

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**Az atorvastatin kezelés és az uncoupling protein-2  
hatása és szerepe a zsíryanycserében**

**Dr. Kassai Andrea**



**DEBRECENI EGYETEM  
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
ANYAGCSERE ÉS ENDOKRIN BETEGSÉGEK PROGRAM  
Debrecen, 2010**

## TARTALOMJEGYZÉK:

I.	<u>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</u> .....	3
II.	<u>ÖSSZEFOGLALÁS</u> .....	6
III.	<u>ABSTRACT</u> .....	7
IV.	<u>BEVEZETÉS</u> .....	8
4.1	A HDL .....	8
4.2	A reverz koleszterin transzport és a HDL remodelling.....	9
4.3	A koleszterin-észter-transzfer-protein (CETP).....	10
4.4	A lecitin-koleszterin-acil-transzferáz (LCAT) .....	12
4.5	A HDL antioxidáns hatása és a paraoxonáz (PON1).....	13
4.6	A HDL egyéb atheroszklerózis kialakulása ellen védő hatásai.....	16
4.7	Az atorvastatin .....	17
4.8	Az Uncoupling protein-2 (UCP-2) .....	18
4.9	Az inzulin szekréció folyamata .....	22
4.10	Fiziológiás változások éhezés során.....	24
4.11	Az UCP2 szerepe a $\beta$ -sejtekben és éhezéskor .....	27
V.	<u>CÉLKITŰZÉSEK</u> .....	28
5.1	Az atorvastatin kezelés hatása a lipid paraméterekre és a HDL remodellingben szereplő enzimekre .....	28
5.2	Az UCP2 hatása a zsíryanycserére éhezéskor .....	29
VI.	<u>MÓDSZEREK</u> .....	29
6.1	Betegek .....	29
6.2	Lipid paraméterek meghatározása .....	30
6.3	Az LCAT aktivitás meghatározása .....	30
6.4	A CETP aktivitás meghatározása.....	31
6.5	A paraoxonáz aktivitás és koncentráció meghatározása.....	31
6.6	Az állatok kezelése .....	32
6.7	Biokémiai mérések .....	32
6.8	Szövetteni vizsgálatok.....	33
6.9	Western blot .....	33

6.10	Real-time PCR.....	33
6.11	Statisztikai analízis.....	34
VII.	<b><u>EREDMÉNYEK</u></b> .....	35
7.1	A lipid paraméterek, LCAT, CETP és paraoxonáz-1 aktivitások változásai 35	
7.2	A biokémiai markerek változásai éheztetést követően .....	38
7.3	Hepatikus szteatózis.....	41
7.4	A lipid szabályozásban szerepet játszó molekulák expressziójának változása a májban.....	42
VIII.	<b><u>MEGBESZÉLÉS</u></b> .....	45
IX.	<b><u>IRODALOMJEGYZÉK</u></b> .....	53
X.	<b><u>KÖZLEMÉNYEK</u></b> .....	64
XI.	<b><u>KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS</u></b> .....	67

## I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>ABCA1</b>	ATP-binding cassette transzporter A1
<b>ABCG1</b>	ATP-binding cassette transzporter G1
<b>ABCG4</b>	ATP-binding cassette transzporter G4
<b>ACC-<math>\alpha</math></b>	acetyl-CoA karboxiláz
<b>ADP</b>	adenozin difoszfát
<b>AOX</b>	acyl-CoA oxidáz
<b>apo A-I</b>	apolipoprotein A-I
<b>apo B</b>	apolipoprotein B
<b>ATP</b>	adenozin trifoszfát
<b><math>\beta</math>-OHB</b>	$\beta$ -hidroxi-butirát
<b>CETP</b>	koleszterin-észter-transzfer-protein
<b>CPT-1</b>	carnitine palmitoyl transferáz-1
<b>CYP2E1</b>	citokróm P450 2E1
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EGTA</b>	ethylene glycol tetraacetic acid
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FADH<sub>2</sub></b>	flavin adenine dinucleotid
<b>FAS</b>	zsírsav szintáz
<b>FFA</b>	szabad zsírsav
<b>GK</b>	glükokináz
<b>GLUT-2</b>	glükóz transzporter-2
<b>HDL</b>	high-density lipoprotein
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
<b>HSL</b>	hormon szenzitív lipáz

<b>ILLUSTRATE</b>	investigation of lipid level management using coronary ultrasound to assess reduction of atherosclerosis by CETP inhibition and HDL elevation
<b>LCAT</b>	lecitin-koleszterin-acil-transzferáz
<b>LDL</b>	low-density lipoprotein
<b>MCAD</b>	medium-chain acyl-CoA dehydrogenáz
<b>MCP-1</b>	Methylcyclopropene-1
<b>mRNS</b>	messenger ribonukleinsav
<b>mtHMGS</b>	mitokondriális $\beta$ -hidroxi $\beta$ -metilglutaril CoA szintáz
<b>MTTP</b>	mikroszómális triglicerid transzfer protein
<b>NADH</b>	nicotinamide adenine dinucleotid
<b>NCEP</b>	national cholesterol education program
<b>NCEP ATP III</b>	national cholesterol education program adult treatment panel III
<b>NO</b>	nitrogén oxid
<b>oxLDL</b>	oxidált low-density lipoprotein
<b>PAF</b>	platelet-activating factor
<b>PAF-AH</b>	platelet-activating factor acetylhydrolase
<b>PCR</b>	polimerase chain reaction
<b>P<sub>i</sub></b>	inorganikus foszfát
<b>PMSF</b>	phenylmethanesulphonylfluoride
<b>PON</b>	paraoxonáz
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$
<b>SCD-1</b>	stearoyl-CoA deszaturáz-1
<b>SR-B1</b>	scavenger receptor B1
<b>SRE-BP-1c</b>	sterol regulatory element-binding protein-1c
<b>SRE-BP-2</b>	sterol regulatory element-binding protein-2
<b>TAG</b>	triacilglicerol
<b>TBP</b>	TATA boks binding protein
<b>UCP2</b>	uncoupling protein-2

**VA-HIT** veterans affairs high-density lipoprotein cholesterol intervention trial

**VLDL** very-low density lipoprotein

## II. ÖSSZEFOGLALÁS

A tanulmányunk célja az volt, hogy az atorvastatin lipid paraméterekre, különös tekintettel a HDL-re, valamint a HDL remodellingjében szereplő LCAT és CETP aktivitására gyakorolt hatását vizsgáljuk, és hogy ezek hogyan befolyásolják a HDL-hez kötött antioxidáns enzim, a paraoxonáz aktivitását. A vizsgálatunkba 33 II.a és II.b típusú primer hyperlipoproteinaemiás beteg került bevonásra. A betegek 3 hónapig napi 20 mg atorvastatin kezelésben részesültek. A kezelés előtt és után a lipid paraméterek mellett megmértük a szérum paraoxonáz koncentrációját és aktivitását, az oxLDL szintjét, valamint az LCAT és CETP aktivitását. Az atorvastatin kezelés szignifikánsan csökkentette a koleszterin, a triglicerid, az LDL-C és az apoB szintjét, míg nem befolyásolta a HDL és az apo A-I szintjét. A paraoxonáz specifikus aktivitása, a PON/HDL hányados és az LCAT aktivitás szignifikánsan emelkedett, míg az oxLDL szintje és a CETP aktivitása szignifikánsan csökkent. Összefoglalásképp elmondhatjuk, hogy az atorvastatin hatással lehet a HDL összetételére és funkciójára, és valószínűleg ezen keresztül emeli a paraoxonáz aktivitását és csökkentheti az atheroszklerózis kialakulását.

A munkám másik részében az uncoupling protein-2 (UCP2)  $\beta$ -sejtekben betöltött szerepét vizsgáltuk. Az UCP2 a  $\beta$ -sejtek ATP szintjének befolyásolása révén szabályozza az inzulin szekréciót. Az UCP2 hiányában az egerekben javul a glükóz szint szabályozás, míg az UCP2 fokozott expressziója gátolja a glükóz stimulált inzulin szekréciót. Ezen megfigyelések hozzák kapcsolatba az UCP2-t és annak meglepő evolúciós szerepét a  $\beta$ -sejt funkciózavarral 2-es típusú diabetesben. Vizsgálatunk során magasabb reziduális szérum inzulin szintet és a zsírsavanyagcserében csökkent változást találtunk az éheztetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. UCP2 hiányában éhezéskor kezdetben perifériás lipolízis és hepatikus zsírakkumuláció jön létre a vártnál kisebb mértékben, viszont elhúzódó szteatózisban tetőzik, amely a máj csökkent zsírsav felhasználására és eltávolítására utal. Összefoglalásként megállapítjuk, hogy az UCP2 által szabályozott inzulin szekréció fiziológias mechanizmusa az éhezésre adott válasznak.

### **III.ABSTRACT**

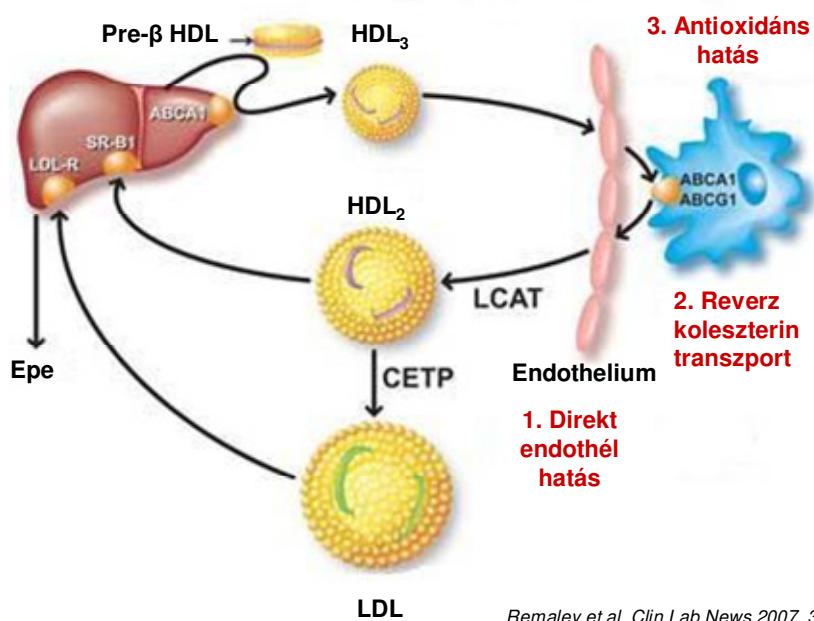
The aim of our study was to examine the influence of atorvastatin on lipid parameters, particularly on HDL, and on the activity of LCAT and CETP and how they affect the activity of the HDL-associated antioxidant enzyme paraoxonase. Thirty-three patients with types II.a and II.b primary hyperlipoproteinemia were enrolled into our study. The patients received atorvastatin, 20 mg daily, for 3 months. In addition to the lipid parameters we measured the serum paraoxonase activity and concentration, oxidized LDL, LCAT and CETP activities. Atorvastatin significantly reduced the levels of cholesterol, triglyceride, LDL-C and apoB, while it did not influence the levels of HDL-C and apo A-I. The increases in serum PON-specific activity, PON/HDL ratio and LCAT activity were significant, while oxLDL and CETP activities were significantly decreased. Atorvastatin may influence the composition and function of HDL, thereby possibly increasing the activity of paraoxonase and preventing atherosclerosis.

In the other part of my experiments we studied the role of uncoupling protein-2 (UCP2) in pancreatic  $\beta$ -cells. UCP2 regulates insulin secretion by controlling ATP levels in beta-cells. Although UCP2 deficiency improves glycemic control in mice, increased expression of UCP2 interferes with glucose-stimulated insulin secretion. These observations link UCP2 to beta-cell dysfunction in type 2 diabetes with a perplexing evolutionary role. We found higher residual serum insulin levels and blunted lipid metabolic responses in fasted *ucp2*<sup>-/-</sup> mice. In the absence of UCP2, fasting initially promotes peripheral lipolysis and hepatic fat accumulation at less than expected rates but culminates in protracted steatosis, indicating diminished hepatic utilization and clearance of fatty acids. We conclude that UCP2-mediated control of insulin secretion is a physiologically relevant mechanism of the metabolic response to fasting.

## IV. BEVEZETÉS

### 4.1 A HDL

Az érlemezsedés következtében kialakuló kardiovaszkuláris megbetegedés jelenti a vezető halálokot a fejlett országokban. Az elmúlt 30 év során a kardiovaszkuláris betegség számos független rizikó faktorát azonosították. Ezek közül a magas LDL ( $\geq 160$  mg/dl vagy 4.1 mmol/L) és az alacsony HDL szint ( $\leq 40$  mg/dl vagy 1.03 mmol/L) játszik kiemelkedően fontos szerepet az érlemezsedés kialakulásában. Az alacsony HDL szint fontosságára hívja fel a figyelmet Gordon és mtsainak az a megfigyelése, miszerint minden 1 mg/dl HDL koleszterin szint emelkedés 2.5%-kal csökkenti a koronária betegség rizikóját[1]. Ezen kívül számos epidemiológiai vizsgálat bizonyította a HDL szint és a koronária betegség közötti inverz kapcsolatot, azonban a pontos mechanizmus, amellyel a HDL kifejti védő hatását még nem ismert. A HDL védő hatásának a háttérében három fő mechanizmust feltételeznek: i.) a reverz koleszterin transzportot, ii.) direkt endothel hatást és iii.) az antioxidáns hatást (1. ábra).



Remaley et al. Clin Lab News 2007, 33(11):07

### 1. ábra

A reverz koleszterin transzport és a HDL atheroszklerózis elleni védő hatásai

Azonban a HDL atheroszklerózis elleni védő hatása valószínűleg a HDL egy vagy több védő mechanizmusának, mintsem egyszerűen csak a HDL plazma koncentrációjának köszönhető. Ismertek olyan körülmények, amikor az emelkedett HDL koncentrációhoz nem társul fokozott védelem, és ennek ellenkezője is előfordul, amikor a HDL fokozott védő hatása a HDL koncentráció emelkedése nélkül is elérhető[2]. Az eddigi tanulmányok azt mutatják, hogy a HDL antiatherogén hatása szorosan összefügg a HDL plazma koncentrációjával. Ezek alapján alakult ki az a vélemény, hogy a HDL funkcióját és antiatherogén aktivitását a HDL „minősége”, nem pedig a HDL mennyisége határozza meg. A HDL „minőségének” és a reverz koleszterin transzportnak a megértéséhez fontos tudni, hogy a HDL frakció igen heterogén[3]. A humán HDL-t két fő szubfrakcióra lehet szétválasztani sűrűség alapján, ultracentrifugálás révén: a kisebb sűrűségű HDL2-re és a nagyobb sűrűségű HDL3-ra. Emellett a HDL-t agaróz gél elektroforézis révén is szét lehet választani:  $\alpha$ , pre- $\beta$  és  $\gamma$  migrációra. Az  $\alpha$ -migráló HDL-ek érett, gömb alakú részecskék, amelyek a plazmában lévő HDL-ek nagy részét adják. Ide tartozik a HDL2 és a HDL3. A pre- $\beta$  HDL-t korong alakú részecske jellemzi, amelyet foszfolipidekhez és nem észterifikált koleszterinhez kötött apolipoprotein A-I alkot. Az  $\alpha$ -HDL-en belül lévő kisebb szubpopuláció apolipoprotein E-t és foszfolipideket tartalmazó nagy gömb alakú részecskékből áll. Ez a heterogenitás a HDL funkcióján keresztül a teljes HDL frakció kardiovaszkuláris védő hatását befolyásolhatja.

#### **4.2 A reverz koleszterin transzport és a HDL remodelling**

Reverz koleszterin transzportnak nevezzük azt a folyamatot, amely során a HDL a feleslegben levő koleszterint a perifériás sejtekből a májba szállítja az epével történő kiválasztásra. Ebben a folyamatban foglal helyet a HDL remodelling, mely során a májban és vékonybélben termelt, kicsi, korong alakú pre- $\beta$  vagy naszcens HDL érett, gömb formájú HDL-é, azaz HDL3-má alakul. A reverz koleszterin transzport első lépéseként a lipidben szegény, főleg apoA-I-et tartalmazó pre- $\beta$  HDL felveszi a feleslegben lévő szabad koleszterint a perifériás sejtektől. A perifériás sejtekből történő koleszterin kiáramlásban a sejtek plazma membránjában lévő ABCA1 transzporternek és a HDL-en lévő apolipoprotein A-I-nek van kiemelt szerepe. Az ABCA1 kulcsfontosságú az intracelluláris lipid transzportban, valamint a transzmembrán lipid áramlásban. Ez

utóbbi során az ABCA1 vizes pórust formál a sejt felszínén, és így juttatja a koleszterint az apolipoprotein A-I-re[4]. Ezután a HDL felszínén lévő szabad koleszterint a lecitin-koleszterin-acil-transzferáz (LCAT) koleszterin észterre alakítja, melynek következtében a koleszterin észter a HDL magjába vándorol létrehozva a gömb alakú, érett HDL3-t. A HDL-ben lévő koleszterin észtert a máj, valamint a szteroid szintézisben szereplő mellékvese és a gonádok a HDL receptoron, azaz a scavenger receptor-B1-en (SR-B1) keresztül veszik fel. A máj a HDL-t egészben is képes felvenni. A másik lehetőség az, hogy a koleszterin-észter-transzfer-protein (CETP) a koleszterin észtert apolipoprotein B-t tartalmazó részecskékre (VLDL, IDL, LDL) szállítja, és cserébe trigliceridet helyez a HDL-re, amely ezúton HDL2-vé alakul. Így az apolipoprotein B-t tartalmazó részecskékre került koleszterin LDL-receptoron keresztül jut a májba. A koleszterin leadását követően a HDL-en lévő trigliceridet és foszfolipidet főleg a hepatikus és az endotheliális lipáz hidrolizálja, így a lipidben szegény HDL vagy újra bekerül a körforgásba, mint koleszterin akceptor, vagy leválik róla az apo A-I, amit a vese proximális epitheliális sejtjei bekebeleznek és lebontanak. A máj által felvett koleszterin észter visszaalakul szabad koleszterinné, amely vagy epesavvá alakul, vagy direkt távozik az epével[5]. A HDL folyamatos és kiterjedt remodellingje szabályozza a HDL alakját, méretét, összetételét, és felel a HDL heterogenitásáért.

Brinton és mtsai kimutatták, hogy a plazma HDL szintje nem a HDL termeléssel, hanem a HDL lebomlással áll szoros kapcsolatban[6]. Ezen megfigyelés a reverz koleszterin transzport jelentőségére hívja fel a figyelmet, hiszen ennek a folyamatnak valamely pontján létrejövő változás befolyással van a HDL szintjére és összetételére[7].

### **4.3 A koleszterin-észter-transzfer-protein (CETP)**

A CETP a reverz koleszterin transzport és a HDL remodelling egyik kulcsfontosságú enzime, amely ezáltal központi szerepet tölt be a HDL szintjének, méretének és alakjának szabályozásában. A CETP egy HDL-hez kötött glycoprotein, amely a májban termelődik. A CETP a HDL és az apolipoprotein B-t tartalmazó részecskék között hozza létre a koleszterin észter és triglicerid cserét. A mai napig nem eldöntött, hogy a CETP proatherogén vagy antiatherogén. A CETP-et sokan proatherogénnek tekintik, hiszen koleszterin észtert szállít az antiatherogén HDL-ről a

potenciálisan atherogén VLDL-re és LDL-re. Ha a CETP által a VLDL-re és az LDL-re szállított koleszterin észter az érfal makrofágjai veszik fel, a CETP proatherogén, viszont ha a VLDL-re és az LDL-re került koleszterin észter a máj veszi fel, akkor a CETP antiatherogénnek tekinthető. Úgy tűnik, hogy nyulakon végzett kísérletek a proatherogén hatást támasztják alá. Nyulakban a CETP szintje magasabb, mint az emberekben. Ezért nyulakkal végzett kísérletek során a CETP-et vagy antisense oligonukleotiddal vagy CETP ellenes immunitás kialakításával gátolták. Ezen kísérletek során a HDL szintje 42%-kal emelkedett, az LDL szintje csökkent, és az atheroszklerotikus plakkal borított aorta felszín szignifikánsan csökkent[8;9].

A CETP-nek számos polimorfizmusa ismert, ezek közül a leggyakrabban tanulmányozott a TaqIB polimorfizmus. A B2 allél alacsonyabb plazma CETP aktivitással, magasabb HDL szinttel és nagyobb HDL partikulával, valamint férfiakban csökkent kardiovaszkuláris rizikóval jár[10]. Ez utóbbi megfigyelés nőkben nem volt szignifikáns. A másik gyakori polimorfizmus az I405V és a R451Q mutáció.

