

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Cseri Karolina**

**A gyulladássos környezet és a pravasztatin hatása a  
vázizom regenerációs képességére**

**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022.**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A gyulladássos környezet és a pravasztatin hatása a  
vázizom regenerációs képességére**

**Cseri Karolina**

**Témavezetők: Dr. Csernoch László, Dr. Tózsérné Dr. Benkő  
Szilvia**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022.**

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés és irodalmi áttekintés .....	4
Idiopátiás inflammatórikus miopátiák .....	4
Polymyositis (PM) .....	6
Dermatomyositis (DM).....	6
Zárványtestes myositis (inclusion body myositis, IBM) .....	7
Immunmediált nekrotizáló miopátia (IMNM) .....	7
Antiszintetáz szindróma (ASS).....	8
Overlap myositis .....	9
Nem specifikus myositis.....	9
Antimitokondriális M2- asszociált myositis.....	9
A koleszterin .....	9
A sztatinok .....	12
A sztatinok szerkezete, farmakokinetikai sajátosságai, hatásmechanizmusa .....	13
A sztatinok pleiotróp hatása .....	16
A sztatinok mellékhatásai, sztatin-indukált miopátiák .....	17
High mobility group box 1 protein (HMGB1) .....	20
Célkitűzések.....	25
Anyagok és módszerek .....	26
Humán eredetű harántcsíkolt izomszöveten végzett kísérletek, vizsgálatok .....	26
Humán eredetű harántcsíkolt izomszövet felhasználásának etikai jóváhagyása .....	26
Biopsziás minták és műtéti anyagok beszerzése .....	26
Humán vázizom szatellita sejtjeiből indított primer sejtenyészetek .....	27
Proliferáció és differenciáció vizsgálata humán vázizom primer sejtenyészetein .....	27
Immunhisztokémia a HMGB1 kimutatására:.....	28
Immunhisztokémia CD45 kimutatására .....	28
Western blot analízis a humán izomminták HMGB1 tartalmának meghatározására .....	29
Egér eredetű immortalizált sejtvonalakon végzett kísérletek .....	30
Egér eredetű sejtvonalak tenyésztése.....	30
Tenyésztési protokoll kokultúrában élő egér sejtvonalak proliferációjának vizsgálatához .....	30
Tenyésztési protokoll kokultúrában tartott sejtvonalak IL-6 termelésének megfigyeléséhez.....	31

Tenyésztési protokoll és pravasztatin kezelés az IL-6 citokin vizsgálatához .....	31
Tenyésztési protokoll és pravasztatin kezelés a C2C12 és RAW264.7 sejtek proliferációjának vizsgálatához .....	32
Tenyésztési protokoll és pravasztatin kezelés a C2C12 sejtek differenciációjának vizsgálatához	32
Kísérleti „kóstoltatás” sejt kultúrákon .....	33
ELISA vizsgálat az IL-6 citokin mennyiségi meghatározására .....	33
Immuncitokémia az IL-6 kimutatására .....	33
MTT teszt a sejtek életképességének meghatározására .....	34
Statisztikai analízis humán vázizom eredetű sejteken és egér sejt vonalakon végzett kísérletek adataiból .....	35
Eredmények .....	36
Humán harántcsíkolt izomszöveten végzett vizsgálatok eredményei .....	36
Idiopátiás gyulladásos miopátiában szenvedő betegek izommintáiból indított primer sejt kultúrákban a sejtek proliferációs képessége csökken .....	36
Az idiopátiás gyulladásos miopátiában szenvedő páciensek izommintáiban kevesebb a regenerálódó izomrost és a HMGB1 a sejt magban lokalizálódik .....	40
Az idiopátiás gyulladásos miopátiában szenvedő páciensek izommintái kevesebb HMGB1-et tartalmaznak, mint a kontroll.....	43
Egér eredetű sejt vonalakon végzett kísérletek eredményei .....	44
A kokultúrában történő tenyésztés nem volt hatással a C2C12 és RAW264.7 sejtek proliferációs képességére .....	44
A kokultúrában történő tenyésztés fokozta a kokultúra IL-6 termelését .....	46
A pravasztatin fokozta a kokultúra és az izomsejt tenyésztés IL-6 termelését .....	48
A pravasztatin csökkentette az izomsejtek proliferációs képességét.....	49
A pravasztatin csökkentette az izomsejtek differenciációs kapacitását .....	50
Diszkusszió, következtetések .....	52
Gyulladásban a humán vázizom.....	52
Izomgyulladás modellezése laboratóriumban .....	54
Összefoglalás .....	59
Summary.....	60
Önállóan és csapatban végzett munkák.....	61
Köszönetnyilvánítás .....	62
Irodalomjegyzék.....	63
Kulcsszavak .....	76
Keywords .....	76
Függelék.....	77

## Rövidítések jegyzéke

ADM	amiopátiás dermatomyositis
AIM2	absent in melanoma 2
AMP	adenozin-monofoszfát
ARS	aminosav-transzfer RNS szintetáz
ASS	antisztetáz szindróma
CADM	klínikailag amiopátiás dermatomyositis
C-IBM	klínikai IBM
CK	kreatin-kináz
CPD-IBM	klínikopatológiai IBM
DM	dermatomyositis
DMSA	dermatomyositis-specifikus autoantitest
ENMC	European Neuromuscular Centre International Workshop
EULAR/ACR	European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology
GMP	guanozin-monofoszfát
HMGR	3-hidroxi-3-metil-glutaril koenzim -A reduktáz
IBM	zárványtestes myositis
IFN-1	1-es típusú interferon
IIM	idiopátiás inflammatórikus miopátiák
IL-1	interleukin-1
ILD	intersticiális tüdőbetegség
IMNM	immunmediált nekrotizáló miopátia
JDM	juvenilis dermatomyositis
LDL	kis denzitású lipoprotein
MAC	membránkárosító komplex
MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1
MDA-5	antimelanóma differenciáció asszociált gén 5
MHC-I	1-es típusú fő hisztokompatibilitási komplex
MRI	mágnesesrezonancia-képzés
MSA	myositis specifikus antitestek
NT5C1A	citoszolikus 5' nukleotidáz 1A
NXP-2	antinukleáris mátrix protein 2
P-IBM	feltételezhető IBM
PM	polymyositis
PUF-60	poli-U-kötő faktor 60 kDa protein
SAE	kis ubiquitin-szerű módosító aktiváló enzim
Scl	szkleroderma
SRP	szignálfelismerő ribonukleoprotein
SSc	szisztémás szklerózis
TIF1- $\gamma$	antitranszkripciós intermedier faktor 1- $\gamma$
TNF	tumor nekrozis faktor
TRIM21	tripartite motif 21

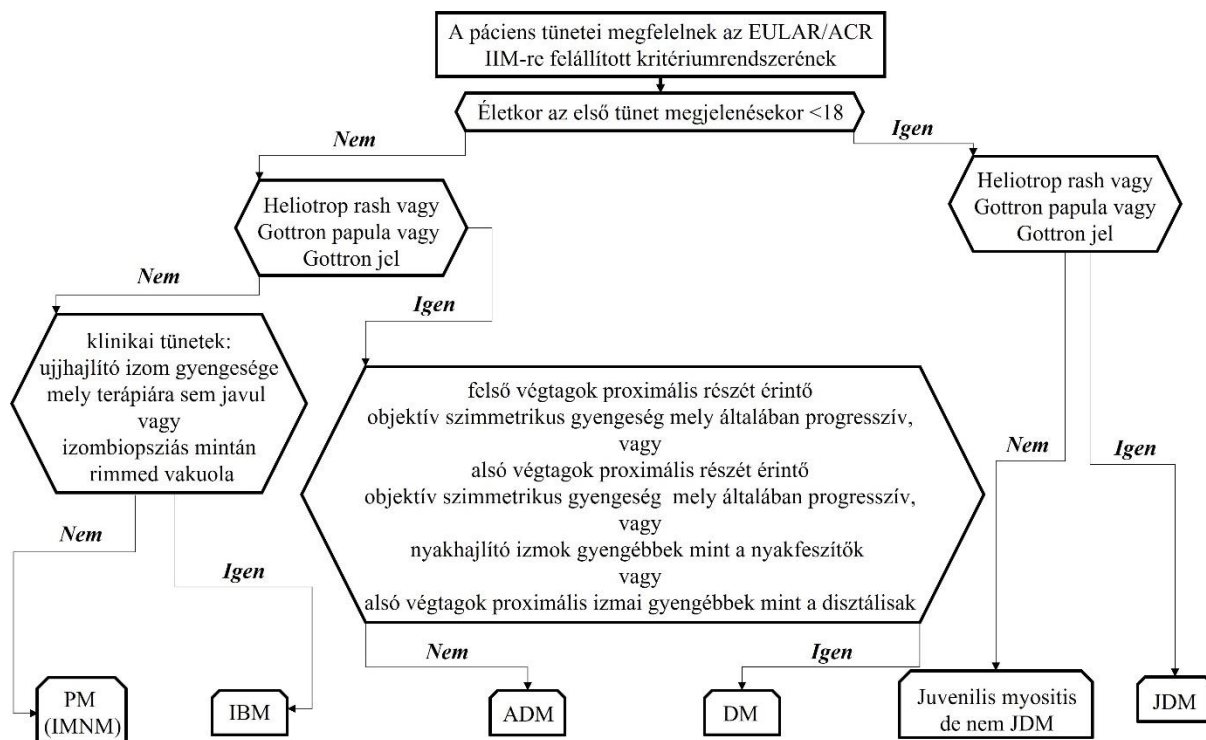
## Bevezetés és irodalmi áttekintés

A szívinfarktus és az ischémiás szívbetegség az 1900-as évek előtt szinte teljesen ismeretlen volt. 1920 után egyre több esetről számoltak be, s az 1930-as évekre már komoly közegészségügyi problémát okozott. A statisztikák alapján Amerikában jelenleg minden tizedik másodpercben létrejön egy szívinfarktus. Magyarországon évente 50 ezer ember hal meg szívrohamban. Napjainkban széles körben elfogadott nézet, hogy a szívhalálozás mögött a mozgásszegény életmód, a túlzott táplálékfelvétel, a finomított élelmiszerek túlfogyasztása és a rostszegény táplálkozás áll. A táplálkozás koleszterinszint növelő hatásának, valamint a magas vérzsírszint és a szívhalálozás közötti összefüggés elméletének akadnak ellenzői, de a koleszterinszintcsökkentő sztatínok népszerűsége évek óta töretlen (1). Kockázatuk abban rejlik, hogy a sztatínok amellet, hogy blokkolják a szervezet saját koleszterinszintézisét, egyéb olyan módokon is befolyásolják az anyagcserét, az önszabályozó mechanizmusokat, melyek jelenlegi ismereteinken még túlmutatnak (2). Mellékhatásként egyre gyakoribb az autoimmun izomérítettség vagy a végzetes veseelégtelenség.

## Idiopátiás inflammatórikus miopátiák

Az idiopátiás inflammatórikus miopátiák (IIM) olyan neuromuszkuláris betegségek heterogén csoportjait foglalják magukban, melyeket általánosan myositisként szokás említeni. Ezeket évtizedekig három alcsoportra osztották az izomgyengeség, izomgyulladás és extramuszkuláris tünetek megléte és súlyossági foka alapján. 1975-ben Bohan és Peter munkássága nyomán még csak két csoportot tartottak számon, a polymyositist (PM) és a dermatomyositist (DM) (3, 4), majd 1995-ben Griggs és munkatársai leírták a zárványtestes myositist is (inclusion body myositis, IBM), mint harmadik csoportot (5). 2003-ban egy nemzetközi konferencián (European Neuromuscular Centre International Workshop – 2003 ENMC-IIM) immunmediált nekrotizáló miopátiával (IMNM) és nem-specifikus miozitisszel bővítették a meglévő kategóriákat (6). Az elmúlt évtized kutatási eredményei, a myositis-

specifikus antitestek (MSA) felfedezése és a kiterjedt klinikai tapasztalatok alapján szükségessé vált egy új klasszifikációs rendszer megalkotása. A diagnózis felállításakor először az EULAR/ACR (European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology) klasszifikációs kritériumokat kell figyelembe venni, majd egy többlépcsős szempontrendszer alapján lehet meghatározni az alcsoportot. A jelenlegi kategorizálás hat alcsoportot különít el: polymyositis (PM)- melynek alcsoportja lett az immunmediált nekrotizáló miopátia (IMNM), zárványtestes myositis (IBM), amiopátiás dermatomyositis (ADM), dermatomyositis (DM), és fiatalkori dermatomyositis (juvenilis dermatomyositis, JDM) (1. ábra) (7). Amennyiben a páciens tünetei megfelelnek az EULAR/ACR IIM-re felállított kritériumrendszerének, a következő szempont a páciens életkora az első tünetek megjelenésekor. Amennyiben 18 éves kor alatt jelentkeztek a panaszok, úgy a bőrtünetek megléte esetén juvenilis dermatomyositis, bőrtünetek hiányában juvenilis myositis lehet a diagnózis. 18 éves kor fölött felnőttkori megbetegedésről beszélhetünk, ebben az esetben a következő szempont a bőrtünetek megléte vagy hiánya. Amennyiben bőrtünet nincs, de terápiára nem reagáló ujjhajlítózom gyengeséget panaszol a páciens vagy az izombiopsziás mintán igazolódott a rimmed vakuóla, akkor a diagnózis zárványtestes myositis, amennyiben sem az ujjhajlító izom makacs gyengesége nem jellemző, s a szövettani képen sem igazolódott rimmed vakuóla jelenléte, úgy a diagnózis polymyositis. Abban az esetben, ha felnőttkori kezdetnél bőrtünetek is jelentkeznek, eldöntendő kérdés, hogy jellemző-e a felső vagy az alsó végtagok szimmetrikus és progresszív gyengesége, vagy a nyakhajlító izmok gyengülése a nyakfeszítőkhöz képest, vagy az alsó végtagok proximális gyengesége a disztális régiókhöz képest. Amennyiben ezek közül legalább egy tünet jelen van, úgy a diagnózis dermatomyositis, ha nincs, akkor amiopátiás dermatomyositis állhat fenn.



**1. ábra Az IIM diagnózisának pontosítása többlépcsős szempontrendszer alapján (7)**

### Polymyositis (PM)

A 2003 évi ENMC-IIM osztályozási rendszer alapján a típusos polymyositisben vezető tünet a szubakut vagy ismeretlen kezdetű izomgyengeség, a laboratóriumi eredmények emelkedett kreatin-kináz szinteket mutatnak, a kórszövettani mintákon pedig jellegzetes CD8+ T-sejtes beszűrődés látható az izomrostok körül. Bőrelváltozás nem jellemző. A polymyositiszes páciensek több mint felénél a betegség lefolyása során diagnózisuk átminősíthető zárványtestes myositisre (IBM) (8).

### Dermatomyositis (DM)

A dermatomyositis jellemző klinikai tünetei a kétoldali, szimmetrikus végtagi izomgyengeség, és a jellegzetes bőrelváltozások (heliotróp kiütés, periorbitális ödéma, Gottron papulák, Gottron jel, eritéma a mellkas felső részén ún. V-jel, perifaszculáris atrófia). Klinikopatológiai szempontból a dermatomyositisnek még három formája létezik.

Egyik a klinikailag amiopátiás DM (CADM), melynél megjelennek a dermatomyositisre jellemző bőrtünetek, de nincs izom érintettség. Másik alcsoportba azok a kórképek kerültek, melyek klinikai és patológiai szempontból DM-ben jellegzetesek, de nincs bőrtünet. A harmadik típus a fiatalkori DM, mely a 18. életév előtt jelenik meg (6, 7, 9). A közelmúltban megtalálták a dermatomyositis-specifikus autoantitesteket is (DMSA). Az autoantitestek megléte alapján hat alcsoportot lehet elkülöníteni, melyeket eltérő klinikopatológiai tulajdonságok jellemeznek: anti-transzkripciós intermedier faktor 1- $\gamma$  DM (TIF1- $\gamma$  DM), anti-nukleáris mátrix protein 2 DM (NXP-2 DM), anti-melanóma differenciáció-asszociált gén 5 DM (MDA-5 DM), anti-kis ubiquitin-szerű módosító aktiváló enzim DM (SAE DM), szeronegatív DM (10). A jelentős kutatási eredmények miatt a dermatomyositisek újra osztályozása jelenleg is tart (11-13).

### *Zárványtestes myositis (inclusion body myositis, IBM)*

A 2011 évi ENMC-IBM (ENMC IBM Research Diagnostic Criteria) (14) osztályozási rendszer szerint az IBM jelenleg három kategóriába sorolható: klinikopatológiai IBM (CPD-IBM), klinikai IBM (C-IBM), és feltételezhető IBM (probable IBM, P-IBM). Az IBM többségében 45 éves kor után jelentkezik. Általánosan jellemző a lassan kialakuló, sokszor aszimmetrikus izomgyengeség. Kórszövettani megjelenésére tipikus az endomízium CD8+T sejteket tartalmazó limfocitás beszűrődése. Ehhez társulhat nem nekrotizáló izomrost invázió, rimmed vakuólum, intracelluláris fehérje aggregátum és tubulofilamentum. A klinikai és feltételezhető IBM korai diagnosztizálását megkönnyíti az MHC-I immunhisztokémiai kimutatása az izomrostokon (15).

### *Immunmediált nekrotizáló miopátia (IMNM)*

Az immunmediált nekrotizáló miopátia jelenleg használatban lévő osztályozását 2016-ban hozták létre egy nemzetközi kongresszuson (ENMC International Workshop-2016 ENMC-

IMNM) (16). Osztályozása szerológiai alapon történik. A betegségre jellegzetes autoantitestek megléte alapján három alcsoportot különböztetnek meg: anti-3-hidroxi-3-metil-glutaril koenzim-A reduktáz IMNM (anti-HMGCR IMNM), anti-szignálfelismerő ribonukleoprotein IMNM (anti-SRP IMNM), szeronegatív IMNM. A három alcsoport közös tünetei a proximális izomgyengeség és az emelkedett szérum kreatin-kináz szintek (17). Az anti-HMGCR IMNM -t eredetileg sztatinokkal kezelt pácienseknél írták le, de már ismert, hogy sztatin terápia nélkül is kialakulhat, jellemzően fiatalabb korúaknál (akár 10 hónapos korban) és ázsiai népeknél (17-20). A szeronegatív IMNM-ban típusos kóros elváltozás a nekrotikus és regenerálódó rostok szórványos jelenléte, a gyulladással beszőrdés ritka és főleg makrofágok alkotják, gyenge vagy erőteljes MHC-I expresszió a nem nekrotizáló, vagy nem regenerálódó rostokon, valamint membránkárosító komplex (MAC) lerakódása a szórványosan elhelyezkedő nem nekrotizáló izomrostok szarkolemmáján (17, 20-22). Az autoantitest-pozitív páciensek 20%-nál limfociták beszőrdés is jellemzi az érintett izom szövettani képét (13).

### *Antiszintetáz szindróma (ASS)*

A betegség elnevezése az aminosav-transzfer RNS szintetáz (ARS) elleni autoantitestek (anti-ARS vagy antiszintetáz antitestek) jelenlétére utal. Eddig nyolc antitestet sikerült azonosítani: anti-Jo-1 (antihisztidil), anti-PL-7 (antitreonil), anti-PL-12 (antialanil), anti-EJ (antiglicil), anti-OJ (antiizoleucil), anti-KS (antiaszparagil), anti-Zo (antifenilalanil), anti-Ha (antitirozil). Az ASS egy szerológiai alapon létrehozott kategória, mely legalább egyféle anti-ARS autoantitest jelenlétét feltételezi az alábbi klinikai tünetekkel: izomgyulladás, intersticiális tüdőbetegség (ILD), mechanikus kéz, ízületi gyulladás, Raynaud-szindróma és láz (23). A klinikai és szövettani jellemzők átfedhetnek a dermatomyositis kórképével (23, 24).

