

OTKA 063025

## ZÁRÓJELENTÉS

Pályázatunk keretében az atherosclerosis szempontjából veszélyeztetett betegcsoportokban tanulmányoztuk az adipokinek, a HDL remodelling és a HDL-hez kötött antioxidáns enzim, a paraoxonáz (PON1) kapcsolatát.

### **A HDL-hez kötött human paraoxonáz-1 és az adipokinek vizsgálata elhízott gyermekekben**

Vizsgálatainkat egy elhízott gyermek populáción indítottuk el, mivel a gyermekkori elhízás egyre nagyobb problémát jelent Magyarországon, növekvő tendenciája mára népegészségügyi problémává vált. A gyermekkorban kifejlődő kóros anyagcsere-állapot predisponáló faktort jelent a későbbi, felnőttkori kardiovaszkuláris morbiditás szempontjából. Jelen vizsgálatunk két adipokin- a leptin és az adiponektin-, valamint a paraoxonáz enzim (PON1), mint atherosclerosis befolyásoló tényezők kapcsolatát vizsgálta gyermekkori elhízásban.

Vizsgálatunkban elhízott (OB) és normál (K) testsúlyú, 8-14 év közötti gyerekek vettek részt. Az elhízott gyerekek esetében vizsgáltuk az életmódváltozás hatását az elhízásuk mértékére, szénhidrát- és lipid- anyagcseréjükre. Az elhízott gyerekek csoportjában a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan nagyobb leptinszintet ( $p < 0.0001$ ), szignifikánsan alacsonyabb adiponektinszintet és PON1 arilészteráz aktivitást mértünk. Az elhízott csoportban szignifikáns negatív korrelációt találtunk a szérumban leptinszint és a PON1 arilészteráz aktivitás között, a testzsír-százalék és a PON1 arilészteráz aktivitása között, valamint pozitív korrelációt a testzsír-százalék és a szérumban leptinszint között. Az elhízott gyerekek alapanyagcseréjét vizsgálva negatív korreláció mutatkozott a testzsír-százalék és az alapanyagcsere-értékek, valamint a testzsír-százalék és az FT3 szintek között. A gyerekek leptinszintje negatívan korrelált az FT3 szinttel és az alapanyagcsere-értékekkel.

Eredményeink azt sugallják, hogy a gyermekkori elhízásban észlelt kóros anyagcsere állapot kedvező feltételt teremthet a korai atherosclerosis kialakulásához. Ezen anyagcsere- állapotok megítélésében elhízott betegeknél a hagyományos rizikófaktorokon kívül a megváltozott leptin, adiponektinszint és paraoxonáz aktivitás is hasznos marker lehet. A kapott eredményeket nemzetközi folyóiratban, a *Pediatric Research*-ben publikáltuk (2010).

Elhízott gyermekek számára 2 hetes életmódtábor szerveztünk, ahol 23 nem-diabetikus 10-14 éves elhízott gyermek részesült csoportterápiában. Hipokalóriás étrend fogyasztása mellett, fokozott fizikai aktivitással, pszichés motivációval segítettük a gyermekek fogyását. A 2 hetes tábor után szignifikánsan csökkent a BMI mellett a testzsír-százalék és a szérumban proatherogén leptin szintje.

Szignifikánsan nőtt az adiponektin szint és az antioxidáns PON1 aktivitása. Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a szérumban leptin és adiponektin, és pozitív korrelációt a leptin és TNF- $\alpha$  között. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy már rövidtávú életmódváltozás is jelentős testsúlycsökkenést okozva antiatherogén hatású. A gyermekek fokozott fizikai aktivitása és megfelelő táplálkozása csökkentheti a későbbi életkorban az érlemezés kialakulását. Jelenleg az adatok statisztikai feldolgozása és a kapott eredmények értékelése, a nemzetközi irodalommal való összevetése folyamatban van. Eredményeinket angol nyelven tervezzük publikálni.