CETP deficienciában a koleszterin észter a HDL partikula magjában marad, így a HDL nagyobb és koleszterin észterben gazdagabb lesz. A HDL szintje megemelkedik valószínűleg a megnagyobbodott HDL és a hozzá kapcsolódó apo A-I és apo A-II[11] csökkent katabolizmusa miatt. Annak ellenére, hogy magasabb a HDL szintje, a koleszterin észterben gazdag, nagy HDL partikula funkcióját veszítette, mivel alkalmatlan a koleszterin felvételére a perifériás sejtekből[12], ugyanis az ABCA1 csak lipidben szegény apoA-I partikulára mediálja a koleszterin kiáramlást a perifériás sejtekből. Ugyanakkor, az ABCA1-en kívül más molekulák is képesek a sejtmembránon keresztül történő lipid szállításra, úgy mint a SR-BI, az ABCG1 és ABCG4, amelyekről kimutatták, hogy nagyobb méretű HDL molekulákra (HDL2) stimulálják a koleszterin kiáramlást[13]. E szerint ezek a transzporterek képesek fenntartani a koleszterin felvételt a perifériás sejtekből olyankor is, amikor nagyméretű HDL partikula áll rendelkezésre[14]. Emelkedett HDL szint esetén fokozódhat a HDL antioxidáns, ezáltal pedig az antiatherogén hatása[15]. CETP deficienciában a HDL szint emelkedése mellett az LDL mérete változatos, a szintje pedig csökken, mely utóbbi a CETP gyógyszeres gátlásának érelmeszesedés ellen védő lehetséges hatását támogatja[16].

A Honolulu Heart Study-ban CETP D442G mutációja miatt csökkent CETP szinttel rendelkező, a mutációra nézve heterozigóta japán betegeket vizsgáltak[17]. A vizsgálat eredménye szerint a CETP deficiencia antiatherogén, amikor a HDL szintje magasabb, mint 60 mg/dl, viszont nem fejt ki védő hatást, ha a triglicerid és az LDL szintje jelentősen emelkedett. Sőt a koronária betegség rizikója 50 %-kal emelkedett, amikor a HDL szintje 41-60 mg/dl között volt[18].

Úgy tűnik, hogy a HDL szint emelése céljából a nemrégiben kifejlesztett CETP inhibitorok szintén a proatherogén hatást támasztják alá. A CETP inhibitorok kifejlesztésének háttérében a CETP csökkent aktivitása során és CETP deficienciában megfigyelt kedvező hatások álltak. A CETP gyógyszeres gátlásakor kialakuló kedvező hatások mögött az az elképzelés áll, hogy a HDL szintje megemelkedik, és a máj koleszterin felvétele a SR-BI-en keresztül fokozódik, így a koleszterin perifériás sejtekből a májba történő szállítása felgyorsul[18]. Az első embereken alkalmazható CETP inhibitorot Japánban fejlesztették ki, ez a JTT-705 volt. Nyulakon végzett kísérletek során a JTT-705 95%-kal csökkentette a CETP aktivitást, 90%-kal növelte a HDL szintet, 40%-kal csökkentette az LDL szintjét, végül 80%-kal csökkentette az aorta érlemezését[19]. A második CETP inhibitor a torcetrapib volt. A torcetrapibbal végzett nagyszabású ILLUSTRATE-nek nevezett tanulmány több szempontból is sikertelen volt. Egyrészt a koronária erek érlemezésének intravaszkuláris ultrahanggal vizsgált progresszióját nem tudta csökkenteni, másrészt a vizsgálatot meg kellett szakítani, mivel a mortalitás szignifikánsan emelkedett[20]. Valószínűleg hatóanyag specifikus toxicitás okozta a torcetrapib kudarcát, nem pedig a gyógyszer háttérében álló mechanizmus. A vizsgálat során vérnyomás emelkedést figyeltek meg, ugyanis a torcetrapib aldosteron agonistaként is működik, így emeli a szisztémás aldosteron szintet[21]. Valószínűleg ez a mellékhatás a magyarázata annak, hogy a torcetrapib nem tudta lassítani az érlemezés progresszióját, sőt növelte az arteria carotis communis intima-media vastagságát[22].

#### **4.4 A lecitin-koleszterin-acil-transzferáz (LCAT)**

Az LCAT (E.C.2.3.1.43) a reverz koleszterin transzport másik kulcsfontosságú enzime, amely szintén befolyással van a HDL tulajdonságaira. Az LCAT génje a 16-os

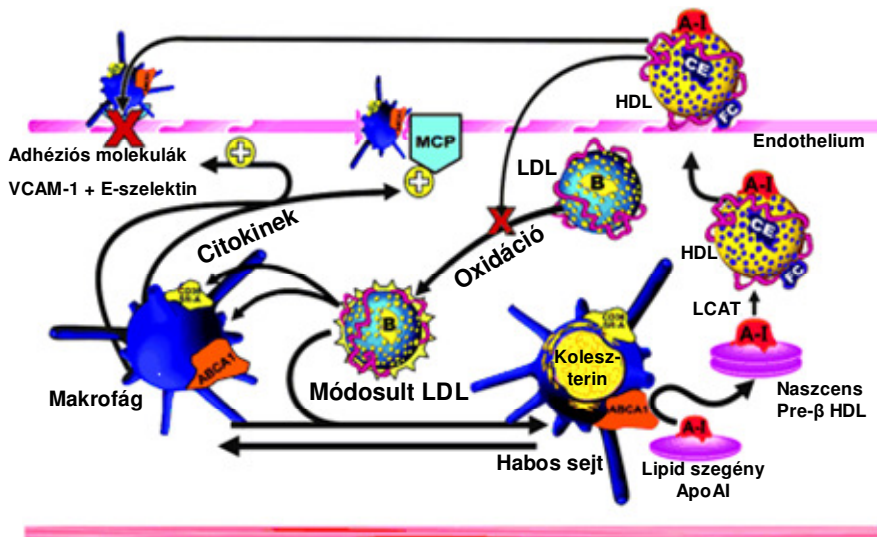
kromoszómán található, és elsősorban a máj termeli. A keringésbe kerülve a HDL-hez kötődik, amely az LCAT elsődleges aktivátorát, az apolipoprotein A-I-et is tartalmazza[23]. Annak ellenére, hogy az LCAT a plazmában elsősorban a HDL-hez kötődik, kimutatták, hogy az LDL frakcióban is aktív[24]. A reverz koleszterin transzport során az LCAT a kofaktora, az apolipoprotein A-I segítségével koleszterinből koleszterin észter formát úgy, hogy az a lecithin sn-2 pozíciójában levő zsírsavát a koleszterin OH-csoportjára szállítja[25]. Az LCAT megítélése az érlemezés kialakulása szempontjából szinte egyértelműen antiatherogén, ugyanis a szabad koleszterin koleszterin észterre alakításával a HDL felszínén szabad helyet biztosít a további koleszterin felvételéhez, ezáltal fokozva a reverz koleszterin transzportot. Így az LCAT kedvezően befolyásolja a plazma lipid összetételét, azáltal, hogy emeli a HDL szintet és csökkenti az LDL szintet. Az LCAT génjenek mutációja az LCAT aktivitás vagy teljes, vagy részleges hiányához vezet. Az LCAT teljes hiányát Familiáris LCAT Deficienciának, a részleges hiányát Fish Eye (Halszem-) betegségnek nevezzük. Mindkét betegség autoszomális recesszíven öröklődik, és jelentősen csökkent HDL és apo A-I szinttel jár, viszont korai koronária betegség nem társul hozzájuk[26]. Az alacsony HDL szintet a szabad koleszterinben gazdag pre-beta HDL fokozott katabolizmusa magyarázza. Ezek a részecskék nem tudnak érett, koleszterin észterben gazdag HDL-lé alakulni az LCAT hiánya miatt[27].

Kimutatták, hogy a reverz koleszterin transzportban játszott szerepe mellett az LCAT képes hidrolizálni az LDL-en lévő oxidált foszfatidil-kolint és ezáltal megelőzni az oxidált foszfatidil-kolinnak a keringő LDL-en történő felhasználását[28], ezzel hozzájárulva a HDL antioxidáns hatásához. Az LCAT az LDL-en lévő oxidált lipid szint csökkentése révén csökkenti a makrofágok scavenger receptoron keresztül történő oxidált LDL felvételét, amely jelentős antiatherogén szereppel ruházza fel az LCAT-ot[29].

#### **4.5 A HDL antioxidáns hatása és a paraoxonáz (PON1)**

A reverz koleszterin transzport mellett a másik feltételezett mechanizmus, amely a HDL atheroprotektív hatását támaszthatja alá, a HDL LDL oxidációt gátló képessége. A HDL ezen antioxidáns hatása számos, a HDL-hez kötött molekulának köszönhető, ezek közül az apolipoprotein A-I, a platelet-activating factor acetylhydrolase (PAFAH) és a

paraoxonáz a legjelentősebb. A paraoxonáz egy HDL-hez kötött enzim, amely az LDL-en és a HDL-en lévő oxidált foszfolipideket és koleszterin észtereket hidrolizálja, és megakadályozza az LDL-en történő felhalmozódásukat. Az oxidált LDL kialakulása ellen védő hatás jelentőségét hangsúlyozza a régóta elismert tény, hogy az LDL oxidációnak központi szerepe van az érlemezés kialakulásában [30;31] (2. ábra).



Brewer et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1755-1760.

## 2. ábra

### Az atheroszklerózis kialakulása és az ellene védő HDL

Emellett a HDL-t is védi az oxidációtól, és ezáltal javítja a HDL hatékonyságát a reverz koleszterin transzportban. A PON1-t először az idegméreg organofoszfátokat közömbösítő képessége révén fedezték fel. A neve is innen ered, ugyanis a PON1 képes hidrolizálni a paraoxont, amely a rovarirtó parathionnak a metabolitja[32]. Számos egyéb rovarirtó metabolitok, mint például a diazoxon, mellett a PON az ideggázok úgy, mint a szarin és a szomán hidrolízisére is képes[33]. A PON észteráz aktivitása az aromás észterekre, úgy mint a fenil-acetátra is kiterjed[33]. A PON-nak az aromás és hosszú láncú alifás laktonok is szubsztrátjai[33]. Az enzimen két kalcium kötő hely található, az egyik az enzim stabilitásához, a másik a hidrolitikus aktivitáshoz szükséges[33]. A

paraoxonáz organofoszfátokat hidrolizáló hatása erősen kalcium függő, viszont a lipid peroxidok felhalmozódásának megelőzéséhez nem igényel kalciumot[34]. Az LCAT-tal és az apo A-I-gyel összehasonlítva a paraoxonáz sokkal hatékonyabban védi az LDL-t az oxidációtól[32]. A paraoxonáz a májban termelődik, majd innen a vérbe szekretálódik, ahol a HDL-hez kötődik[33]. A paraoxonáz szérum szintje viszonylag konstans egy adott emberben, ugyanakkor az egyének közötti eltérés nagy. Ezért az egyének közötti nagy aktivitásbeli különbségért a génjének a polimorfizmusa felel. A paraoxonáz génje a 7-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. A paraoxonáznak két polimorfizmusa ismert, az egyik a kódoló régióban, a 192-es pozícióban, a másik az 55-ösben helyezkedik el. A 192-es pozíció esetében glutamin (Q) vagy arginin (R), míg az 55-ösben leucin (L) vagy methionin (M) található. A PON1 A esetében a 192-es pozícióban glutamin található és a PON aktivitása alacsony, míg a PON1 B esetében arginin helyezkedik el a 192-es helyen, és az aktivitás magasabb[7]. Amennyiben az 55-ös pozícióban leucin helyezkedik el, akkor a paraoxon hidrolitikus aktivitás magasabb, ha methionin, akkor alacsonyabb[35]. A paraoxonáz LDL oxidáció ellen védő kapacitása ellentéte a paraoxonáz hidrolitikus aktivitásának. Ennek megfelelően a 192-es glutamin(Q) és az 55-ös methionin (M) rendelkezik a legnagyobb védő hatással[34]. Számos tanulmány vizsgálta a PON polimorfizmusok és a koronária betegség rizikója közötti kapcsolatot. Mackness és mtsai nemrég elvégezte néhány eset-kontrol tanulmány meta-analízisét, amely azt mutatta, hogy a 192-es R allél és a koronária betegség jelenléte között szignifikáns kapcsolat van, és Q allél jobban véd a koronária betegséggel szemben, mint az R allél[32]. Ezt a polimorfizmust emelkedett koronária betegség rizikójával hozták kapcsolatba[36]. Ugyanakkor a PON koncentráció és aktivitás jobb előrejelzője a kardiovaszkuláris rizikónak, mint a PON genotípus[37;38].

A következő érdekes megfigyelést Mackness és mtsai írták le, hogy a koronária betegségben szenvedőkben a paraoxonáz aktivitás fele a betegségtől mentes egyénekhez képest, és hasonló a helyzet az ischemiás mellkasi fájdalom fellépését követő néhány órán belül a myocardiális infarktust túlélőkben, amely arra utal, hogy az alacsony PON aktivitás megelőzhette az eseményt[39].

A platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) egy másik antioxidáns hatással rendelkező enzim, amely nagyobb részben az LDL-en, kisebb részben pedig a

HDL-en található. Azonban az LDL-en lévő PAF-AH-val ellentétben, a HDL-en lévő PAF-AH aktivitás a paraoxonáznak, nem pedig egy külön enzimnek köszönhető[40], ugyanis a PAF-AH-hoz hasonlóan a paraoxonáz is képes a platelet-activating factor (PAF) hidrolízisére.

Végül a HDL fő apolipoproteinjéről, az apo A-I-ről írták le, hogy képes az LDL-ről eltávolítani a lipid hidroperoxidokat[41], és védi a foszfolipideket az oxidációtól, valamint az LCAT LDL-en lévő oxidált foszfolipidek metabolizmusában játszott szerepéről is beszámoltak már[42]. A paraoxonáz sokkal hatékonyabban védi az LDL-t az oxidációtól, mint az LCAT vagy az apo A-I[32].

#### **4.6 A HDL egyéb atheroszklerózis kialakulása ellen védő hatásai**

Az előbbieken említett reverz koleszterin transzport és az antioxidáns hatás mellett a HDL antiatherogén hatása még a HDL számos egyéb tulajdonságának is köszönhető. A HDL néhány védő hatása a teljesség igénye nélkül: gátolja az endothel sejtek platelet activating factor (PAF) szintézisét[43], stimulálja az endothel prostacyclin szintézisét[44], antithrombotikus, antiinflammatorikus, és stimulálja az endothel nitrogén oxid (NO) szintézisét. Ezen hatások közül a HDL antiinflammatorikus, valamint az endothelre gyakorolt hatásáról lesz szó bővebben.

Az atheroszklerózissal kapcsolatban elfogadott tény, hogy egy krónikus inflammatorikus betegség, amelyet részben az érfalban lévő oxidált LDL jelenléte idéz elő. Ez alapján logikusnak tűnik, hogy a HDL antiatherogén tulajdonsága, legalábbis részben a HDL antioxidáns és antiinflammatorikus hatásának köszönhető. Egy korai lépése ennek a gyulladós folyamatnak a monocyták adhézioja az endothelhez, amely vagy megsérült, vagy valamilyen más módon lett stimulálva, hogy adhézio molekúákat expresszáljon. A HDL képes gátolni az endothel adhézio molekúáinak expresszióját.

Végül a HDL direkt endothel hatásához tartozik az, hogy a HDL képes megakadályozni a vasorelaxáció gátlását. Az endothel függő vasorelaxáció során az endothel nitrogén oxid szintetáza által termelt nitrogén oxid relaxálja az artéria simaizom sejtjeit[5]. A macrophagok myeloperoxidázt és foszfolipázt termelnek, amelyek oxidálják az LDL-t, és annak lecitinjét lizolecitinné hidrolizálják[5]. Az oxidált LDL, elsősorban annak magas lizolecitin tartalma gátolja az endothel függő vasorelaxációt[45]: a

lizolecitin az oxidált LDL-ről az endothelre kerül[46], ahol gátolja a nitrogén oxid kibocsájtást[45]. A HDL megköti a lizolecitint, így képes megakadályozni a vasorelaxáció gátlását[47].

#### **4.7 Az atorvastatin**

A 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (HMG-CoA) reduktáz az intracelluláris koleszterin szintézis kulcsenzime, és annak első, sebesség meghatározó lépését katalizálja, amely során a HMG-CoA-t mevalonáttá alakítja[48]. Ezt az enzimet gátolják a sztatinok, más néven a HMG-CoA inhibitorok, melynek az egyik leggyakrabban használt tagja az atorvastatin. A sztatinok elsődlegesen a májban hatva gátolják a de novo koleszterin szintézist, ami a hepatocyták koleszterin raktárának csökkenéséhez vezet[49]. Ennek egyrészt az lesz a következménye, hogy a máj LDL-receptor expressziója fokozódik, amelyen keresztül fokozódik az LDL eltávolítása a plazmából[50]. Ezen LDL-receptoron keresztül a trigliceridben gazdag VLDL eltávolítása is növekszik anélkül, hogy a VLDL előtte LDL-é alakult volna[50], másrészt erősen csökken a máj VLDL termelése[50]. Mindezen folyamatoknak köszönhetően lecsökken a plazmában keringő apo B100-at tartalmazó részecskék száma. A hepatocyták mellett a sztatinok a makrofágok koleszterin szintézisét is gátolják[51].

A többi sztatinhoz hasonlóan az atorvastatin primer hypercholesterolemiában dózisfüggő módon jelentősen csökkenti a plazma koleszterin és LDL-koleszterin szintjét[52], valamint szignifikánsan csökkenti a plazma triglicerid szintjét mind primer hyperkoleszterolémiában, mind pedig primer hypertrigliceridémiában[53;54].

Korábbi tanulmányok vizsgálták az atorvastatin a HDL remodellingben szereplő CETP-re gyakorolt hatását. Guerin és mtsai atorvastatin kezelés hatására kismértékű, de szignifikáns (-7%-os) csökkenést találtak a CETP aktivitásában, amely pontosan tükrözte a CETP koncentrációjában bekövetkezett csökkenést[55]. Szerintük a CETP aktivitásában bekövetkezett csökkenésért az alacsonyabb VLDL szint felel, ugyanis a kevesebb koleszterin észtert felvevő partikula csökkenti a CETP aktivitást. Szintén Guerin és mtsai azt is kimutatták, hogy az atorvastatin CETP aktivitást csökkentő hatása dózistól független[49]. Ugyanakkor más tanulmányok arra hívták fel a figyelmet, hogy a CETP gén expressziója emelkedik a táplálékkal felvett koleszterin vagy az endogén

hyperkoleszterolémia hatására[56]. A CETP gén proximális promoterében azonosították azt a DNS szakaszt, amely felelős a CETP gén szterol hatására kiváltott fokozott aktivációjáért[57]. Az atorvastatin plazma CETP koncentrációját csökkentő hatása lehetséges, hogy a pozitív sterol-regulatory element (SRE) CETP gén expressziójának csökkentésén keresztül jön létre.

Végül a sztatinok paraoxonázra gyakorolt hatását vizsgálva az találták, hogy az atorvastatin és szimvastatin szignifikánsan emelték a szérum PON aktivitását, és csökkentették az oxidatív stresszt[58-60]. Deakin és mtsai kimutatták, hogy a sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2) a PON1 gén proximális promoter régiójához kötődik, és fokozza a promoter aktivitását. A sztatinok egyik antiatherogén hatása valószínűleg úgy valósul meg, hogy a sztatinok növelik az SREBP-2-t, amely következtében a PON expressziója is fokozódik[61].

