

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**AZ ATORVASTATIN KEZELÉS ÉS AZ UNCOUPLING  
PROTEIN-2 HATÁSA ÉS SZEREPE A  
ZSÍRANYAGCSERÉBEN**

**Dr. Kassai Andrea**



**DEBRECENI EGYETEM**  
Egészségtudományok Doktori Iskola  
Anyagcsere és Endokrin Betegségek Program

Debrecen, 2010

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**AZ ATORVASTATIN KEZELÉS ÉS AZ UNCOUPLING  
PROTEIN-2 HATÁSA ÉS SZEREPE A  
ZSÍRANYAGCSERÉBEN**

**Dr. Kassai Andrea**

Témavezetők:  
Prof. Dr. Paragh György  
Dr. Seres Ildikó



**DEBRECENI EGYETEM**  
Egészségtudományok Doktori Iskola  
Anyagcsere és Endokrin Betegségek Program

Debrecen, 2010

*Az értekezés címe:*

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

*Doktori Iskola:*

Egészségtudományok Doktori Iskola, Anyagcsere és Endokrin Betegségek Program

*Témavezetők:*

Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora  
Dr. Seres Ildikó, Ph.D.

*A doktori szigorlati bizottság:*

Elnöke: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora  
Tagok: Prof. Dr. Ilyés István, Ph.D.  
Dr. Reiber István, Ph.D

*A bíráló bizottság:*

Elnöke: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora  
Opponensek: Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora  
Prof. Dr. Somogyi Anikó, az MTA doktora  
Tagok: Prof. Dr. Ilyés István, Ph.D.  
Dr. Reiber István, Ph.D

*Az értekezés védésének időpontja és helye:*

**2010. május 11. 13:00, az I.sz. Belgyógyászati Klinika Tanterme**

# **I. BEVEZETÉS**

## **1.1 A HDL**

Az érlelmeszesedés 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 érlelmeszesedés kialakulásában. A HDL védő hatásának a háttérében három fő mechanizmust feltételeznek: i.) a reverz koleszterin transzportot, ii.) direkt endothel hatást és iii.) az antioxidáns hatást.

Jelenleg az a kialakult 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. Ez a heterogenitás a HDL funkcióján keresztül a teljes HDL frakció kardiovaszkuláris védő hatását befolyásolhatja.

## **1.2 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. Ezután a HDL felszínén lévő szabad koleszterint a lecitin-koleszterin-acil-transzferáz (LCAT) koleszterin észterré 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 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 máj által felvett koleszterin észter visszaalakul szabad koleszterinné, amely vagy epesavvá alakul, vagy direkt távozik az epével. A HDL folyamatos és kiterjedt remodellingje szabályozza a HDL alakját, méretét, összetételét, és felel a HDL heterogenitásáért.

### **1.3 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

VLDL-re és az LDL-re szállított koleszterin észtert az érfal makrofágjai veszik fel, a CETP proatherogén, viszont ha a VLDL-re és az LDL-re került koleszterin észtert a máj veszi fel, akkor a CETP antiatherogénnek tekinthető.

Úgy tűnik, hogy a HDL szint emelése céljából a nemrégiben kifejlesztett CETP inhibitorok a proatherogén hatást támasztják alá.

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

Az LCAT a reverz koleszterin transzport másik kulcsfontosságú enzime, amely szintén befolyással van a HDL tulajdonságaira. A keringésbe kerülve a HDL-hez kötődik. A reverz koleszterin transzport során az LCAT a kofaktora, az apolipoprotein A-I segítségével koleszterinből koleszterin észtert formál úgy, hogy az a lecitin sn-2 pozíciójában levő zsírsavát a koleszterin OH-csoportjára szállítja. 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.

#### **1.5 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 kialakulásába.

Emellett a HDL-t is védi az oxidációtól, és ezáltal javítja a HDL hatékonyságát a reverz koleszterin transzportban. A paraoxonáz a májban termelődik, majd innen a vérbe szekretálódik, ahol a HDL-hez kötődik. A paraoxonáz szérum szintje viszonylag konstans egy adott emberben, ugyanakkor az egyének közötti eltérés nagy. Ezért az egyének közötti nagy aktivitásbeli különbséget a génjének a polimorfizmusa felel.