### *Overlap myositis*

Az overlap myositis egy heterogén klinikoszerológiai szindróma. A diagnózist akkor lehet felállítani, ha az izomgyulladás mellett jelen van legalább egy átfedő tünet mely jellemző kötőszövetes betegségeknél és /vagy jelen van egy átfedő autoantitest az alábbiak közül: anti-Ku, anti-PM/Scl (polymyositis, szkleroderma), anti-U3-RNP (antifibrillarin), anti-RuvBL1/2, anti-Ro52/TRIM21 (tripartite motif 21), anti-U1snRNP (U1 kis nukleáris ribonukleoprotein), anti-NT5C1A (citoszolikus 5' nukleotidáz 1A), anti-PUF-60 (poli-U-kötő faktor 60 kDa protein) (25).

### *Nem specifikus myositis*

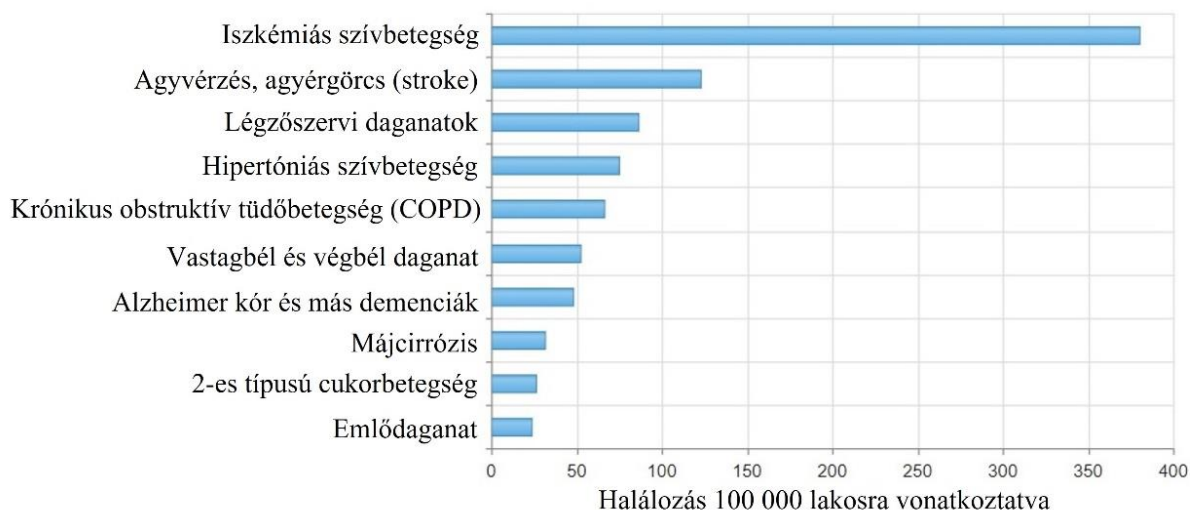
2003-ban egy nemzetközi konferencián hozták létre (2003 ENMC-IIM) (26) a nem specifikus myositis alkategóriát melynek kritériumai a perivaszkuláris és perimíziális gyulladással járó sejtinfiltráció vagy a szórványos CD8+ T sejtbeszűrődés (6). Gyakorlatilag olyan esetek kerülnek ebbe a kategóriába, ahol erőteljes MHC-I expresszió van jelen gyulladással járó sejtinfiltráció nélkül. Heterogén csoport, tagjai más kategóriákba nem sorolhatók.

### *Antimitokondriális M2- asszociált myositis*

Antimitokondriális antitestek számos kórképnél megjelennek: primer májcirrózis, autoimmun hepatitisz, reumatoid arthritisz, pszoriázis, szisztémás szklerózis (SSc), Sjögren szindróma, Hashimoto thyreoiditis. Egy több mint 200 pácienset vizsgáló japán tanulmány alapján mitokondriális M2 antitestek együtt fordulnak elő elhúzódó, krónikus betegségekkel, izomsorvadással és kardiopulmonális betegségekkel. Könnyen összetéveszthető az IMNM-val (27, 28).

### **A koleszterin**

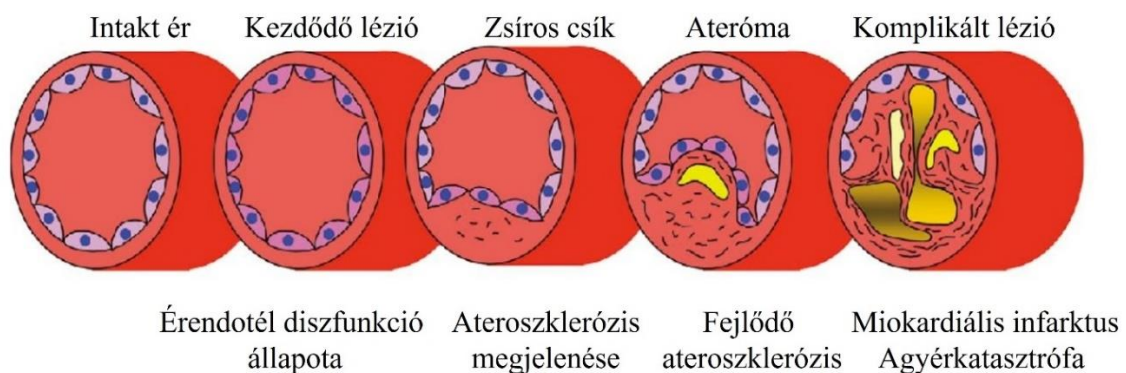
A koleszterin a lipidek közé tartozó, szteránvázis, szerves molekula (29). Nélkülözhetetlen alkotó eleme az emberi és állati sejtek membránjának. A koleszterin prekursoraként szolgál az epesavak, szteroid hormonok és a D-vitamin bioszintéziséhez. A szervezet minden egyes sejtje képes szintetizálni, gerincesekben legnagyobb mennyiségben a májsejtek termelik (30). Már száz évvel ezelőtt megfigyelte Virchow a német patológus, hogy a miokardiális infarktuszban elhunyt páciensek artériáinak fala vastag és szabálytalan, illetve sárgás, zsíros anyaggal tömített. Az artériának ezt a patológiás megjelenését aterómának nevezte el. A kutatók kezdetben szkeptikusan álltak a koleszterin és a szívkoszorúér betegségek kapcsolatához, de később egyre több tanulmány látott napvilágot, melyek bizonyították a koleszterin szerepét a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában. Későbbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a koronária betegségekből eredő halálozás főleg az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) koleszterinnek tulajdonítható, mely a totál koleszterin 70%-át teszi ki. Így született meg az az elmélet, mely szerint a megemelkedett totál, pontosabban LDL koleszterinszint okozhat koszorúér megbetegedést (31). Legelsőként említhető az 1948-as híres Framingham tanulmány (32) Több mint ötezer, 30 és 62 éves kor közötti férfit és nőt vizsgáltak, s megállapították, hogy a kardiovaszkuláris betegségek kialakulására hatást gyakorol a vérnyomás, a vér koleszterin- és trigliceridszintje, az életkor és a nem, továbbá különböző pszichoszociális tényezők is. Ennek alapján kidolgozták a koronária megbetegedések kockázatának többváltozós modelljét, a Framingham Heart Score -t (33). Jelenleg a fejlett országokban és hazánkban is emberek millióinak halálát okozzák az érlelmeszesedés talaján kialakult szív-és érrendszeri betegségek, melyek nem csak korai halálozással, hanem hosszú, rokkantságban telt évekkkel is sújtják a társadalmat (2. ábra).



**2. ábra. A WHO magyarországi statisztikája.** A 10 leggyakoribb halálok 2019-ben, korra és nemre való tekintet nélkül (WHO statistical profile - Top 10 causes of death in Hungary for both sexes aged all ages (2019)).

Az érlemezés kialakulása a „sérülésre adott válasz” hipotézis szerint (damage response hypothesis) az érendotél sejteinek sérülésével kezdődik. Ezt követően a sérülés helyén a simaizomsejtek és az aktivált makrofágok lipideket, főleg LDL-t abszorbeálva habos sejtekké alakulnak, melyek halmaza a „zsíros csík”. Majd további monociták és makrofágok érkeznek a területre, feltételezhetően a felgyült koleszterin eltakarítására. Az ér mediális rétegéből simaizomsejtek vándorolnak az intimába, továbbá érkeznek még B- és T-sejtek is (34). Az ide sereglett sejtek kemoattraktánsokkal további immunsejteket vonzanak a sérült területre. A fehérvérsejtek oxidálják az LDL-t és stimulálják a simaizomsejtek proliferációját. Az oxidált LDL önmagában is immunogén, ezentúl könnyen bejut a leukocitákba, immobilizálja a makrofágokat, s citotoxikus hatása van az érendotélsejtekre és a simaizomsejtekre. A makrofágok interleukin-1-et (IL-1) és tumornekrózis faktort (TNF) szabadítanak föl, valamint monocita kemoattraktáns protein-1-gyel (MCP-1) további leukocitákat vonzzanak a területre és fokozzák azok adhézios képességét. A koleszterinből és az ide özönlött sejtekből végül kialakul egy növekvő plakk. A stabil plakkok jellemzően lassan nőnek. Belsejükben sok a

simaizomsejt, kevés az immunsejt. Érlumen felőli oldaluk vastag fibrotikus fallal védett, így kevésbé hajlamosak kiszakadni. Az instabil plakkok gyorsan növekednek, közepükben nekrotizáló, zsíros részt tartalmaznak makrofágokkal, és kevés simaizomsejttel. Az érlumen felé néző fibrotikus sapkájuk vékony, ezért könnyen felszakadnak. A plakk felszakadása beindítja a véralvadási kaszkádot. A folyamat előrehaladtával az artériák fala megkeményedik, a lumenük beszűkül, így az érintett terület vérellátása romlik. A nagyobb plakkok méretük miatt felszakadás nélkül is okozhatnak embóliát (35-37). Az érfalról leváló plakkok szűkebb lumenű artériákhoz érve elzárhatják a lument. Az ateroszklerózis az érendotél integritását is csökkenti, s az érfal kiboltosulása (ateroszklerotikus aneurizma) vérzésekhez vezet. A test bármelyik artériája érintett lehet (3. ábra).



**3. ábra. Az érlemezés kialakulásának folyamata és következményei (38, 39).**

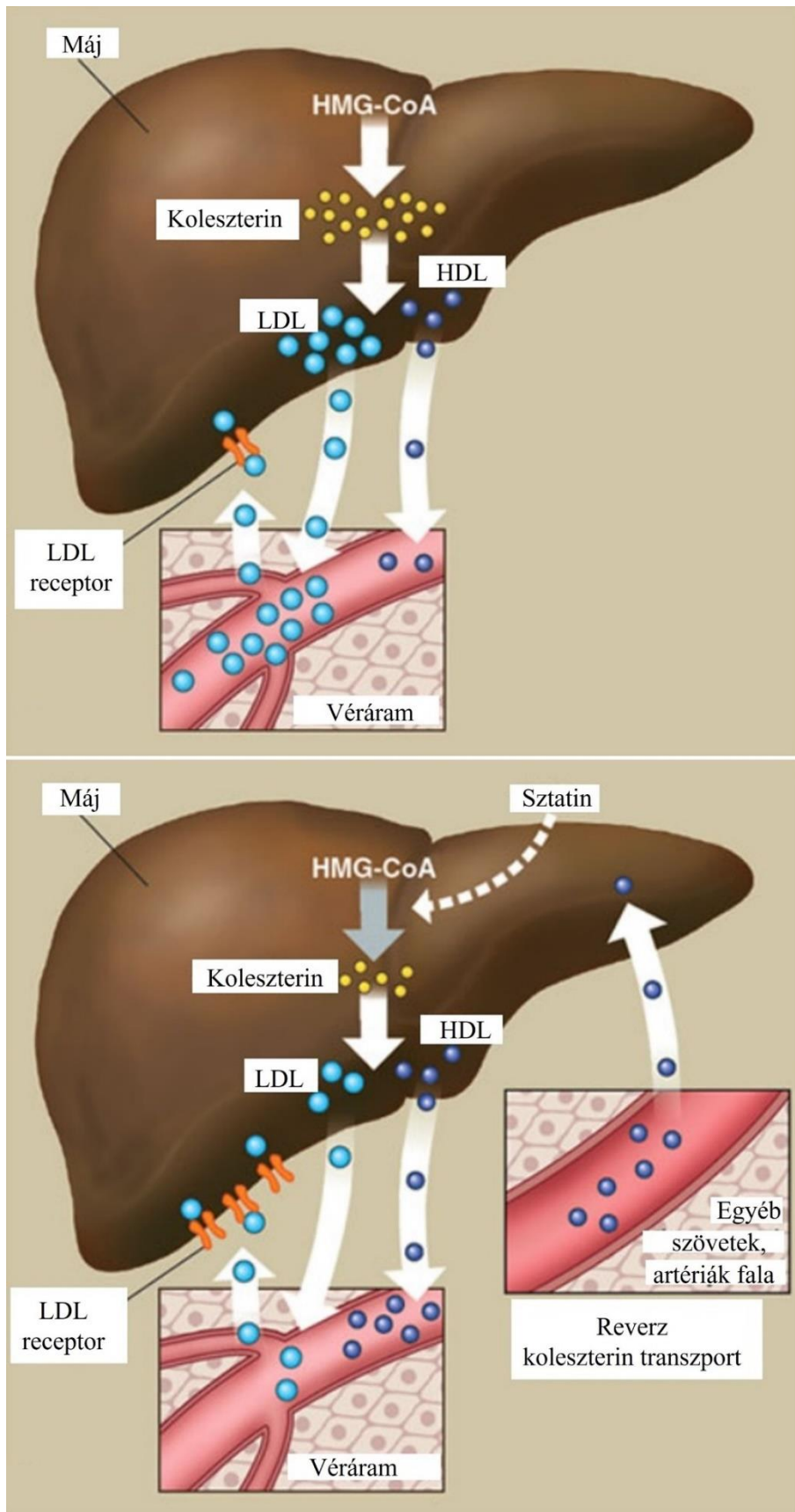
## A sztatinok

A sztatinok széles körben alkalmazott, nagy hatékonyságú gyógyszerek a hiperkoleszterinémia kezelésében (40, 41). A koleszterinszint csökkentése mellett enyhítik a gyulladást és az oxidatív stresszt (42). A természetben előforduló sztatinok penészgombák másodlagos anyagcseretermékei. Az először felfedezett sztatin a kompaktin vagy mevasztatin volt (ML-236B), melyet 1973-ban izolált Akira Endo japán biokémikus a *Penicillium citrinum* nevű penészgombából. A legelső, kereskedelmi forgalomban elérhető sztatin, a

lovasztatint *Monascus ruber* és *Aspergillus terreus* nevű gombákból nyerték ki. A lovasztatin bevezetése óta már számos sztatin megjelent, melyek közül jelenleg elérhető a félszintetikus szimvasztatin és pravasztatin valamint a szintetikus fluvasztatin, atorvasztatin, roszuvasztatin, pitavasztatin is. Napjainkban az atorvasztatin és a roszuvasztatin a legnépszerűbbek (43) (44). A sztatinok hatását felfedezésük óta már számos nagyszabású klinikai vizsgálatban tesztelték, s kimutatták, hogy a vér LDL koncentrációját 25-35%-kal, a szívrohamok gyakoriságát 25-30%-kal csökkentik jelentősebb mellékhatás nélkül. 2005-ben az egyik gyógyszercsoport értékesítésével 25 milliárd dollár jövedelmet értek el. Becslések szerint világszerte jelenleg 30 millió ember áll sztatin kezelés alatt (45, 46).

#### *A sztatinok szerkezete, farmakokinetikai sajátosságai, hatásmechanizmusa*

A sztatinok a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA-) reduktáz kompetitív gátlószerei. A koleszterin szintézis során a HMG-CoA reduktáz katalizálja a HMG-CoA átalakulását mevalonáttá. A sztatinokat a máj metabolizálja, így elsődleges hatásukat a májban fejtik ki. A HMG-CoA reduktáz gátlásával a májban és egyéb szövetekben csökken a koleszterinszintézis, s mivel a koleszterin nagyon fontos alkotó eleme a sejtmembránoknak, a sejtek a plazma lipoproteinjeinek felvételével próbálják a hiányt fedezni, ehhez pedig fokozzák az LDL receptoraik szintézisét (4. ábra). A sztatinok ilyen közvetett módon képesek csökkenteni a plazma koleszterinkoncentrációját, dózistól függően akár 55%-kal is (47).



4. ábra. A sztatínok feltételezett hatásmechanizmusa (48)

A sztatinok szerkezetében három fő rész található: egy HMG-CoA analóg, egy hidrofób gyűrű, mely a HMG-CoA reduktázhoz való kötődésért felel, és oldalcsoportok, melyek a molekula oldékonyságát és a sztatinok számos farmakokinetikai sajátosságát meghatározzák (49-51). A pravasztatin a mevasztatin aktív, tisztított metabolitja, eredetileg mevasztatinnal kezelt kutyák vizeletéből nyerték ki (52, 53). A sztatinok célszerve a máj, itt történik a metabolizmusuk. A lovasztatin, szimvasztatin, atorvasztatin és cerivasztatin metabolizmusa a CYP 3A4, a fluvasztatin metabolizmusa a CYP 2C9 fehérjék segítségével történik, melyek a citokróm P450 szupercsalád tagjai. A pravasztatin metabolizmusa nem veszi igénybe a citokróm rendszert, metabolizmusában többféle reakció szerepel, például izomerizáció, szulfatáció, glutation konjugáció, oxidáció (54, 55). A pravasztatin a májsejtek citoplazmájában enzimatikusan, illetve egy része abszorpció előtt a gyomorsavban nem enzimatikusan átalakul két, viszonylag inaktív metabolittá (56). A lipofil sztatinok szisztémás biohasznosulása a lipofil jelleg miatt alacsony (kivételek a pitavasztatin), ugyanis a béltraktusból a portális vénán keresztül egyenesen a májba jutnak (Hepatic first-pass effect). Ez egyben előnyös is, mivel a lipofil molekulák könnyen penetrálnák az extrahepatikus sejteket, számtalan nem kívánt mellékhatást okozva. A hidrofil sztatinok aktív transzporttal tudnak bejutni a hepatocitákba, így csak korlátozott mértékben képesek penetrálni a nem hepatofil sejteket (57). A pravasztatin és a roszuvasztatin kiemelkedően hidrofil a többi sztatinhoz képest, így feltehetően kevésbé képesek átjutni az izomsejtek membránján, mint a lipofil társaik. Ennek ellenére a hidrofil sztatinokkal történő kezelések esetén ugyanolyan gyakorisággal fordul elő súlyos rabdomiolízis (58). A pravasztatin az egyetlen sztatin mely nem kötődik plazmafehérjékhez, így a vérben a szabad koncentrációja a többi sztatinéhoz képest magasabb (59, 60). A sztatinok számos emlős sejtenyészetben hatékonyan kifejtik gátló hatásukat. A pravasztatinon kívül *in vitro* minden sztatin gátolja a koleszterin szintézist olyan extrahepatikus sejtek tenyészeiben, mint pl. egér peritoneális makrofágok, patkány

simaizomsejtek, humán monocita-makrofág sejtek. Hasonló hatás eléréséhez a pravasztatinból sokkal nagyobb dózisa van szükség, mely azzal magyarázható, hogy az extrahepatikus sejtek nehezebben veszik fel a pravasztatint mint a hepatociták. Komai és munkatársai májsejtekben a pravasztatin felvételét segítő, speciális hordozó molekulát találtak (61).