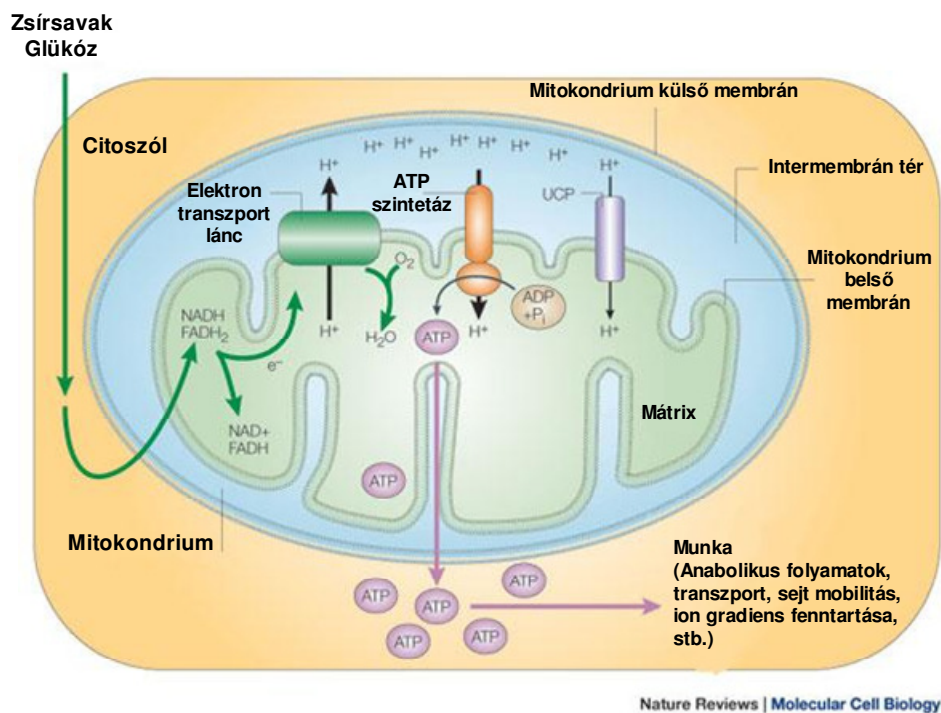
#### **4.8 Az Uncoupling protein-2 (UCP-2)**

A koronária betegség egyik fő rizikó faktora az alacsony HDL szint, míg rizikó szempontjából a meglévő koronária betegséggel egyenrangú rizikót jelent a diabetes mellitus és az ezzel együtt járó diabeteses dyslipidemia (az NCEP ATP III ajánlása szerint). Az uncoupling protein-2 (UCP-2) jelentős szerepet játszik a  $\beta$ -sejtek működésében és fontos szerepe van az inzulin szekréciójában.

Az uncoupling proteinek a mitokondrium belső membránjában található transzporterek. A mitokondrium külső membránja átjárható a kisebb metabolitok számára, míg a belső membrán permeabilitása szorosan szabályozott, amely a magas elektrokémiai gradiens fenntartásához szükséges. Ez a gradiens, amelyet a mitokondrium elektron transzport lánc hoz létre, az energia megőrzéséhez és az ATP szintézishez szükséges. A folyamatot, mely során a respiráció alatt termelődő energia ATP szintézisre fordítódik, oxidatív foszforilációnak nevezzük.

Az oxidatív foszforilációval és az ebből származó energia felhasználásával foglalkozó Peter Mitchell 1961-ben megalkotott kemiozmotikus elmélete hatalmas fordulópontot jelentett. A különböző energia források, úgy mint glükóz, zsír, és aminosavak oxidációja során elektronok termelődnek NADH és FADH<sub>2</sub> formájában[62]. A NADH és a FADH<sub>2</sub> részben a mitokondriumban, részben a citoszólban termelődik,

ahonnan a mitokondriumba szállítódnak. A NADH és a FADH<sub>2</sub> elektronokat ad át a mitokondrium belső membránjában lévő elektron transzport láncnak, amely 5 protein komplexből áll. Az elektronok végighaladnak az elektron transzport láncon, hogy elérjék végső céljukat, a molekuláris oxigént, amely így vízzé redukálódik. Emiatt a folyamatot respirációnak is nevezik. Amint az elektronok végighaladnak az elektron transzport láncon, az I-es, III-as és IV-es komplex adott számú protont pumpál a mitokondrium mátrixából a membrán közti térbe, ezáltal létrehozva a belső membránon keresztül kialakuló proton gradienst. Ez a proton elektrokémiai gradiens két részből áll: az egyik a proton koncentráció, a másik az elektromos potenciál különbség a mitokondrium belső membránjának két oldalán.



Krauss et al. Nature reviews 2005;6: 248-261.

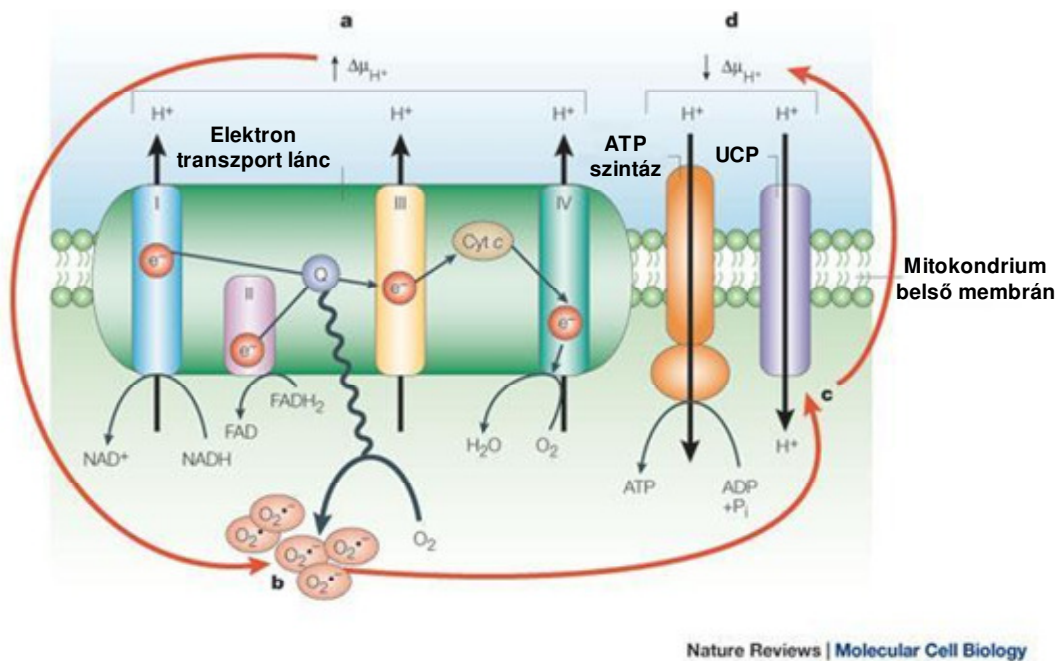
**3. ábra**  
**Az oxidatív foszforiláció és az uncoupling protein-2**

A proton gradiens formájában kialakult és megőrzött energiát az V-ös komplex, azaz az ATP szintetáz használja fel, úgy, hogy amint a protonok visszazállítódnak a membrán közti térből a mitokondrium mátrixába, ATP szintetizálódik ADP-ből és inorganikus foszfátból ( $P_i$ ) (3. ábra). A mitokondrium elektrokémiai proton gradiense a sejtek ATP szintézisének elsődleges forrása. A protonok az ATP szintetázon kívül egy másik módon is vissza tudnak jutni a mitokondrium mátrixába, ez pedig a proton visszacsorgás. Mitchell teóriája szerint az ATP szintézissel nem kapcsolt proton visszacsorgás hőtermelésre használódik fel. Így került felfedezésre a barna zsírszövetben található uncoupling protein, amely nélkülözhetetlen a hideghez való adaptációban, a thermogenesisben. Az ATP szintézis és az elektron transzport lánc szétkcsolása egyrészt az adaptív hőtermelésben játszik fontos szerepet, másrészt lehetőséget biztosít a különböző anyagcsere folyamatokhoz nélkülözhetetlen koenzimek folyamatos oxidációjához.

A barna zsírszövetben található UCP1 klónozással nyert homológjait UCP2-nak és UCP3-nek nevezték el. Az UCP2 és UCP3 génje emberekben a 11-es kromoszómán egymás mellett helyezkedik el. Az UCP1 csak a barna zsírszövetben található, míg az UCP2 számos szövetben és sejt típusban, az UCP3 elsősorban a vázizomban van jelen. Az UCP1 igen nagy koncentrációban fordul elő, a mitokondrium membrán proteinek közel 10 %-át teszik ki[63]. Ez az elektron transzport lánc és az ATP szintézis gyors és teljes szétkapcsolásához, és egyúttal a mitokondrium belső membrán proton konduktanciájának a nagymértékű növekedéséhez szükséges. Ezzel szemben az UCP2 és UCP3 igen kicsi koncentrációban van jelen, a mitokondrium membrán proteinek 0.01-0.1 %-át képezik[64]. Az UCP2 és UCP3 elnevezése félrevezető, hiszen arra utal, hogy az UCP1-hoz hasonlóan képesek az elektron transzport lánc és az ATP szintézis szétkapcsolására, valamint az adaptív hőtermelésre. Bebizonyosodott, hogy az UCP2 és UCP3 szét tudják kapcsolni az elektron transzport láncot és az ATP szintézist, viszont a hőtermelésben nem játszanak szerepet.

Mivel az UCP2 és UCP3 pontos funkciója még a mai napig sem teljesen tisztázott, több lehetséges szerep is felmerült. Az egyik lehetőség, hogy az UCP2 és UCP3 csökkenti a reaktív oxigéngyökök képződését. A sejtek teljes reaktív oxigéngyök termelésének nagy része a mitokondriumból ered. Ennek az a magyarázata, hogy az

elektron transzport láncon végighaladó elektront az oxigén molekula képes felvenni, és szuperoxid anionná alakulni. A reaktív oxigéngyök képződés a mitokondrium belső membránjának proton gradiensétől függ. A megemelkedett proton gradiens és a magas mitokondriális membrán potenciál következtében az elektron transzport lelassul, a mobil elektron szállítók féléletideje megnő, amelyek végül az I-es és a III-as komplexen a molekuláris oxigén egyetlen elektron által kiváltott részleges redukciójához vezetnek, ezáltal az elektron transzport láncban a reaktív oxigéngyök képződés fokozódik. Az UCP2 által mediált protoncsorgás (ún. mild uncoupling) enyhén csökkenti a proton gradienst, ezáltal csökkenti a reaktív oxigéngyök képződést az I-es és III-as komplexeken.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology  
 Krauss et al. Nature reviews 2005;6: 248-261.

#### 4. ábra

#### Az uncoupling protein-2 és a reaktív oxigéngyök képződés

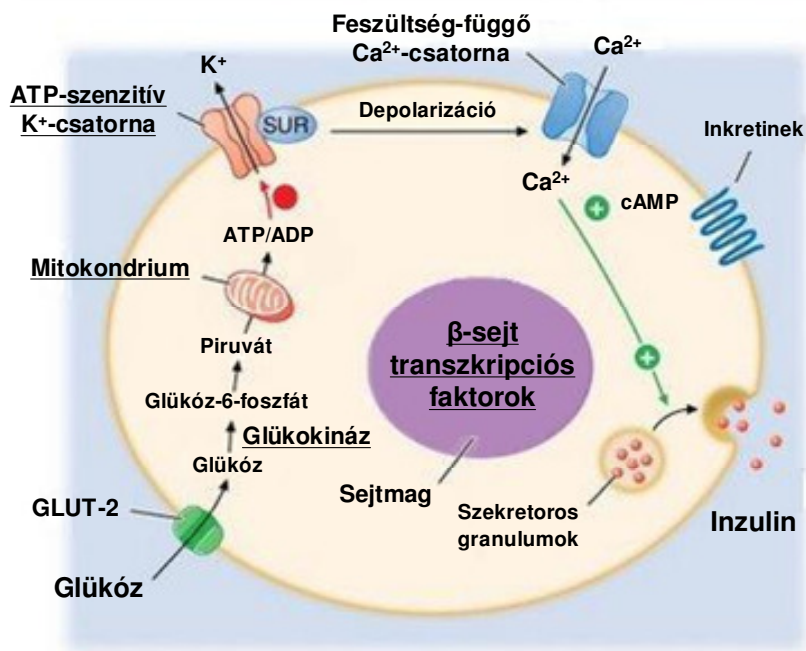
A „mild uncoupling”, azaz protoncsorgás azt jelenti, hogy az UCP2 enyhén növeli a proton vezetőképességét, ezáltal enyhén csökkenti a proton gradienst, ugyanakkor ATP

továbbra is termelődik[65], ellentétben az UCP1-nal, amely teljesen szétkapcsolja az ATP szintézist és az elektron transzport láncot. Azonban az UCP2 alaphelyzetben nem befolyásolja a proton konduktanciát, az UCP2 proton konduktancia növekedéséhez először az UCP2-nak aktiválódnia kell. A reaktív oxigéngyökök az UCP2-t aktiválni képesek, így egy lokális feedback mechanizmust hoznak létre (4. ábra).

Az UCP2 másik lehetséges funkciója az inzulin szekréció szabályozása.

#### **4.9 Az inzulin szekréció folyamata**

A hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeinek a feladata, hogy szükség szerint inzulint szintetizáljanak, és szekretáljanak a vércukor háztartás szabályozása céljából. Ahhoz, hogy ezt a feladatot megfelelően el tudják látni, a  $\beta$ -sejtek folyamatosan ellenőrzik a tápanyag ellátást, metabolizálják a rendelkezésre álló tápanyagokat, és a metabolizmusuk mértékétől függően változik a funkciójuk. A tápanyagok közül a glükóz metabolizmusából származó intracelluláris szignálok képezik az inzulin szekréció legerősebb stimulusát. Ez a mechanizmus egyedülálló, hiszen az inzulin szekréciót nem receptor-ligand kölcsönhatás, hanem a glükóz intracelluláris metabolizmusa hozza létre. A glükóz a nagy kapacitású glucose transporter-type 2-n (GLUT-2) keresztül jut be a  $\beta$ -sejtekbe[66]. A glükózt ezután a glükokináz (GK), a  $\beta$ -sejtekben a glikolízis első enzime, foszforilálja, amely lényegében a glükóz érzékelője. A glükóz végigmegy a glikolízis, a Krebs-ciklus és az oxidatív foszforiláció folyamatán, amely ATP termelődéshez vezet. Az ATP szint emelkedése miatt kialakuló ATP/ADP hányados hirtelen változásai az ATP-szenzitív  $K^+$ -csatorna bezáródásához vezetnek. A depolarizálódó  $\beta$ -sejten lévő feszültség-függő L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák kinyitnak, a citoplazmatikus szabad  $Ca^{2+}$ -koncentráció  $[Ca^{2+}]_i$  megemelkedik, amely az inzulint tartalmazó vezikulák exocitózisához vezet[66] (5. ábra). Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy az elektron transzport és az ATP szintézis szoros kapcsolata milyen jelentőséggel bír a  $\beta$ -sejtek mitokondriumában, hiszen a citoplazma ATP/ADP hányadosa a központi szignálja a glükóz stimulált inzulin szekréciónak.



Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

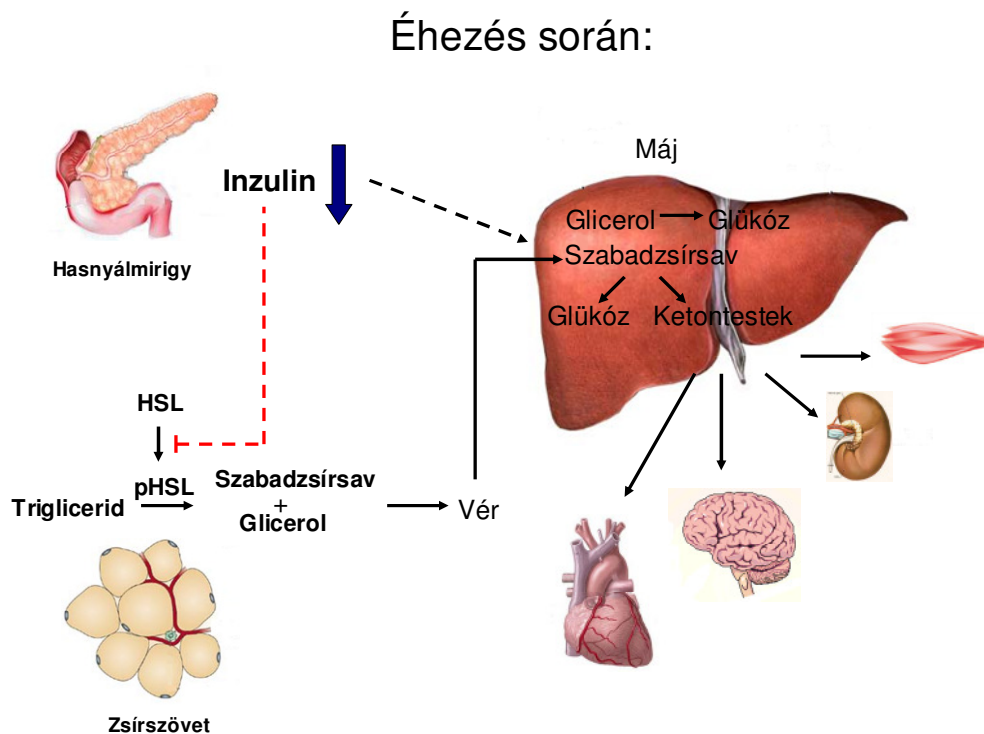
## 5. ábra

### Az inzulinszekréció folyamata

Alacsony glükóz szint esetén, a  $\beta$ -sejtek a szabad zsírsavak oxidálásával fedezik az energia szükségletüket. Amikor a glükóz szintje újra megemelkedik, a zsírsav oxidáció csökken, és a glükóz oxidáció fedezi ismét a  $\beta$ -sejtek energia szükségletének nagy részét. A zsírsav oxidációról a glükóz oxidációra történő váltás úgy valósul meg, hogy a glükóz gátolja a zsírsav oxidációt. Ennek első lépése az, hogy a Krebs-ciklus intermediereinek a szintje megemelkedik, amely fokozott citrát képződéshez vezet. A fokozott mitokondriális citrát képződés megnöveli a citoszól citrát szintjét. A citoszólban lévő citrát malonyl-CoA-vá alakul, amely allosztérikus inhibitor a mitokondriális membrán enzimjének, a carnitine palmitoyltransferase-1-nek (CPT-1). A CPT-1 szabályozza a hosszú láncú acyl-CoA oxidációra való szállítását a mitokondriumba. Tehát a malonyl-CoA-nak köszönhetően jön létre a váltás a zsírsav és glükóz oxidáció között[66].

#### 4.10 Fiziológias változások éhezés során

Az evolúció során az élőlényeknek alkalmazkodniuk kellett a folyamatosan változó táplálékellátáshoz. A táplálék hiányára a sejtek úgy válaszolnak, hogy fenn tudják tartani a sejtek energia ellátását, hogy az éhezésből helyre tudjon állni[67]. Az éhezésre adott válasz szoros hormonális kontroll alatt áll, amelynek központjában az inzulin hatásának gátlása áll. Ilyenkor ugyanis a szénhidrátan alapuló energiaellátásról át kell váltani az elsősorban zsír oxidációból származó ellátásra (6. ábra).

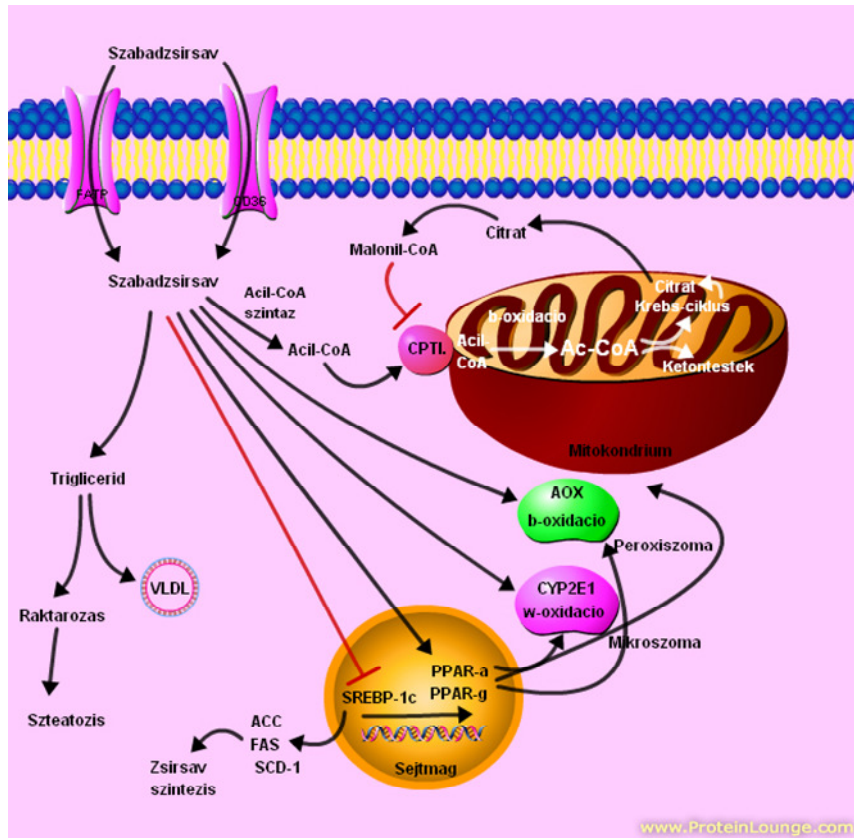


6. ábra

#### Éhezés során bekövetkező változások

Éhezéskor a zsírszövetben tárolt trigliceridek szabad zsírsavakká hidrolizálódnak, majd a keringésbe kerülnek, hogy más szöveteket lássanak el energiával[68]. Az egyik triglicerid hidrolízisben szereplő enzim a hormon-szenzitív lipáz (HSL)[69]. Az HSL egyik fő szabályzója az inzulin, amely gátolja az HSL-t, a másik az epinefrin, amely serkenti az HSL-t. Körülbelül 24 órás éhezést követően megemelkedik a szérumban szabad

zsírsav szintje, amely a lipolízis aktiválódását jelzi[70]. A keringésből a májba felvett szabad zsírsavak a májsejtekben felhalmozódnak, és a mitokondriumban acetyl-CoA-vá oxidálódnak ( $\beta$ -oxidáció). Az acetyl-CoA nagy része ketontest ( $\beta$ -hidroxibutirát, aceton, acetoacetát) képződésre használódik fel, vagy a legtöbb szövethez hasonlóan az acetyl-CoA belép a Krebs-ciklusba, és ATP képződik belőle (7. ábra).