### **A HDL-hez kötött human paraoxonáz-1 és az adipokinek vizsgálata elhízott felnőttekben**

Az elhízott felnőtteken végzett tanulmányunk a testsúlycsökkentés hatását vizsgálta. 91 metabolikus szindrómában szenvedő nőbeteg 3.5 hónapig alacsony-szénhidrát tartalmú diétán tartottunk. Azt találtuk, hogy a BMI szignifikánsan csökkent, az átlagos súlycsökkenés 8.5 kg volt. A szérumban triglicerid, koleszterin, és glukóz szintje csökkent, míg az LDL, HDL, apoB, apoA1 szintje nem változott. A hsCRP, anti-oxLDL és leptin szintek csökkentek, míg a szérumban PON1 aktivitása és adiponektin szintje nőtt a testsúlycsökkenés hatására. Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a PON1 és leptin között és pozitív volt a korreláció a PON1 és az adiponektin között. Mindebből arra következtethetünk, hogy a hyperleptinemia és a hypo adiponektinemia szoros kapcsolatban áll a PON1 aktivitáscsökkenésével, hozzájárulva ezzel az elhízott betegek fokozott atherosclerosisához. Az alacsony szénhidrát tartalmú diéta normalizálja a lipidprofilot, az adipokinek szinteket, és a PON1 aktivitás növelésével javítja az antioxidáns státuszt a metabolikus szindrómában szenvedő betegekben.

Az eredmények összefoglalása és az orlistattal történő testsúlycsökkentéssel való kiegészítése alapja volt annak az előadásnak, mely bemutatásra került a 2nd International Conference on Paraoxonases nemzetközi konferencián 2006 szeptemberében. Ezt a konferenciát munkatársaimmal közösen szerveztük és 21 ország 126 kutatója vett részt. (részletek: <http://ponconf.med.unideb.hu>)

Fenti munkáinkból készült összefoglalókat az Európai Obezitás Társaság Konferenciáján, 2007.áprilisában, Budapesten, valamint 2007 júniusában az Európai Atherosclerosis Társaság Konferenciáján mutattuk be, és a többi paraméterrel kiegészítve angol nyelven publikáltuk (Atherosclerosis 2008, Exp Clin Endocrinol Diabetes 2008).

Az obezitáshoz társuló fokozott atherosclerosis folyamatában jelentős szerepet játszanak a HDL-hez kötött antioxidáns PON1 enzimén kívül a lipoprotein remodellingben résztvevő cholesteryl ester transfer protein (CETP) és a lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). 25 nem-diabetikus obez (BMI: 28-40 kg/m<sup>2</sup>), és 25 súlyosan elhízott (BMI:>40 kg/m<sup>2</sup>) beteg adatait hasonlítottuk 24 egészséges

normál súlyú egyénéhez. Azt találtuk, hogy a PON1 szignifikáns inverz korrelációt mutat a BMI-vel és a haskörfogattal valamint a leptin szinttel. Megállapítottuk, hogy az LCAT negatív, míg a CETP pozitív kapcsolatot mutat a metabolikus szindróma tipikus jellemzőivel (elhízás, vérnyomás, húgysav, glükóz, hsCRP, triglicerid és leptin). Azonban a HDL-C és az sE-selectin, mint az endotél aktivációjának markere nem mutatott összefüggést sem az LCAT aktivitással, sem a CETP szinttel. eredményeinket nemzetközi folyóiratban publikáltuk (Metabolism 2007).

Egy másik elhízott felnőtt populációban összehasonlítottuk az alacsony szénhidrát-tartalmú és az alacsony zsírtartamú diéták hatását a metabolikus paraméterekre. Megállapítottuk, hogy 3 hónapos diétás kezelés (1200 kcal/nap) hatására szignifikánsan nagyobb súlycsökkenést, BMI és haskörfogat csökkenést értek el a betegek a szénhidrát-szegény diétával, mint a zsírszegény diétával. A szénhidrát-szegény diéta kedvezőbb hatású volt a szénhidrát és lipid metabolizmusra is. Mindkét diétával kezelt csoportban szignifikánsan csökkent a leptin és nőtt az adiponektin szint. A CRP szint a szénhidrátszegény csoportban szignifikánsan csökkent, míg a zsírszegény csoportban nem változott.

A fenti munkáink összefoglalóit az Európai Obezitás Társaság Konferenciáján, 2008 májusában Genfben bemutattuk, valamint az utóbbi eredmények angol nyelven való publikációját tervezzük.