### *A sztatinok pleiotróp hatása*

A sztatinok a koleszterinszint csökkentése mellett egyéb hatásokat is elősegítenek, melyek függetlenek a szérumban a koleszterinszint változásától (49) (4. táblázat). Az egyik ilyen pleiotróp hatás az izoprenoid intermedierek keletkezésének gátlása. A mevalonát útvonalnak nem csak a koleszterin az egyetlen fontos terméke. Az ubikvinonok az elektrontranszportban, a dolikolok a glikoproteinek szintézisében vesznek részt, az izopentenil-adenin pedig a transzfer RNS alkotórésze (62, 63). A sztatinok jelentős immunmoduláló hatással is bírnak. Patkány sejteken végzett kísérletek során a lovasztatin gátolta a makrofágok TNF és IL-1 $\beta$  termelését, valamint a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek proliferációját (64, 65). Irodalmi adatok alapján a sztatinok hatással vannak az érfalba migráló immunsejtek, főleg monocita/makrofágok és T-sejtek proliferációjára, differenciációjára és szekréciós aktivitására. A hidrofíli és lipofíli sztatinok IFN- $\gamma$  stimulussal együtt alkalmazva gátolják a humán makrofágok, érendotél sejtek és simaizom sejtek MHC II expresszióját (65-76). Kwak és munkatársai megfigyelték, hogy a sztatinok dóziszfüggően gátolják az interferon- $\gamma$  által indukált MHC II expressziót endotélsejteken, monocita-makrofág sejteken, vaszkuláris simaizomsejteken és fibroblasztokon (71). A T-sejtet aktiváló MHC II molekula mellett az érgyulladás másik fontos komponense a CD40-CD40 ligand (CD40L) útvonal. A CD40 és ligandja a tumor nekrosis faktor proteincsaládba tartoznak, melyek számos gyulladásos folyamatban részt vesznek, pl.: fehérvérsejtek adhéziója és migrációja, kemokin- és citokintermelés indukálása, fibroblasztok aktiválása (77). Sztatin kezelés hatására mind

humán endotélsejteken, mind monocita-makrofág sejteken csökkent a CD40 expressziója (78). A magas zsírtartalmú diétán tartott egereknél a gyulladásos citokinek emelkedésével párhuzamosan a 4-1BB (TNF- $\alpha$  receptorcsalád) expressziója vázizomban fokozódik. Ugyanez megfigyelhető izom-makrofág kokultúrában is. A 4-1BB ligandja az izmot infiltráló makrofágokon van jelen, s a receptor-ligand kapcsolódás hatására gyulladásos citokinek szabadulnak föl mind az izomsejtből, mind a makrofágból (79).

### *A sztatínok mellékhatásai, sztatín-indukált miopátiák*

A sztatín terápia során néhány esetben súlyos mellékhatásokkal lehet számolni, melyek a vázizmokat károsítják. Izomkárosító hatásuk szorosan összefügg magas plazmakoncentrációjukkal (80-82). A vázizmot intenzív anyagcsere és magas vérátáramlás jellemzi (83), így számos anyagot nagy mennyiségben képes megkötni, ennek következtében erősen ki van téve a vérben keringő gyógyszerek hatásainak (84). A sztatínok által kiváltott izomkárosodások kialakulásuk szerint lehetnek toxikus, nem-autoimmun eredetű miopátiák és sztatín-indukált nekrotizáló autoimmun miopátiák (SINAM). A tünetek súlyossága dóziszfüggő (85). A sztatín-indukált miotoxicitás tünetei viszonylag széles spektrumon mozognak, az enyhe nem specifikus mialgiáktól kezdve az emelkedett kreatin kináz szintekkel járó myositisen át egészen az életveszélyes rhabdomyositisig, melynek végső stádiuma a veseelégtelenség. A toxikus miopátia a sztatín kezelés megvonásával legtöbb esetben megszüntethető (86). A pontos patomechanizmus még ismeretlen, de feltételezhető, hogy bizonyos nélkülözhetetlen metabolitok hiánya és a membránintegritás meggyengülése vezet miotoxicitáshoz (87). A SINAM egy ritka és súlyos formája a gyógyszer-indukált miopátiáknak, melynél a sztatín kezelés hatására olyan autoimmun folyamatok indulnak be, melyeket már nem lehet megállítani a sztatín kezelés felfüggesztésével (86). Ennek a jelenségnek az egyik lehetséges magyarázata az, hogy egyes pácienseknél jelen van egy látens, örökletes metabolikus miopátia, mely teljesen tünetmentes addig, amíg a sztatín

kezelés a HMG-CoA reduktáz ellen képződött antitestek szintjét jelentősen meg nem emeli. Ugyanis a HMG-CoA reduktáz kompetitív gátlása stimulálja ezen enzim *de novo* szintézisét, így az felhalmozódik a sejtekben (88). Sztatin kezelést követően a regenerálódó izomrostokban olyan magas a HMG-CoA reduktáz szintje, mely képes állandósítani az autoimmun állapotot (89-91). Ilyen esetekben csak agresszív, immunszuppresszív szerek segíthetnek (92). A sztatinokhoz köthető autoimmun betegségek közé tartozik a tipikus polymyositis és dermatomyositis (93). A HMG-CoA reduktáz gátlásához köthető izomtoxicitás rendkívül ritka, de súlyos mellékhatás. Egyik leggyakoribb nem kívánt hatás a mialgia, melynek jellemző tünete a diffúz izomfájdalom és izomgyengeség, normál plazma CK (kreatin-kináz) értékek mellett. Az izombiopsziás mintákon a mitokondriális diszfunkció jelei, fokozott lipid raktározás, és ún. rongyos-vörös izomrostok (red-ragged fibers) láthatók (41, 87, 94). Egyes tanulmányok szerint a sztatinok a Q10 hiányon keresztül is kifejthetnek káros hatást, ugyanis *in vitro* kísérletekben a Q10 koenzim adagolása gátolta a sztatin indukálta apoptózist (95). Klinikai gyakorlatban is megfigyelték a Q10 pozitív szerepét a sztatin-indukált miopátiák tüneteinek enyhítésében (96). Az etanol intoxikációhoz hasonlóan a sztatinok is ronthatják az izomsejtek membrán integritását, mely a sejtproliferáció csökkenéséhez vezet (41, 97). A sztatinoknál megfigyelték, hogy befolyásolják az izomsejtek membránjának Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPáz és Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> ATPáz pumpáit, melynek hatása szintén toxikus lehet az izomra (98). A sztatin-indukált miopátiák kockázata kombinált terápiák esetén jelentősen növekszik. Azok a gyógyszerek lehetnek veszélyesek, melyek gátolják a citokróm P-450 rendszert vagy azonos enzimen keresztül metabolizálódnak a májban. Ilyenek lehetnek pl. a makrolid antibiotikumok, azol gyűrűt tartalmazó gombaellenes szerek, ciklosporinok, és a nagy mennyiségű grapefruitlé. Ezek a szerek sztatinokkal együtt alkalmazva drasztikusan megemelik a sztatinok plazma-koncentrációját melynek következtében kialakulhat miopátia (99, 100).

Miopátiához vezethet olyan gyógyszerinterakció is, amikor a páciens multidrog-rezisztens fehérje 2 (MRP2) elleni gátlószert kap sztatinnal együtt, ugyanis a hidrofílsztatinek nem képesek diffúzióval bejutni a sejtekbe, mint a lipofílsztatinek, így hordozó molekulák segítségével szorulnak. Ilyen transzporter például az MRP2. Ez a kombináció is túlzottan megemeli a vér sztatín koncentrációját (41). A HMG-CoA redukáz elleni autoantitestek mellett fokozódik a nem nekrotizáló izomrostok szarkolemmájának MHC-I expressziója, valamint jelentős miofagocitózis jelenik meg anélkül, hogy az izomszövetben limfociták beszűrődés lenne észlelhető. Ezek a tünetek együttesen jellemzőek a toxikus miopátiára (86).

Alfirevic és munkatársai a sztatín-indukált miotoxicitás fenotípusának standardizációja kapcsán azt javasolták, hogy a tünetek és mérhető jelek szerint hét fokozat lehetséges: emelkedett CK szintek, tolerálható mialgia, nem tolerálható mialgia, miopátia, súlyos miopátia, rabdomiolízis, autoimmun-mediált nekrotizáló myositis (42). A sztatinek mellékhatásait számos mechanizmussal magyarázzák, pl.: mitokondriális károsodás (42, 87, 101, 102) a szarkolemma gátolt glikoprotein szintézise (103), és gátolt klorid csatorna aktivációj (104), az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése és a membrán fluiditást érintő változások (105-107). A sztatín indukálta miopátiák hisztopatológiai sajátosságai a nekrotizáló rostok, miofagocitózis és a nagy tömegben jelentkező fagocitáló makrofágok jelenléte (108). Az izomszövetbe szűrődött jelentős mennyiségű makrofág a takarításon kívül patogén funkciót is betölthet, károsíthatja az izomrostokat. A sztatinek gyulladáscsökkentő hatása jól ismert, azonban elképzelhető, hogy a makrofágokon keresztül izomgyulladást provokálnak. Az izomzatot érintő hatások mellett a hosszú távú sztatín kezelés esetében megfigyeltek emelkedett májenzim szinteket, és gyakoribb volt a diabétesz mellitusz (109).

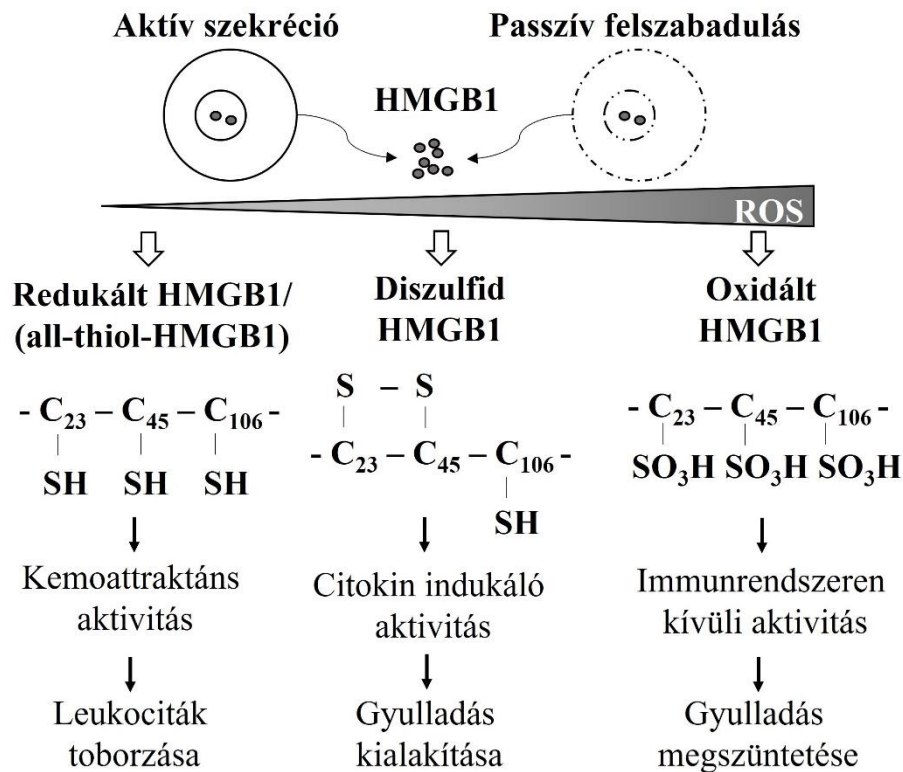
## High mobility group box 1 protein (HMGB1)

Az érett korú páciensek esetében az izompanaszok megjelenését a koleszterinszint csökkentését célzó sztatín terápia iniciálja. Egyes esetekben a kezelés felfüggesztése sem oldja meg a panaszokat, mivel a tüneteket autoimmun folyamatok állandósítják. A károsodott sejtekből kiszabadult molekulák, mint a HMGB1, a továbbiakban is triggerelik a gyulladást. Így a HMGB1-nek patogén szerepe lehet az izomgyulladás, izomgyengesség, izomfájdalom kialakulásában, olyan autoimmun betegségeknél, mint az idiopátiás inflammatórikus miopátiák, vagy a reumatoid arthritisz. A „High Mobility Group” fehérjék nem-hisztón típusú kromatinfehérjék, melyek minden sejtípusban jelen vannak. Nevüket onnan kapták, hogy erősen poláros jellegük és kis méretük miatt nagyon mozgékonyak a gélelektroforézis során. Funkcionális alegységeik szerint megkülönböztetünk A, B és C alcsoportokat. A HMGB1 25 kDa molekulatömegű, 215 aminosavból álló konzervált, kromoszómális fehérje (110). Sokoldalú, a sejten belül és a sejten kívül is fontos funkciót tölt be. Az élő sejtekből aktívan, az elpusztult sejtekből passzívan szabadul föl. Az extracelluláris térben alarmin, azaz figyelmeztető funkciót ellátva képes aktiválni a természetes (veleszületett) immunrendszert. Jelenleg ismert, bizonyított receptorai a toll-szerű receptor-4 (TLR-4) és a RAGE (receptor for advanced glycation end products). Számos receptor rendszert kapcsolatba hoztak a HMGB1-gyel de ezek feltételezhetően nem a valódi receptorai, hanem a HMGB1-gyel komplexbe kerülő molekulákra specifikusak. Az extracelluláris térbe nagy mennyiségben kijutott HMGB1-nek gyulladáskeltő hatása van. Hatását nagyban befolyásolja, hogy önmagában vagy partnermolekulákkal alkotott komplexben kötődik a receptoraihoz. A HMGB1 hajlamos megkötni különböző proinflatórikus molekulákat, s ezek szinergista módon fokozzák egymás hatását, pl.: DNS, RNS, hisztónok, nukleoszómák, lipopoliszacharid (LPS), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1, CXCL-12), interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  és egyéb faktorok. A HMGB1 minden egyes redox állapotához különböző citokin-stimuláló és

kemoattraktáns aktivitás kapcsolódik. Amikor a HMGB1 egyedül kapcsolódik receptorához, az általa kifejtett proinflammatorikus hatás a HMGB1 redox állapotának függvénye, melyet a molekulában található három cisztein állapota határoz meg. Nyugvó sejtek magjában a HMGB1 teljesen redukált formában van jelen, ilyenkor mind három ciszteinen tiol csoport található. Ebben a formában kemokinként viselkedik, mert a sejtből kiszabadulva és CXCL-12-vel (SDF-1) komplexet alkotva a CXCR4 receptorhoz kapcsolódik, és felerősíti a társ molekula kemotaktikus hatását. Így vesz részt a leukociták, fibroblasztok toborzásában (111). Enyhe oxidáló hatásra diszulfid HMGB1 keletkezik, azaz a C23-as és C45-ös ciszteinje között diszulfid híd alakul ki, míg a C106-os cisztein továbbra is redukált formában marad. Ezzel a módosulással kemotaktikus hatását elveszítve csak citokinként viselkedik, az extracelluláris térben TLR-4 receptorhoz kötődve erősen aktiválja a proinflammatorikus citokinek termelődését (112). Venereau és munkatársai azt találták, hogy a diszulfid HMGB1 képes aktiválni a nukleáris faktor (NF)  $\kappa$ B útvonalat (NF- $\kappa$ B) továbbá a fibroblasztokat és a makrofágokat olyan gyulladásszerű citokinek termelésére serkenti, mint az interleukin-6 (IL-6), IL-8, tumornekrózis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (111). Tovább oxidálva szulfonil csoportok rakódnak egy vagy több ciszteinjére, s a molekula önmagában nem fejt ki többé proinflammatorikus hatást (112). A redukált és diszulfid forma reverzibilisen képes egymásba átalakulni, míg a szulfonilált HMGB1 irreverzibilis állapotú. Az oxidált és a denaturált fehérjének sem kemoattraktív sem proinflammatorikus hatása nincs (113). A HMGB1 és RAGE közötti kapcsolat hatása jelenleg intenzív kutatás tárgyát képezi. A vizsgálatok összességében arra mutatnak, hogy a HMGB1 kötődése RAGE-hez közvetlenül aktiválja az NF- $\kappa$ B útvonalat és az ebből fakadó citokin képződést. A makrofágokon mind a TLR-4 mind pedig a RAGE receptor megtalálható, de ha a TLR-4 funkcionálisan inaktív, vagy nincs jelen, akkor a sejtet a HMGB1 egyik izoformája sem tudja citokintermelésre ösztönözni. Így feltételezhető, hogy a HMGB1-RAGE kapcsolat közvetlenül nem képes citokintermelést indukálni. Lu és Billiar



lokalizációs szignál szakaszt tartalmaz (NLS1: 28-44 aminosavak; NLS2: 179-185 aminosavak), melyek fontos szerepet töltenek be a fehérje sejtmagba történő transzportjában. A RAGE kötéséért az 50-183 közötti aminosav szakasz felelős. Az extracelluláris citokin aktivitás a B boxban található, és a hasított A box alegység segítségével antagonizálható. A B box 106-os pozícióban található ciszteinje nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a HMGB1 aktiválni tudja a citokin felszabadulást. A fehérje transzkripciót stimuláló hatását a C-terminális savas vég biztosítja



6. ábra. A HMGB1 aktivitásának redox kontrollja (113)

A HMGB1 redox állapota szövetfüggő is. Például a diszulfid HMGB1-et normál esetben magasan expresszálja a lép és a máj szövete, ugyanakkor az izomban ez a forma csak akut sérülés után jelenik meg (124). Gyulladás során a sejtek mikrokozonyzetében nagy mennyiségű ROS (reaktív oxigén gyök) található, melyet legnagyobb mennyiségben a leukociták szabadítanak föl. A HMGB1 feltételezhetően akkor oxidálódik, mikor a sejtől kijutva gyulladásos környezetbe kerül. A teljesen redukált HMGB1 extracelluláris féléletideje

szérumban *in vitro* 17 perc, majd diszulfid HMGB1-gyé konvertálódik (125). Zandarashvili és munkatársai különböző extracelluláris folyadékokban vizsgálták a HMGB1 kinetikáját, s azt találták, hogy a HMGB1 teljesen redukált és diszulfid állapotai közti egyensúlyt az extracelluláris környezet alakítja. Michele Ferrara és munkatársai közleményükben azt taglalják, hogy az infiltráló és cirkuláló leukociták a diszulfid HMGB1 transzporterei. Izomszövet-specifikus HMGB1 knockout egereken végzett kísérleteikben azt találták, hogy az izomsérülést követő 6. órában elkezdődött a leukociták beszűrődése s ezzel párhuzamosan egyre emelkedett a kimutatható HMGB1 mennyisége is. Továbbá nagyobb mennyiségben találtak dsHMGB1-et a sérült izom felülúszójában, mint lizátumában. A HMGB1 redox izoformáinak eloszlása hasonló volt a vad típus és az izomspecifikus HMGB1 knock out egerek esetében, és sérülést követően a totál HMGB1 legnagyobb része diszulfid állapotban volt. Ez alapján arra következtettek, hogy a dsHMGB1 a sérült izomban a nem-miogén sejtekből szabadul fel és feltételezhetően az izmot infiltráló leukocitákból származik. A dsHMGB1 a lép, máj és tumor szövetek esetében is a leukocitákból szabadulhat föl. Feltételezhető, hogy a HMGB1 oxidációja fiziológias és patológias körülmények között időben és térben szabályozott folyamat lehet, mely finoman összehangolja a gyulladási és regenerációs folyamatokat (125, 126). Számos tanulmány foglalkozik a HMGB1 izomregenerációban betöltött szerepével (127, 128). Az izom és máj szövetében az akut sérülést követő regenerációt a HMGB1 redox izoformái irányítják (129). A regenerálódó izomrostok sejtmagjai nagy mennyiségben expresszálnak HMGB1-et és mind a teljesen redukált mind a diszulfid HMGB1 forma nagy mennyiségben jelenik meg a sérült izmok tenyésztő médiumában (111).

## Célkitűzések

Humán biopsziás és műtéti anyagokon végzett kísérleteink során az alábbi kérdésre kerestünk választ:

1. -Hogyan hat az *in vivo* gyulladásos környezet az izom szatellita sejteinek proliferációs és differenciációs képességére?
2. -Milyen hatása lehet az *in vivo* metilprednizolon kezelésnek a miogenezisre?
3. -Hogyan befolyásolja a kortikoszteroid kezelés a myositises izomból indított primer tenyészetek osztódó és fúzionáló képességét?
4. -Sztatin indukálta miopátiás izomban a makrofágok és a miogén sejtek hogyan hatnak egymás proliferációjára?
5. -A pravasztatin, mint ismert gyulladáscsökkentő anyag, képes-e mérsékelni az izomgyulladást?
6. Hogyan hat a pravasztatin a miogén sejtek proliferációs és differenciációs képességére?