7. ábra

### Éhezés alatt a májsejtekben lejátszódó változások

A májban felhalmozódó zsírsavakat a citoszólban lévő enzim, az acyl-CoA szintáz acyl-CoA-vá alakítja. Az acyl-CoA nem tud közvetlenül keresztül jutni a mitokondrium belső membránján, ezért az acyl-CoA mitokondriumba történő bejutása kulcsfontosságú szabályzó pontja a  $\beta$ -oxidációnak[71]. Amint átjut a mitokondrium belső membránján, az oxidáció teljesen végbe megy, és acetyl-CoA képződik. Az acyl-CoA mitokondriumba történő szállításában részt vevő egyik protein a carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1). Ebből következik, hogy a  $\beta$ -oxidáció mértékének

szabályozásáért a CPT-1 felel. A CPT-1 fiziológias inhibitora a malonyl-CoA[72], amely elégséges szénhidrát ellátás esetén létrehozza a  $\beta$ -oxidációról a glükóz oxidációra történő váltást az előző pontban leírtaknak megfelelően. Emellett még megjegyzendő, hogy a malonyl-CoA a zsírsav szintézis szubsztrátja, és ezért a CPT-1 gátlásának másik szerepe az, hogy elkerülje a párhuzamosan zajló zsírsav szintézist és oxidációt[73].

Éhezés során a májra hárul az a feladat, hogy energiát szolgáltatson a szervezet többi részére. A máj először a glikogén raktárakat használja fel, hogy glükózt termeljen az extra-hepatikus szövetek számára. 24 órás éhezés után a májnak fenn kell tartania a Krebs-ciklust, hogy ATP-t termeljen saját maga számára, és a glükoneogenezis során glükózt termeljen az extra-hepatikus szöveteknek. Mivel ez a két folyamat ugyanazokat az intermediereket használja, a Krebs-ciklus és a glükoneogenezis lelassul, az acetyl-CoA felhalmozódik a mitokondriumban, amely kondenzációs folyamatok révén ketontest képződéshez vezet[69]. A ketontestek közül az acetoacetát és a  $\beta$ -hidroxibutirát metabolikusan aktív, valamint a ketontestek, különösképpen a  $\beta$ -hidroxibutirát szerepet játszanak a lipolízis szabályozásában, ugyanis csökkenteni tudják a lipolízis mértékét, ezáltal meghosszabbítják a lipid raktárak fennállását, és növelik a hosszú távú túlélést[74]. A ketontestek a májból az extra-hepatikus szövetekbe szállítódnak, hogy ott energia forrásként szolgáljanak.

Végül fontos megemlíteni az éhezés során a májban bekövetkező fiziológias változások szabályozásában központi szerepet játszó peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -t (PPAR $\alpha$ ). A PPAR $\alpha$  a peroxisome proliferator-activated receptor-ok (PPAR-ok) közé tartozik. A PPAR-ok ligand által aktivált transzkripciós faktorok, amelyek az adott gén átíródását kis lipofil molekulák, mint például zsírsavak, hatására szabályozzák. A PPAR $\alpha$  szabályozza a máj zsír katabolizmusában szerepet játszó gének expresszióját úgy, mint a zsírsav oxidáció (mikroszomális, peroxisomális és mitokondriális), zsírsav felvétel és/vagy kötődés és lipoprotein összeszerelés és szállítás génjeit[75;76]. A PPAR $\alpha$ -tól függő jelátvitel számára az éhezés jelenti az egyik fiziológias kihívást, hiszen nagy mennyiségű zsírsav szállítódik a májba oxidáció céljából. Míg a PPAR $\alpha$  szabályozza a zsírsav katabolizmust a májban, addig a PPAR $\gamma$  befolyásolja a zsírsav tárolást a zsírszövetben .

#### 4.11 Az UCP2 szerepe a $\beta$ -sejtekben és éhezéskor

Az előző pontban leírtaknak megfelelően a  $\beta$ -sejtekben az ATP szint emelkedésének kiemelt szerepe van az inzulin szekréciónak. Az UCP2 protoncsorgás révén csökkenti a proton gradienst, ezáltal az ATP szintézist, végül az alacsonyabb ATP szint csökkent inzulin szekréciónak vezet. Mindezekből következik az UCP2 negatív hatása a glükóz stimulált inzulin szekréciónak. Meggyőző bizonyítékaul szolgáltak ennek a feltételezésnek az UCP2 knockout egereken végzett kísérletek. Az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek szigetsejtjeinek ATP szintje magasabb volt[77], és akármilyen glükóz koncentrációval stimulálták az inzulin szekréciónak, az emelkedettebb volt a vad típusú egerek szigetsejtjeihez képest[77]. Az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek szérumjának inzulin koncentrációja magasabb, míg a szérum glükóz szintje alacsonyabb volt, valamint ezek az egerek in vivo a vércukor szint emelkedésre több inzulint szekretálnak[77]. A  $\beta$ -sejtekben az UCP2 működésének egyik lehetséges szabályozója a zsírsav oxidáció, ugyanis a zsírsavak  $\beta$ -oxidációja során fokozottan termelődnek reaktív oxigéngyökök, amelyek aktiválják az UCP2-t[78;79]. Hasonló a helyzet a hyperglycaemiával kapcsolatban, amikor szintén reaktív oxigéngyököktől függő módon csökken az inzulin termelés. Hyperglycaemiában a glükóz metabolizmusa fokozódik, több elektron kerül az elektron transzport láncba, több proton pumpálódik a membrán közötti térbe, végül magasabb lesz a membrán potenciál[62]. Ennek következtében az előbbieken leírt módon több reaktív oxigéngyök képződik, amely fokozott UCP2 aktivitáshoz vezet, így csökken a glükóz stimulált inzulin szekréciónak. Ezek alapján az az elképzelés alakult ki, hogy a fokozott UCP2 expresszió a  $\beta$ -sejtek funkció zavarához és 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásához vezethet. Az UCP2 reaktív oxigéngyök ellenes hatásának jelentőségére hívja fel a figyelmet az a tény, hogy a  $\beta$ -sejtekből szinte teljesen hiányoznak az antioxidáns enzimek, így a  $\beta$ -sejtek fokozottan érzékenyek az oxidatív stresszel szemben[80;81].

Az UCP2 aktivitás fontos szerepet játszhat a  $\beta$ -sejtek folyamatosan változó táplálék ellátásra adott fiziológias válaszána koordinálásában. Az UCP2 szerepe jelentős lehet az inzulin szekréciónak gátlásában, mikor a vércukor szintje alacsony. Éhezéskor a vér nem észterifikált zsírsav szintje megemelkedik, ezen zsírsavak oxidálódnak, amely során képződő reaktív oxigéngyökök az UCP2 expressziójához és aktiválásához vezetnek[75;82]. Ennek következtében az inzulin szekréciónak csökken, ami megelőzi a

hypoglycaemia kialakulását éhezéskor. Ezzel szemben étkezés után mind a glükóz, mind a zsírsav szint megemelkedik, ami az éhezéshez hasonlóan a megemelkedett reaktív oxigénradikálok révén növeli az UCP2 aktivitást. Étkezést követően nagymértékű inzulin szekrécióra van szükség, melyet az UCP2 hatása valamelyest csökkent[83]. Az inzulin szekréció folyamatos fenntartásához az ATP/ADP hányadoson kívül még szükség van más inzulin szekréciót fokozó szignálra. Ezen szignálokot olyan molekulák adják, amelyek szintje a Krebs-ciklus aktivitásától függ. Étkezés után a tápanyag bőség miatt a rendszer túlterheltté válik, azaz a Krebs-ciklus lelassul a megemelkedett proton gradiens miatt. Az UCP2-nak köszönhetően létrejövő protoncsorgás csökkenti a proton gradienst, ezáltal a Krebs-ciklus megfelelő sebességgel tud működni és termelni az inzulin szekréció fenntartásához szükséges szignálokot. Az egyensúly fenntartásához finom szabályozásra van szükség, amely valószínűleg az UCP2 rendkívül rövid, 30 percnyi félléletidejének köszönhető[83]. Összefoglalásként elmondható, hogy az UCP2 éhezéskor csökkenti az inzulin szekréciót, ugyanakkor étkezés után fenntartja a glükóz stimulált inzulin szekréciót.

## **V. CÉLKITŰZÉSEK**

### **5.1 Az atorvastatin kezelés hatása a lipid paraméterekre és a HDL remodellingben szereplő enzimekre**

Mivel az LDL terápiás célértéket napi 20 mg-os atorvastatin dózissal a betegek nagy részében el tudjuk érni, mi elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogyan változik a HDL szintje ugyanezen atorvastatin dózis hatására. Az atheroszklerózis elleni védelemben a HDL szintje mellett kiemelt jelentősége van a HDL minőségének, amely a HDL antiatherogén aktivitásáért felel. A HDL funkcióját és minőségét elsősorban a HDL-hez kapcsolódó enzimek és proteinek határozzák meg, ezért az apo A-I szintje mellett arra is kíváncsiak voltunk, hogyan változik a HDL remodellingben szereplő LCAT és CETP aktivitása és funkciója 20 mg-os atorvastatin kezelés hatására. Végül célunk volt még, hogy megvizsgáljuk az atorvastatin hatását a szérumban a paraoxonáz-1 koncentrációra és aktivitásra, amelyet az atorvastatin a HDL remodellingben szerepet játszó enzimek aktivitására hatva befolyásolhat.

## 5.2 Az UCP2 hatása a zsíryanycserére éhezéskor

Korábbi vizsgálatok arra hívták fel a figyelmet, hogy az UCP2 a  $\beta$ -sejtekben szerepet játszhat azok károsodott inzulin szekréciójában és ezáltal a 2-es típusú diabetes kialakulásában. Jelen munkámban azt az elképzelést vizsgáltuk, hogy éhezéskor a  $\beta$ -sejtekben megemelkedő UCP2 a glükóz stimulált inzulin szekréció csökkentésére irányuló fiziológias válasz, amely ezáltal serkenti a perifériás lipolízist és a máj lipid felhasználását, azaz az UCP2 inzulin szekréciót befolyásoló hatása szükséges ahhoz, hogy éhezés hatására létrejöjjön a szénhidrát oxidációról a zsírsav oxidációra történő váltás. Az elképzelésünket *ucp2<sup>-/-</sup>* és vad típusú egereken vizsgáltuk, és kíváncsiak voltunk arra, hogy az UCP2 hiánya 24 és 72 órás éhezés hatására milyen változásokat idéz elő a zsíryanycserében.

## VI. MÓDSZEREK

### 6.1 Betegek

Az atorvastatin kezelés hatását 33 II. a és II. b típusú primer hyperlipoproteinaemiában szenvedő betegen vizsgáltuk. A betegek között 17 férfi és 16 nő szerepelt, az átlagéletkor  $62,9 \pm 5,55$  év volt, a testtömeg-index pedig  $26,9 \pm 2,86$  kg/m<sup>2</sup> volt. A betegek hat hétig tartó gyógyszer kiürítő periódust követően kerültek a vizsgálatba bevonásra. Ez alatt az NCEP Step1-es diétáját kellett tartaniuk, amely szerint a napi koleszterin bevitelnek 300 mg-nál kevesebbnek kellett lennie, és a zsiradékból származó energia a napi kalória bevitel 30%-át nem haladhatta meg, és ennek <10%-a lehetett telített zsír. Ezt követően 3 hónapig napi 20 mg atorvastatin kezelésben részesültek a betegek a standard diéta mellett.

A betegek más gyógyszeres kezelésben nem részesültek, és nem volt más definitív betegségük. A vizsgálatba 21 és 70 éves kor közötti, korábban nem kezelt II. a és II. b típusú hyperlipidémias betegek kerültek beválasztásra. A II. a és II. b típusú hyperlipidémia diagnosztikai kritériuma volt: LDL koleszterin > 4.2 mmol/l  $\pm$  triglyceride > 2.2 mmol/l. A betegek vizsgálatba történő beválasztásakor kizáró kritérium volt: a diabetes mellitus, a hypertensio, koronária betegség, myocardialis infarctus, májbetegség, az epekövesség, dohányzás, alkoholizmus, antikoaguláns vagy

kortikoszteroid vagy korábbi lipid csökkentő kezelés, malignus alapterbetegség, microalbuminuria, terhesség, szoptatás és 130 µmol/L feletti szérumszint kreatinin szint.

A vizsgálatot a DE OEC etikai bizottsága engedélyezte, a betegek felvilágosítás után írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatba.

## **6.2 Lipid paraméterek meghatározása**

A vérminták (5 ml vénás vér) levétele legalább 12 óra éhezés után történt. A lipid paramétereket azonnal meghatároztuk. A többi méréshez alacsony fordulatszámú centrifugálással nyert szérumszint a mérésig -20°C-on volt tárolva. A kezelés megkezdése előtt, illetve a 3 hónapos kezelést követően végeztük a koleszterin, triglicerid, HDL koleszterin, LDL koleszterin, apo A-I, apo B100, Lp(a), paraoxonáz-, CETP-, LCAT-aktivitás és oxidált LDL meghatározását.

A lipid meghatározások a DE OEC KBMPI-ben Cobas Integra 700 Analyser (Roche, Basel, Svájc) készüléken validált analitikai módszerekkel történtek. Az LDL koleszterin értékét a Friedewald egyenlet segítségével, indirekt módon határoztuk meg (4,5 mmol/L triglicerid szint alatt). Az apolipoproteinek vizsgálata immun-nephelometriás módszerrel történt (Orion Diagnostica kit).

Az ox-LDL-t szendvics ELISA módszerrel mértük. A mérés során az ox-LDL ellenes antitestet határoztuk meg Wak-Chem-Med (Berlin, Németország) kittel. A plazmában lévő ox-LDL az inkubáció során reagál az egérben termeltetett, monoklonális, ox-LDL ellenes antitesttel. A nem reaktív plazma komponensek eltávolítása után a szilárd fázishoz kötött ox-LDL-t peroxidázzal konjugált, apolipoprotein B ellenes antitest ismeri fel. A kötött konjugátumot tetrametil benzidin reakcióval detektáljuk, és spektrofotometriásan mérjük. Az intra- és inter-assay koefficiens 5.4% és 8.3 volt.

## **6.3 Az LCAT aktivitás meghatározása**

Az LCAT aktivitást kereskedelmi forgalomban lévő kittel határoztuk meg (Roar Biomedical Inc.). A plazmát a fluoreszcens szubsztráttal inkubáltuk, majd az intakt szubsztrát fluoreszcens intenzitását 470nm-en Hitachi F-4500 Fluorescence Spectrophotometer-rel mértük meg. Amint az LCAT hidrolizálta a szubsztrátot, egy monomer képződött, amelyet 390 nm-en detektáltunk. Az LCAT aktivitást a 470 nm-en

és 390 nm-en mért emisszió intenzitásának változásából számoltuk ki. Az intra- és inter-assay koefficiens <5 % volt.

#### **6.4 A CETP aktivitás meghatározása**

A CETP aktivitást szintén egy kittel mértünk (Roar Biomedical Inc.). A kit donor (szintetikus foszfolipid és koleszterin észter) és akceptor (VLDL) partikulát tartalmaz. A méréshez használt puffert 150 mM NaCl, 10 mM Tris és 2 mM EDTA felhasználásával állítottuk össze, a pH-ját 7,4-re állítottuk be. 6 µl plazmát 20 µl donor és akceptor eleggyel és 1000 µl pufferrel kevertük össze. A CETP által mediált koleszterin észter transzfert a donorról az akceptor molekulára a fluoreszcens koleszterin-linoleát fluoreszcencia növekedéséből határoztuk meg Hitachi F-4500 Fluorescence Spectrophotometer segítségével. Az excitáció 465 nm-en, az emisszió 535 nm-en történt. Az intra- és inter-assay koefficiens <3 % volt.

#### **6.5 A paraoxonáz aktivitás és koncentráció meghatározása**

A szérum paraoxonáz aktivitás meghatározása spektrofotometriásan történt paraoxon szubsztrát (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát; Sigma) felhasználásával. A méréskor 50 µl szérumhoz 1 ml Tris/HCl puffert (100 mM, pH 8,0) adtunk, amely 2 mM CaCl<sub>2</sub>-t és 5,5 mM paraoxont tartalmazott. A paraoxonáz hatására paraoxonból képződő 4-nitrofenol keletkezésének sebességét 412 nm-en és 25°C-on határoztuk meg Hewlett-Packard 8453 UV-Visible spektrofotométerrel. Az enzim aktivitást a moláris extinkciós koefficiens (17100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) segítségével számoltuk ki. A paraoxonáz aktivitás 1 unitja megfelel percenként 1 nmol 4-nitrofenol keletkezésének. A PON/HDL arányt úgy számoltuk ki, hogy a PON aktivitást elosztottuk a HDL-koleszterin koncentrációjával.

A szérum PON koncentrációját ELISA-val határoztuk meg (WAK-Chemie Medical GmbH). A szérum koncentrációt tisztított paraoxonáz segítségével készített standard görbével határoztuk meg. Az mérés egyenes szakasza 0.17 és 1.36 µg PON/ml közé esett. Az intra-assay koefficiens 3.2 % volt.

A PON specifikus aktivitást úgy számoltuk ki, hogy a PON aktivitást elosztottuk a PON koncentrációval, és nmol min<sup>-1</sup> µg<sup>-1</sup>-ben fejeztük ki.

## 6.6 Az állatok kezelése

Az *ucp2*-knockout egerek létrehozását korábban már leírták[77]. Az *ucp2* génre heterozigóta (*ucp2<sup>+/-</sup>*) egereket Dr. Bradford B. Lowelltól (Harvard Medical School, Boston, MA) kaptuk. Az *ucp2* knockout (*ucp2<sup>-/-</sup>*) egereket a heterozigóta egerek keresztezésével nyertük. A genotípust az egerek farkából nyert DNS-ből a korábban leírt módon határoztuk meg[84].

A kísérletünkhöz 12-14 hetes hím *ucp2*-t nem expresszáló (*ucp2<sup>-/-</sup>*) egereket valamint vad típusú társaikat használtuk. Az állatokat 24 vagy 72 órán át éhezettük, míg a kontroll csoportba tartozó egerek korlátlanul fogyaszthatták a hagyományos egér eledelt. Az állatok mindkét csoportban korlátlan mennyiségű vizet ihattak. A 24 vagy 72 óras éheztetés után az egereket leöltük. A testsúlyukat megmértük, a vércukor szinteket a farkok vénából nyert vérből meghatároztuk. További biokémiai vizsgálatokhoz szív punkcióval nyertünk vért. Az egerek máját és az epididymis körüli zsírszövetét eltávolítottuk, súlyukat megmértük, végül vagy folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk vagy szövettani vizsgálatra készítettük elő. Az állatokon végzett összes kísérletet a Rhode Island Hospital etikai bizottsága jóváhagyta.

## 6.7 Biokémiai mérések

A nem észterifikált zsírsav (Wako, Richmond, VA), a triglicerid és a  $\beta$ -hidroxibutirát (Stanbio, Boerne, TX) plazma szintjének meghatározásához kereskedelmi forgalomban lévő kitet használtunk. A plazma inzulin szintjét ELISA-val mértük meg (Linco, St. Charles, MO). A teljes máj szövet lipid tartalmát kloroform-metanol-os extrakcióval határoztuk meg[85]. A máj szövetet kloroform és metanol megfelelő arányú keverékével homogenizáltuk, majd további kloroformot és vizet adtunk a keverékhez, miközben tovább folytattuk a homogenizálást. A homogenizátumot leszűrtük, és pár percig állni hagytuk, hogy a rétegek szétváljanak. Az alsó réteget a kloroform képezi, míg a felsőt a metanol és víz keveréke. A kloroform réteg tartalmazza a megtisztított lipideket. A felső réteg eltávolítása után a kloroform réteget evaporáció révén kiszárítottuk, és a maradvány súlyát megmértük, és a következő egyenlet alapján kiszámoltuk a teljes lipid tartalmat: (a lipid súlya az adott alikvotban x a kloroform réteg térfogata)/aliquot térfogata.