## **1.6 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. Ezt az enzimet gátolják a sztatínok, más néven a HMG-CoA inhibitorok, melynek az egyik leggyakrabban használt tagja az atorvastatin. A sztatínok elsődlegesen a májban hatva gátolják a de novo koleszterin szintézist, ami a hepatocyták koleszterin raktárának csökkenéséhez vezet. Ennek egyrészt az lesz a következménye, hogy a máj LDL-receptor expressziója fokozódik, amelyen keresztül fokozódik az LDL és a VLDL eltávolítása a plazmából, másrészt erősen csökken a máj VLDL termelése. Mindezen folyamatoknak köszönhetően lecsökken a plazmában keringő apo B100-at tartalmazó részecskék száma.

A többi sztatinhoz hasonlóan az atorvastatin primer hypercholesterolemiában dóziszfüggő módon jelentősen csökkenti a plazma koleszterin és LDL-koleszterin szintjét, valamint szignifikánsan csökkenti a plazma triglicerid szintjét mind primer hypercholesterolémiában, mind pedig primer hypertrigliceridémiában.

### **1.7 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 különböző energia források, úgy mint glükóz, zsír, és aminosavak oxidációja során elektronok termelődnek NADH és FADH<sub>2</sub> formájában. A NADH és a FADH<sub>2</sub> elektronokat ad át a mitokondrium belső membránjában lévő elektron transzport láncnak. Amint az elektronok végighaladnak az elektron transzport láncban, proton pumpálódik a mitokondrium mátrixából a membrán közti térbe, ezáltal létrehozva a belső membránon keresztül kialakuló proton gradienst.

A proton gradiens formájában kialakult és megőrzött energiát az V-ös komplex, azaz az ATP szintáz használja fel, és ATP szintetizálódik. A protonok az ATP szintázon 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 használandó fel. Így került felfedezésre a barna zsírszövetben található uncoupling protein, amely nélkülözhetetlen a hideghez való adaptációban, a thermogenesisben.

A barna zsírszövetben található UCP1 klónozással nyert homológjait UCP2-nak és UCP3-nek nevezték el. 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 oxigénradikálok képződését. Az UCP2 másik lehetséges funkciója az inzulin szekréció szabályozása.

## **1.8 Az inzulin szekréció folyamata**

A tápanyagok közül a glükóz metabolizmusából származó intracelluláris szignálok képezik az inzulin szekréció legerősebb stimulusát. A glükóz a nagy kapacitású glucose transporter-type 2-n (GLUT-2) keresztül jut be a  $\beta$ -sejtekbe. 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. 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.

### **1.9 Fiziológias változások éhezés során**

Az evolúció során az élőlényeknek alkalmazkodniuk kellett a folyamatosan változó táplálékellátáshoz. 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.

Éhezéskor a zsírszövetben tárolt trigliceridek szabad zsírsavakká hidrolizálódnak, majd a keringésbe kerülnek, hogy más szöveteket lássanak el energiával. Az egyik triglicerid hidrolízisben szereplő enzim a hormon-szenzitív lipáz (HSL). Az HSL egyik fő szabályzója az inzulin, amely gátolja az HSL-t. Körülbelül 24 órás éhezést követően megemelkedik a szérumban szabad zsírsav szintje, amely a lipolízis aktiválódását jelzi. 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.

## 1.10 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 szekrécióban. Az UCP2 protoncsorgás révén csökkenti a proton gradienst, ezáltal az ATP szintézist, végül az alacsonyabb ATP szint csökkent inzulin szekrécióhoz vezet. Mindezekből következik az UCP2 negatív hatása a glükóz stimulált inzulin szekrécióra. Meggyőző bizonyítékaul szolgáltak ennek a feltételezésnek az UCP2 knockout egereken végzett kísérletek. Az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek szérumának inzulin koncentrációja magasabb, míg a szérum glükóz szintje alacsonyabb volt, valamint ezek az egerek in vivo a vércukor szint emelkedésre több inzulint szekretálnak. A  $\beta$ -sejtekben az UCP2 működésének egyik lehetséges szabályozója a zsírsav oxidáció, ugyanis a zsírsavak  $\beta$ -oxidációja során fokozottan termelődnek reaktív oxigénradikálok, amelyek aktiválják az UCP2-t. 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 aktivitás fontos szerepet játszhat a  $\beta$ -sejtek folyamatosan változó táplálék ellátásra adott fiziológiai válaszában koordinálásában. Az UCP2 szerepe jelentős lehet az inzulin szekréció gátlásában, mikor a vércukor szintje alacsony, amely megelőzi a hypoglycaemia kialakulását éhezéskor. Az egyensúly fenntartásához finom szabályozásra van szükség, amely valószínűleg az UCP2 rendkívül rövid, 30 percnyi féléletidejének köszönhető.