## Anyagok és módszerek

Humán eredetű harántcsíkolt izomszöveten végzett kísérletek, vizsgálatok

### *Humán eredetű harántcsíkolt izomszövet felhasználásának etikai jóváhagyása*

A vizsgálati protokollt a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Humán Etikai Bizottsága hagyta jóvá. Minden páciens írásbeli és szóbeli tájékoztatást kapott a vizsgálat menetéről, és írásban beleegyező nyilatkozatot tett arról, hogy szövetmintáját kísérleteinkhez felhasználhatjuk.

### *Biopsziás minták és műtéti anyagok beszerzése*

Kísérleteinkhez használt humán izom minták egy része polymyositisben (n=15) és dermatomyositisben (n=6) szenvedő páciensek izombiopsziás anyaga, másik része oszteoartritiszes betegek (n=12) ortopédiai műtét során felszabadított vázizom darabjai. A 21 IIM páciens közül 13 a biopszia vételt megelőzően nem kapott kortikoszteroid terápiát míg 8 beteg napi 12-16 mg methylprednisolon kezelést kapott. Az IIM páciensek életkora 23 és 74 év között változott ( $52,7 \pm 13,3$ ; mean  $\pm$  SD, n=21). Nemek szerint 3 férfi és 18 nő vett részt a vizsgálatokban. A proximális izmok biopsziavételezése sebészi úton történt helyi érzéstelenítésben (deltaizom, négyfejű combizom - attól függően, hogy az adott páciensnél melyik volt leginkább érintett). A középső farizomból származó mintákat coxartrózisban szenvedő páciensek csípőprotézis műtete során gyűjtöttük (életkor szerint  $65,3 \pm 8,8$ , n=12, 4 férfi, 8 nő).

### *Humán vázizom szatellita sejtjeiből indított primer sejtenyészetek*

A biopsziás és csipőprotézis műtétek során gyűjtött izomminták szatellita sejtjeit mechanikus és enzimátikus elválasztással szabadítottuk ki Jaffe módszerének módosított változata alapján (145). A biopsziás mintát 0,75 mg/ml 2-es típusú kollagenázt (Sigma, St. Louis, MO, USA) valamint tripszint (Difco, Detroit, MI, USA) tartalmazó  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Mg}^{2+}$ - mentes foszfát pufferben emésztettük. A kiszabadult sejteket 5% magzati szarvasmarha (FBS) - és 5% lószérumot (HS) (Gibco, Life Technologies, Budapest, Hungary) tartalmazó HAM's F12 növesztő médiumban (Sigma, St. Louis, MO, USA) üveg fedőlemezre szélesztettük és 37 °C-on 5%  $\text{CO}_2$  jelenlétében tenyésztettük. A differenciáció beindításához a tenyésztett sejteket 4 nap után 2% HS-t és 2% FBS-t tartalmazó differenciációs tápfolyadékba helyeztük (DMEM; Sigma) a következő 7 napra.

### *Proliferáció és differenciáció vizsgálata humán vázizom primer sejtenyészetein*

A humán vázizomsejtek primer sejt kultúráiról a kiszélesztéstől számított 2. naptól kezdve a 11. napig felvételeket készítettünk 24 óránként fáziskontraszt mikroszkóp és a hozzá kapcsolt Canon EOS-300D (Canon Corp., Japán) digitális tükörreflexes kamera segítségével. Minden üveglemezről 5 fotó készült az egyes napokon. A fotókon manuálisan jelöltük a miogén sejtmagokat, majd morfolometriai elemzést végeztünk. A proliferáció jellemzéséhez normáltuk a miogén magok számának növekedését a tenyészet 2. napján számolt magszámra. A differenciáció kifejezésére a fúziós indexet adtuk meg, mely a miotubulusokban található magok száma és az összes miogén magszám hányadosaként fejezhető ki.

### *Immunhisztokémia a HMGB1 kimutatására:*

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz (IHC) formalinban fixált, parafinba ágyazott izommintákat dolgoztuk fel (146). A HMGB1-re specifikus elsődleges antitestet (egérben termeltetett monoklonális anti-HMGB1 antitest, Sigma, St. Louis, MO, USA) 1% szarvasmarha szérumból albumint tartalmazó foszfát pufferben (PBS) 1:500 arányban hígítva használtuk 2 µg/ml végkoncentrációban. A metszeteket a primer antitesttel egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on, nedves kamrában és másnap háromszor mostuk 10 percig PBS-ben. A mosási lépéseket követően torna peroxidázzal konjugált, egér ellen termeltetett másodlagos antitesttel (Super Sensitive™ One-Step Polymer-HRP Detection System, Biogenex Laboratories, CA, USA) 15 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten. A reakciót VECTOR DAB peroxidáz szubsztrát kit segítségével tettük láthatóvá (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a gyártó által javasolt protokollt követve. A sejtmagok kontrasztfestése hematoxilinnal történt. A szövettani festéshez humán mandulából készült metszetek szolgálták pozitív kontrollként. A negatív kontrollhoz primer antitestet nem tartalmazó, 1%-os borjú szérumból albumin (BSA) oldattal inkubáltuk a metszeteket

### *Immunhisztokémia CD45 kimutatására*

Formalinban fixált, parafinba ágyazott humán izomból készült metszeteken mutattuk ki a CD45 pozitív sejtek jelenlétét. A paraffinos metszeteket előbb deparaffináltuk, rehidráltuk, majd az endogén peroxidázok hatásának kiküszöbölésére desztillált vízzel készített 0,3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal inkubáltuk 15 percig nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Az antigének feltárása Tris-EDTA oldattal (10 mM Tris bázis, 1 mM EDTA oldat, 0,05 % Tween 20, pH 9,0) történt hagyományos konyhai főzőkuktában (100 °C), a forrástól számítva 20 percig. A nem specifikus kötőhelyeket 5% BSA-PBS oldattal blokkoltuk. A szövetmetszeteket 1 órán át inkubáltuk egérben termelt monoklonális, humán CD45 elleni antitesttel (CD45 clone

2B11 + PD7/26 mmAB, Dako, Glostrup, Dánia), melyet 2,5% BSA-PBS-ben 1:50 arányban hígítottunk. Negatív kontrollhoz primer antitest nélkül készült 2,5% BSA-PBS-ben inkubáltuk a metszeteket. A másodlagos antitest peroxidáz polimerrel konjugált, kecskében termeltetett nyúl elleni antitest (K4002, Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse, Dako, Glostrup, Denmark). A reakciót VECTOR VIP peroxidáz szubsztrát kit (SK4600, Vector Laboratories, Burlingame, CA) alkalmazásával tettük láthatóvá, a gyártó által javasolt protokoll alapján. A metszeteket metilénkékkel kontrasztosítottuk

### *Western blot analízis a humán izomminták HMGB1 tartalmának meghatározására*

A western blot vizsgálathoz az izomszövetekből készült lizátumok teljes proteintartalmát használtuk. Az izomminták egy darabját a műtétet követően azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben majd lízis pufferben (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, and pH 7.5) homogénre dörzsöltük mozsár segítségével. A szövetlizátumokat 40–50 kHz frekvenciás, 5–10 másodpercig tartó szónikus kavitációnak vetettük alá. Az így előkészített mintákat elektroforézishez alkalmazott oldatban hígítottuk (50 % glicerol, 10 % SDS, 310 mM Tris-HCl, pH 6.8; 100 mM DTT, 0.02 % brómfenolkék) és 10 percig főztük. Mintánként 30 µg fehérjét szeparáltunk 7,5%-os SDS-PAGE gélen, majd a proteineket elektroforetikus eljárással nitrocellulóz membránra juttattuk (BioRad, Wien, Ausztria). Transzfer után a membrán nem specifikus kötőhelyeit 5% zsírmentes tejport tartalmazó foszfát pufferrel blokkoltuk 30 percig, szobahőmérsékleten. Blokkolás után a membránt egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on HMGB1 elleni (1:700 hígítás; egér monoklonális HMGB1 elleni antitest, Sigma, St. Louis, MO, USA) és aktin elleni elsődleges antitesttel (1:1500 hígítás; Santa-Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Németország). A membránokat másnap 3x10 percig mostuk PBST oldatban (0.1 % Tween-20 PBS-ben) majd 1 órán keresztül inkubáltuk HRP-vel kapcsolt másodlagos antitestekkel (1:1000; HRP-kapcsolt kecskében nyúl és egér ellen

termelt IgG; Bio-Rad Laboratories, CA, USA), melyeket 5% zsírmentes tejport tartalmazó PBS-ben hígítottunk. A lumineszcens jeleket megnövelt kemilumineszcenciás eljárással detektáltuk (ECL) (Thermo Scientific, Budapest, Magyarország) a gyártó által javasolt protokollt követve.

## Egér eredetű immortalizált sejtvonalakon végzett kísérletek

### *Egér eredetű sejtvonalak tenyésztése*

A C2C12 egy immortalizált egér vázizom sejtvonal, mely egy kifejlett C3H egértörzs harántcsíkolt izomzatából indult (ECACC, European Collection of Cell Cultures, United Kingdom). A RAW 264.7 makrofág sejtvonalat (American Type Culture Collection) Prof. Virág László ajándékozta a kísérleteinkhez. A sejteket Dulbecco által módosított Eagle's médiumban tenyésztettük, melyet kiegészítettünk 50U/ml penicillinnel, 50µg/ml streptomycinnel, a proliferációhoz 10% főtális borjúsérummal (FBS), a mioblasztok miotubulussá történő differenciáltatásához pedig 2% lószérummal (HS). A sejteket 37°C-on inkubáltuk 5% CO<sub>2</sub> tartalmú termosztátban. A tápoldatot két naponta frissre cseréltük.

### *Tenyésztési protokoll kokultúrában élő egér sejtvonalak proliferációjának vizsgálatához*

A kokultúrában élő sejtek proliferációjának vizsgálatához 3 cm átmérőjű petri-csészék széli részére helyeztünk 10<sup>5</sup> darab C2C12 sejtet 200 µl médiumban. Ugyanezen csészék középső részén 5x10<sup>3</sup> darab RAW264.7 sejt tenyésztését indítottuk el 100 µl tápfolyadékban. Miután a sejtek leülepedtek a minimális térfogatú médiumban, gyengéden átmostuk őket foszfát puffer oldattal (PBS), majd 2 ml médiumban folytattuk a tenyésztésüket. Ily módon a kétféle sejtípus egy ideig direkt sejt-sejt kapcsolat nélkül egyazon tápfolyadékban tenyészett. A

monokultúrák sejtjeit is a fent leírt elrendezésnek megfelelően helyeztünk el a petri-csészékben, hogy az összehasonlításból eredő hibázás lehetőségét minimalizáljuk.

A médiumot két naponta frissre cseréltük.

A sejteket May-Grünwald és Giemsa oldattal festettük meg. A műanyag petri-csésze alján ülő, letapadt C2C12 sejteket háromszor mostuk PBS oldatban majd 5 perc metanosos fixálást követően 5 percig festettük Giemsa festékkel (Magyarország, Halásztelek, Molar Chemicals Kft.). Ezt követően mosási lépés nélkül May-Grünwald oldatot adtunk a sejtekhez, melyet közvetlenül felhasználás előtt csapvízben hígítottunk (25x) és 15 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a sejteket csapvízzel óvatosan átmostuk majd hagytuk megszáradni. A sejtekről felvételeket készítettünk (EVOS FLC Cell Imaging System, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) melyeken ImageJ szoftver (NIH, Bethesda, MD, USA) programmal határoztuk meg a sejtek által lefedett területeket

### *Tenyésztési protokoll kokultúrában tartott sejtvonalak IL-6 termelésének megfigyeléséhez*

96 lyukú sejttenyésztő mikrolemezekre 200 µl térfogatú proliferáltató médiumban  $5 \times 10^2$  darab C2C12 sejtet és 50 darab RAW264.7 makrofágot helyeztünk el lyukanként. A tenyésztés harmadik napján a sejteken lévő tápoldatot 2% lószérumot tartalmazó médiumra cseréltük a mioblasztok differenciálódásának támogatására. Az 1,3,5,7, és 9. napokon a médiumot begyűjtöttük, és rövid centrifugálást követően (2000 rpm, 5 perc)  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra helyeztük a további felhasználásig. A megfelelő összehasonlítás érdekében a C2C12 és RAW264.7 monokultúrákat is a fent leírt módon gondoztuk.

### *Tenyésztési protokoll és pravasztatin kezelés az IL-6 citokin vizsgálatához*

$10^5$  darab C2C12 sejtet szélesztettünk 24 lyukú tenyésztő edénybe, lyukanként 2 ml proliferáltató médiumban. A tenyésztés harmadik napján a médiumot 2% lószérumot

tartalmazó, differenciációt segítő tápoldatra cseréltük. A hatodik napon, amikor a tenyészet már jelentős mennyiségű miotubulust tartalmazott  $5 \times 10^4$  darab RAW 264.7 makrofágot szélesztettünk a növekvő izomsejtekre. Az így létrehozott kokultúrát 24 órán át kezeltük 500  $\mu\text{M}$  pravasztatinnal (Cat.no. P4498, Sigma-Aldrich) szérum mentes DMEM-ben. A tenyésztő médiumot begyűjtés után centrifugáltuk és  $-80^\circ\text{C}$ -on tartottuk a tervezett mérésekig. A megfelelő összehasonlíthatóság érdekében monokultúrákat is indítottunk, melyeket a kokultúrákkal azonos módon kezeltünk. Kontrollnak kezeletlen sejteket használtunk.

#### *Tenyésztési protokoll és pravasztatin kezelés a C2C12 és RAW264.7 sejtek proliferációjának vizsgálatához*

96 lyukú tenyésztő edényben monokultúrákat indítottunk lyukanként  $10^3$  darab C2C12 sejtekkel és  $5 \times 10^2$  darab RAW 264.7 makrofágokkal. Miután a sejtek megtapadtak a tenyésztő edény alján, 500  $\mu\text{M}$  pravasztatin kezelést indítottunk 10% FBS tartalmú, proliferáltató médiummal. 24 órás kezelést követően felvételeket készítettünk az egyes lyukakban található tenyészetekről és ImageJ szoftver program segítségével meghatároztuk a sejtek által lefedett területeket.

#### *Tenyésztési protokoll és pravasztatin kezelés a C2C12 sejtek differenciációjának vizsgálatához*

$5 \times 10^2$  darab C2C12 sejtet szélesztettünk 96 lyukú tenyésztő edény egyes lyukaiba 10% FBS-sel szupplementált proliferáltató médiumban. A harmadik napon a magas szérumtartalmú tenyésztő médiumot alacsony szérum tartalmú differenciáltató tápoldatra cseréltük, majd a negyedik napon 500  $\mu\text{M}$  pravasztatint adtunk a sejteknek. Az 5. 7. 9. napokon a pravasztatinnal kezelt és nem kezelt (kontroll) tenyészeteket óvatosan átmostuk PBS pufferrel majd May-Grünwald Giemsa protokoll szerint megfestettük a tenyészet sejtjeit. A negyedik naptól kezdve a tenyésztő oldatot kétnaponta lecseréltük friss médiumra úgy, hogy a pravasztatinnal kezelt sejtek a médiumcsere alkalmával továbbra is kaptak pravasztatint. A

tenyészetéről fotókat készítettünk melyeken meghatároztuk a miotubulusok és a festődött sejtmagok számát.

### *Kísérleti „kóstoltatás” sejtkultúrákon*

A kísérlet során az volt a célunk, hogy a miogén és mieloid sejtek „megkóstolják” egymás szolubilis faktorait, citokinjeit, és egyéb anyagcsere termékeit. C2C12 és RAW 264.7 sejteket szélesztettünk 96 lyukú tenyésztő edényekbe. A tenyésztés 5. napján a sejtek felülúszóját begyűjtöttük, 2000 rpm sebességgel 5 percig centrifugáltuk, majd 0,22 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn átnyomtuk (Sigma-Aldrich). Az izomsejtekről begyűjtött felülúszó felét kiegészítettük azonos térfogatú friss tápoldattal, s az így hígított médiumot, mely tartalmazta a C2C12 sejtek anyagcsere termékeit, a makrofágokra helyeztük. Hasonló módon jártunk el a RAW 264.7 sejtekről levett felülúszókkal is, melyeket a fenti módon hígítva az izomsejtekre helyeztünk. Az így megcserélt, és friss médiummal is kiegészített tápfolyadékban a monokultúrákat még 24 óráig tenyésztettük 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> -ot tartalmazó termosztátban. 24 óra elteltével a felülúszót begyűjtöttük, centrifugáltuk, leszűrtük, majd ELISA vizsgálat alá vetettük. Kontrollként a monokultúrákkal párhuzamosan, azonos feltételek között tenyésztett kokultúrákat használtunk.

### *ELISA vizsgálat az IL-6 citokin mennyiségi meghatározására*

A sejtenyészetekről származó médium IL-6 koncentrációját a kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kittel mértük a gyártó utasítása alapján (Murine IL-6 ELISA Set, Diaclone Research, France). A mérés 3 biológiai párhuzamossal történt

### *Immuncitokémia az IL-6 kimutatására*

A kokultúrában tartott sejteket 3 µg/ml Brefeldin A -val kezeltük (Sigma-Aldrich) 1 órán keresztül, hogy megakadályozzuk a proteinek szállítását az endoplazmatikus retikulum és a

Golgi apparátus között. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk PBS-sel majd 4%-os paraformaldehid (PFA; pH 7.4) oldattal fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Az autofluoreszcencia elkerülésére glicinnel történő kioltást alkalmaztunk, melynek során 5 percig 30 mM glicin-PBS oldatban (pH 7.4) inkubáltuk a tenyészetet. A sejtmembránt 0,5% Tritonx-100-PBS oldattal történő 20 perces kezeléssel tettük átjárhatóvá. A nem-specifikus kötőhelyeket egy órán át blokkoltuk (Serum-free protein block, Dako, Carpinteria, CA), majd a blokkoláshoz használt oldatot kiegészítettük IL-6 elleni antitesttel (Cat.no.NB600-1131, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) és ezzel inkubáltuk a tenyészeteket 4°C-on egy éjszakán át, nedves kamrában. A sejteket másnap háromszor mostuk 0,1% Tween-20-PBS oldattal majd a PBS-ben hígított másodlagos antitesttel (Cat.no. A32731, Invitrogen, Life Technologies, San Francisco, CA, USA) inkubáltuk egy órán keresztül szobahőmérsékleten, nedves kamrában. A tenyészeteket ezután háromszor mostuk PBS-ben majd 5 µl Mowiol 4-88 oldatot (Cat.no. 81381, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) rácseppentve üveglappal lefedtük. A kiértékelés során a festés pozitivitását vizsgáltuk, kvantitatív analízist fluoreszcens jelintenzitás alapján nem végeztünk.

#### *MTT teszt a sejtek életképességének meghatározására*

A tenyésztés hetedik napján meghatároztuk a kontroll és a pravasztatinnal kezelt C2C12 sejtek életképességét MTT-teszt segítségével (Sigma-Aldrich). Az MTT teszt egy kolorimetriás vizsgálat, mely alkalmas a sejtek metabolikus aktivitásának értékelésére, valamint az életképes sejtek számának meghatározására. A metabolikusan aktív sejtek képesek endocitózissal fölvenni a tetrazólium-bromid molekulákat (3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H tetrazólium bromid) melyeket a mitokondriális dehidrogenázok liláskék színű formazán kristályokká alakítanak. A sejteket 30 percig inkubáltuk 0,01% MTT reagenssel 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban.

Az inkubációs idő leteltével az MTT reagenst is tartalmazó médiumot eltávolítottuk, a sejteket pedig 100 µl DMSO-ban lizáltuk. A szolubilizált sejteket egy tiszta ELISA-mikrolemeze, melyen lemértük a kékes oldat optikai denzitását 550 nm hullámhosszon. A pravasztatinnal kezelt sejtekből származó abszorbanciát a kezeletlen sejtek abszorbanciájának százalékában fejeztük ki.