A korábbi évek tudományos kutatómunkája alapján a Springer Kiadótól megbízást kaptam egy paraoxonázzal foglalkozó könyv szerkesztésére, izraeli és angol szerkesztőtársakkal. (Proteins and Cell Regulation sorozat Vol.6. „The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism” ) Ebben a könyvben munkatársaimmal két fejezetet írtunk, angol nyelven, melyekben összefoglaltuk a kiterjedt irodalmi áttekintés mellett a saját elért eredményeinket is. Mindkét fejezet részben kapcsolódott ehhez a projekthez, ezért mindkét fejezetben feltüntettük az OTKA támogatását.

Az obesez betegek kapott eredményeinket a UCLA által szervezett „3<sup>rd</sup> International Conference on Paraoxonases” konferencián mutatta be Los Angelesben az OTKA pályázat társpályázója (dr. Seres Ildikó). Az előadás anyagának könyvfejezet formájában történő publikálása folyamatban van „Alteration of PON1 activity in adult and childhood obesity and its relation to adipokine levels” címmel, mely összefoglalja a pályázatban megfogalmazott kísérleti terv megvalósítása során elért eddigi eredményeinket.

### **Az adipokinek, a cyttatin C és a paraoxonáz kapcsolata krónikus vesebetegségben**

Kutatási programunkat a fokozott atherogenezisre való hajlammal járó kórképek közül a krónikus vesebetegséggel folytattuk. Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben vizsgáltuk a

lipidabnormalitások és az endogén antioxidáns rendszer, a HDL-hez kötött paraoxonáz (PON1) valamint az adipokin termelődésének kapcsolatát.

Krónikus vesebetegekben a fokozott reaktív oxigéngyökök termelődése mellett a magas homocystein szint is hozzájárul a betegek kardiovaszkuláris szövődményeihez. A HDL antioxidáns hatásáért jelentős részben a paraoxonáz enzim felelős, amely gátolja az LDL oxidációját. Az utóbbi évek kutatásai igazolták, hogy a PON1 enzim laktonáz aktivitással is rendelkezik, hidrolizálja a homocystein-thiolactont, ami a homocystein metabolizmusa során keletkezik. A fehérjék metilációja során keletkező aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) vesén keresztül történő eliminációja hemodializált betegekben károsodik és az NO synthase inhibitoraként hozzájárul az endothél dysfunkcióhoz. Korábbi tanulmányok emelkedett szérum leptin, adiponektin és ADMA koncentrációkat igazoltak krónikus vesebetegeknél.

Megvizsgáltuk hemodializált betegek PON1 paraoxonase és homocystein thiolactonase (HTLase) aktivitásának kapcsolatát, valamint az ADMA és a HTLase aktivitás korrelációját. Megvizsgáltuk, milyen összefüggés van a PON1 aktivitás, adiponektin, leptin és ADMA koncentrációk között.

114 hemodializált, korban, nemben illesztett beteget vontunk be. BMI alapján csoportokat képeztünk: malnutritív, normál súlyú és elhízott betegcsoportot. Az ADMA, adiponektin, leptin szintet kompetitív ELISA módszerrel, a PON1 paraoxonáz, arylészteráz és HTLase aktivitását spektrofotometriásan mértük.

Eredményeink szerint mind az elhízott, mind a normál súlyú hemodializált betegek PON1 paraoxonáz és HTLase aktivitása szignifikánsan kisebb volt a malnutritív csoporthoz képest. A PON1 paraoxonáz és HTLase aktivitása pozitív korrelációt mutatott ( $p < 0.01$ ). A PON/HDL arány és a HTLase aktivitás korrelációja szintén szignifikáns volt ( $p < 0.01$ ). A PON1 arylészteráz és HTLase aktivitása között nem találtunk korrelációt. Hasonló ADMA koncentrációt mértünk minden csoportban. A PON1 paraoxonáz aktivitás nem szignifikáns negatív korrelációt mutatott az ADMA szintekkel. A PON1 HTLase aktivitása szignifikáns inverz korrelációt mutatott az ADMA szinttel. Ez a korreláció kimutatható volt az alultáplált és normál súlyú csoportban, de az elhízottakban nem.

Az obez csoportban szignifikánsan magasabb CRP koncentrációkat mértünk, mint a malnutritív csoportban. A PON1 aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt az obez csoportban, mint a malnutritívban. Negatív korrelációt figyeltünk meg a PON1 aktivitás és a CRP szintek között. A leptin koncentráció szignifikánsan magasabb volt az elhízottakban, mint az alultápláltakban. Szignifikáns,

inverz korrelációt találtunk a PON1 aktivitás és a leptin koncentrációk között. Nem volt szignifikáns összefüggés a PON1 aktivitás és az adiponektin szintek között.