## 6.8 Szövetteni vizsgálatok

A májak szövetteni vizsgálatra szánt darabját Tissue-Tek mediumba (Sakura, Torrance, CA) ágyasztuk be, majd abban lefagyasztottuk. A metszetek elkészítéséhez beágyazott máj szövetekből 4  $\mu\text{m}$  vastagságú szekciók készültek. A májban történő lipid akkumuláció mértékének megítéléséhez az Oil red O-val festett máj metszetek képeit digitalizáltuk (MicroPublisher 3.3 RTV; Qimaging, Burnaby, British Columbia). Az Oil red O-val festett területet egy konstans optikai denzitással rendelkező háttér felett rögzítettük Image Pro Plus 5.1 szoftver segítségével (MediaCybernetics, Silver Spring, MD), hogy ki tudjuk számolni azt, hogy a terület hány százaléka festődött pozitívan Oil red O-val. Az állandó optikai körülményeket az egész morfológiai vizsgálat alatt megtartottuk.

## 6.9 Western blot

A májdarabokat az alábbi pufferben emésztettük meg: 50 mM HEPES (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 % Tween-20, 10 % glycerol, 0.1 mM Na-ortovanadát, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  apoprotinin, és 1 mM  $\beta$ -glicerofoszfát. A kapott lizátumok fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay Reagent Kit-tel (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) mértük meg. Az azonos mennyiségben betöltött fehérjéket 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd PVDF membránra (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA) transzferáltuk. Az immunoblotokat foszforilált hormone-sensitive lipase (HSL) (Cell Signaling, Danvers, MA), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  (Sigma), PPAR- $\gamma$ , és sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) ellenes poliklonális nyúl antitestekkel kezeltük. Másodlagos antitestként számarban termeltetett, tormaperoxidázzal jelölt antitestet (Santa Cruz) használtunk. A blotokat kemilumineszcenciás (ECL, PerkinElmer) módszerrel hívtuk elő. Az egyenes töltést  $\beta$ -actinnal igazoltuk.

## 6.10 Real-time PCR

Az RNS-t TRIzol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA) vontuk ki a folyékony nitrogénben lefagyasztott máj mintákból, miközben a genomikus DNS szennyeződéstől

RNase-mentes DNase (Roche, Indianapolis, IN) emésztéssel tisztítottuk meg mintáinkat. Ezután következett a reverz transzkripció a first-strand cDNA synthesis kit-tel (Roche). A PCR-okat iCycler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) és SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével végeztük. Referencia génként aTATA box-binding proteint (TBP) használtuk. A teljes hosszúságú egér TBP gént (957 bázispár) amplifikáltuk, és pCR2.1 vektorba klónoztuk, majd ebből hígítási sort készítettünk, amely a standard görbe felállításához volt szükséges. A minták 5 ng RNS-nek megfelelő mennyiségű cDNS-ét használtuk templátként a gén specifikus primerekkel (1. táblázat). Minden egyes mintát a saját TBP mRNS tartalmára normalizáltuk. Az adatokat az etetett kontrolhoz hasonlított relatív bőségben adtuk meg.

<b>NCBI</b>			
<b>Protein</b>	<b>Accession No.</b>	<b>Forward primer (5'- 3')</b>	<b>Reverse primer (3'-5')</b>
ACC- $\alpha$	NM_133360	CAGGGACTATGTCCTGAAGCA	GGTCATGTGGACGATGGAGT
AOX	NM_015729	TTATGCGCAGACAGAGATGG	TATGTGGCAGTGGTTTCCAA
CPT1A	NM_013495	CAGCAGCAGGTGGAAGTGT	GGAAACACCATAGCCGTCAT
CYP2E1	NM_021282	CCAAAGAGAGGCACACTTCC	GCACAGCCAATCAGAAAGGT
FAS	NM_007988	GGCATCATTGGGCACTCCTT	GCTGCAAGCACAGCCTCTCT
mtHMGS	NM_008256	CCTACCGCAAGAAGATCCAG	GAAAGGCTGGTTGTTTCCAG
MCAD	NM_007382	TGATCAACGCGCACATTC	GAACGTTCCCAGGCCAAG
MTPP	NM_008642	GGATCCTCTTCTGCCTATACTGG	TGTCAAGGCTGTATGTGGAC
SCD-1	NM_009127	CCTCCGAAATGAACGAGAG	CAGGACGGATGTCTTCTTCCA
TBP	NM_013684	ACTTCGTGCAAGAAATGCTGAA	TGTCCGTGGCTCTCTTATTCTCA

## 1. táblázat

### A vizsgált gének primer-jeinek szekvenciái

#### 6.11 Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez az SAS for Windows 6.11 számítógépes programot használtuk. Eredményeink bemutatásához leíró analízist (átlag  $\pm$  standard deviáció),

értékeléséhez pedig párosított Student's *t*-próbát használtunk. Az eredmények eloszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük. A nem normális eloszlású paramétereket logaritmusosan átalakítottuk, hogy kijavítsuk a torzulásokat. A  $p < 0,05$  valószínűséget tekintettük a szignifikancia szintjének.

Az egereken végzett kísérletek eredményeit átlagértékként és annak közepes hibájaként (átlag  $\pm$  SEM) adtuk meg. Az adatok statisztikai összehasonlítását nem párosított Student's *t*-próbával, az összetett összehasonlításokat ANOVA segítségével végeztük. Az összefüggéseket Fisher-féle valószínűségszámítással, Mann-Whitney-féle U-teszttel, és binomiális számítással vizsgáltuk. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.

## VII. EREDMÉNYEK

### 7.1 A lipid paraméterek, LCAT, CETP és paraoxonáz-1 aktivitások változásai

	<b>Kezelés előtt</b>	<b>Kezelés után</b>	<b>P</b>
<b>Koleszterin</b> (mmol/l)	6.68 $\pm$ 0.61	4.57 $\pm$ 0.78	$p < 0.001$
<b>Triglicerid</b> (mmol/l)	1.75 $\pm$ 0.77	1.20 $\pm$ 0.31	$p < 0.001$
<b>LDL koleszterin</b> (mmol/l)	4.39 $\pm$ 0.50	2.65 $\pm$ 0.54	$p < 0.001$
<b>HDL koleszterin</b> (mmol/l)	1.49 $\pm$ 0.29	1.43 $\pm$ 0.31	Ns
<b>apo A-I</b> (g/l)	1.649 $\pm$ 0.24	1.647 $\pm$ 0.21	Ns
<b>apo B100</b> (g/l)	1.40 $\pm$ 0.24	0.88 $\pm$ 0.16	$p < 0.001$
<b>oxLDL</b> (U/l)	60.49 $\pm$ 15.94	32.65 $\pm$ 9.43	$p < 0.001$

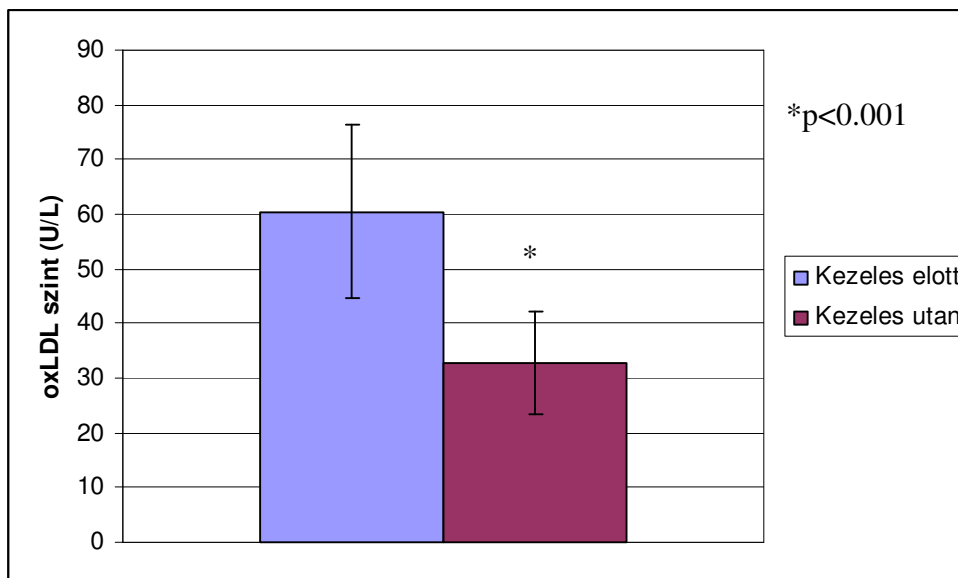
#### 2. táblázat

A lipid paraméterek változásai az atorvastatin kezelés hatására

Vizsgálataink során először a lipid paraméterek változásaira voltunk kíváncsiak atorvastatin kezelést követően. Megállapíthatjuk, hogy eredményeink szerint az atorvastatin kedvező hatást fejtett ki a lipid paraméterekre (2. táblázat).

A kiindulási értékhez viszonyítva az atorvastatin a szérum koleszterin ( $6,68 \pm 0,61$ -ről  $4,57 \pm 0,78$  mmol/l-re;  $p < 0,001$ ) és triglicerid ( $1,75 \pm 0,77$ -ről  $1,20 \pm 0,31$  mmol/l-re;  $p < 0,001$ ) szintjét szignifikánsan csökkentette. Emellett szignifikáns csökkenést találtunk az LDL koleszterin ( $4,39 \pm 0,50$ -ről  $2,65 \pm 0,54$  mmol/l-re;  $p < 0,001$ ) és az LDL fő apolipoproteinje, az apo B100 ( $1,40 \pm 0,24$ -ről  $0,88 \pm 0,16$  g/l-re;  $p < 0,001$ ) szintjében is. Az NCEP ATP III által ajánlott LDL célértéket a betegek 92%-a érte el. Ugyanakkor a kezelés a HDL koleszterin ( $1,49 \pm 0,29$ -ről  $1,43 \pm 0,31$  mmol/l-re) és a HDL fő apolipoproteinje, az apo A-I ( $1,649 \pm 0,24$ -ről  $1,647 \pm 0,21$  g/l-re) szintjét szignifikánsan nem változtatta meg.

Az oxidált LDL változását is vizsgáltuk a kezelést követően, és szignifikáns csökkenést találtunk ( $60,49 \pm 15,94$ -ről  $32,65 \pm 9,43$  U/l-re;  $p < 0,001$ ) (8. ábra).

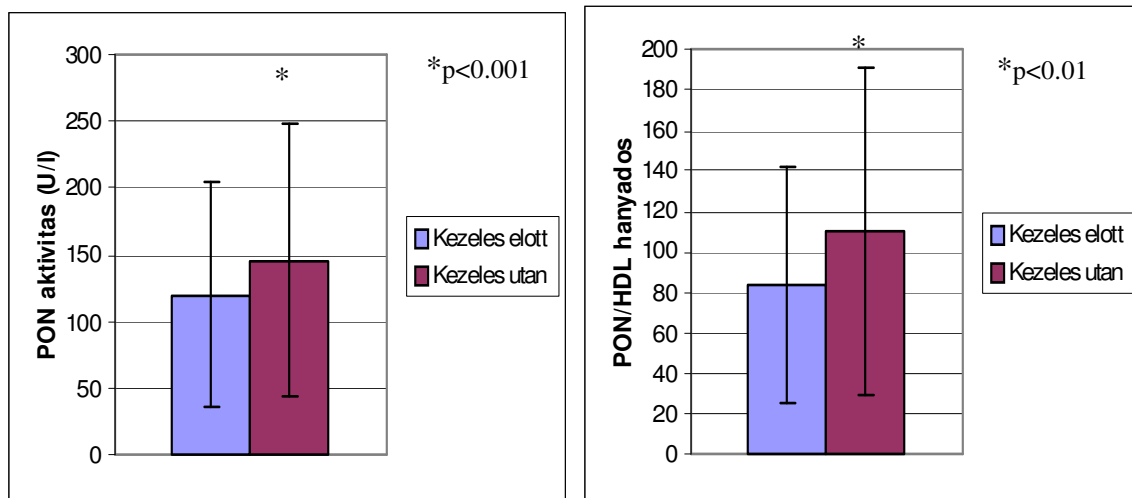


**8. ábra**

#### **Az ox LDL változása atorvastatin kezelés hatására**

Mivel a HDL atheroszklerózis ellen védő hatása nem csak a HDL plazma koncentrációjától - amely tanulmányunk során nem szignifikánsan csökkent -, hanem a

HDL funkciójától is függ, kíváncsiak voltunk arra, hogy ez utóbbi hogyan változik atorvastatin kezelés hatására. A HDL egyik antiatherogén funkciója a HDL antioxidáns hatása, amely részben a HDL-en lévő paraoxonáznak köszönhető, ezért az is érdekelt minket, hogy milyen hatással van az atorvastatin kezelés a paraoxonázra. Az atorvastatin kezelés kedvezően hatott a HDL-hez kötött paraoxonáz-1 aktivitására is, ami szignifikánsan emelkedett ( $120,43 \pm 84,12$ -ről  $145,93 \pm 102,26$  U/l;  $p < 0,001$ ) (6. ábra), ugyanakkor a paraoxonáz-1 koncentráció nem változott szignifikánsan ( $45,4 \pm 2,8$ -ről  $46,8 \pm 3,1$   $\mu\text{g/ml}$ -re). A paraoxonáz-1 aktivitásából és koncentrációjából számított paraoxonáz-1 specifikus aktivitás szignifikánsan emelkedett atorvastatin kezelést követően ( $2,65 \pm 0,4$ -ről  $3,11 \pm 0,35$   $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ -re;  $p < 0,01$ ). Kíváncsiak voltunk arra is, hogy ennek megfelelően hogyan módosult a PON/HDL arány, és azt találtuk, hogy szignifikánsan emelkedett ( $84 \pm 57,9$ -ről  $109,83 \pm 80,43$ -ra;  $p < 0,01$ ) (9. ábra). Ezen eredmények megegyeznek a korábban végzett tanulmányunkkal, mely során napi 10 mg atorvastatin kaptak a betegek 6 hónapon át[86].

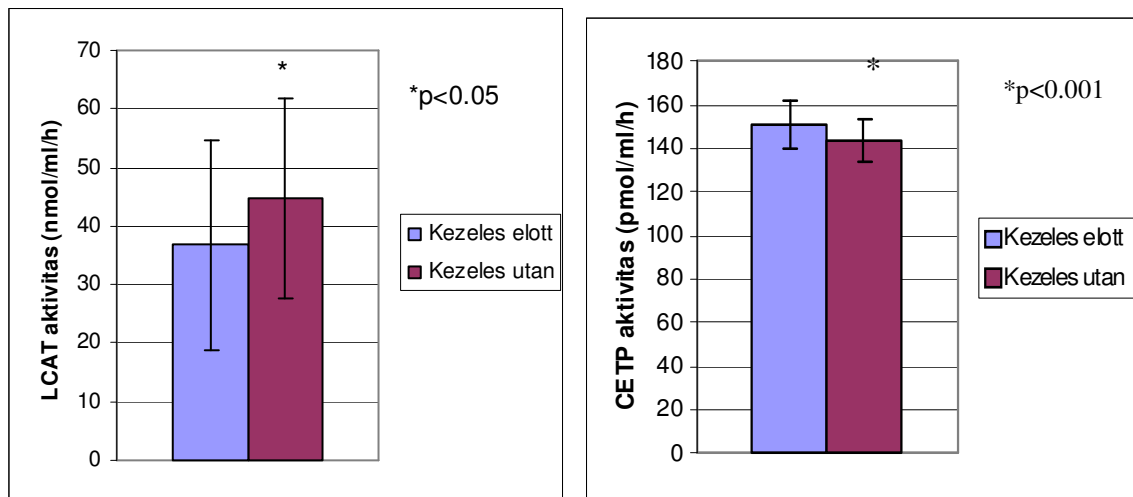


**9. ábra**

**Az atorvastatin kezelés hatása a PON aktivitásra és a PON/HDL hányadosra**

Végül tanulmányunk célját képezte még a HDL remodelling két kulcsenzimének aktivitás változásának vizsgálata is. Az atorvastatin kezelés hatására az LCAT aktivitás szignifikáns növekedést ( $36,78 \pm 18,31$ -ről  $44,76 \pm 17,43$   $\text{nmol/ml/h}$ -ra;  $p < 0,05$ ), míg a

CETP aktivitás ( $151,29 \pm 11,35$ -ről  $143,59 \pm 9,40$  pmol/ml/h-ra;  $p < 0,001$ ) szignifikáns csökkenést mutatott (10. ábra). Jelenleg elfogadott álláspont szerint mind az LCAT aktivitás emelkedés, mind a CETP aktivitás csökkenés antiatherogénnek tekinthető, amely változások hozzájárulnak az atorvastatin kedvező, atheroszklerózis ellenes hatásához. Ez arra utalhat, hogy az atorvastatin nem csak a sztatin családra jellemző LDL koleszterin csökkentés révén, hanem egyéb hatásokkal is hozzájárul az atheroszklerózis elleni védelemhez.



**10. ábra**

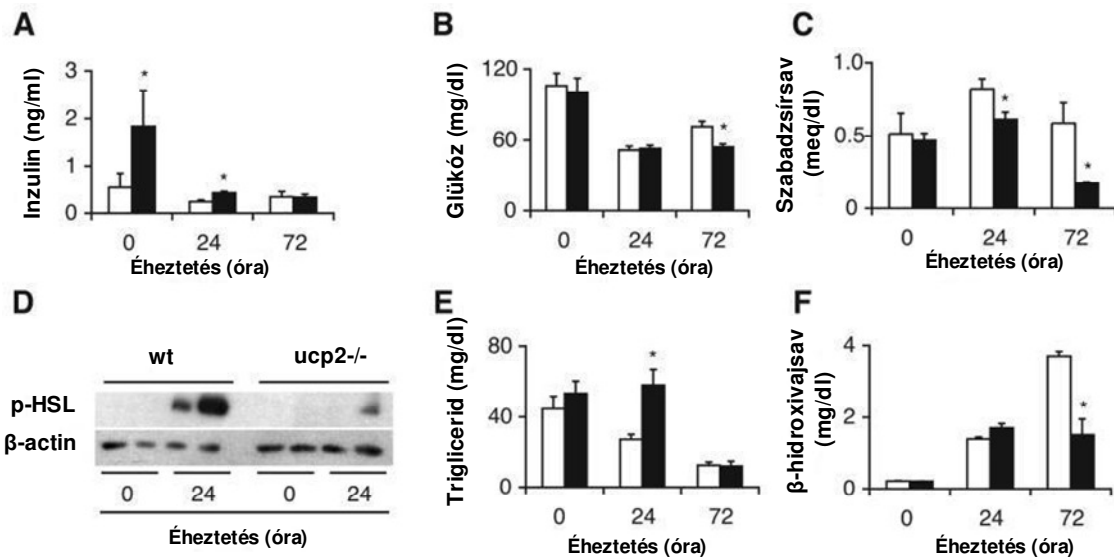
**Az atorvastatin hatása a HDL remodellingben szereplő LCAT és CETP aktivitására**

### 7.2 A biokémiai markerek változásai éheztetést követően

Az *ucp2*<sup>-/-</sup> és vad típusú egereket 72 órán át éhezttük, hogy vizsgálhassuk az UCP2 hiányának a hatását az éheztetésre adott metabolikus válasza. Korábbi vizsgálatok szerint a szérumban az inzulin szintje emelkedett volt *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben[77]. Azonban fontos kihangsúlyozni, hogy az emelkedett inzulin szint az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben nem inzulin rezisztenciának köszönhető, hiszen enyhe hypoglycaemiával és normális inzulin tolerancia teszttel jár[77].

Megfigyeléseink szerint az éheztetett *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben a szérumban az inzulin szintje háromszor magasabb volt a vad típusú egerekhez képest (11/A ábra). Ez a különbség egy éjszakán át tartó éheztetést követően kialakuló alacsony inzulin szint mellett is fenn áll[77], viszont az UCP2 hiányának hatása a hosszabb ideig tartó éheztetésre eddig még

nem került leírásra. A szérumban az inzulin szintje magasabb maradt az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben 24 órás éhezést követően, ugyanakkor ez a különbség eltűnt a 72 órán át tartó éhezéskor (11/A ábra).