## **II. CÉLKITŰZÉSEK**

### **2.1 Az atorvastatin kezelés hatása a lipid paraméterekre és a HDL remodelingben 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 remodelingben szereplő LCAT és CETP aktivitása és funkciója 20 mg-os atorvastatin kezelés hatására. Végül célunk volt még, hogy megvizsgáljuk az atorvastatin hatását a szérum paraoxonáz-1 koncentrációra és aktivitásra, amelyet az atorvastatin a HDL remodelingben szerepet játszó enzimek aktivitására hatva befolyásolhat.

### **2.2 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.

### **III. MÓDSZEREK**

#### **3.1 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 hyperlipidémiás betegek kerültek beválasztásra. A II. a és II. b típusú hyperlipidémia diagnosztikai kritériuma volt: LDL koleszterin > 4.2 mmol/l  $\pm$  triglicerid > 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 alapbetegség, microalbuminuria, terhesség, szoptatás és 130  $\mu$ mol/L feletti szérum kreatinin szint.

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

### **3.2 Lipid paraméterek meghatározása**

A vérminták (5 ml vénás vér) levétele legalább 12 óra éhezés után történt. 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 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.

### **3.3 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. 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.

### **3.4 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  $\mu$ l plazmát 20  $\mu$ l donor és akceptor eleggyel és 1000  $\mu$ l pufferrel kevertük össze. A CETP által mediált koleszetrin észter transzfert a donorról az akceptor molekulára a fluoreszcens koleszterin-linoléat 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.

### **3.5 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  $\mu$ l szérumhoz 1 ml Tris/HCl puffert (100 mM, pH 8,0) adtunk, amely 2 mM  $\text{CaCl}_2$ -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 ( $17100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) 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  $\mu\text{g}$  PON/ml közé esett. Az intra-assay koeficiens 3.2 % volt.

A PON specifikus aktivitást úgy számoltuk ki, hogy a PON aktivitást elosztottuk a PON koncentrációval, és  $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ -ben fejeztük ki.

### **3.6 Az állatok kezelése**

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 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 órás éheztetés után az egereket leöltük. A testsúlyukat megmértük, a vércukor szinteket a farok 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.

### **3.7 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. A következő egyenlet alapján számoltuk ki a teljes lipid tartalmat: (a lipid súlya az adott alikvotban x a kloroform réteg térfogata)/aliquot térfogata.

### **3.8 Szövettani vizsgálatok**

A májak szövettani vizsgálatra szánt darabját Tissue-Tek mediumba (Sakura, Torrance, CA) ágyasztuk be, majd abban lefagyasztottuk. A metszetek elkészítéséhez beágyazott máj szövetekből 4  $\mu$ 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.

### **3.9 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 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml apoprotinin, és 1 mM β-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 immunoblottokat foszforilált hormone-sensitive lipase (HSL) (Cell Signaling, Danvers, MA), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-α (Sigma), PPAR-γ, 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 egyenletes töltést β-actinnal igazoltuk.

### **3.10 Real-time PCR**

Az RNS-t TRIzol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA) vontuk ki a folyékony nitrogénben lefagyasztott máj mintákból. 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. Minden egyes mintát a saját TBP mRNS tartalmára normalizáltuk. Az adatokat az etetett kontrolhoz hasonlított relatív bőségekben adtuk meg.

### **3.11 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.

## IV. EREDMÉNYEK

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

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.

A kiindulási értékhez viszonyítva az atorvastatin a szérumban a 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;  $p < 0,001$ ).

Mivel a HDL atheroszklerózis ellen védő hatása nem csak a HDL plazma koncentrációjától, 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;  $p < 0,001$ ), 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;  $p < 0.01$ ).

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  $143,59 \pm 9,40$   $\text{pmol/ml/h}$ -ra;  $p < 0,001$ ) szignifikáns csökkenést mutatott. 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.

## 4.2 A biokémiai markerek változásai éheztetést követően

Az *ucp2<sup>-/-</sup>* és vad típusú egereket 72 órán át éhezettük, hogy vizsgálhassuk az UCP2 hiányának a hatását az éheztetésre adott metabolikus válasza.

Megfigyeléseink szerint az etetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben a szérum inzulin szintje háromszor magasabb volt a vad típusú egerekhez képest. A szérum inzulin szintje magasabb maradt az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben 24 órás éheztetést követően, ugyanakkor ez a különbség eltűnt a 72 órán át tartó éheztetéskor.

