2001; 34: 475-481.
42. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M et al: Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47: 598-602.
43. Inoue M, Suehiro T, Nakamura T et al: Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2000; 49: 1400-1405.
44. Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy A et al: Codon 311 (Cys--> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 110-112.

45. Jenkins AJ, Steele JS, Janus ED, Best JD: Increased plasma apolipoprotein(a) levels in IDDM patient with microalbuminuria. *Diabetes* 1991; 40: 787-790.
46. Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH et al: Cholesterol transport between cells and high density lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1085: 273-298.
47. Juretic D, Tadijanovic M, Rekic B et al: Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Croat Med J* 2001; 42: 146-150.
48. Kannel WB, Dawber TR, Friedman GD et al: Risk factors in coronary heart disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease: The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1964; 61: 888-899.
49. Kannel WB, McGee DL: Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979; 241: 2035-2038.
50. Kasiske BL, Umen AJ: Persistent hyperlipidemia in renal transplant patients. *Medicine* 1987; 66: 309-316.
51. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M et al: Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002; 160: 425-432.
52. Kondo I, Yamamoto M: Genetic polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease. *Brain Res* 1998; 806: 271-273.
53. La Du BN, Aviram M, Billecke S et al: On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 379-388.
54. La Du BN, Eckerson HW: The polymorphic paraoxonase/arylesterase isozymes of human serum. *Fed Proc* 1984; 43: 2338-2341.
55. Leviev I, James RW: Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 516-521.

56. Levini GN, Keaney JF jr, Vita JA: Cholesterol reduction in cardiovascular disease: clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med* 1995; 332: 512-521.
57. Libby P: Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol* 2001; 88 (Suppl 1): S3-S8.
58. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH: Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290: 697-701.
59. Mackness B, Davies GK, Turkie W et al: Paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1451-1457.
60. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D et al: Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86: 193-199.
61. Malin R, Rantalaio V, Huang X-H et al: Association between M/L55-polymorphism of paraoxonase enzyme and oxidative DNA damage in patients with type 2 diabetes mellitus and in control subjects. *Hum Genet* 1999; 105: 179-180.
62. Mertens A, Holvoet P: Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; 15: 2073-2084.
63. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Multiple Risk Factor Intervention Trial: Risk factor changes and mortality result. *JAMA* 1982; 248: 1465-1477.
64. Navab M, Hama SY, Hough GP et al: High density associated enzymes: their role in vascular biology. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 449-456.
65. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ et al: Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997; 99: 2005-2019.

66. Niemeijer-Kanters SDJM, Banga JD, Erkelens DW: Lipid-lowering therapy in diabetes mellitus. *Neth J Med.* 2001; 58: 214-222.
67. Nikkila EA, Huttunen JK, Ehnholm C: Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes* 1977; 26: 11-17.
68. Nofer J-R, Kehrel B, Fobker M et al: HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161: 1-16.
69. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K: Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrin Metab* 1997; 82: 2257-2260.
70. Pyörälä K, Pedersen TR, Kjekshus J et al: Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 1997; 20: 614-620.
71. Quaschnig T, Krane V, Metzger T, Wanner C: Abnormalities in uremic lipoprotein metabolism and its impact on cardiovascular disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S14-S19.
72. Renczes G, Róna K, Szabó I, Somogyi A: Az emberi paraoxonáz enzim polimorfizmusa és klinikai jelentősége. *Orv Hetil* 1997; 138: 2057-2059.
73. Robins SJ: PPAR α ligands and clinical trials: cardiovascular risk reduction with fibrates. *J Cardiovasc Risk* 2001; 8: 195-201.
74. Rowles J, Scherer SW, Xi T et al: Cloning and characterisation of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human *J Biol Chem* 1996; 271: 22376-22382.
75. Rubins HB, Robins SJ, Collins D et al: Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein

- cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 410-418.
76. Ruiz J, Blanche H, James RW et al: Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346: 869-872.
 77. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI: DNA polymorphisms in two paraoxonase genes are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 36-44.
 78. Schiavon R, De Fanti E, Giavarina D et al: Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clin Chim Acta* 1996; 247: 71-80.
 79. Senti M, Aubo C, Tomas M: Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. *Metabolism* 2000; 49: 557-559.
 80. Serrato M, Marian AJ: A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96: 3005-3008.
 81. Shoji T, Ishimura E, Inaba M et al: Atherogenic lipoproteins in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S30-S33.
 82. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M et al: Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2214-2225.
 83. Sozmen B, Delu Y, Girgin FK, Sozmen EY: Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control. *Clin Biochem* 1999; 32: 423-427.
 84. Stein O, Stein Y: Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144: 285-301.

85. Steinberg D: A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1995; 131 (Suppl 1): S5-S10.
86. Sviridov D, Nestel P: Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 245-254.
87. Taskinen MR, Nikkila EA, Pelkonen R, Sane T: Plasma lipoproteins, lipolytic enzymes, and very-low-density-lipoprotein triglyceride turnover in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 619-624.
88. The Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary artery disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-1389.
89. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F et al: Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2113-2119.
90. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC et al: Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995; 96: 2758-2767.
91. Venkiteswaran K, Sgoutas DS, Santanam N, Neylan JF: Tacrolimus, cyclosporine and plasma lipoproteins in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2001; 14: 405-410.
92. Wallace AJ, Sutherland WH, Mann JI, Williams SM: The effect of meal rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55: 951-958.
93. Wanner C, Krane V, Metzger T, Quaschnig T: Lipid changes and statins in chronic renal insufficiency and dialysis. *J Nephrol* 2001; 14 (Suppl 4): S76-S80

94. Wheeler DC: Are there potential non-lipid-lowering uses of statins? *Drugs* 1998; 56: 517-522.
95. Yamada A, Shoji T, Tahara H et al: Effect of insulin resistance on serum paraoxonase activity in a nondiabetic population. *Metabolism* 2001; 50: 805-811.
96. Young SG, Fielding CJ: The ABCs of cholesterol efflux. *Nat Genet* 1999; 22: 316-318.
97. Zech R, Rockseisen M, Kluge K et al: Lipoproteins and hydrolysis of organophosphorus compounds. *Chem Biol Interact* 1993; 87: 85-94.
98. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A et al: Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55: 648-658.