*Statisztikai analízis humán vázizom eredetű sejteken és egér sejtvonalakon végzett kísérletek adataiból*

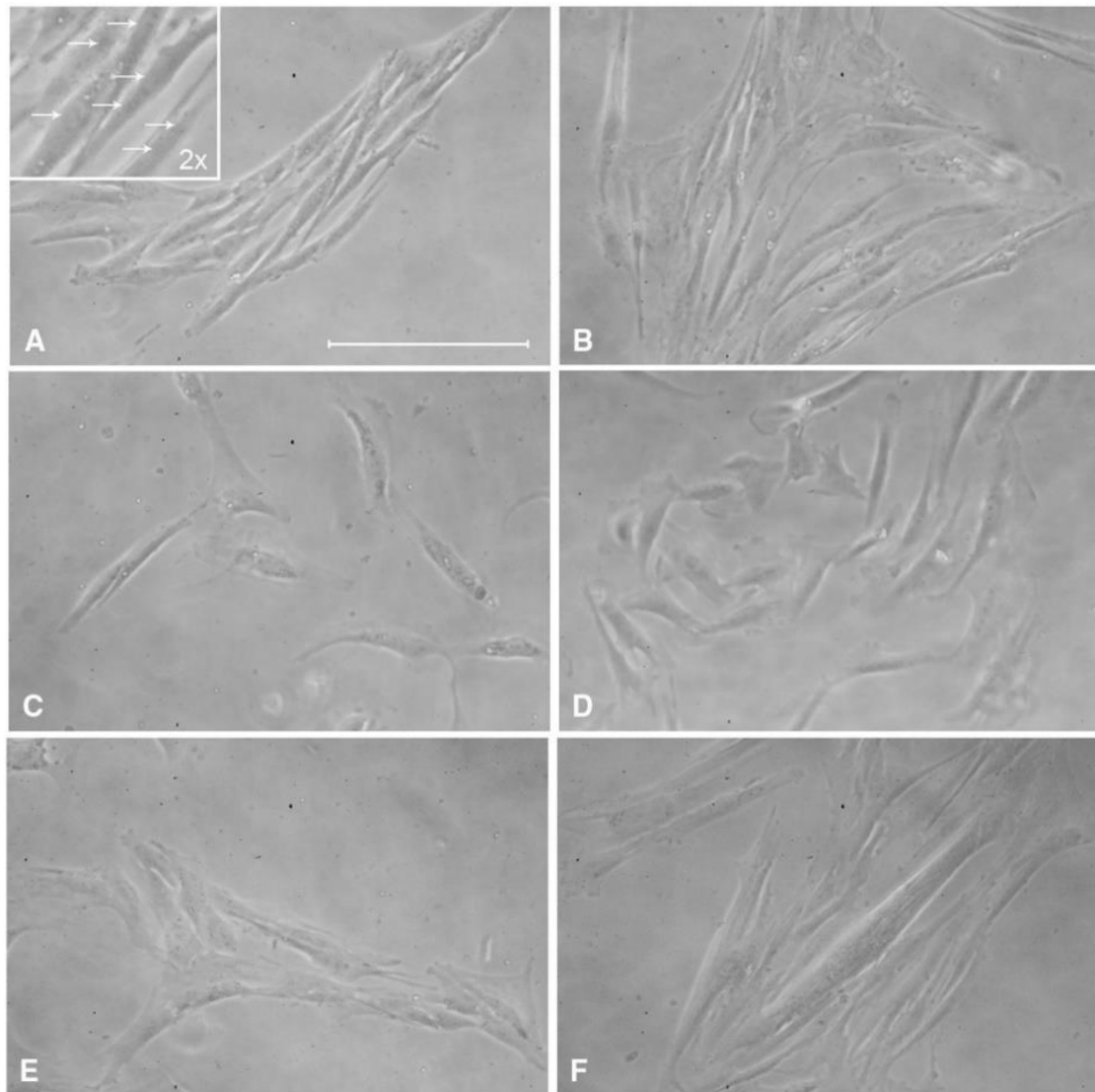
A humán vázizom eredetű sejteken végzett kísérletek adataiból a leíró statisztikákat és a statisztikai teszteket a SigmaPlot 12 programba ágyazott SigmaStat szoftver (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) alkalmazásával számoltuk. A nem normál eloszlású adatok két csoportjának összehasonlítását Mann-Whitney Rank Sum teszttel végeztük. Három ilyen csoport esetén a rangok varianciáját elemezve a Kruskal-Wallis one way módszerét a Dunn-féle módszerrel együtt használtuk, s post hoc páronként teszteltünk (ANOVA on Ranks). A nem-lineáris görbék illeszkedését GraphPad Prism 6.0 programmal számoltuk és hasonlítottuk össze (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Az eredményeket átlag ± SEM (átlag standard hibája). A különbségeket 0,05 alatti p érték esetén tekintettük szignifikánsnak. Az egér sejtvonalakon végzett vizsgálatok esetén az adatok legalább három független kísérlet eredményeiből származnak. A statisztikai vizsgálatokhoz ismételten a GraphPad Prism 6.0 szoftvert használtuk. Az értékeket az átlag ± átlagok standard deviációja formában adtuk meg. Az eredmények szignifikanciáját egy utas ANOVA varianciaanalízissel és a páronkénti átlagok különbségének vizsgálatára használatos Bonferroni-teszt (Bonferroni multiple comparison) segítségével határoztuk meg. Néhány esetre párosítatlan T-próbát alkalmaztunk.

## Eredmények

### Humán harántcsíkolt izomszöveten végzett vizsgálatok eredményei

*Idiopátiás gyulladással miopátiában szenvedő betegek izommintáiból indított primer sejt kultúrákban a sejtek proliferációs képessége csökken*

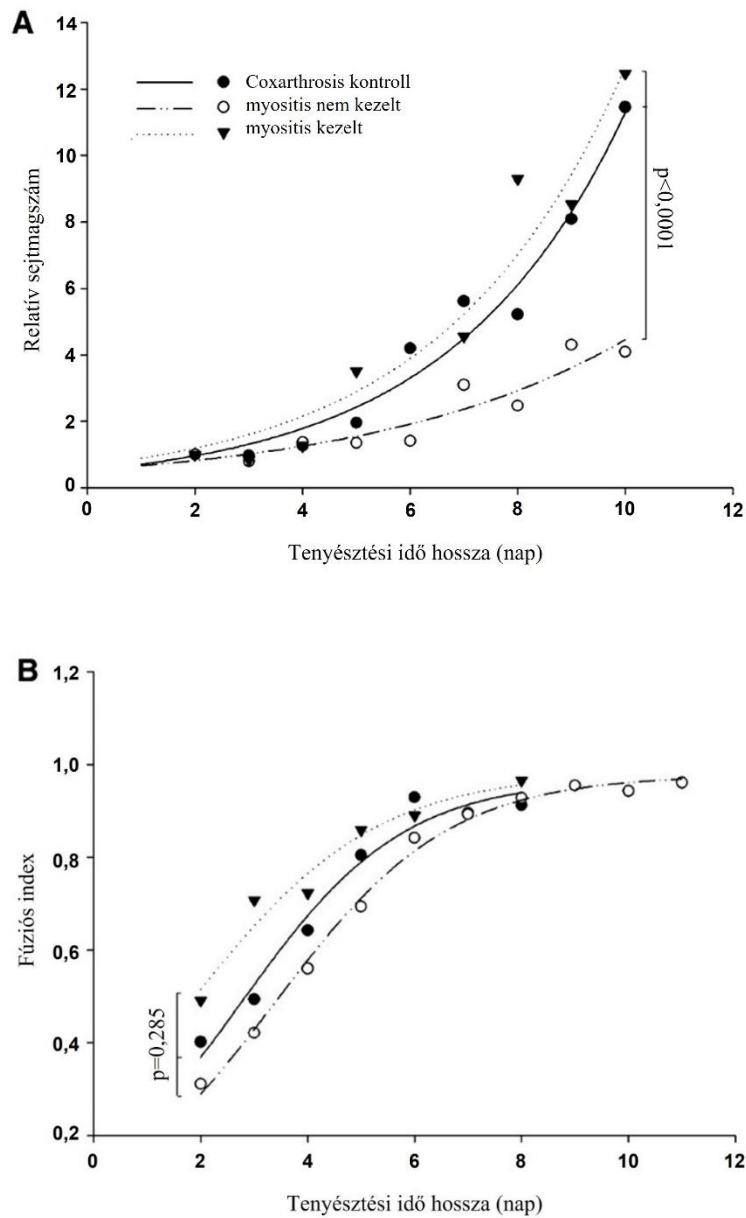
Humán vázizom szatellita sejtjeiből indított primer sejt kultúrákat hasonlítottunk össze. A szatellita sejtek egy része 9 IIM-ben szenvedő betegtől származott, akik közül hatan még nem kaptak kortikoszteroid kezelést, hárman pedig már kezelés alatt álltak. A szatellita sejtek másik része 7, csípőízületi porckopásban (coxarthrosis) szenvedő páciensztől származott, akik kórtörténetében nem szerepelt IIM. A teljesen egészséges donorok hiányában ezeket a tenyészteteket használtuk referenciaként. A miogén sejt magok számát normalizáltuk a tenyésztés második napján számolt sejt magszámra, így korrigáltuk a szatellita sejt preparálása során keletkezett esetleges eltéréseket. Két paraméteres exponenciális növekedési görbéket illesztettünk az adatokra ( $y = y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$ ). A nemlineáris illeszkedés és a görbék összehasonlítása során azt találtuk, hogy a három adathalmaz három egyedi görbét fed le ( $p < 0,0001$ ). A  $k$  paraméter értékei mutatják a növekedés ütemét, mely coxarthrosis esetén  $0,307 \pm 0,028$ , kezeletlen myositises páciensek esetében  $0,211 \pm 0,035$ , és kortikoszteroid kezelés alatt álló myositises pácienseknél  $0,295 \pm 0,043$ -nak adódott. Ezek az értékek azt jelzik, hogy a szatellita sejtekben, mioblasztokban és miotubulusokban lévő miogén sejt magok száma kisebb mértékben emelkedik a kezeletlen IIM páciensek biopsziás mintáiból indított primer tenyészteteiben, mint a coxarthrosisos páciensek műtéti anyagából indított sejt kultúráiban (8. ábra).



**7. ábra. Fáziskontraszt mikrográfok humán izommintákból indított primer tenyészetekről a tenyésztés 6. és 10. napján.**

A, D: Coxarthrosisos páciensek izmából származó primer tenyészet, B, E: kortikoszteroiddal nem kezelt idiopátiás gyulladós miopátiában szenvedő páciensektől származó primer tenyészet, C, F: kortikoszteroid terápiaiban részesült idiopátiás gyulladós miopátiában szenvedő páciensektől származó primer tenyészet. A skála 10  $\mu\text{m}$  hosszúságot jelöl. A fotók egységes nagyításnál készültek. Az A fotóhoz mellékelünk egy kétszeres nagyítású képet, melyen fehér nyilakkal jelöltünk néhány sejtmagot.

Az IIM-ben szenvedő páciensek standard, kortikoszteroidokkal történő kezelése hatással volt az izmaikból indított primer tenyészetek proliferációs ütemére is, ugyanis növekedési rátájuk a coxarthrosisos páciensek mintáiból indított tenyészetekhez közelített. A tenyészeteket 11 napig tartottuk fenn és vizsgáltuk. A 7. ábrán látható a számoláshoz használt néhány reprezentatív fotó, két különböző időpontban. A fáziskontraszt mikroszkóp alatt készült felvételek azt mutatják, hogy a tenyésztés 6. napján, a proliferáció előrehaladott, de a differenciáció még korai stádiumában, a sejtek morfológiája nem változott. Ebben a stádiumban a coxarthrosisos és IIM tenyészetek miotubulusai 2-10 sejtmagot tartalmaztak, de kisebb a sejtszám és a sejtmagszám is (7.A-C ábra). A tenyésztés 10. napjára a különbség még inkább szembeütő (7.D-F ábra). A proliferációs rátával szemben a prekursor sejtek fúziós kapacitása nem károsodott az IIM-ben szenvedő páciensektől származó primer tenyészetekben. A fúziós index adataira illesztett 3 paraméteres szigmoid görbék ( $y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ ) nem különböztek egymástól szignifikánsan ( $p=0,285$ ). A kezeletlen IIM páciensek mintáiból indított tenyészetek esetén a fúziós indexre illesztett görbék enyhe jobbra tolódást mutattak (coxarthrosisos minták tenyészetei:  $x_0 = 2.745 \pm 0.25$  nap; kezeletlen IIM tenyészetei:  $x_0 = 3.404 \pm 0.086$  nap), mely arra utal, hogy kissé később a sejtek fúziója. A kortikoszteroidokkal történő kezelés azonban balra tolta el a fúziós index görbéjét ( $x_0 = 1.831 \pm 0.29$  nap), s az eltolódás hasonló mértékű volt, mint a kezeletlen myositises görbe eltolódása a coxarthrosisoshoz képest (8.B ábra).



**8. ábra. A mioblasztok proliferációs és fúziós tulajdonságai coxarthrosisban és idiopátiás gyulladós miopátiában szenvedő páciensek vázizmaiból indított primer sejtenyészetekben.**

A miopátiás betegek egy része kortikoszteroid kezelésben részesült. Szaggatott vonalak jelzik a kontrolltól eltérő görbéket. A görbék illesztése nem lineáris.

A: miogén sejtmagok száma normalizálva a tenyésztés 2. napján számolt miogén sejtmagszámra. Az adatokra két paraméteres exponenciális görbét illesztettünk. B: a sokmagvú sejtek miogén sejtmagjainak aránya az összes miogén sejt számához viszonyítva. Az adatokra három paraméteres szigmoid görbét illesztettünk.

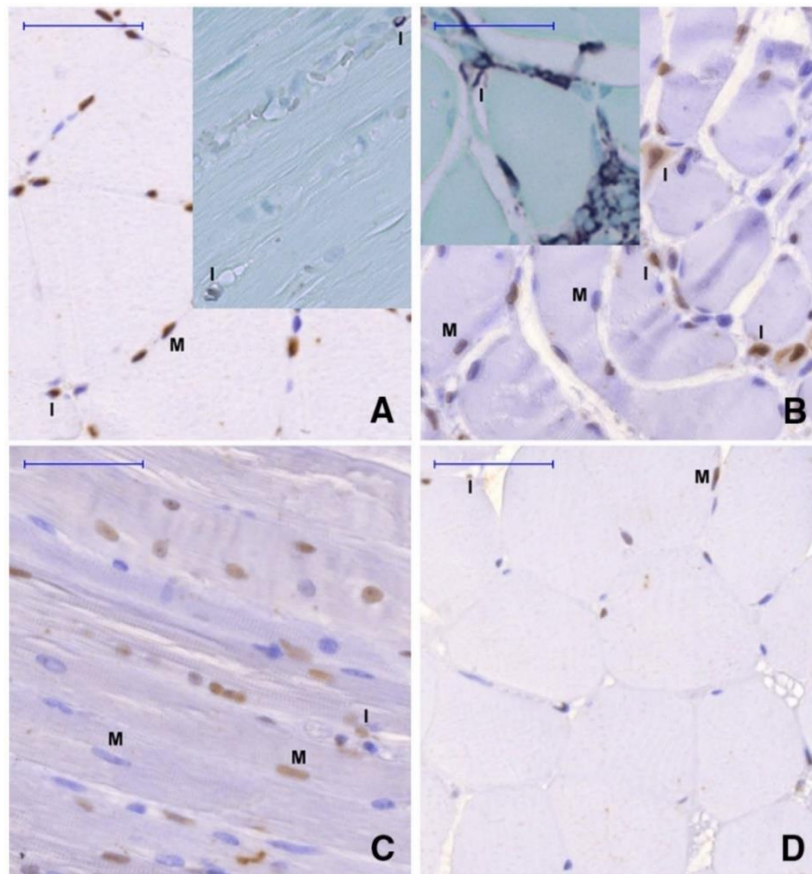
*Az idiopátiás gyulladós miopátiában szenvedő páciensek izommintáiban kevesebb a regenerálódó izomrost és a HMGB1 a sejtmagban lokalizálódik*

Felnőtt vázizomból készült szövettani metszeteken megfestettük a HMGB1-et. A metszeteket 4 coxarthrosisos, 4 kezeletlen IIM-ben szenvedő és 4 kortikoszteroid kezelt IIM-ben szenvedő páciens izommintáiból készítettük. Néhány páciens mintáit sejtenyésztéshez és hisztológiai festéshez is fel tudtuk használni. A kisebb méretű minták csak egyféle vizsgálathoz voltak elegendőek. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során az IIM-ben szenvedő páciensektől származó metszeteken kevesebb volt az izomrostokban a HMGB1 pozitív miogén sejtmag, mint a coxarthrosisos metszeteken (9.A ábra). Az infiltráló mononukleáris és endotél sejtek minden csoportban HMGB1 pozitív festődést mutattak (9. ábra). A vázizomrostok minden csoportban tartalmaztak HMGB1 pozitív és HMGB1 negatív magokat is. Mononukleáris sejtes beszűrődést a coxarthrosisos izmokban is találtunk, de a kortikoszteroiddal nem kezelt IIM páciensek mintáiban sokkal hangsúlyosabb volt a gyulladós infiltráció, melyet CD45-re specifikus festéssel igazoltunk (9. ábra részlet).

Az izom keresztmetszetének egységnyi területén a HMGB1 pozitív miogén magok száma szignifikánsan kisebb volt ( $p < 0,05$ ) mind a kezeletlen ( $402.5 \pm 60.2 \text{ mm}^2$ ) mind a kezelt IIM ( $360.1 \pm 77.5 \text{ mm}^2$ ) csoportban a coxarthrosisos kontroll csoporthoz képest ( $882.74 \pm 155.1 \text{ mm}^2$ ) (10. ábra).