Annak ellenére, hogy a kezdeti vércukor szint és az éheztetést követő hypoglycaemia szignifikánsan nem különbözött az *ucp2<sup>-/-</sup>* és a vad típusú egerekben, 72 órás éheztetés után az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek vércukor szintje alacsonyabb volt a vad típusú kontrol egerekhez képest.

24 órás éhezést követően a szérum zsírsav szintje emelkedett a vad típusú egerekben, míg az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben ezen emelkedés csak kismértékű volt. Ez a különbség még szembetűnőbb volt 72 órás éheztetést követően, amikor az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerek zsírsav szintje az éheztetés előtti érték alá esett. 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. Ebből következik, hogy az éheztetés hatására kialakuló lipolízis csökkent az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. 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 szérum triglicerid szintje fokozatosan csökkent a vad típusú egerekben az éheztetés

előrehaladtával. 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 szérum 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 válaszra.

### **4.3 Hepatikus szteatózis**

24 órás éheztetést követően a teljes szövet zsír extrakció és Oil red O festés csökkent zsír felhalmozódást mutatott az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek májában. 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.

### **4.4 A zsíryanycsere szabályozásában szerepet játszó molekulák expressziójának változása a májban**

A mitokondrium zsírsav felvételének sebesség meghatározó enzime, a karnitin palmitoyltransferáz 1 (CPT 1) gén expressziója éheztetés hatására fokozatosan emelkedett a vad típusú egerekben, míg nem változott az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben. Hasonlóan alakult a gén expresszió a közepes lánc-specifikus acyl-CoA dehidrogenáz (MCAD), a mitokondrium  $\beta$ -oxidáció kulcsenzimének esetében is.

Éhezéskor a zsírsav oxidáció másodlagos útvonalakon is bekövetkezhet. Ezért az acyl-CoA oxidáz (AOX) (peroxiszomális  $\beta$ -oxidáció) és a citokróm P-450 2E1 (CYP2E1) (mikroszómális  $\omega$ -oxidáció) expresszióját is vizsgáltuk. Mindkét gén expressziója alacsonyabb volt az éheztetett *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. A mitokondriális  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA szintáznak, a ketogenezis kulcsfontosságú enzimének gén expressziója jelentősen emelkedett az éhezés során a vad típusú egerekben, viszont nem változott az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben.

A mikroszómális triglicerid transzfer protein (MTTP), a májsejtekből VLDL-t exportáló protein gén expressziója fokozatosan csökkent az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben.

Megmértük az acetyl-CoA karboxiláz (ACC), a zsírsav szintáz (FAS) és a stearyl-CoA deszaturáz (SCD) mRNS szintjét. 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. Úgy tűnik, hogy a mi állatmodellünkben az UCP2 hiányának hatása elsősorban a zsír lebontás zavarában nyilvánul meg.

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. A vártnak megfelelően a máj SREBP-1 szintje csökkent a vad típusú egerekben 24 órás éheztetést követően, viszont nem változott az *ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. 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.

## V. MEGBESZÉLÉS

A korábbi primer prevenciók tanulmányok közül először a Helsinki Heart Study hívta fel a figyelmet arra, hogy a HDL szint 15%-os növekedése jelentős szereppel bírhat a kardiovaszkuláris események csökkenésében. Ezt követően több tanulmány metaanalízise alapján azt mutatták ki, hogy 1%-os HDL emelkedés nőknél 3%-kal, férfiaknál 2%-kal csökkenti a kardiovaszkuláris események rizikóját. Ezek a tanulmányok azt bizonyították, hogy mind a primer, mind a szekunder prevencióban a HDL szint emelkedés a klinikai végpontokat kedvezően befolyásolja. Ez 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 GREACE tanulmány azt mutatta, 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 atheroszklerózis kialakulásával szemben védő hatása nemcsak a HDL mennyiségétől, hanem az összetételétől is függ, amelyet a HDL remodellingben szerepet játszó enzimek aktivitása befolyásol.

A korábbi irodalmi adatokból jól ismert, hogy az LCAT növekedése a HDL emelését hozza létre, míg a CETP szintje inverz

kapcsolatban áll a HDL szinttel. Jelen vizsgálatunkban 20 mg atorvastatin alkalmazása mellett 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. 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. 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. 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, 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 sztatinek 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.

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.

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 szövödmény, a diabeteses dyslipidemia. A diabeteses dyslipidemia következtében kialakuló korai atheroszklerózis jelentőségét hangsúlyozza, hogy az NCEP meglévő koronária betegséggel egyenrangú rizikóként kezeli a diabetes mellitust. A diabetes egyre több embert érint napjainkban.