## 11. ábra

### A biokémiai paraméterek és a p-HSL változásai éheztes hatására

(üres oszlop: vad típus, telt oszlop: *ucp2*<sup>-/-</sup>; n= 4-10; átlag és SE értékek)

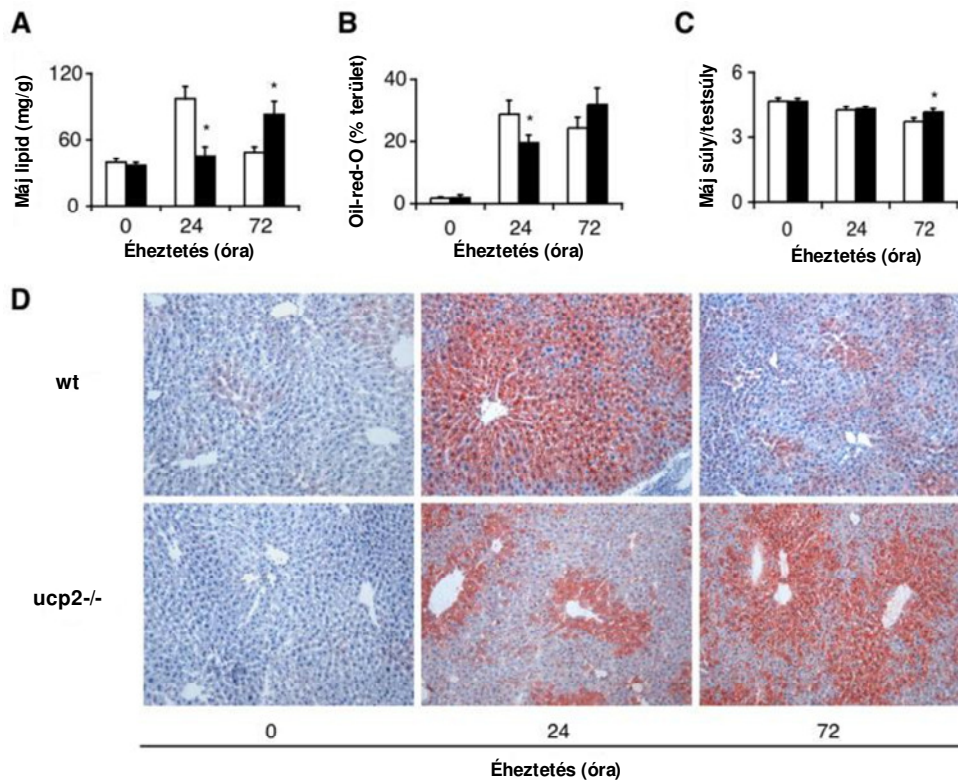
Annak ellenére, hogy a kezdeti vércukor szint és az éhezteset követő hypoglycaemia szignifikánsan nem különbözött az *ucp2*<sup>-/-</sup> és a vad típusú egerekben, 72 órás éheztes után az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek vércukor szintje alacsonyabb volt a vad típusú kontrol egerekhez képest. Mindez megegyezik az UCP2 hiányában kialakuló anyagcsere szabályozás zavarával (11/B ábra).

24 órás éhezteset követően a szérumban zsírsav szintje emelkedett a vad típusú egerekben, míg az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben ezen emelkedés csak kismértékű volt (11/C ábra). Ez

a különbség még szembetűnőbb volt 72 órás éheztetést követően, amikor az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek zsírsav szintje az éheztetés előtti érték alá esett (11/C ábra). Mindez arra utal, hogy elégtelen a rendelkezésre álló zsírsav az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. A szérumban a zsírsav szint emelkedéséért a zsírszövetben lezajló lipolízis felel, amely a zsírsavcsere egyik legkorábbi éheztetésre adott válasza. A lipolízis során a fehér zsírszövetben tárolt trigliceridek zsírsavvá hidrolizálódnak. Ennek a folyamatnak a legfőbb meghatározója a hormon-szenzitív lipáz (HSL)[87]. Az HSL foszforiláció útján aktiválódik, amely érzékeny az inzulin által kifejtett gátló hatásra[88]. Ennek alapján azt feltételeztük, hogy az éheztetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben lévő magasabb inzulin szint csökkent HSL aktivációval jár. A perifériás zsírszövetben lezajló lipolitikus aktivitás meghatározásához Western blotot használtunk, hogy megállapítsuk az HSL foszforiláció mértékét az éheztetett állatok epididymis körüli zsírpárnájában. Éheztetés előtt és után az *ucp2<sup>-/-</sup>* és vad típusú egerek epididymis zsírpárnájának a súlya között nem volt különbség. 24 órás éheztetést követően a foszforilált HSL szint jelentősen emelkedett a vad típusú egerekben, amely az inzulin által kifejtett gátlás hiányára utal, míg az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben az HSL változása csak kismértékű volt (11/D ábra). Ebből következik, hogy az éheztetés hatására kialakuló lipolízis csökkent az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben, amelyet a magasabb reziduális szérumban az inzulin szint magyarázhat. Genotípustól függetlenül a 72 órás éheztetés olyan nagymértékű lipolízissel járt, hogy a legtöbb állatban az epididymis körüli zsírpárna eltűnéséhez vezetett, amely az HSL aktiváció vizsgálatát lehetetlenné tette az éheztetés ezen extrém fázisában. A fokozott hidrolízis és felhasználás miatt a csökkenő perifériás zsírraktáraknak megfelelően a szérumban a triglicerid szintje fokozatosan csökkent a vad típusú egerekben az éheztetés előrehaladtával (11/E ábra). Ezzel szemben az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben ez a csökkenés később következett be hasonlóan a zsírsav szintjének változásához. 72 órás éheztetést követően az *ucp2<sup>-/-</sup>* és vad típusú egerek szérumban a triglicerid szintje egyformán alacsony volt, amelynek magyarázatául a perifériás zsírraktárak eltűnése szolgál. Ezután az éhezés által kiváltott ketogenezis mértékének meghatározásához a  $\beta$ -OHB szintjét mértük meg. Míg a vad típusú egerek folyamatosan emelkedő  $\beta$ -OHB szinttel reagáltak az éheztetésre, addig az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek képtelenek voltak hasonló válasza, amely az UCP2 hiányában kialakuló károsodott éheztetés által kiváltott ketogenezisre utal (11/F ábra).

### 7.3 Hepatikus szteatózis

Az éheztetést követően kialakuló lipolízis miatt nagy mennyiségű zsírsav szállítódik a májba, ahol alternatív energiaforrássul szolgál[89]. Éhezéskor a májba szállított zsírsav mennyisége gyakran meghaladja a máj mitokondriális  $\beta$ -oxidációjának kapacitását, amely tranzienst triglicerid akkumulációhoz vezet, amely szteatózis formájában nyilvánul meg[90;91]. Mivel az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben az éhezést követő zsírsav szint emelkedés csökkent volt, ezekben az állatokban kisebb mértékű szteatózist vártunk. 24 órás éheztetést követően a teljes szövet zsír extrakció (12/A ábra) és Oil red O festés (12/B és 12/D ábra) csökkent zsír felhalmozódást mutatott az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek májában.



### 12. ábra

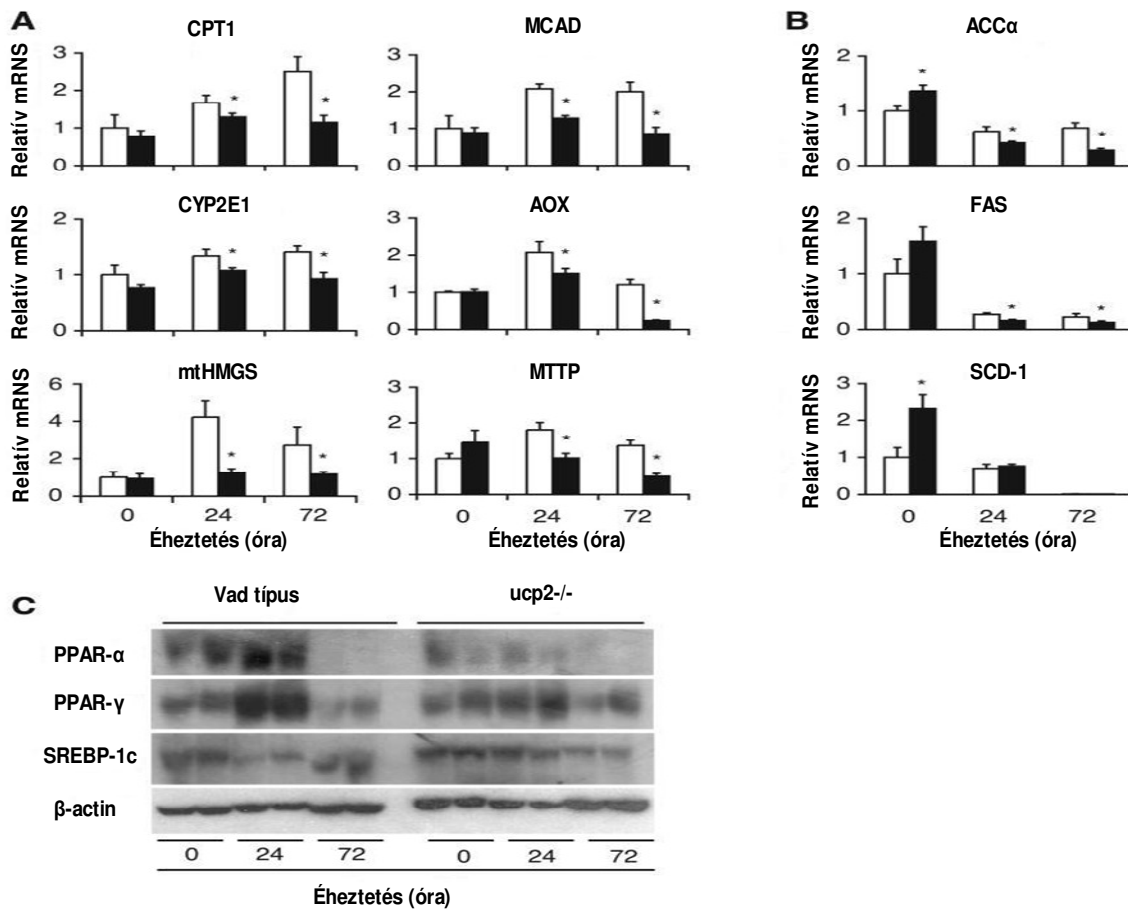
#### Az éheztetés hatására kialakuló szteatózis

(üres oszlop: vad típus, telt oszlop: *ucp2*<sup>-/-</sup>; n= 4-10; átlag és SE értékek)

Meglepő módon viszont a 72 órás éheztetés után a szteatózis súlyosabbá vált az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben, míg a vad típusú egerek lényeges javulást mutattak. Az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek májának

fokozott zsír felhalmozódását az emelkedett máj súly és testsúly hányados is jelezte 72 órás éheztetést követően (12/C ábra). Mindezek arra utalnak, hogy a hosszan éheztetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májsejtjei nem képesek a zsírsavakat a lipid katabolikus útvonalak, mint például  $\beta$ -oxidáció és ketogenezis, fele irányítani, amely a májsejtek csökkent zsír kiválasztásához vezet.

#### 7.4 A lipid-anyagcsere szabályozásban szerepet játszó molekulák expressziójának változása a májban



### 13. ábra

A zsíryanagcserében jelentős szerepet játszó molekulák expressziója éheztetést követően

(üres oszlop: vad típus, telt oszlop: *ucp2<sup>-/-</sup>*; n= 4-10; átlag és SE értékek)

A máj lipid és energia metabolizmusát elsősorban az inzulin szabályozza transzkripciós szinten[92]. Ahhoz, hogy jobban megértsük az UCP2 éhezés során a zsírsav anyagcserére gyakorolt hatásának mechanizmusát, megvizsgáltuk a máj főbb zsírsavanyagcsere szabályozásában szerepet játszó enzimeinek gén expresszióját.

A mitokondrium zsírsav felvételének sebesség meghatározó enzime, a *carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT 1)* gén expressziója éheztetés hatására fokozatosan emelkedett a vad típusú egerekben, míg nem változott az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben (13/A ábra). Hasonlóan alakult a gén expresszió a *közepes lánc-specifikus acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)*, a mitokondrium  $\beta$ -oxidáció kulcsenzimének esetében is, ami arra utal, hogy az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májsejtjeinek mitokondriumát csökkent kapacitás jellemzi az éheztetés által kiváltott zsír felhasználásban (13/A ábra).

Éhezéskor a zsírsav oxidáció másodlagos útvonalakon is bekövetkezhet[93]. Ezért az *acyl-CoA oxidase (AOX)* és a *cytochrome P-450 2E1 (CYP2E1)* expresszióját is vizsgáltuk. Az előbbi a peroxisomális  $\beta$ -oxidációban, az utóbbi a mikroszómális  $\omega$ -oxidációban játszik szerepet. Mindkét gén expressziója alacsonyabb volt az éheztetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben, ami transzkripciós szinten a másodlagos zsírsav oxidációs útvonalak kompenzációjának hiányát jelzi (13/A ábra). A *mitokondriális  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA synthase (mtHMGs)*-nak, a ketogenezis kulcsfontosságú enzimének gén expressziója jelentősen emelkedett az éhezés során a vad típusú egerekben, viszont nem változott az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben (13/A ábra).

A *mikroszómális triglicerid transzfer protein (MTTP)*, a májsejtekből VLDL-t exportáló protein gén expressziója fokozatosan csökkent az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben, ami arra utal, hogy a de novo szintetizált trigliceridek károsodott szekréciója közrejátszhat az UCP2 hiányában éheztetéskor kialakuló késői szteatózisban (13/A ábra). Mindezek azt támasztják alá, hogy az UCP2 szükséges a ketogenezis megfelelő indukciójához és a VLDL transzportjához az éheztetésre adott válaszban.

Mivel a lipid anyagcsere anabolikus útvonala is szerepet játszik a szteatózis kialakulásában, ezért az éheztetett állatokon megvizsgáltuk az UCP2 hiányának a máj lipogén enzimeinek expressziójára gyakorolt hatását. Megmértük az *acetyl-CoA carboxylase (ACC)*, a *fatty acid synthase (FAS)* és a *stearoyl-CoA desaturase (SCD)* mRNS szintjét. Ezeknek az enzimeknek a transzkripcióját az inzulin fokozza, ami de

novo zsírsav szintézishez vezet a májban[92;94]. Az UCP2 hiányában jelenlévő magasabb inzulin szint miatt az ACC- $\alpha$ , a FAS és az SCD-1 mRNS szintje magasabb volt etetett állapotban az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben, mint a vad típusú egerekben (13/B ábra). Az éheztetés hatására mind a három enzim gén expressziója jelentősen csökkent mind a vad típusú és az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben, de az utóbbiakban a mRNS szint csökkenése sokkal kifejezettebb volt (13/B ábra). Ez az eredmény ellentmond az UCP2 hiányában megfigyelt magasabb reziduális inzulin szintnek, amely arra utal, hogy inzulintól független szabályzó útvonalak felelnek a vad típusú és az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek közötti különbségért. A vizsgált gének expressziójában megfigyelt változások arra utalnak, hogy a szérum metabolikus paraméterei és az éheztetés hatására kialakult szteatózis inkább a katabolikus, mint az anabolikus útvonalakkal hozható összefüggésbe az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben. Úgy tűnik, hogy a mi állatmodellünkben az UCP2 hiányának hatása elsősorban a zsír lebontás zavarában nyilvánul meg.

Az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek éheztetés következtében kialakuló anyagcsere változásait tovább vizsgálva, megnéztük a lipid homeosztázis szabályozásában részt vevő transzkripciós faktorok expresszióját a májban. A *peroxisome proliferator-activated receptors* PPAR- $\alpha$  és PPAR- $\gamma$  nukleáris hormon receptorokat, amelyeket a zsírsavak és azok származékai aktiválnak[95]. A PPAR- $\alpha$  szabályozza a mitokondriális, a peroxiszómális és a mikroszómális zsírsav oxidációban és a ketogenezisben szerepet játszó géneket[76], míg a PPAR- $\gamma$  adipocita differenciációban és lipid raktározásban vesz részt, míg expressziója a májban elhízáshoz és éhezéshez kapcsolódó zsírmájban figyelhető meg[96;97]. A korábbi megfigyeléseknek megfelelően, miszerint mind a PPAR- $\alpha$  és PPAR- $\gamma$  expressziója fokozódik éheztetés hatására a májban[98], a máj PPAR- $\alpha$  és PPAR- $\gamma$  szintje a májban emelkedett 24 órás éheztetést követően a vad típusú egerekben, míg ez a válasz gyengébb volt az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben (13/C ábra). *Sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c) szabályozza a máj de novo zsírsav és triglicerid szintézisét úgy, hogy a lipogén gének (ACC, FAS és SCD-1) expresszióját fokozza[94;99]. A PPAR- $\alpha$ -val és a PPAR- $\gamma$ -val ellentétben éhezés hatására a máj SREBP-1 expressziója csökken[100]. A vártak megfelelően a máj SREBP-1 szintje csökkent a vad típusú egerekben 24 órás éheztetést követően, viszont nem változott az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben (13/C ábra). Az eredmények arra utalnak, hogy az UCP2 hiánya csökkenti az éheztetés által

kiváltott változásokat az általunk vizsgált főbb lipid szabályzó transzkripciós faktorok szintjében. Ugyanakkor 72 órás éhezés után mind a vad típusú, mind az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben a PPAR- $\alpha$ , a PPAR- $\gamma$  és a SREBP-1 szintje egyformán alacsony volt, ami az anyagcsere folyamatok szabályozásának általános diszfunkciójára utal az éheztetés ezen extrém fázisában.

## VIII. MEGBESZÉLÉS

A korábbi primer prevenciós tanulmányok közül először a Helsinki Heart Study hívta fel a figyelmet arra, hogy a HDL szint 15%-os növekedése jelentős szereppel bírhat a cardiovasculáris események csökkenésében[101]. Ezt követően több tanulmány metaanalízise alapján azt mutatták ki, hogy 1%-os HDL emelkedés nőknél 3%-kal, férfiaknál 2%-kal csökkenti a cardiovasculáris események rizikóját[1]. Rubins és mtsai közel normális kiindulású koleszterin szinttel és alacsony HDL szinttel rendelkező koszorúér-betegeknél azt találták, hogy a gemfibrozil kezelés hatására az LDL koleszterin szint nem változott, míg a HDL koleszterin szintje 6%-kal nőtt, és ez jelentős mértékben hozzájárult a 22%-os nem halálos infarctus és ischaemiás halálozás csökkenéséhez[102].

Ezek a tanulmányok azt bizonyították, hogy mind a primer, mind a szekunder prevencióban a HDL szint emelkedés a klinikai végpontokat kedvezően befolyásolja. A VA-HIT tanulmányban kimutatták, hogy a vizsgálatban részt vevő, koronária betegségben szenvedő 8500 férfi 87%-ának magas volt az LDL szintje, míg 64%-ának a HDL szintje volt alacsony. A koronária betegségben szenvedők között a normális plazma LDL szint mellett észlelhető alacsony HDL szint az egyik leggyakoribb lipid eltérés, amely a betegek 30-40%-ában fordul elő[103]. Ez is azt mutatja, hogy a lipid csökkentők alkalmazásánál az össz koleszterin és az LDL koleszterin csökkentő hatáson kívül figyelembe kell venni azok HDL-re gyakorolt hatását is.

A simvastatin atorvastatin összehasonlító tanulmány arra hívta fel a figyelmet, hogy az atorvastatin dózisának emelése a HDL emelő hatás csökkenéséhez vezet, sőt a HDL fő apolipoproteinjét, az apo A-I-t csökkenti[104].

A GREACE tanulmányban dózis titrálás után, napi 24 mg átlagos atorvastatin dózist alkalmaztak az LDL koleszterin célértékek eléréséhez, amely a betegek 95%-ában sikeres volt[105]. 20 mg atorvastatin alkalmazása mellett a betegek 82%-a elérte az LDL koleszterin célértéket. Ez is azt mutatja, hogy az atorvastatin 20 mg-os dózisban történő alkalmazása a primer és a szekunder prevencióban elégséges lehet a betegek nagy részénél a terápiás célértékek eléréséhez. Jelen vizsgálatunkban a betegek 92%-a érte el a terápiás LDL koleszterin értéket.

Az LDL-n kívül azonban fontos az atherosclerosis progressziójának megítélése szempontjából a HDL-re gyakorolt hatás is. Vizsgálatunkban a HDL és a HDL fő apolipoproteinje, az apo A-I nem változott szignifikánsan. A HDL vonatkozásában hasonló eredményről számolt be Guerin[49], Fuhrman[58] és Le[106], míg az apo A-I vonatkozásában Guerin és mtsai 24%-os emelkedést észleltek[49]. A HDL atheroszklerózis kialakulásával szemben védő hatása nemcsak a HDL mennyiségétől, hanem az összetételétől is függ, amelyet a HDL remodellingben szerepet játszó enzimek aktivitása befolyásol[3].