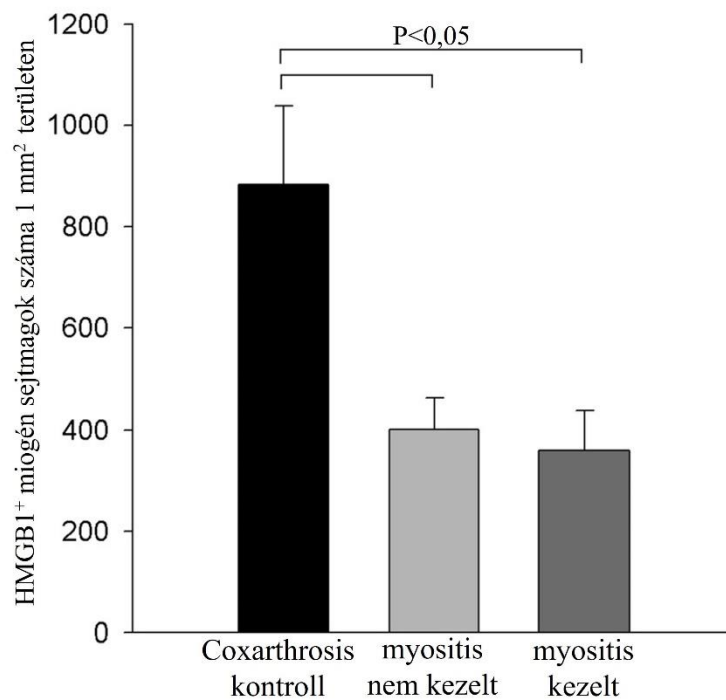
Az izomregeneráció jeleinek azonosítása érdekében megvizsgáltuk az izomrostok centrálisan elhelyezkedő sejtmagjainak arányát. A centrális helyzetű sejtmagokat az izom minták keresztmetszeti felszínén számoltuk (11. ábra). A 11 minta 4 coxarthrosisos betegből, 4 IIM-ben szenvedő, de kortikoszteroiddal nem kezelt betegből és 3 IIM-ben szenvedő és metilprednizolon terápia alatt álló páciensből származott. Az izmok keresztmetszeti képén hat látótérben számoltuk meg a centrális sejtmagokat, átlagoltuk, s az arányt az összes miogén magszámhoz viszonyítva adtuk meg. Azt találtuk, hogy a coxarthrosisos mintákban az összes

miogén sejtmag  $4,53 \pm 1,35\%$ -a centrális helyzetű, s ehhez képest a kortikoszteroid terápiában nem részesülő IIM páciensek mintáiban jelentősen kevesebb a centrális magok száma ( $p=0,039$ ), az összes miogén magnak csak  $1,37 \pm 0,51\%$ -a. A kortikoszteroid terápiában részesült páciensek mintáiban ez az arány  $2,32 \pm 0,62\%$  volt, mely egyik csoport eredményeitől sem tér el szignifikánsan. (12. ábra)

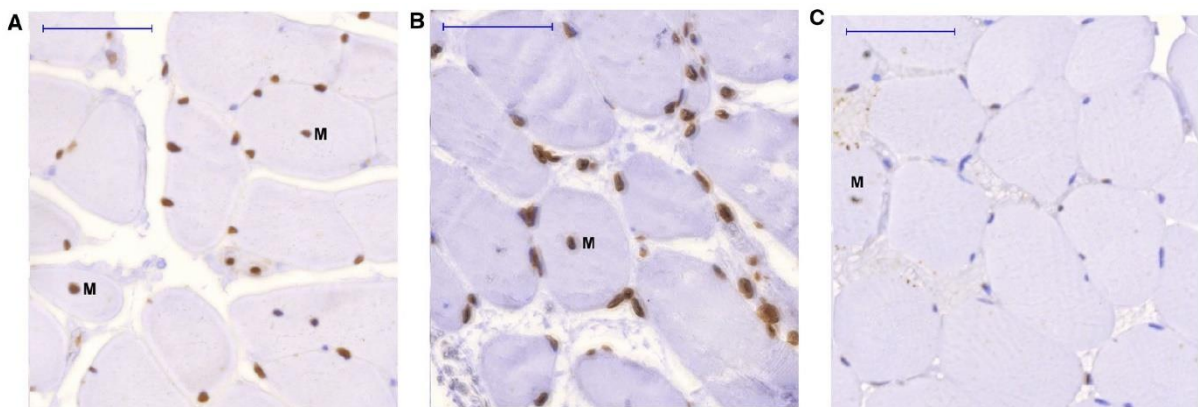


**9. ábra. HMGB1 kimutatása immunhisztokémiai festéssel humán vázizomban.**

*A: Coxarthrosisban szenvedő páciensek műteti anyagából készült metszet, HMGB1+ részekkel, B és C: kortikoszteroid terápiában nem részesült idiopátiás gyulladós miopátiában szenvedő páciens biopsziás mintájából készült metszet HMGB1+ festődéssel, D: kortikoszteroid terápiában részesült idiopátiás gyulladós miopátiában szenvedő páciens biopsziás mintájából készült metszet HMGB1+ festődéssel. Az A és B fotókhoz mellékelt képeken CD45+ sejteket megjelenítő immunhisztokémiai festés eredménye látható. M= miogén sejtmagok, I= endotél sejtek és infiltráló sejtek magjai. A skála 50 μm hosszúságot jelöl.*

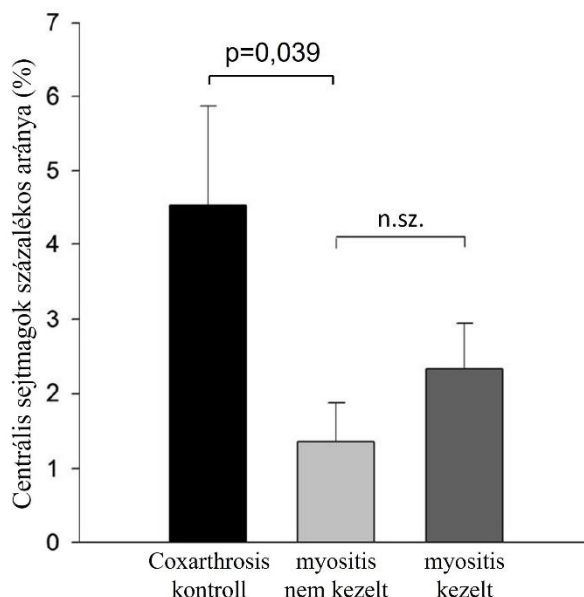


**10. ábra. Izomrostok keresztmetszeti felületén vizsgált HMGB1 pozitív sejtmagok száma humán izommintákban.** Coxarthrosisos csoport: 4 minta, összesen 30 vizsgált látótér. Kortikoszteroid terápiában nem részesült idiopátiás gyulladós miopátia csoport: 4 minta, összesen 28 vizsgált látótér. Kortikoszteroid terápiában részesült idiopátiás gyulladós miopátia csoport: 4 minta, összesen 20 vizsgált látótér. Az oszlopok átlagokat jelölnek. A függőleges vonalak mutatják a SEM-et.



**11. ábra. Centralizált sejtmagok humán vázizom keresztmetszeti képén.**

A: coxarthrosisban szenvedő páciensről származó minta, B: kortikoszteroiddal nem kezelt IIM páciensről származó minta, C: kortikoszteroiddal kezelt IIM páciensről származó minta. Az „M” betűvel jelzett részek a centrálisan elhelyezkedő miogén sejtmagokat jelölik. A skála 50  $\mu$ m hosszúságot mutat.

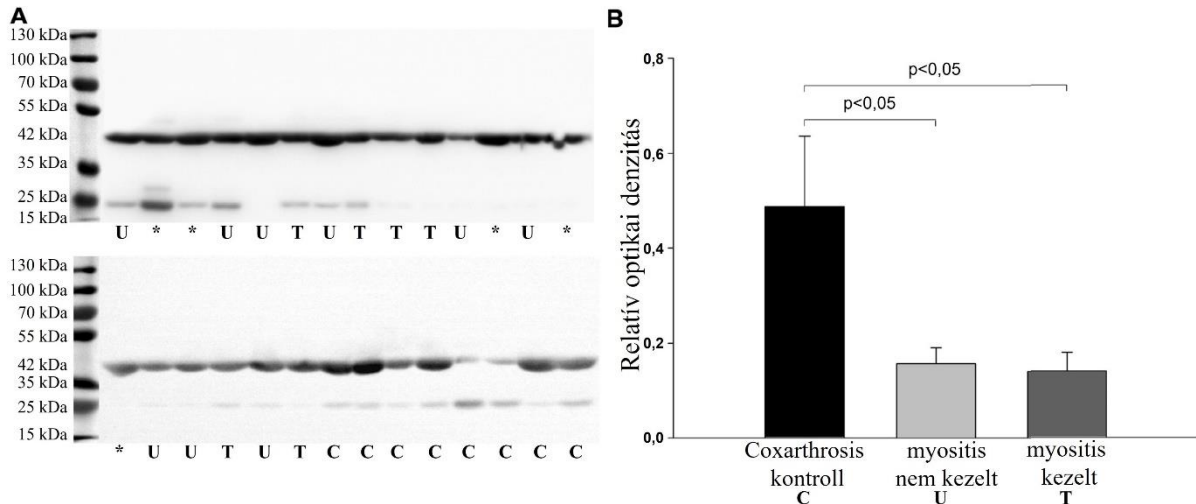


**12. ábra. Centralizált sejtmagok százalékos megoszlása.** *Centralizált magok százalékban kifejezve coxarthrosisos (n=4; 30 látótér), kortikoszteroiddal nem kezelt (kezeletlen myositis, n=4; 28 látótér), és kortikoszteroiddal kezelt IIM (kezelt myositis, n=4; 20 látótér) IIM-ben szenvedő páciensből származó izommintákban. Az oszlopok átlagértékeket mutatnak. A függőleges vonalak a SEM-et jelölik.*

*Az idiopátiás gyulladós miopátiában szenvedő páciensek izommintái kevesebb HMGB1-et tartalmaznak, mint a kontroll*

Western blot vizsgálattal határoztuk meg 8 coxarthrosisos beteg, 9 kortikoszteroid kezelésben nem részesült IIM páciens és 6 kortikoszteroiddal kezelt páciens izommintáinak HMGB1 tartalmát. Később patológus javaslatára kizártunk 5 mintát, melyek olyan páciensektől származtak, akik nem feleltek meg egyértelműen a diagnosztikai kritériumoknak, vagy a kísérleteink alatt változott meg a diagnózisuk (pl. szisztémás lupus erythematosus). A fennmaradó 23 minta esetében az átlagos relatív optikai denzitásokat aktinra normalizálva a következő eredményeket kaptuk az egyes csoportokban: coxarthrosis esetén  $0,488 \pm 0,15$ ; kezeletlen myositis esetén  $0,157 \pm 0,033$ ; kezelt myositis esetén  $0,14 \pm 0,039$ . A myositises csoport izommintáinak HMGB1 tartalma szignifikánsan kisebb volt ( $p < 0,05$ ) a

coxarthrosisos csoportéhoz képest, de a kezelt és kezeletlen IIM csoportokat egymással összehasonlítva nem találtunk számottevő különbséget (13. ábra).



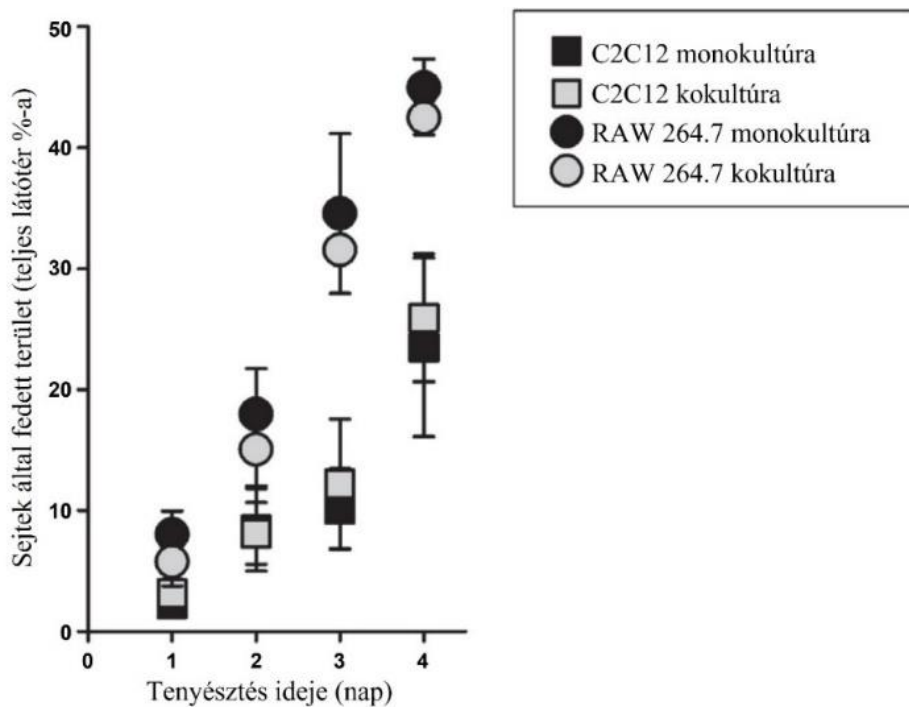
**13. ábra. HMGB1 (25kDa) expresszió vizsgálata Western blot módszerrel humán izommintákból.** A vázizmok 8 oszteoartrózis (C), 6, kortikoszteroiddal kezelt, IIM -ben szenvedő (T) és 9, kortikoszteroiddal nem kezelt, IIM-ben szenvedő (U) páciensből származtak. Belső kontrollként aktint használtunk (42kDa). A csillagok az elégtelen diagnózis miatt kiszűrt páciensek mintáit jelölik. A HMGB1-et jelző sávok relatív optikai denzitását az ugyanazon mintákból származó, aktint jelölő sávok optikai denzitásával hasonlítottuk össze. Az oszlopok átlagértékeket mutatnak. A függőleges vonalak a SEM-et jelölik.

Egér eredetű sejtvonalakon végzett kísérletek eredményei

*A kokultúrában történő tenyésztés nem volt hatással a C2C12 és RAW264.7 sejtek proliferációs képességére*

A kétféle sejttípus egymásra hatását vizsgálva, a sejteket mono-és kokultúrában tenyésztettük és figyeltük, hogyan hatnak egymás proliferációs képességére (14. ábra). Egy nappal a szélesztést követően a sejtek által elfoglalt terület a C2C12 izomsejtek esetében, monokultúrában  $2,3 \pm 0,9\%$ , kokultúrában  $3,1 \pm 1,2\%$  ( $p > 0,05$ ), RAW makrofágok esetében monokultúrában  $8,0 \pm 1,9\%$ , kokultúrában  $5,8 \pm 2,0\%$  ( $p > 0,05$ ). A kétféle sejttípus növekedési üteme közötti különbség a tenyésztés harmadik napjára vált kifejezetté, amikor a C2C12

sejtek által borított felület monokultúrában  $10,1 \pm 3,4\%$ , kokultúrában  $12,1 \pm 5,4\%$  ( $p > 0,05$ ) volt, RAW 264.7 makrofágok esetében pedig monokultúrában  $34,6 \pm 6,6\%$ , és kokultúrában  $31,6 \pm 3,6\%$  ( $p > 0,05$ ) volt. A RAW 264.7 sejtek proliferációja a harmadik naptól kezdve szignifikánsan gyorsabbnak mutatkozott a C2C12 sejtekénél monokultúrában ( $p < 0,0001$ ) és kokultúrában is ( $p < 0,0001$ ). A kokultúrában történő tenyésztésnek azonban sem a mioblasztok sem a makrofágok osztódási rátájára nem volt hatása.



**14. ábra: C2C12 izomsejtek és RAW 264.7 makrofágok proliferációja mono- és kokultúrában. 6 sejtkultúrából származó eredmények. Minden értéket az átlag  $\pm$  az átlagok standard deviációja (SD) formában adtuk meg.**

### *A kokultúrában történő tenyésztés fokozta a kokultúra IL-6 termelését*

A C2C12 és RAW264.7 sejtek kokultúrában történő tenyésztése serkentően hatott az IL-6 termelésre.

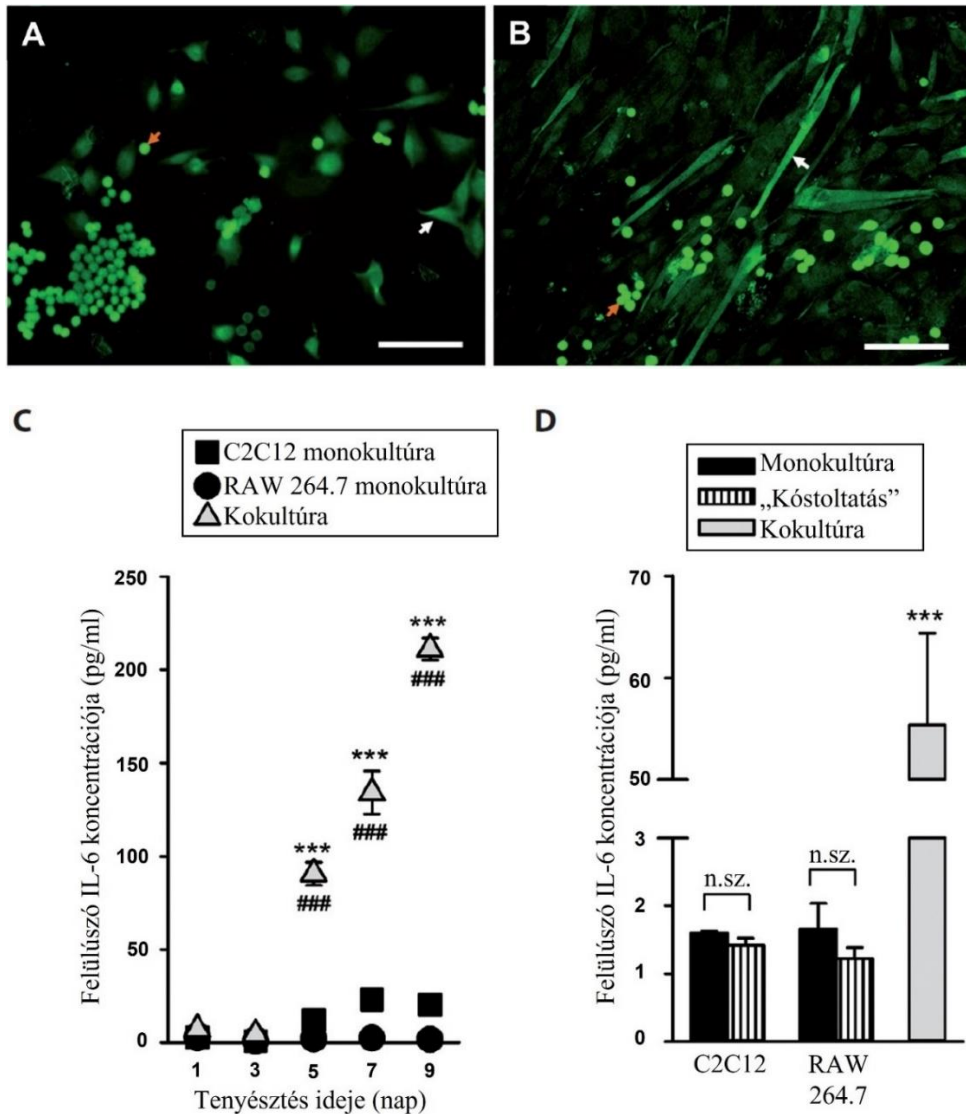
A kokultúrában lévő sejtekben immunfestéssel tettük láthatóvá az IL-6 citokint.

Azt találtuk, hogy az IL-6 termelés jelen van a proliferáló miogén sejtekben és monocita/makrofágokban továbbá megfigyelhető a miogenezis differenciációs stádiumában fejlődő miotubulusokban is (15.AB ábra).

A sejtenyészet médiumában monitoroztuk a sejtekből felszabadult IL-6 koncentrációját. A tenyésztés 1-3 napján mely a miogenezis proliferációs stádiuma, alacsony IL-6 koncentrációkat mértünk a tenyészetek felülúszójában és nem találtunk szignifikáns különbséget a kokultúrák és a monokultúrák között (15.C ábra).

A tenyésztés ötödik napjától kezdve az IL-6 koncentrációja a kokultúrák esetében fokozatosan emelkedett, de a monokultúráknál változatlanul alacsony maradt. A hetedik és kilencedik napon az IL-6 koncentráció tovább emelkedett, s a monokultúrák IL-6 termeléséhez képest szignifikánsan magasabb lett. Annak ellenére, hogy a C2C12 és a RAW 264.7 sejtek is szabadítottak fel mérhető mennyiségű IL-6-ot, monokultúrákban a 9 napos tenyésztés alatt végig alacsony volt a citokin koncentrációja.

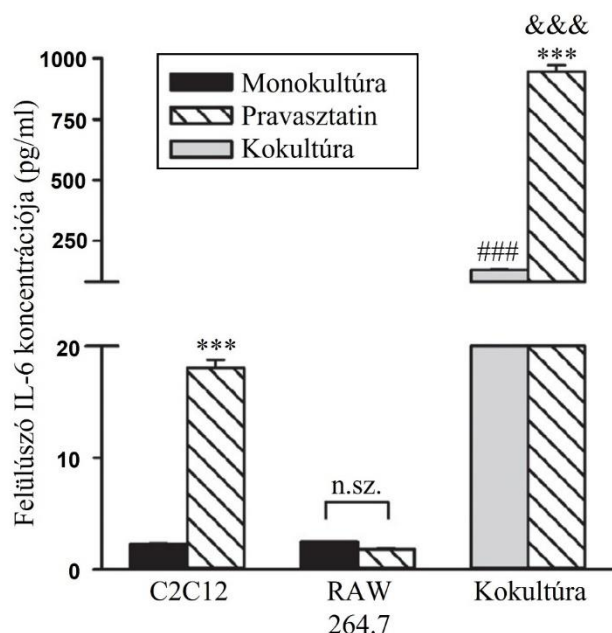
A tenyésztés hatodik napján, a „kóstoltatás” utáni 24. órában a monokultúrák IL-6 termelése egymástól nem tér el, de a kokultúra IL-6 termelésétől jelentősen elmarad (15.D ábra).