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 energiátárolás céljából kialakult takarékos jelleg nem képes lépést tartani a napjaink bőséges, folyamatos élelmiszer ellátásával és az

ülő életmóddal. Ebben a folyamatban szerepet játszó molekulák azonosítását teheti lehetővé, ha jobban megértjük, hogyan zajlik az éhezésre adott metabolikus válasz szabályozása fiziológias körülmények között.

Jelen munkámban igazolódott, hogy egerekben az UCP2 befolyással van az éhezés hatására a zsíryanycserében bekövetkező változásokra, ugyanis az UCP2 hiányában zavart a máj komplex biokémiai válasza, amely magába foglalja a zsírsavak hatékony lebontását, átalakítását és újra eloszlását.

A zsírsav oxidációban kisebb szerepet betöltő peroxiszómális  $\beta$ -oxidáció és mikroszómális  $\omega$ -oxidáció jelentőssé válik károsodott mitokondriális  $\beta$ -oxidáció esetén, vagy amikor nagyobb mennyiségben szállítódik zsírsav a májba, mint például éhezéskor. Az UCP2 hiányában a mitokondrium elégtelen  $\beta$ -oxidációs kapacitása elméletileg a zsírsav lebontást áterelheti a peroxiszómába és a mikroszómába, viszont erre utaló jelet nem találtunk az éheztetett *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben.

Az éhezés hatása a lipid anyagcserét szabályozó transzkripciós faktorokra jól ismert. A perifériás lipolízis és a májba történő fokozott zsírsav szállítás eredményeként az éheztetés fokozza a máj PPAR- $\alpha$  és PPAR- $\gamma$  expresszióját. 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. 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, 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, arra a következtetésre jutottunk, hogy az SREBP-1c kevéssé játszik közre az UCP2 hiánya miatt fellépő metabolikus változásokra az éheztetett májban.

Annak ellenére, hogy az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek májában éheztetés hatására kialakuló zsír akkumuláció később jelenik meg, 72 óra után sokkal súlyosabbá válik, amikorra viszont a vad típusú egerekben a szteatózis már helyre áll. 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. 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. A jelen vizsgálatban a reziduális szérum inzulin szint magasabb marad az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben még a 24 órás éheztetést követően is, mely arra utal, hogy a  $\beta$ -sejtekben az UCP2 hiánya a máj zsíryanagcseréjének 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, és arra utal, hogy az inzulin szekréció elégtelen csökkentése a zsíryanagcsere éhezésre adott válaszát megzavarja az *ucp2*<sup>-/-</sup>

egerekben. 24 órás éhezést követően az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerek szérum inzulin szintje hasonló a vad típusú egerek éheztetés előtti kiindulási szintjéhez, és néhány metabolikus változás 72 órás éhezés után a legszembetűnőbb, amikor az inzulin szintek a vad típusú és az *ucp2*<sup>-/-</sup> egerekben már nem különbözik. Nemrég az UCP2 ellenes antiszensz oligonukleotiddal kezelt egerek zsírszövetében fokozott inzulin jelátvitelt írtak le. 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 zsíryanycserében az éhezés hatására bekövetkező változásokra. Eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, hogy az UCP2 upregulációja a  $\beta$ -sejtekben fiziológiásan fontos az éhezésre adott válaszban. A növekvő UCP2 szint csökkenti a  $\beta$ -sejtek inzulin termelését, ezáltal fokozza a perifériás lipolízist és a máj zsír felhasználását éhezéskor. Ugyanakkor 2-es típusú diabetesben az UCP2 állandó bősége  $\beta$ -sejt funkciózavarához vezet, így járulva hozzá az anyagcsere zavarához. Egyre több bizonyíték támasztja alá azt, hogy az UCP2 gátlása genetikai ablációval, antiszensz oligonukleotiddal, interferens RNS-sel, vagy a növényi kivonattal, a genipinnel helyre állíthatja a  $\beta$ -sejtek inzulin szekretáló képességét és javítja a 2-es típusú diabetest.

## **VI. 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 szérumban a 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 szteatóziban 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.

## VII. 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, Japan, 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

Kosztaczky B, Foris G, Seres I, **Kassai A**, Kalmar T, Paragh G. Mevalonate cycle of human monocytes is disturbed by leptin in vitro. *XIV International symposium 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. *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 Szabadgyógyászati 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.