A korábbi irodalmi adatokból jól ismert, hogy az LCAT növekedése a HDL emelését hozza létre[107], míg a CETP szintje inverz kapcsolatban áll a HDL szinttel[108]. Az atorvastatin a CETP-re kifejtett hatását vizsgálva Le és mtsai azt találták, hogy csökkent a CETP aktivitás 20 mg-os és 80 mg-os atorvastatin kezelés mellett[106]. 20 mg atorvastatin hatására 10,3%-kal, míg 80 mg atorvastatin hatására 26,4%-kal csökkent a CETP aktivitása. Emellett Guerin és mtsai vizsgálata során az atorvastatin (napi 10 mg 6 héten át) a CETP aktivitást 7%-kal csökkentette, valamint a koleszterin transzfer HDL-ről apoB-t tartalmazó partikulára 37%-kal csökkent[55]. Jelen vizsgálatunkban 20 mg atorvastatin alkalmazása mellett kisebb mértékben, de szignifikánsan, 5%-kal csökkent a CETP aktivitása.

Ezen kívül a HDL szintet és remodellinget jelentős mértékben meghatározó LCAT szignifikáns, 21,7%-os aktivitás emelkedését is észleltük. Ezen vizsgálatunk az egyike az első tanulmányoknak, amelyek az atorvastatin LCAT aktivitásra gyakorolt hatását vizsgálja[109]. Annak ellenére, hogy a jelen munkánkban nem találtunk szignifikáns változást az apo A-I szintjében, korábban már leírták, hogy az atorvastatin hatására emelkedik az apo A-I plazma szintje, amely valószínűleg az újonnan képződött,

apo A-I-et tartalmazó HDL partikula emelkedéséből származik. Mivel ezen újonnan képződött HDL részecskék mediálják a reverz koleszterin transzportot, ezáltal a HDL növekvő szabad koleszterin tartalma fokozza az LCAT aktivitását, ugyanis az LCAT folyamatosan alakítja át a szabad koleszterint koleszterin észterré.

Érdekes az, hogy az LCAT aktivitás emelkedés és a CETP aktivitás csökkenés is HDL emelő hatással bír, ennek ellenére a vizsgálatunk során szignifikánsan nem emelkedett a HDL szint. A HDL mennyiségi változásán kívül fontos lehet annak minőségi változása, melyet az előbb említett enzim és fehérje jelentős mértékben befolyásolhat[3]. A minőségi változás hatással lehet a HDL antiatherogén funkcióira, így az endothelre gyakorolt direkt hatására, a reverz koleszterin transzportra és az antioxidáns hatásra. Az antioxidáns hatás kiváltásában jelentős szerepet játszik a HDL-hez kötött paraoxonáz, mely gátolja az LDL oxidációját azáltal, hogy az oxidált foszfolipideket hidrolizálja[110]. Ezen enzim aktivitás változása az egyik korai markere is lehet a remodellingben résztvevő LCAT és CETP HDL-re gyakorolt hatásának. Korábbi vizsgálatunk során azt találtuk, hogy az atorvastatin fokozta a paraoxonáz aktivitását[86], jelen vizsgálatunk a korábbi vizsgálatunkat megerősíti. Szignifikánsan nőtt a paraoxonáz aktivitás 20 mg atorvastatin kezelés mellett. Részben ez is hozzájárulhatott ahhoz, hogy szignifikánsan csökkent az oxidált LDL aránya az atorvastatin kezelés után. A csökkent oxidált LDL szintet az is magyarázhatja, hogy a sztatinok elsődlegesen a máj intracelluláris koleszterin szintézisét gátolják, így a csökkenő intracelluláris koleszterin tartalom hatására fokozódik a máj LDL receptorainak expressziója. Az atorvastatin hatására nagymértékben csökkent keringő LDL partikulum szám miatt az LDL-nek kisebb az esélye az oxidációra, hiszen kisebb számban van jelen a plazmában.

Annak ellenére, hogy az LCAT és CETP aktivitásában bekövetkező változások hatására a HDL szintnek emelkednie kellett volna, mi nem találtunk szignifikáns változást a HDL és az apo A-I szintjében atorvastatin kezelést követően. A korlátozottan rendelkezésre álló betegek miatt alacsony minta szám magyarázhatja, hogy nem láttunk semmilyen hatást a HDL és apo A-I szintjére.

Összefoglalásképp elmondhatjuk, hogy a vizsgálati eredményünk arra hívja fel a figyelmet, hogy az atorvastatin nemcsak csökkenti az LDL szintjét, hanem emeli az antioxidáns enzim, a paraoxonáz aktivitását, amely hatások együtt az atheroszklerózis

kialakulásában fontos szerepet játszó oxidált LDL szintjének jelentős csökkenéséhez vezetnek. Mindebből következik, hogy az atorvastatin hozzájárul az atheroszklerózis progressziójának gátlásához.

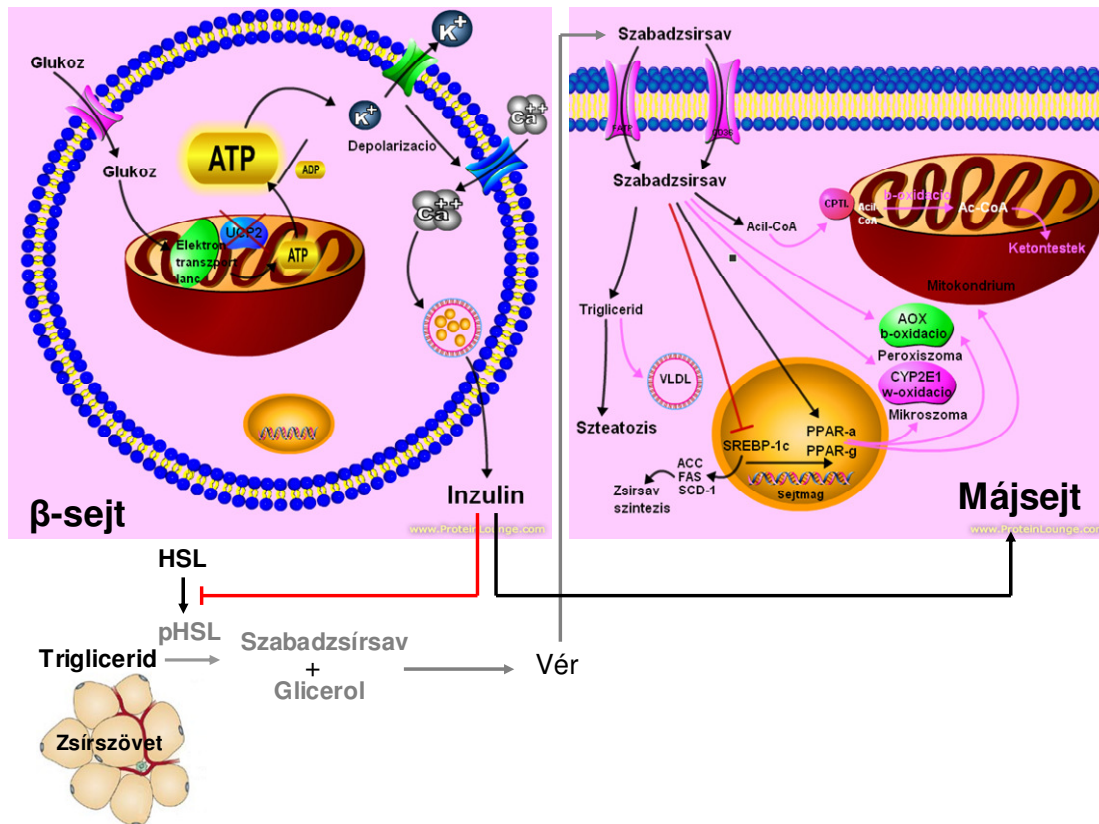
A lipid anyagcsere zavara és a korai atheroszklerózis egyéb betegségekhez társulva, másodlagosan is kialakulhat. Erre az egyik legismertebb példa a diabetes mellitus és a hozzá társuló szövődmény, a diabeteses dyslipidemia. A diabeteses dyslipidemia következtében kialakuló korai atheroszklerózis jelentőségét hangsúlyozza, hogy az NCEP meglévő koronária betegséggel egyenrangú rizikóként kezeli a diabetes mellitust. Sajnálatos módon a diabetes egyre több embert érint napjainkban.

A fejlett országokban az obezitás és a 2-es típusú diabetes egyre növekvő prevalenciájának hátterében álló molekuláris mechanizmus megértése céljából jelentős törekvések vannak[111]. Egyik elképzelés szerint az obezitás és a diabetes ilyen nagymértékű terjedésének hátterében a környezeti változáshoz való adaptáció hibája áll, hiszen a vadászó-gyűjtögető őseink esetében a hatékony energiatárolás céljából kialakult takarékos jelleg nem képes lépést tartani a napjaink bőséges, folyamatos élelmiszer ellátásával és az ülő életmóddal[112;113]. Ebben a folyamatban szerepet játszó molekulák azonosítását teheti lehetővé, ha jobban megértjük, hogyan zajlik az éhezésre adott metabolikus válasz szabályozása fiziológiás körülmények között.

Jelen munkámban igazolódott, hogy egerekben az UCP2 befolyással van az éhezés hatására a zsíryanagyserében bekövetkező változásokra, ugyanis az UCP2 hiányában zavart a máj komplex biokémiai válasza, amely magába foglalja a zsírsavak hatékony lebontását, átalakítását és újra eloszlását. Biokémiai paraméterek és a főbb zsíryanagyserét szabályozó enzimek és transzkripciós faktorok vizsgálata alapján az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben az éheztetés hatására a perifériás lipolízisben és a máj zsír felhasználásában létrejövő változások enyhébbnek tűnnek (14. ábra).

A zsírsav oxidációban kisebb szerepet betöltő peroxisómális  $\beta$ -oxidáció és mikroszómális  $\omega$ -oxidáció [114] jelentőssé válik károsodott mitokondriális  $\beta$ -oxidáció esetén, vagy amikor nagyobb mennyiségben szállítódik zsírsav a májba, mint például éhezéskor[93]. Ez a mechanizmus nemrég került leírásra nem-alkoholos zsírmáj betegségben szenvedők májában[115]. Az UCP2 hiányában a mitokondrium elégtelen  $\beta$ -oxidációs kapacitása elméletileg a zsírsav lebontást átterelheti a peroxisómába és a

mikroszómába, viszont erre utaló jelet nem találtunk. Az éheztetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben lévő alacsony AOX és CYP2E1 gének expressziója arra utal, hogy a nem mitokondriális zsírsav lebontás ebben az állatmodellben elfojtott marad.



14. ábra

A  $\beta$ -sejtekből hiányzó UCP2 hatása a máj zsír anyagcseréjére éhezés során

Az éhezés hatása a lipid anyagcserét szabályozó transzkripciós faktorokra jól ismert. Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a perifériás lipolízis és a májba történő fokozott zsírsav szállítás eredményeként az éheztetés fokozza a máj PPAR- $\alpha$ [116] és PPAR- $\gamma$ [96] expresszióját. Ugyanakkor a PPAR- $\alpha$  és a PPAR- $\gamma$  hatása a máj lipid metabolizmusára különbözik. Míg a PPAR- $\gamma$  overexpressziója egerek májában lipid felhalmozódást okoz[98], addig a PPAR- $\alpha$  a lipid felhasználást fokozza. Ez utóbbit éheztetett PPAR- $\alpha$  knockout egereken mutatták ki, amelyekben fokozott hepaticus szteatózist és csökkent zsírsav oxidációt és ketogenezist találtak[76;117]. Vizsgálataink során a vad típusú egerekben 24 órás éheztetést követően a máj PPAR- $\alpha$  és PPAR- $\gamma$

expressziója emelkedett, míg ez a válasz károsodott volt az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májában (13/C ábra). Az állatmodellünkben az éheztetés hatására létrejött változás a SREBP-1c expressziójában nem korrelált a szteatózis mértékével. A vad típusú egerekben a 24 órás éhezés a máj csökkent SREBP-1c szintjéhez vezetett, viszont az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben változatlan maradt (13/C ábra), míg az éhezés alatt a szteatózisban bekövetkezett változások ellentétes módon alakultak a két állatcsoportban. Együtt véve az SREBP-1c által befolyásolt ACC- $\alpha$ , FAS és SCD-1 gének SREBP-1c-hez hasonlóan disszonáns expresszióját (13/B ábra), arra a következtetésre jutottunk, hogy az SREBP-1c kevésbé játszik közre az UCP2 hiánya miatt fellépő metabolikus változásokra az éheztetett májban.

Eredményeink azt mutatták, hogy a vad típusú és az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek anyagcseréjében fellépő különbségek egyre feltűnőbbé váltak az éheztetés előrehaladtával. 72 órás éhezés után az UCP2 hiányában a szérum zsírsav és  $\beta$ -OHB szintje (11. ábra), valamint a zsírsav oxidációért, ketogeneziséért és VLDL exportért felelős gének expressziója a májban egyre rendellenesebbé vált (13. ábra). Annak ellenére, hogy az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májában éheztetés hatására kialakuló zsír akkumuláció később jelenik meg, 72 óra után sokkal súlyosabbá válik, amikor viszont a vad típusú egerekben a szteatózis már helyre áll (10. ábra). Elképzelhető, hogy az éheztetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben az elégtelen lipolízis miatt kezdetben kevesebb zsírsav képződik és kerül felvételre a májba, így a szteatózis mértéke kisebb lesz, és a zsírsavak kisebb hatással lesznek az anyagcsere szabályozásra. Amikor az éhezés tovább folytatódik, a szteatózis gyorsan helyre áll, amint a májsejtek az elégtelen glükóz ellátás miatt a zsírsavakat használják fel energiatermelés céljából[90;91]. Ezzel ellentétben az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek késleltetett szteatóziséért úgy tűnik, hogy a máj károsodott zsír felhasználása felel.

Az inzulin kulcsfontosságú szerepet játszik a perifériás lipolízis és a máj zsír lebontásának gátlásában éhezéskor. Korábbi tanulmányokból jól ismert, hogy az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben a glükóz stimulált inzulin szekréció fokozottabb és hyperinzulinaemia alakul ki a  $\beta$ -sejtek módosult glükóz érzékelése miatt[77]. Joseph és mtsai egy éjszakán át tartó (15-18 órás) éhezés hatását írta le hagyományos egér eledelen és magas zsírtartalmú diétán tartott *ucp2<sup>-/-</sup>* és vad típusú egereken[118]. A mi munkánkhoz hasonlóan az *ucp2<sup>-/-</sup>* és vad típusú egerek vércukor szintjei között nem találtak különbséget 15-18 órás éhezést

követően, és a plazma inzulin szintje az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben magasabb volt a vad típushoz képest. (Ugyanakkor a mi megfigyelésünktől eltérően a szabad zsírsav és triglicerid szintjében nem találtak különbséget).

A jelen vizsgálatban a reziduális szérum inzulin szint magasabb marad az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben még a 24 órás éhezést követően is (11/A ábra), mely arra utal, hogy a  $\beta$ -sejtekben az UCP2 hiánya a máj zsírsavanyagcserejének éhezésre adott válaszát károsítja. Ez az eredmény alátámasztja azt a mostanában felvetett elképzelést, miszerint az UCP2-nak evolúciós szerepe van a  $\beta$ -sejtek glükóz stimulált inzulin szekréciójának csökkentésében[119;120], és arra utal, hogy az inzulin szekréció elégtelen csökkentése a zsírsavanyagcsere éhezésre adott válaszát megzavarja az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben. Vizsgálatunk során 24 órás éhezést követően az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek szérum inzulin szintje hasonló volt a vad típusú egerek éhezést megelőző kiindulási szintjéhez, és néhány metabolikus változás 72 órás éhezés után volt a legszembetűnőbb, amikor az inzulin szintek a vad típusú és az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben már nem különböztek. Annak ellenére, hogy a korábbi munkánk inzulin tolerancia tesztje nem mutatott változást az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek perifériás inzulin érzékenységében[77], nemrég az UCP2 ellenes antiszensz oligonukleotiddal kezelt egerek zsírszövetében fokozott inzulin jelátvitelt írtak le[121]. Ez arra utal, hogy az éheztetett *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek májában látott változásokban a módosult perifériás inzulin hatás szerepet játszhat.

Összefoglalásként elmondható, hogy egerekben az UCP2 jelenléte kedvező hatással van a zsírsavanyagcsereben az éhezés hatására bekövetkező változásokra. Eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, hogy az UCP2 upregulációja a  $\beta$ -sejtekben fiziológiásan fontos az éhezésre adott válaszban[119;120]. A növekvő UCP2 szint csökkenti a  $\beta$ -sejtek inzulin termelését, ezáltal fokozza a perifériás lipolízist és a máj zsír felhasználását éhezéskor. Következésképpen az UCP2 fokozott jelenléte előnyösnek tűnik ezen körülmények között. Az UCP2 fokozott expressziója és aktivációja a  $\beta$ -sejtekben magába foglalhat egy amplifikációs hurkot, amelyet az éhezés kezdeti fázisában a periférián felszabadított zsírsavak hajtanak. Ugyanakkor ez a szabályozó mechanizmus rosszul irányított 2-es típusú diabetesben, ahol az UCP2 állandó bősége  $\beta$ -sejt funkciózavarához vezet, így járulva hozzá az anyagcsere zavarához. Emellett a 2-es típusú diabetesre jellemző tartós hyperglycaemia és magas zsírsav szint a  $\beta$ -sejtekben

oxidatív stresszt indukál, így folyamatosan aktiválja a szabadgyök-UCP2 útvonalat[62;78]. Egyre több bizonyíték támasztja alá azt, hogy az UCP2 gátlása genetikai ablációval[77], antiszensz oligonukleotiddal[121], interferens RNS-sel[122], vagy a növényi kivonattal, a genipinnel helyre állíthatja a  $\beta$ -sejtek inzulin szekretáló képességét és javítja a 2-es típusú diabéteszt.

## IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Jr., Bangdiwala S, Tyroler HA: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.
2. Barter PJ, Rye KA: Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:399-403.
3. Rye KA, Clay MA, Barter PJ: Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999;145:227-238.
4. Schmitz G, Langmann T: Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:129-140.
5. Stein O, Stein Y: Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999;144:285-301.
6. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL: Elevated high density lipoprotein cholesterol levels correlate with decreased apolipoprotein A-I and A-II fractional catabolic rate in women. *J Clin Invest* 1989;84:262-269.
7. Kwiterovich PO, Jr.: The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 1998;82:13Q-21Q.
8. Rittershaus CW, Miller DP, Thomas LJ, Picard MD, Honan CM, Emmett CD, Pettey CL, Adari H, Hammond RA, Beattie DT, Callow AD, Marsh HC, Ryan US: Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2000;20:2106-2112.
9. Whitlock ME, Swenson TL, Ramakrishnan R, Leonard MT, Marcel YL, Milne RW, Tall AR: Monoclonal antibody inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity in the rabbit. Effects on lipoprotein composition and high density lipoprotein cholesteryl ester metabolism. *J Clin Invest* 1989;84:129-137.
10. Cuchel M, Wolfe ML, deLemos AS, Rader DJ: The frequency of the cholesteryl ester transfer protein-TaqI B2 allele is lower in African Americans than in Caucasians. *Atherosclerosis* 2002;163:169-174.
11. Ikewaki K, Rader DJ, Sakamoto T, Nishiwaki M, Wakimoto N, Schaefer JR, Ishikawa T, Fairwell T, Zech LA, Nakamura H, .: Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1993;92:1650-1658.

12. Ohta T, Nakamura R, Takata K, Saito Y, Yamashita S, Horiuchi S, Matsuda I: Structural and functional differences of subspecies of apoA-I-containing lipoprotein in patients with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Lipid Res.* 1995;36:696-704.
13. Asztalos BF, Llera-Moya M, Dallal GE, Horvath KV, Schaefer EJ, Rothblat GH: Differential effects of HDL subpopulations on cellular A. *J Lipid Res.* 2005;46:2246-2253.
14. Klerkx AH, El Harchaoui K, van der Steeg WA, Boekholdt SM, Stroes ES, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA: Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2006;26:706-715.
15. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR: Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2003;23:160-167.
16. Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y: Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:589-596.
17. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall AR: Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996;97:2917-2923.
18. Forrester JS, Makkar R, Shah PK: Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition: an update for clinicians. *Circulation* 2005;111:1847-1854.
19. Okamoto H, Iwamoto Y, Maki M, Sotani T, Yonemori F, Wakitani K: Effect of JTT-705 on cholesteryl ester transfer protein and plasma lipid levels in normolipidemic animals. *Eur J Pharmacol* 2003;466:147-154.
20. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B: Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl.J Med* 2007;357:2109-2122.
21. Forrest MJ, Bloomfield D, Briscoe RJ, Brown PN, Cumiskey AM, Ehrhart J, Hershey JC, Keller WJ, Ma X, McPherson HE, Messina E, Peterson LB, Sharif-Rodriguez W, Siegl PK, Sinclair PJ, Sparrow CP, Stevenson AS, Sun SY, Tsai C, Vargas H, Walker M, III, West SH, White V, Woltmann RF: Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *Br J Pharmacol* 2008;154:1465-1473.