**15. ábra: C2C12 izomsejtek és RAW 264.7 makrofágok IL-6 termelése mono-és kokultúrában.** A Az IL-6 immunfluoreszcens festéssel történő kimutatása a proliferáló C2C12 mioblaszt és RAW 264.7 sejtek 3 napos kokultúrájában. B Differenciáló C2C12 miotubulusok és RAW 264.7 makrofágok 6 napos kokultúrában. A skála 100 $\mu$ m hosszt mutat. A fehér nyilak egy nem differenciálódott mioblasztra és egy differenciált miotubulusra mutatnak. A piros nyilak a RAW makrofágokat jelölik. C Mono-és kokultúrák felülúszójának IL-6 koncentrációja 9 napos tenyésztés ideje alatt. Minden egyes csoport 3 sejtenyészet átlagát mutatja. D C2C12 és RAW264.7 sejtenyészetek felülúszójának IL-6 koncentrációja a tenyésztés 6. napján, 24 órával a „kóstoltatás” után. Minden egyes csoport 4 sejtenyészetet képvisel. Minden értéket az átlag  $\pm$  az átlagok standard deviációja (SD) formában adtuk meg. Három csillaggal jelöltük (\*\*\*) a szignifikáns eltérést a C2C12 monokultúrához képest, ahol  $p < 0,001$ ; három kettős kereszttel jelöltük (###) a szignifikáns eltérést a RAW 264.7 monokultúrához képest, ahol  $p < 0,001$ ; nsz: nem szignifikáns különbség, ahol  $p > 0,05$ .

### *A pravasztatin fokozta a kokultúra és az izomsejtenyészet IL-6 termelését*

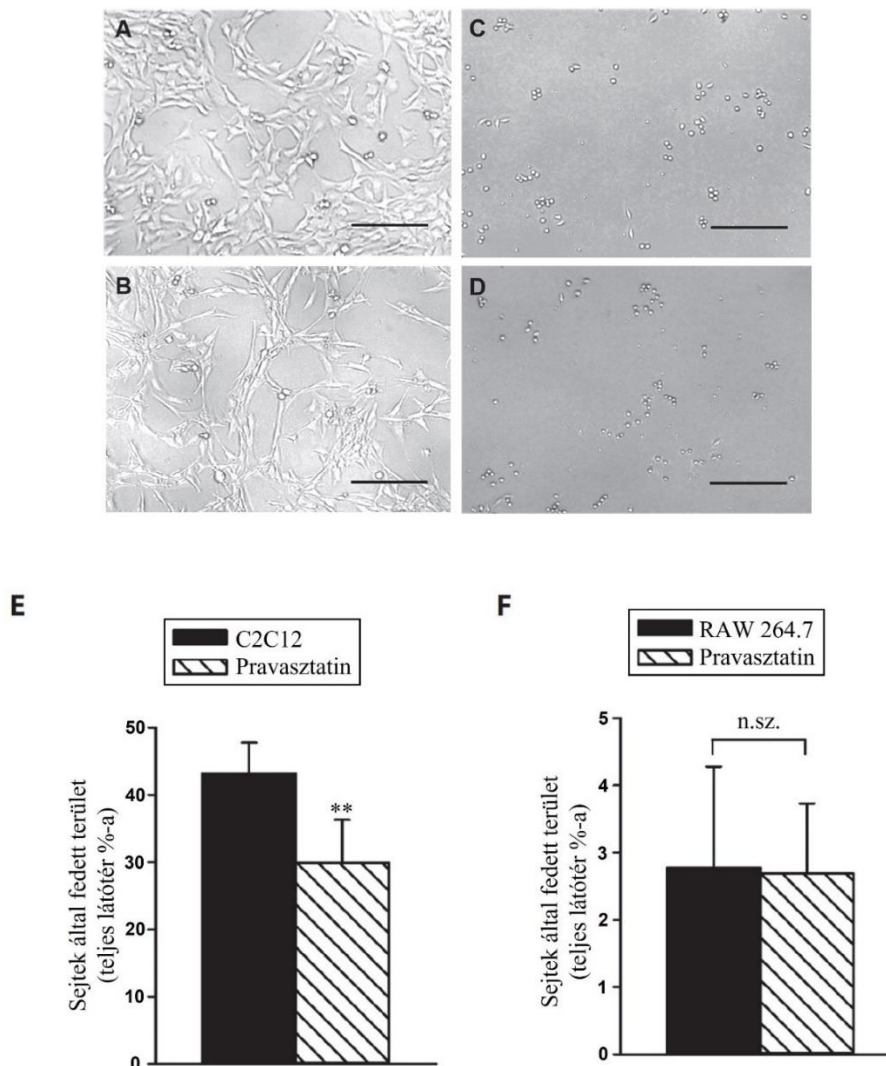
A sztatinek ismert gyulladáscsökkentő hatása miatt feltételeztük, hogy a vízdékony pravasztatin csökkenti a kokultúrák IL-6 termelését. 500 $\mu$ M pravasztatinnal kezeltünk 6 napos mono-és kokultúrákat, 24 órán keresztül (16. ábra). Az elvárásainkkal ellentétben azt találtuk, hogy a pravasztatin szignifikánsan emelte a sejtek IL-6 termelését mind C2C12 monokultúrában (kontroll: 2,3 $\pm$ 0,2 pg/ml; pravasztatin kezelt: 18,0 $\pm$ 1,5 pg/ml;  $p < 0,001$ ) mind kokultúrában (kontroll: 129,3 $\pm$ 5,8 pg/ml; pravasztatin kezelt: 945,8 $\pm$ 50,2 pg/ml;  $p < 0,001$ ). A RAW 264.7 makrofágok monokultúrája esetében pravasztatin kezelés hatására nem találtunk jelentős változást a sejtek IL-6 felszabadításában (kontroll: 2,5 $\pm$ 0,1 pg/ml; pravasztatin kezelt: 1,8 $\pm$ 0,1 pg/ml;  $p > 0,05$ ).



**16. ábra: C2C12 izomsejtek és RAW 264.7 makrofág kokultúrák felülúszójának IL-6 koncentrációja a tenyésztés 7. napján, 24 órás pravasztatin kezelést követően és kontroll körülmények között.** Az egyes csoportok négy sejtenyészet értékeit reprezentálják. Minden értéket az átlag  $\pm$  az átlagok standard deviációja (SD) formában adtuk meg. Három csillaggal jelöltük (\*\*\*) a szignifikáns eltérést a pravasztatinnal kezelt és nem kezelt kultúrák között, ahol  $p < 0,001$ ; három kettős kereszttel jelöltük (###) a szignifikáns eltérést a nem kezelt mono-és kokultúrák között, ahol  $p < 0,001$ ; &&&-val jelöltük a szignifikáns különbséget a pravasztatinnal kezelt mono-és kokultúrák; nsz: nem szignifikáns különbség, ahol  $p > 0,05$ .

### *A pravasztatin csökkentette az izomsejtek proliferációs képességét*

A C2C12 sejtek intenzív IL-6 termelése mögött a pravasztatin kezelésre megszaporodott sejtszámot feltételeztük. Megvizsgáltuk a 24 órás monokultúrák proliferációját pravasztatin kezelés mellett. 24 óra elteltével a pravasztatinnal kezelt mioblasztok száma jelentősen csökkent ( $p < 0,01$ ; 17.AB ábra), de a 24 órás kezelés nem okozott változást a makrofágok számában ( $p > 0,05$ ; 17.CD ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a kokultúra megnövekedett IL-6 termelését pravasztatin kezelést követően nem a megnövekedett sejtszám eredményezte (17.EF ábra).



**17. ábra: Pravasztatin hatása a C2C12 mioblasztokra és RAW 264.7 makrofágokra. Áteső fényenél készült felvételek natív, nem festett tenyészetekről a tenyésztés első napján. A nem kezelt C2C12 sejtek, B 500  $\mu$ M pravasztatinnal kezelt C2C12 sejtek,**

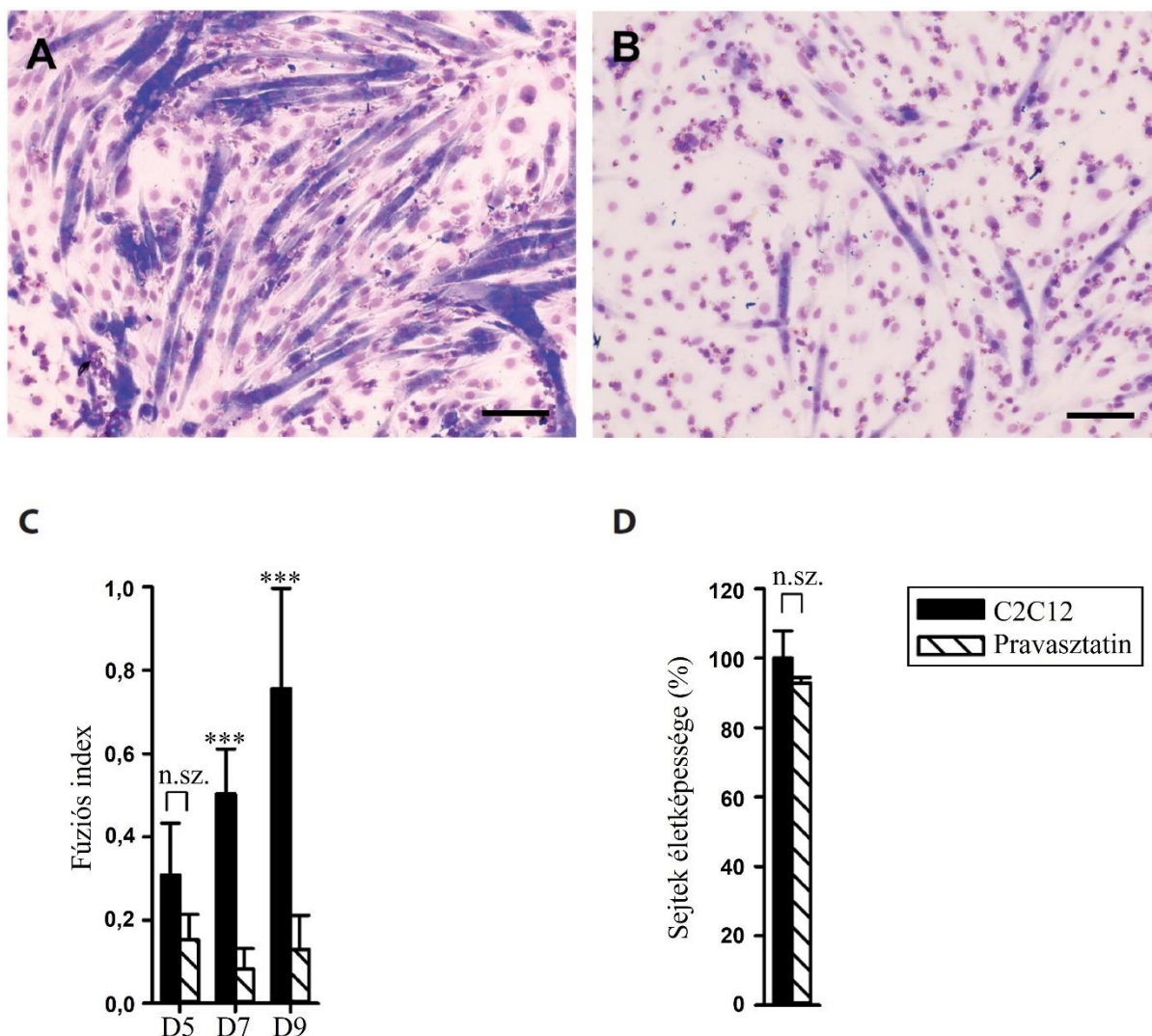
*C kezeletlen RAW 264.7 sejtek, D 500  $\mu$ M pravasztatinnal kezelt RAW 264.7 sejtek. A skála 100  $\mu$ m hosszúságot jelöl. E C2C12 monokultúrákban a sejtek által fedett relatív felület, a látótér %-ban kifejezve, F RAW 264.7 monokultúrákban a sejtek által fedett relatív felület, a látótér %-ban kifejezve. Az egyes oszlopok 6 sejt kultúrából származó adatokat mutatnak, minden sejt kultúrájánál 5 látóteret vizsgáltunk. Minden értéket az átlag  $\pm$  az átlagok standard deviációja (SD) formában adtuk meg. Két csillaggal (\*\*) jelöltük a szignifikáns különbséget, ahol  $p < 0,01$ ; nsz.: nem szignifikáns különbség.*

### *A pravasztatin csökkentette az izomsejtek differenciációs kapacitását*

A pravasztatin kiemelkedően negatív hatást gyakorolt a C2C12 sejtek proliferációjára, ezért megvizsgáltuk hatását a sejtek differenciációjára is (18.AB ábra).

A fúziós index (FI) kifejezi a miotubulusokban lévő sejt magok arányát a tenyészet összes sejt magjához viszonyítva. Differenciálódó C2C12 sejteket 9 napon át kezeltünk pravasztatinnal, s a tenyésztés 7. és 9. napján szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) kevesebb miotubulust találtunk a tenyészetekben a kezeletlen kontrollhoz képest (18.C ábra).

A kontroll tenyészetek esetében a fúziós index az 5. naptól kezdve fokozatosan nőtt, de a pravasztatinnal kezelt tenyészetek esetében nem változott. A kezelt sejtek életképessége azonban a kontroll sejtekéhez volt hasonló ( $p > 0,3$ ) (18.D ábra).



**18. ábra: A pravasztatin hatása a C2C12 sejtek differenciációjára. Fénymikroszkóp alatt készült felvételek, May-Grünwald-Giemsa festés. A pravasztatinnal nem kezelt, 7 napos, differenciálódó C2C12 sejtek, B pravasztatinnal kezelt, 7 napos, differenciálódó C2C12 sejtek. A skála 100  $\mu\text{m}$  hosszát jelöl. C A pravasztatinnal kezelt C2C12 sejtenyészetek fúziós indexe a kontroll tenyészetekhez hasonlítva, a differenciáció 5. (D5), 7. (D7) és 9. (D9) napján. D MTT teszt a pravasztatinnal kezelt és kontroll C2C12 sejtek életképességének meghatározására a tenyésztés 7. napján. Minden értéket az átlag  $\pm$  az átlagok standard deviációja (SD) formában adtuk meg. Három csillaggal (\*\*\*) jelöltük a szignifikáns különbséget, ahol  $p < 0,001$ ; nsz: nem szignifikáns különbség, ahol  $p > 0,05$ )**

## Diszkusszió, következtetések

### Gyulladásban a humán vázizom

Az idiopátiás inflammatórikus miopátiák a vázizomrendszer krónikus, immunmediált elváltozásai, melyek az izmok fájdalmát és gyengeségét okozzák (147). Munkánk során először arra a kérdésre kerestük a választ, hogy krónikus myositisben hatással van-e a gyulladásos környezet az izom szatellita sejtjeinek proliferációs és differenciációs képességére. Az izmokat gyulladáscsökkentő hatású metilprednizolonnal kezelt és nem kezelt, idiopátiás inflammatórikus miopátiában szenvedő páciensektől gyűjtöttük. A páciensek kortikoszteroiddal történő kezelése hatással volt a vázizmok gyulladásos infiltrációjára, és az izomból indított primer tenyészetek izomsejtjeinek proliferációjára és differenciációjára is. A szteroidokkal nem kezelt, IIM páciensektől származó tenyészetekben a sejtek osztódása és fúziója is lassabb volt a referenciaként használt coxarthrosisos mintákból indított primer tenyészetekhez viszonyítva. Adataink alapján az idiopátiás inflammatórikus miopátiában szenvedő páciensek izmaiból indított primer sejttenyészet proliferációs képessége az általunk használt kontrolléhoz képest csökkent. Ennek megfelelően a centrális sejtmagot tartalmazó izomrostból is kevesebbet találtunk az IIM minták metszetein a coxarthrosisos kontrollhoz képest. A páciensek előzetes kortikoszteroid kezelése növelte a centrális magokat tartalmazó rostok számát. A metilprednizolon kezelés *in vivo* mérsékelte a vázizmok gyulladásos sejtes beszűrődését. Venereau és munkatársai leírták, hogy az extracelluláris térben alarmin funkciót ellátó HMGB1 nagy mennyiségben kifejeződik a regenerálódó izomrostok sejtmagjaiban, továbbá HMGB1 teljesen redukált és diszulfid HMGB1 formája is nagy mennyiségben kimutatható sérült izmok tenyésztő médiumában. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk gyűjtött izommintákban a HMGB1-et a sejtmagban vagy a citoplazmában találjuk meg, és mutat-e mennyiségbeli eltérést a

coxarthrosisos kontroll, a szteroiddal kezelt és nem myositises páciensektől származó izomminták között. A HMGB1-et immunhisztokémiai festéssel szövettani metszeteken mutattuk ki, s mind a miogén mind pedig az infiltrátum sejteiben a sejtmagban lokalizálódott, kortikoszteroid kezeléstől és betegségtől függetlenül. Az izomminták HMGB1 tartalmában különbségeket találtunk, ugyanis a myositis megléte a szteroid kezeléstől függetlenül is az izomminták kevesebb HMGB1 tartalmához vezetett, mely alátámasztja az ismert irodalmi adatokat (Venereau és munkatársai). A kortikoszteroid kezelés nem volt hatással az izomminták összes HMGB1 tartalmára, továbbá nem befolyásolta a HMGB1 pozitív sejtmagok és a regenerációt jelző centrális magok számát sem. Salomonsson és munkatársai azt találták, hogy miopátiás egérnél az MHC-1-et túlexpresszáló izomrostok HMGB1 expressziója megnőtt és a kiterjedt gyulladásos beszűrődés mononukleáris sejtei HMGB1 pozitivitást mutattak (148). Ezzel szemben vizsgálataink során kevesebb HMGB1-et találtunk a gyulladásos miopátiás izmokban, mint a kontrollként használt coxarthrosisos mintákban. A különbség eredhet abból, hogy a mintáinkban nem talákoztunk extrém nagy kiterjedésű mononukleáris infiltrációval, de az egér és humán szervezet alapvető különbségei miatt is okozhatnak eltérést. A különbség abból is adódhat, hogy egészséges embertől származó izomminta hiányában coxarthrosisos páciensek izmait használtuk referencia anyagként. Nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy az IIM minták HMGB1 tartalma csak a coxarthrosisos minták HMGB1 tartalmához képest kisebb. Eredményeinkből arra is következtethetünk, hogy a degeneratív ízületi elváltozások nem csak az ízület képleteinek funkcióját károsítják, de a környező vázizomszövet is érintett lehet. Ulfgren és munkatársai 2004-ben publikálták, hogy az egészséges humán vázizomszövetben nem tudtak HMGB1-et kimutatni, ellenben az IIM-ben szenvedő páciensek izomszövetében kiemelkedő HMGB1 expressziót találtak az infiltrátum és az érendotél sejteinek citoplazmájában, valamint extracellulárisan is (149). Az IIM minták szövettani metszeteiben találtunk HMGB1 pozitív

sejtmagot tartalmazó izomrostokat, de kevesebbet, mint a coxarthrosisos minták metszeteiben. A citoplazma HMGB1 negativitása azzal magyarázható, hogy a HMGB1 nem csak a sejtplazmába de az extracelluláris térbe is képes áthelyeződni, így a mintafeldolgozás során a detektálható fehérje egy részét elveszíthettük.