Vizsgálatainkból arra következtethetünk, hogy az antioxidáns tulajdonságú PON1 enzim csökkent aktivitása az emelkedett CRP szinttel együtt elősegítheti az atherosclerost elhízott hemodializált vesebetegeknél. Feltételezhető, hogy a hemodializált betegek tápláltsági állapota nagymértékben befolyásolja az endotél dysfunkciót és az antioxidáns védelmet.

Ezeket az eredményeket hazai és nemzetközi konferenciákon mutattuk be, nemzetközi folyóiratban való közlésük folyamatban van. (22nd Scientific Meeting of the International-Society-of-Hypertension, Berlin, 2008; XLV. European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association Congress, Stockholm, 2008; Magyar Nephrológiai Társaság Nagygyűlése, Szeged, 2008; Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoport Kongresszus, Nyíregyháza, 2008; Magyar Atherosclerosis Társaság Kongresszusa, Sopron, 2008)

A továbbiakban vesetranszplantált és hemodializált vesebetegekben vizsgáltuk a szérumban Cystatin C és a paraoxonáz aktivitás kapcsolatát. A Cystatin C védő hatása az érlemezés kialakulásával szemben, és a veseműködés érzékeny markere. Ismert, hogy a PON1 laktonáz aktivitással is rendelkezik. Jelen vizsgálatunkban a PON1 paraoxonáz aktivitás, valamint a Cystatin C és a homocisztein szintek közötti összefüggéseket vizsgáltuk 74 hemodializált (HD) és 171 vesetranszplantált beteg (TRX), valamint 110 egészséges kontroll (C) bevonásával. A Cystatin C szintje szignifikánsan magasabb volt a TRX és HD betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva. Negatív korrelációt találtunk a paraoxonáz aktivitás és a Cystatin C szintek között. A homocisztein szintek negatívan korreláltak a paraoxonáz aktivitással, míg pozitívan korreláltak a Cystatin C szintekkel. Eredményeink alapján a Cystatin C szint nem csupán a homocisztein szint prediktív tényezője, de markere lehet a hemodializált és transzplantált vesebetegek antioxidáns státuszának is. Eredményeinket angol nyelven publikáltuk (Disease Markers 2009)

Az általunk is gyakran használt PON1 fenotípus meghatározás kettős szubsztrát módszerrel általánosan elfogadott a PON1-192 Gln→Arg polimorfizmus becslésére a drágább és munkaigényesebb genotipizálás helyettesítő módszereként. Ez a gyakori polimorfizmus szignifikánsan befolyásolja a paraoxonáz aktivitást, és korábban összefüggést találtak e polimorfizmus és a kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulási gyakorisága között. Korábban csak egészséges egyéneken történt összehasonlító vizsgálat a genotípus és fenotípus meghatározások között, mely viszonylag jó egyezést, 7%-os eltérést mutatott. Mi azonban azt feltételeztük, hogy patológiás körülmények között, így krónikus vesebetegekben és vesetranszplantáltakban a két módszer között

ennél nagyobb eltérés is lehet. Ezért 117 krónikus vesebeteg és 146 vesetranszplantált bevonásával, valamint egy igen nagy, 1180 fős referencia populáción (random kiválasztott, nem feltétlenül egészséges, a magyar átlagpopulációt jellemző csoporton) végeztünk PON1-192 Gln→Arg genotípus meghatározást real-time PCR-rel, fenotípus meghatározást kettős szubsztrát módszerrel, valamint mértük a paraoxonáz aktivitást és a lipidparamétereket. A várt mértéket jóval meghaladó különbséget találtunk a geno- és fenotipizálás eredményei között mindhárom vizsgált populációban (28.2% a vesebetegek, 20.55% a vesetranszplantáltak és 30.9% a referencia populációban). Az allélfrekvenciák gyakoriságában nem találtunk különbséget a három csoport összehasonlításakor. Az arileszteráz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a krónikus vesebetegekben. A paraoxonáz aktivitás nem különbözött szignifikánsan a három vizsgált csoportban. Eredményeink alapján a PON1 státusz megítéléséhez a genotípus és a fenotípus meghatározások párhuzamos elvégzése szükséges. Az eredményeket nemzetközi folyóiratban közzétettük (Nephron Clinical Practice 2009).