22. Vergeer M, Bots ML, van Leuven SI, Basart DC, Sijbrands EJ, Evans GW, Grobbee DE, Visseren FL, Stalenhoef AF, Stroes ES, Kastelein JJ: Cholesteryl ester transfer protein inhibitor torcetrapib and off-target toxicity: a pooled analysis of the rating atherosclerotic disease change by imaging with a new CETP inhibitor (RADIANCE) trials. *Circulation* 2008;118:2515-2522.
23. Francone OL, Gurakar A, Fielding C: Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. *J Biol Chem.* 1989;264:7066-7072.
24. Chen CH, Albers JJ: Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1982;107:1091-1096.
25. Glomset JA: The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 1968;9:155-167.
26. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J: The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res.* 1997;38:191-205.
27. Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Schmidt H, Pritchard H, Frohlich J, Clerc M, Dumon MF, Fairwell T, Zech L, .: Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing ApoA-II in classic lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease. *J Clin Invest* 1994;93:321-330.
28. Jimi S, Uesugi N, Saku K, Itabe H, Zhang B, Arakawa K, Takebayashi S: Possible induction of renal dysfunction in patients with lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency by oxidized phosphatidylcholine in glomeruli. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1999;19:794-801.
29. Vohl MC, Neville TA, Kumarathasan R, Braschi S, Sparks DL: A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry* 1999;38:5976-5981.
30. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl.J Med* 1989;320:915-924.
31. Parthasarathy S, Santanam N, Auyeung N: Oxidized low-density lipoprotein, a two-faced Janus in coronary artery disease? *Biochem.Pharmacol* 1998;56:279-284.
32. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI: Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2001;21:473-480.

33. Draganov DI, La Du BN: Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol* 2004;369:78-88.
34. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B: 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 action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1998;18:1617-1624.
35. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN: Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997;122:265-268.
36. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI: Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1997;17:1067-1073.
37. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI: Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2001;21:1451-1457.
38. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, Margolin S, Rieder M, Nickerson D, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Furlong CE: Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2003;23:1465-1471.
39. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN: Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1999;19:330-335.
40. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI: The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:357-362.
41. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM: Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41:1481-1494.
42. Forte TM, Subbanagounder G, Berliner JA, Blanche PJ, Clermont AO, Jia Z, Oda MN, Krauss RM, Bielicki JK: Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *J Lipid Res.* 2002;43:477-485.

43. Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S: High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat.Cell Signal.* 1996;13:73-88.
44. Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ: Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1982;257:6653-6655.
45. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD: Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:160-162.
46. Kugiyama K, Sakamoto T, Misumi I, Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, Horiguchi M, Yasue H: Transferable lipids in oxidized low-density lipoprotein stimulate plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue-type plasminogen activator release from endothelial cells. *Circ.Res.* 1993;73:335-343.
47. Matsuda Y, Hirata K, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Akita H, Yokoyama M: High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ.Res.* 1993;72:1103-1109.
48. Sato R, Goldstein JL, Brown MS: Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 1993;90:9261-9265.
49. Guerin M, Egger P, Soudant C, Le Goff W, van Tol A, Dupuis R, Chapman MJ: Dose-dependent action of atorvastatin in type IIB hyperlipidemia: preferential and progressive reduction of atherogenic apoB-containing lipoprotein subclasses (VLDL-2, IDL, small dense LDL) and stimulation of cellular cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 2002;163:287-296.
50. Packard CJ, Shepherd J: Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1997;17:3542-3556.
51. Koh KK: Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovasc Res.* 2000;47:648-657.
52. Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, Sprecher DL, Schwartz SL, Lupien PJ, Jones PH, Haber HE, Black DM: Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1995;15:678-682.
53. Bakker-Arkema RG, Davidson MH, Goldstein RJ, Davignon J, Isaacsohn JL, Weiss SR, Keilson LM, Brown WV, Miller VT, Shurzinske LJ, Black DM: Efficacy and safety of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *JAMA* 1996;275:128-133.

54. Alaupovic P, Heinonen T, Shurzinske L, Black DM: Effect of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on lipids, apolipoproteins and lipoprotein particles in patients with elevated serum cholesterol and triglyceride levels. *Atherosclerosis* 1997;133:123-133.
55. Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ: Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia : preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2000;20:189-197.
56. Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A: Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest* 1992;90:1290-1295.
57. Oliveira HC, Chouinard RA, Agellon LB, Bruce C, Ma L, Walsh A, Breslow JL, Tall AR: Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. Cis-acting sequences mapped in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1996;271:31831-31838.
58. Fuhrman B, Koren L, Volkova N, Keidar S, Hayek T, Aviram M: Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes. *Atherosclerosis* 2002;164:179-185.
59. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J: Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2000;20:2113-2119.
60. Mirdamadi HZ, Sztanek F, Derdak Z, Seres I, Harangi M, Paragh G: The human paraoxonase-1 phenotype modifies the effect of statins on paraoxonase activity and lipid parameters. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:366-374.
61. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW: Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2003;23:2083-2089.
62. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB: The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol* 2005;6:248-261.
63. Cannon B, Nedergaard J: Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84:277-359.
64. Esteves TC, Brand MD: The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim.Biophys.Acta* 2005;1709:35-44.

65. Brand MD, Esteves TC: Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2005;2:85-93.
66. Deeney JT, Prentki M, Corkey BE: Metabolic control of beta-cell function. *Semin.Cell Dev.Biol* 2000;11:267-275.
67. Cahill GF, Jr.: Starvation in man. *N Engl.J Med* 1970;282:668-675.
68. Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R: Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:333-340.
69. Finn PF, Dice JF: Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* 2006;22:830-844.
70. Horowitz JF, Coppack SW, Paramore D, Cryer PE, Zhao G, Klein S: Effect of short-term fasting on lipid kinetics in lean and obese women. *Am J Physiol* 1999;276:E278-E284.
71. Getty-Kaushik L, Richard AM, Corkey BE: Free fatty acid regulation of glucose-dependent intrinsic oscillatory lipolysis in perfused isolated rat adipocytes. *Diabetes* 2005;54:629-637.
72. Foster DW: The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann.N Y.Acad.Sci.* 2004;1033:1-16.
73. Foster DW: The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann.N Y.Acad.Sci.* 2004;1033:1-16.
74. Taggart AK, Kero J, Gan X, Cai TQ, Cheng K, Ippolito M, Ren N, Kaplan R, Wu K, Wu TJ, Jin L, Liaw C, Chen R, Richman J, Connolly D, Offermanns S, Wright SD, Waters MG: (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem.* 2005;280:26649-26652.
75. Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St Pierre J, Grey ST, Lowell BB: Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 2003;112:1831-1842.
76. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP: A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 1999;96:7473-7478.
77. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB: Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 2001;105:745-755.

78. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N: Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic.Biol Med* 2004;37:755-767.
79. Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet F: Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* 2001;50:803-809.
80. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M: Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic.Biol Med* 1996;20:463-466.
81. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997;46:1733-1742.
82. Patane G, Anello M, Piro S, Vigneri R, Purrello F, Rabuazzo AM: Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition. *Diabetes* 2002;51:2749-2756.
83. Affourtit C, Brand MD: On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells. *Biochim.Biophys.Acta* 2008;1777:973-979.
84. BLIGH EG, DYER WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J Biochem.Physiol* 1959;37:911-917.
85. BLIGH EG, DYER WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J Biochem.Physiol* 1959;37:911-917.
86. Harangi M, Seres I, Varga Z, Emri G, Szilvassy Z, Paragh G, Remenyik E: Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:685-691.
87. Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY: Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* 2004;39:1077-1083.
88. Carmen GY, Victor SM: Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal.* 2006;18:401-408.
89. Jensen MD, Haymond MW, Gerich JE, Cryer PE, Miles JM: Lipolysis during fasting. Decreased suppression by insulin and increased stimulation by epinephrine. *J Clin Invest* 1987;79:207-213.
90. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A: Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr.Rev.* 2002;23:201-229.

91. Wahren J, Sato Y, Ostman J, Hagenfeldt L, Felig P: Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *J Clin Invest* 1984;73:1367-1376.
92. Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799-806.
93. Orellana M, Fuentes O, Rosenbluth H, Lara M, Valdes E: Modulation of rat liver peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation by starvation. *FEBS Lett.* 1992;310:193-196.
94. Browning JD, Horton JD: Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-152.
95. Kersten S, Desvergne B, Wahli W: Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000;405:421-424.
96. Heijboer AC, Donga E, Voshol PJ, Dang ZC, Havekes LM, Romijn JA, Corssmit EP: Sixteen hours of fasting differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res.* 2005;46:582-588.
97. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, Jr., Reitman ML, Gonzalez FJ: Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 2003;111:737-747.
98. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, Gonzalez FJ, Reddy JK: Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem.* 2003;278:498-505.
99. Foufelle F, Ferre P: New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem.J* 2002;366:377-391.
100. Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H: Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 1998;95:5987-5992.
101. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, .: Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl.J Med* 1987;317:1237-1245.
102. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J: 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.
103. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Iranmanesh A, Wilt TJ, Mann D, Mayo-Smith M, Faas FH, Elam MB, Rutan GH, .: Distribution of lipids in 8,500 men with coronary artery disease. Department of Veterans Affairs HDL Intervention Trial Study Group. *Am J Cardiol* 1995;75:1196-1201.
  104. Illingworth DR, Crouse JR, III, Hunninghake DB, Davidson MH, Escobar ID, Stalenhoef AF, Paragh G, Ma PT, Liu M, Melino MR, O'Grady L, Mercuri M, Mitchel YB: A comparison of simvastatin and atorvastatin up to maximal recommended doses in a large multicenter randomized clinical trial. *Curr Med Res.Opin* 2001;17:43-50.
  105. Athyros VG, Papageorgiou AA, Mercouris BR, Athyrou VV, Symeonidis AN, Basayannis EO, Demetriadis DS, Kontopoulos AG: Treatment with atorvastatin to the National Cholesterol Educational Program goal versus 'usual' care in secondary coronary heart disease prevention. The GREek Atorvastatin and Coronary-heart-disease Evaluation (GREACE) study. *Curr Med Res.Opin* 2002;18:220-228.
  106. Le NA, Innis-Whitehouse W, Li X, Bakker-Arkema R, Black D, Brown WV: Lipid and apolipoprotein levels and distribution in patients with hypertriglyceridemia: effect of triglyceride reductions with atorvastatin. *Metabolism* 2000;49:167-177.
  107. Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman SH, Haudenschild CC, Vaisman BL, Hoyt RF, Jr., Demosky SJ, Jr., Kauffman RD, Hazel CM, Marcovina SM, Brewer HB, Jr.: Overexpression of lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 1996;93:11448-11453.
  108. Agellon LB, Walsh A, Hayek T, Moulin P, Jiang XC, Shelanski SA, Breslow JL, Tall AR: Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem.* 1991;266:10796-10801.
  109. Mishra M, Durrington P, Mackness M, Siddals KW, Kaushal K, Davies R, Gibson M, Ray DW: The effect of atorvastatin on serum lipoproteins in acromegaly. *Clin Endocrinol.(Oxf)* 2005;62:650-655.
  110. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM: The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1996;16:831-842.
  111. Moller DE, Kaufman KD: Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu.Rev.Med* 2005;56:45-62.

112. Chakravarthy MV, Booth FW: Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl.Physiol* 2004;96:3-10.
113. Hales CN, Barker DJ: The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001;60:5-20.
114. Wada F, Usami M: Studies on fatty acid omega-oxidation. Antiketogenic effect and gluconeogenicity of dicarboxylic acids. *Biochim.Biophys.Acta* 1977;487:361-368.
115. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Takayanagi R, Nakamuta M: Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol.Med* 2007;20:351-358.
116. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999;103:1489-1498.
117. Hashimoto T, Fujita T, Usuda N, Cook W, Qi C, Peters JM, Gonzalez FJ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK: Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *J Biol Chem.* 1999;274:19228-19236.
118. Joseph JW, Koshkin V, Zhang CY, Wang J, Lowell BB, Chan CB, Wheeler MB: Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes* 2002;51:3211-3219.
119. Bordone L, Guarente L: Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol* 2005;6:298-305.
120. Chan CB, Kashemsant N: Regulation of insulin secretion by uncoupling protein. *Biochem.Soc.Trans.* 2006;34:802-805.
121. De Souza CT, Araujo EP, Stoppiglia LF, Pauli JR, Ropelle E, Rocco SA, Marin RM, Franchini KG, Carvalheira JB, Saad MJ, Boschero AC, Carneiro EM, Velloso LA: Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J* 2007;21:1153-1163.
122. Saleh MC, Wheeler MB, Chan CB: Endogenous islet uncoupling protein-2 expression and loss of glucose homeostasis in ob/ob mice. *J Endocrinol.* 2006;190:659-667.

## X. KÖZLEMÉNYEK

### **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

**Kassai A**, Illés L, Mirdamadi HZ, Seres I, Kalmár T, Audikovszky M, Paragh G. The effect of atorvastatin therapy on lecithin:cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. *Clinical Biochemistry* 2007; 40:1-5

**IF: 2,072**

Sheets AR, Fülöp P, Derdák Z, **Kassai A**, Sabo E, Mark NM, Paragh G, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 modulates the lipid metabolic response to fasting in mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008; 294:1017-1024

**IF: 3,587**

### **Az értekezés alapjául nem szolgáló közlemények:**

Seres I, Fóris G, Varga Z, Kosztáczky B, **Kassai A**, Balogh Z, Fülöp P, Paragh G. The association between angiotensin II-induced free radical generation and membrane fluidity in neutrophils of patients with metabolic syndrome. *J Membr Biol* 2006;214(2):91-8

**IF: 2,112**

Harangi M, Mirdamadi HZ, Seres I, Sztanek F, Molnár M, **Kassai A**, Derdák Z, Illyés L, Paragh G. Atorvastatin effect on the distribution of high-density lipoprotein subfractions and human paraoxonase activity. *Transl Res* 2009;153(4):190-198

**IF: 1,984**

**Az in extenso közlemények összesített impakt faktora: 9,755**

### Nemzetközi folyóiratban megjelent idézhető absztraktok:

Paragh G, Illyés L, Köbling T, Harangi M, Derdák Z, **Kassai A**, Balogh Z, Pados G, Seres I. Atorvastatin effect on paraoxonase and enzymes responsible for HDL remodeling. *XIIIth International Symposium on Atherosclerosis*, Kyoto, Japán, 2003. *Atherosclerosis Supplements* 2003;4(2): 299

Seres I, Paragh G, Kosztáczky B, Kalmár T, Mirdamadi HZ, **Kassai A**, Fóris G. Disturbed Ca<sup>2+</sup> transport in neutrophils of obese patients. *XIV International Symposium on Atherosclerosis*, Róma, Olaszország, 2006. *Atherosclerosis Supplements* 2006;7( 3): 229

Kosztaczký B, Foris G, Seres I, **Kassai A**, Kalmar T, Paragh G. Mevalonate cycle of human monocytes is disturbed by leptin in vitro. *XIV International ymposium on Atherosclerosis*, Róma, Olaszország, 2006. *Atherosclerosis Supplements* 2006;7(3): 577

Seres I, Foris G, **Kassai A**, Mirdamadi HZ, Paragh G. Leptin-induced Ca<sup>2+</sup> transport in neutrophils of obese patients. *15th European Congress on Obesity*, Budapest, Magyarország. *International Journal of Obesity* 2007; 31:S74

Paragh G, **Kassai A**, Sztanek F, Illyes L, Mirdamadi HZ, Seres I. The effect of atorvastatin therapy on HDL subfractions, lecithin:cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and human paraoxonase-1. *European Atherosclerosis Society 76. Kongresszusa*, Helsinki, Finnország, 2007. *Atherosclerosis Supplements* 2007; 8(1):203

**Kassai A**, Wang H, Holloway MP, Altura RA. High Fat and High Carbohydrate diets markedly accelerate diabetes in mice lacking survivin. *Diabetes* 2009;58 Suppl 1:A92

### **Előadások:**

**Kassai A**, Seres I, Kalmár T, Mirdamadi HZ, Paragh G. Az atorvastatin kezelés hatása a HDL remodellingjében szerepet játszó lecitin-koleszterin-acil-transzferázra (LCAT) és koleszterin-észter-transzfer proteinre (CETP). *Magyar Atherosclerosis Társaság XV. Kongresszusa*, Sopron, 2004.

**Kassai A**, Seres I, Kalmár T, Mirdamadi HZ, Paragh G. A CETP mediálta HDL remodellingnek és a paraoxonáz aktivitásának változása atorvastatin kezelés hatására. *Észak-Magyarországi Belgyógyász Társaság Kongresszusa*, Debrecen, 2005. – 1. helyezet

**Kassai A**, Seres I, Kalmár T, Mirdamadi HZ, Paragh G. A HDL remodellingjét befolyásoló enzimek és a paraoxonáz aktivitásának változása atorvastatin kezelés hatására. *Magyar Szabadgyökkelkutató Társaság III. Kongresszusa*, Debrecen, 2005.

**Kassai A**, Wang H, Holloway MP, Altura RA. High Fat and High Carbohydrate diets markedly accelerate diabetes in mice lacking survivin. *Boston Ithaca Islet Club Meeting*, Sturbridge, USA, 2009.

**Kassai A**, Wang H, Holloway MP, Altura RA. High Fat and High Carbohydrate diets markedly accelerate diabetes in mice lacking survivin. *American Diabetes Association's 69<sup>th</sup> Scientific Session*, New Orleans, USA, 2009.

### **Poszterek:**

**Kassai A**, Seres I, Kosztáczky B, Fóris G, Paragh G. The possible connection between Angiotensin II-induced free radical generation and membrane fluidity in neutrophils of

patients with metabolic syndrome. *Semmelweis Symposium: Inflammatory mechanisms in atherosclerosis - A critical appraisal*, Budapest, 2005.

Paragh G, Mirdamadi HZ, Harangi M, Sztanek F, Derdák Z, **Kassai A**, Seres I. The human paraoxonase-1 (PON1) phenotype modifies the effect of statins on PON1 activity and lipid parameters. *XV. International Symposium on Atherosclerosis*, Boston, USA, 2009.

## **XI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS**

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Paragh György professzor úrnak, aki már orvostanhallgató koromban támogatta a kutatás iránti érdeklődésemet, és akinek köszönhetően az egyetemistaként elkezdett munka az értekezés elkészítéséig eljutott. Köszönettel tartozom még azért, hogy intézetvezetőként a vizsgálatok és a kutatómunka feltételeit biztosította, valamint a tanácsokért és a kitartó támogatásért, amellyel segítette és előbbre vitte munkámat. Emellett köszönetemet szeretném még kifejezni, hogy megtisztelt azzal az életre szóló lehetőséggel, hogy kutatásaim egy részét az Egyesült Államokban végezhettem.

Köszönettel tartozom másik témavezetőmnek, az I. Belklinika Kutató Laboratóriumában dolgozó Dr. Seres Ildikónak, aki Paragh professzor úrhoz hasonlóan egyetemista korom óta végig kísérte és támogatta a tudományos tevékenységem. Köszönetemet fejezném még ki a kísérletek megtervezéséhez és kivitelezéséhez nyújtott segítségéért, a baráti támogatásáért és biztatásáért. Köszönettel tartozom még azért, hogy felkeltette a kutatás iránti érdeklődésem, megszeretette velem a kutatást annyira, hogy a PhD hallgatói státuszom lejárta után is a kutatás mellett döntöttem, és elvetette bennem a kutatói szemlélet alapjait, amire az elmúlt négy év kutatói tapasztalatát tovább építhettem.

Köszönöm Dr. Baffy Györgynek a Liver Research Centerben töltött két évet, ahol kutatómunkám feltételeit biztosította, és a lehetőséget, hogy a PhD hallgatói éveim egy részét az Egyesült Államokban tölthettem, és a kutatásban fontos módszereket és

technikákat megtanulhattam. Köszönöm a Baffy labor tagjainak a munkámhoz nyújtott segítségüket.

Köszönöm Mozga Mária Gyöngyi és Lénárt Ferencné asszisztenseknek, hogy a laboratóriumi munkámat közvetlenül segítették.