#### **A PON1 fenotípus szerepe a statin kezelés lipidparaméterekre és paraoxonáz aktivitásra gyakorolt hatására**

Tovább folytattuk a különböző lipidcsökkentők hatásának tanulmányozását a paraoxonáz-1 enzimre. A PON1 gén kódoló régiójában található PON1-192 polimorfizmus meghatározza az enzim aktivitását (Q192R). Fenotípus megoszlás analízissel különbséget tehetünk a PON-1-192 genotípusok között. Vizsgálatunk célja az volt, hogy tisztázzuk a PON fenotípusok szerepét a PON1 aktivitásra és a lipid paraméterekre három különböző statin alkalmazása esetén. Tanulmányunkba 164 IIb típusú hiperlipidémiás beteget vontunk be. Megvizsgáltuk a napi 10 mg atorvastatin, 10/20 mg simvastatin és 80 mg fluvastatinXL kezelés hatását a lipid szintekre és a PON aktivitásra a különböző PON1 fenotípusba tartozó betegek esetén. A fenotípus megoszlást kettős szubsztrát módszerrel mértük.

A három hónapos statin kezelés szignifikánsan növelte a PON1 aktivitását, minden statin-csoportban. Az AB+BB fenotípusba tartozó betegekben szignifikánsan nagyobb mértékű aktivitás-növekedést tapasztaltunk, mint az AA csoportban. A statin kezelés hatékonyabban csökkentette a triglicerid szinteket az AB+BB csoportban, mint az AA csoportban, és ez a különbség a simvastatinnal kezelt csoportban volt a legkifejezettebb. Az AB+BB fenotípusban az atorvastatin kezelés hatására az apoB szint szignifikánsan nagyobb mértékű csökkenést mutatott, mint az AA csoportban.

Eredményeink arra utalnak, hogy a PON1 fenotípus a statin kezelés hatásosságának egy új prediktív faktora lehet, azonban a különböző típusú statinok hatása a PON1 aktivitásra és a lipid szintekre

különböző lehet. Fenti eredményeinket hazai és nemzetközi kongresszusokon is bemutattuk. (Magyar Atherosclerosis Társaság Kongresszusa, Sopron, 2008, 77th European Atherosclerosis Society Congress, Istanbul, 2008, 16th European Congress on Obesity, Geneva, 2008). Eredményeink angol nyelvű közlése is megtörtént (British Journal of Clinical Pharmacology 2008)

### **A statin kezelés hatása a HDL szubfrakciókra és a paraoxonáz aktivitásra**

Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a PON1 enzim eloszlása az egyes HDL szubfrakciókon belül nem egyenletes, a PON1 legnagyobb arányban a az apolipoprotein I-et és II-t is tartalmazó HDL3 szubfrakciókhoz kötődik. A HDL szubfrakciók arányában bekövetkező változások ezért befolyásolhatják a PON1, az LCAT és a CETP enzimek stabilitását és antioxidáns kapacitását. Vizsgálatunkban az atorvastatin kezelés hatását tanulmányoztuk a HDL szubfrakciók arányára, az LDL parikulumok méretére, a paraoxonáz, CETP és LCAT aktivitásra, valamint a lipidparaméterekre 33 IIa és IIb típusú hyperlipidaemiás beteg bevonásával. A 3 hónapos, napi 20 mg-os atorvastatin kezelés szignifikánsan növelte a HDL3 (+8.13%) és csökkentette a HDL2a és HDL2b szubfrakciók arányát (-1.57% és -6.55%). Az átlagos LDL méret szignifikánsan nőtt a kezelés hatására (+3.29%). Az oxidált LDL szintje szignifikánsan csökkent (-46.0%). A PON1 paraoxonáz aktivitás szignifikánsan nőtt. A CETP aktivitás szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a HDL2B aránnyal és negatívan korrelált a HDL3 és HDL2a arányokkal. Az atorvastatin tehát befolyásolja a HDL szubfrakciók arányát, mely hozzájárulhat a PON1 paraoxonáz aktivitás emelkedéséhez, ezáltal az atorvastatin antiatherogén hatásához. Eredményeinket a Translational Research-ben közzöltük angol nyelven (2009).