## Izomgyulladás modellezése laboratóriumban

A kóros autoimmun folyamatok által fenntartott, krónikus izomgyulladásra jellemző, hogy az izmokat infiltráló sejtek többségét makrofágok alkotják. SINAM-ban a limfocitás infiltráció általában hiányzik, de jelentős a miofagocitózis (150). Ezt a fiziológiástól eltérő állapotot igyekeztünk modellezni *in vitro* RAW264.7 makrofágok és C2C12 izomsejtek kokultúrában történő tenyésztésével. Az izomregeneráció során történő miogenezis egyes fázisai jól modellezhetők felnőtt vázizomból izolált szatellita sejtekből indított primer sejttenyészetekkel vagy immortalizált sejtvonalakkal (151). A miogén és mieloid sejtek közötti kapcsolatok feltárására és az inflammatórikus miopátiák *in vitro* modellezésére már Cantini és Carraro is izom-makrofág kokultúrákat használt (152). Dort és munkatársai 2019-ben publikálták, hogy a makrofágok jelentős szerepet játszanak a vázizom regenerációs folyamataiban (153). Kísérleteink során azt találtuk, hogy a kokultúrában tenyésztett izomsejtek és makrofágok nem befolyásolták egymás proliferációs képességét, melyből arra következtethetünk, hogy sejtvonalak esetében, a miogenezis ezen korai stádiumában sem a miogén sem a mieloid sejtek nem szabadítanak föl jelentős mennyiségben olyan citokineket, melyek hatással lennének a sejtek osztódására. Chazaud és munkatársai 2003-ban azt találták, hogy humán primer izomsejt tenyészetben a makrofágok fokozták a sejtek proliferációját. Feltételezték, hogy a jelenség mögött szolubilis faktorok és közvetlen sejt-sejt kapcsolat állhat. A kemotaktikus faktorokra fókuszálva nem tudtak olyan anyagot megnevezni, mely a szatellita sejtekből és mioblasztokból felszabadulva a sejtek osztódását gyorsította, de

kísérleteik alapján arra következtettek, hogy a közvetlen sejt-sejt kapcsolat a makrofág és az izomsejt között gyengítette a miogén sejtek apoptotikus hajlamát, s ez vezetett a tenyészet fokozott sejtdenzitásához (154). Munkacsoportunk ezzel szemben azt találta, hogy a C2C12 és RAW264.7 sejtvonalak kokultúrában tartása fokozta a tenyészet IL-6 termelését, azonban a kokultúrában élő sejtek proliferációjára nem volt hatással. Az izomsejtek IL-6 termelése a differenciáció stádiumába lépve makrofágok jelenléte nélkül is jelentősen emelkedett, annak ellenére, hogy a C2C12 sejtek proliferációja lassabb, mint a RAW264.7 sejtek osztódása. Kísérleteink során a differenciálódó izomsejteket tartalmazó kokultúrák fokozott IL-6 termelése mögött csak feltételezhető, hogy a C2C12 sejtek intenzívebb citokintermelése áll, ugyanis a differenciálódó izomsejtek monokultúrájában mért citokin mennyisége szignifikánsan kisebb volt, mint a vele egy fejlődési stádiumban lévő kokultúra IL-6 produktuma. Az irodalomban több közlemény is megjelent arról, hogy a miogén sejtek, mint a szatellita sejtek, mioblasztok és miotubulusok, számos miokint (izomsejtek által termelt citokin) képesek felszabadítani, melyekkel autokrin vagy parakrin módon szabályozzák az izomregenerációs folyamataik egyes lépéseit (155, 156). Az IL-6 feltételezhetően az izom őssejtjeinek proliferatív kapacitására hatva szabályozza az izom regenerációját. Az izmot ért behatást követően a szatellita sejtek aktiválódnak, proliferálnak és differenciálódnak, s a sejtek fúziójával érett miotubulusok keletkeznek. Az IL-6 felszabadulhat az infiltráló gyulladásosejtekből, a szatellita sejtekből, és az izomrostokból is. Az IL-6 lehet az a szolubilis faktor mely elindítja majd szabályozza a szatellita sejtekből induló miogenezis egyes állomásait. A regenerációban betöltött szerepe mellett feltételezik, hogy az IL-6 patológiás állapotban is komoly feladatot lát el, ugyanis Carson és Baltgalvis krónikusan emelkedett szisztémás IL-6 szinteket mért számos olyan daganat típus esetében, melyek cachexiát, azaz kóros soványságot eredményeztek. Elképzelhető, hogy a megemelkedett IL-6 szint vezetett az izomtömeg nagyfokú csökkenéséhez (157). Cantini és munkatársai már

1995-ben leírták, hogy a citokinek közül az IL-6 lehet az egyik, melyet mind a miogén sejtek, mind a monociták és makrofágok is felszabadítanak, s mely jelentős szerepet játszik a két sejtípus kapcsolatában az izom regenerációja során (152). A laboratóriumunkban tartott sejttenyésztéseink esetében a tenyésztés kezdetétől detektálható mennyiségű IL-6 citokin termeléssel találkoztunk mind a C2C12 mind a RAW sejtek esetében. Az IL-6 jelenlétét a sejt kultúra felülűszojából ELISA módszerrel mutattuk ki, a sejtekben lévő citokint pedig fluoreszcens immunfestéssel tudtuk detektálni mindkét sejtípus esetében. Mivel a sejt kultúrák felülűszojának megcserélésével nem értünk el a kokultúrához mérhető, fokozott IL-6 termelést, arra következtettünk, hogy a kokultúra fokozott IL-6 termelése mögött vagy az izomsejt és makrofág közötti közvetlen sejt kapcsolat állhat, vagy pedig parakrin úton, kis távolságban ható szolubilis faktorok. Serrano és munkatársai kísérleteikben bizonyították, hogy a szatellita sejtek által mediált vázizom hipertrófia esetén az IL-6 a szabályozás kulcsmolekulája (158). Már egyre szélesebb körben elfogadott, hogy a miogén sejtek mind fiziologiás, mind patológiás körülmények között immunsejtekkel is kapcsolatban állnak. A köztük lévő kommunikáció citokinekkel vagy kemokinekkel történik, s újabban feltételezik, hogy közvetlen sejt-sejt kontaktus is kialakul köztük (159-161). Az izmok regenerációjában fontos szerep jut az IL-6-nak, melyet makrofágokból felszabadulva proinflammatorikus citokinként, miogén sejtek által termelve pedig miokinként ismerünk (152, 158, 162). A sztatinok számos pozitív terápiás hatással bírnak, például csökkentik a vér koleszterinszintjét és gátolják a gyulladást, de ennek ellenére néha súlyos miopátiát is okozhatnak (80, 81, 163). Mivel ismert a sztatinok gyulladáscsökkentő hatása, és az IL-6 ismert proinflammatorikus citokin, kísérleteinkben arra számítottunk, hogy az izom-makrofág kokultúra differenciációs fázisában megemelkedett IL-6 termelés pravasztatin kezeléssel gátolható. Ennek ellenére azt találtuk, hogy a C2C12 monokultúra és a C2C12-RAW kokultúra IL-6 termelését a pravasztatin kezelés tovább fokozta. A kezelés a C2C12 sejtek proliferációs és differenciációs

képességét is rontotta. A 6 napos makrofág monokultúra IL-6 termelése pravasztatin kezelésre nem változott és a tenyészet denzitásában sem találtunk változást. A miogén sejtek életképességét nem befolyásolta a pravasztatin kezelés. Ezekből arra következtetünk, hogy a gyulladáson miopátia esetében az izomregeneráció elégtelenségét nem a sejtek életképességbeli változása okozza, hanem a gátolt differenciáció. A kokultúra megnövekedett IL-6 termelését feltételezhetően a pravasztatin által stimulált izomsejtek adhatták. A sztatinok nem csak az izomsejtekre, hanem a makrofágokra is képesek hatást gyakorolni, melynek a sztatin indukálta miopátiákban patológiás szerepe lehet (150). Fu és munkatársai leírták, hogy a sztatin kezelés nincs hatással a monociták citokintermelésére, ellenben a differenciálódott makrofágok citokintermelését fokozza. Kísérleteinkben a fluvasztatin fokozta a differenciált makrofágok IL-6 termelését (164). Elképzelhető, hogy a mi vizsgálataink során a pravasztatin miatt nem volt hatással a RAW sejtek IL-6 termelésére, mert direkt stimulus (pl.: lipopoliszacharid; LPS) hiányában a RAW 264.7 monokultúra főleg monocitákat tartalmazott. Lopnow és munkatársai 2011-ben azt találták, hogy LPS-t és pravasztatint együttesen alkalmazva szinergisztikus hatást tudtak elérni a humán vaszkuláris izomsejtekből és mononukleáris sejtekből álló kokultúra IL-6 termelésére (165). Munkacsoportunk korábban azt találta, hogy a sztatinok csökkentették az izomsejt tenyészet proliferációs képességét és a miotubulusok fúziós kapacitását (166), továbbá a felnőtt vázizomrostok kalciumhomeosztázisára is negatív hatással volt (167). Grunwald és munkatársai hasonló eredményekről számoltak be, ugyanis humán vázizomból származó primer sejtenyészetekben a roszuvasztatin és a szimvasztatin károsította a mioblasztok proliferációját és a szimvasztatin a differenciációt is késleltette (168). A sztatin indukálta toxikus miopátia pontos patomechanizmusa még nem ismert, de feltételezhető, hogy bizonyos esszenciális metabolitok hiánya és a megromlott membránintegritás vezet az izom

károsodásához. Korábban patkány vázizmon végzett kísérleteinkben a sztatinok negatív hatást gyakoroltak a kalcium homeosztázisra, mely az izomerő csökkenéséhez vezetett (167). Korábbi eredményeink és más irodalmi adatok alapján azt feltételezzük, hogy az IL-6 mellett a HMGB1 a másik lehetséges szabályozó molekula, mely fenntartja a kokultúrában élő sejtek közti kapcsolatot (127, 169, 170). A HMGB1 stimulálja a humán monociták citokin termelését, s ezek között az IL-6 is szerepel (170). A krónikus gyulladásos folyamatokban szabályozhatja az izom-makrofág interakciót és kemoattraktív hatással bírhat a migráló mioblasztokra (127, 169). A HMGB1 vészjelzőként funkcionálva gyulladáskeltő citokinek felszabadulását indukálja (171, 172)

## Összefoglalás

A hiperkoleszterinémia kezelésében elsőként választandó gyógyszerek a sztatinok. Alkalmazásuk során ritkán előfordulhat súlyos, izomkárosító mellékhatás. Munkánk során humán izombiopsziás mintákon és műtéti anyagokon, valamint primer izomsejt tenyészeteken végzett kísérleteinkben tanulmányoztuk a gyulladásos környezet hatását az szatellita sejtek életképességére. Az izomgyulladást C2C12 izomsejtekből és RAW264.7 makrofágokból álló kokultúrákon modelleztük *in vitro*. A szteroiddal nem kezelt páciensektől származó izmokban a regenerálódó rostok száma kevesebb, valamint az izmokból indított primer tenyészetekben a sejtek lassabban osztódtak a kontrollhoz képest. A páciensek előzetes kortikoszteroid kezelése mérsékelte a vázizmok gyulladásos beszűrődését. A HMGB1-et a szteroid kezeléstől és betegségtől függetlenül az izmok és az infiltrátum sejtmagjaiban találtuk. A szteroid kezelés ellenére is kevesebb HMGB1-et tartalmaztak a myositises páciensek mintái. A kortikoszteroid kezelés nem befolyásolta sem az izmok összes HMGB1 tartalmát, sem a HMGB1 pozitív sejtmagok vagy a regenerálódó rostok számát. A kokultúrában tenyésztett sejtek nem voltak hatással egymás proliferációs képességére, azonban az együttélés fokozta a kokultúra IL-6 termelését. Az izomsejtek IL-6 termelése a differenciáció stádiumában makrofágok nélkül is emelkedett, de nem érte el a vele egy stádiumban élő kokultúra citokintermelését. A pravasztatin kezelés tovább fokozta az izomsejtkultúra és a kokultúra IL-6 termelését is és rontotta az izomsejtek osztódási és fúziós képességét. A makrofágok IL-6 termelésére vagy osztódására nem volt hatással. Eredményeink arra utalnak, hogy a pravasztatin egyes esetekben fokozhatja az izomgyulladást s a folyamatban a HMGB1-nek is szerepe lehet.

## Summary

Statins are the first line drugs for treating hypercholesterolemia, but rarely, they can have severe, muscle-damaging side effects. We performed experiments on human surgical and biopsy specimens, primary muscle cell cultures, and mouse cell lines. Muscle inflammation was modeled *in vitro* on cocultures of C2C12 and RAW264.7 cells. The number of regenerating fibers was lower in the muscles derived from patients without steroid treatment, and in the primary cell cultures initiated from their samples, the rate of proliferation and differentiation was slower compared to the controls. Previous corticosteroid treatment of patients increased the number of regenerating fibers and reduced the inflammatory infiltration in skeletal muscle. HMGB1 was found in the nuclei of muscle cells and infiltrating cells regardless of disease or steroid treatment. Despite pre-treatment, samples derived from patients with myositis contained less HMGB1. Corticosteroid treatment had no effect either on total HMGB1 content of muscles or the number of HMGB1 positive nuclei or regenerating fibers. In cocultures cells did not affect on each other's proliferative capacity, however coexistence increased the IL-6 production of the coculture. At the stage of differentiation, IL-6 production of muscle cells was elevated even without the presence of macrophages, but the cytokine level was not as high as in a coculture of the same age. Pravastatin treatment further increased IL-6 production of muscle monocultures and cocultures and impaired their proliferation and differentiation ability. Pravastatin did not affect on IL-6 production or proliferation of macrophages. Our results suggest that pravastatin may increase myositis in some cases and that HMGB1 may play a role in this process.

## Önállóan és csapatban végzett munkák

A klinikai diagnózisok felállítását és az izombiopsziák vételezését, valamint a csípőprotézis műtéteket sebészek, patológusok és belgyógyász szakorvosok végezték: Dr. Dankó Katalin, Dr. Griger Zoltán, Dr. Csernátó Zoltán, Dr. Kovács Ilona, Dr. Hortobágyi Tibor. A minták további kezelését, gyűjtését magam végeztem. Az eredmények statisztikai elemzésében részt vettem és ebben nagy segítséget kaptam Dr. Vincze Jánostól, Dr. Cseri Juliannától, Dr. Szentesi Pétertől.

A CD45 és a HMGB1 kimutatását célzó immunhisztokémiai festésben és a metszetek elkészítését én végeztem, ehhez technikai, anyagi-tárgyi segítséget kaptam Dr. Poór Ágnes és Dr. Kovács Ilona patológusoktól.

A humán vázizom szatellita sejtjeit magam izoláltam és a sejttenyészeteket is én indítottam és tartottam fenn. A humán sejtek proliferációját és differenciációját magam vizsgáltam, a sejtmagok és miotubulusok megszámlálását is magam végeztem, ebben Dr. Cseri Juliannától kaptam gyakorlati segítséget. A Western blot vizsgálatokat magam végeztem, ezekben Dr. Fodor Jánostól kaptam tárgyi, technikai segítséget. Az immunfluoreszcens festésről Dr. Szentesi Péter segítségével készítettünk felvételeket.

Az egér eredetű sejtvonalak tenyésztését, a kokultúrák létrehozását, a proliferáció vizsgálatát, a mintagyűjtést, az IL-6 citokin ELISA méréseket, az immuncitokémiai festéseket, a pravasztatin kezelést, az MTT teszteket, s ezek kiértékelését is magam végeztem.

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Csernoch László professzor úrnak, és Dr. Tózsérné Dr. Benkó Szilvia docens asszonynak, akik lehetővé tették számomra, hogy az intézetben végezhessem el az értekezés alapjául szolgáló kísérletes munkákat, és akik időt és fáradságot nem kímélve segítettek munkámat.

Itt szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Szentesi Péternek, aki türelmével, bátorításával segített átlendíteni a nehezebb napokon, s akihez bátran fordulhattam szakmai segítségért.

Köszönettel tartozok minden társszerzőmnek az eredményes közös munkáért.

Jószívvel gondolok Dr. Almássy Jánosra, Dr. Fodor Jánosra, Dr. Gönczi Mónikára, Dr. Dienes Beatrixra, Dr. Magyar Jánosra, Dr. Bányász Tamásra, Dr. Nánási Péterre is, akiktől rengeteget tanulhattam a szakmáról és az életről.

Hálával tartozok még munkacsoportunk minden tagjának, köztük Orosz Józsefnek és Tálásné Őri Rózának, akik betekintést engedtek az egerekkel történő kísérletes munka rejtelseibe.

Köszönet jár munkacsoportunk minden tagjának, akik négy teljes éven át körülvettek barátsággal és jókedvvel.

Hálával tartozok Dr. Vincze Jánosnak és Dr. Cseri Juliannának a közlemények összeállításában és a statisztikai próbákban nyújtott segítségükért.

Nem utolsó sorban itt szeretnék köszönetet mondani korábbi témavezetőmnek, Dr. Maródi Lászlónak, hogy segített elindulni a PhD útvesszőiben.

Örök hálával tartozok korábbi témavezetőmnek, Dr. Dankó Katalin professzor asszonynak az első közleményem megszületéséért, a sok biztatásért, őszinte lelkesedéséért.

Köszönöm férjemnek, szüleimnek, barátaimnak türelmüket, szeretetüket és bátorításukat.

## Irodalomjegyzék

1. de Lorgeril M, Salen P. Cholesterol lowering and mortality: time for a new paradigm? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 September 01;16(6):387-90.
2. KEYS A. Atherosclerosis: a problem in newer public health. *J Mt Sinai Hosp N Y.* 1953 August 01;20(2):118-39.
3. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1975 February 13;292(7):344-7.
4. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975 February 20;292(8):403-7.
5. Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mel JR, et al. Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol.* 1995 November 01;38(5):705-13.
6. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2004 May 01;14(5):337-45.
7. Lundberg IE, Tjarnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, Visser M, et al. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis.* 2017 December 01;76(12):1955-64.
8. De Bleeker JL, Lundberg IE, de Visser M, ENMC Myositis Muscle Biopsy Study Group. 193rd ENMC International workshop Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies 30 November - 2 December 2012, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2013 November 01;23(11):945-51.
9. Lundberg IE, de Visser M, Werth VP. Classification of myositis. *Nat Rev Rheumatol.* 2018 May 01;14(5):269-78.
10. Bolko L, Gitiaux C, Allenbach Y. Dermatomyositis: new antibody, new classification. *Med Sci (Paris).* 2019 November 01;35 Hors serie n degrees 2:18-23.
11. Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, Burleson T, Sanoudou D, Tawil R, et al. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol.* 2005 May 01;57(5):664-78.
12. Ladislau L, Suarez-Calvet X, Toquet S, Landon-Cardinal O, Amelin D, Depp M, et al. JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain.* 2018 June 01;141(6):1609-21.

13. Selva-O'Callaghan A, Pinal-Fernandez I, Trallero-Araguas E, Milisenda JC, Grau-Junyent JM, Mammen AL. Classification and management of adult inflammatory myopathies. *Lancet Neurol*. 2018 September 01;17(9):816-28.
14. Rose MR. 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2–4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2013;23(12):1044-55.
15. Rose MR, ENMC IBM Working Group. 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2-4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2013 December 01;23(12):1044-55.
16. Lundberg IE, Tjarnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, de Visser M, et al. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Adult and Juvenile Idiopathic Inflammatory Myopathies and Their Major Subgroups. *Arthritis Rheumatol*. 2017 December 01;69(12):2271-82.
17. Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, Stenzel W, Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group. 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. *Neuromuscul Disord*. 2018 January 01;28(1):87-99.
18. Liang WC, Uruha A, Suzuki S, Murakami N, Takeshita E, Chen WZ, et al. Pediatric necrotizing myopathy associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2017 February 01;56(2):287-93.
19. Suzuki S, Nishikawa A, Kuwana M, Nishimura H, Watanabe Y, Nakahara J, et al. Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2015 May 13;10:61-y.
20. Watanabe Y, Uruha A, Suzuki S, Nakahara J, Hamanaka K, Takayama K, et al. Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 October 01;87(10):1038-44.
21. Allenbach Y, Benveniste O. Peculiar clinicopathological features of immune-mediated necrotizing myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2018 November 01;30(6):655-63.
22. Anquetil C, Boyer O, Wesner N, Benveniste O, Allenbach Y. Myositis-specific autoantibodies, a cornerstone in immune-mediated necrotizing myopathy. *Autoimmun Rev*. 2019 March 01;18(3):223-30.
23. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Huapaya JA, Albayda J, Paik JJ, Johnson C, et al. A longitudinal cohort study of the anti-synthetase syndrome: increased severity of interstitial lung disease in black patients and patients with anti-PL7 and anti-PL12 autoantibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2017 June 01;56(6):999-1007.
24. Mescam-Mancini L, Allenbach Y, Hervier B, Devilliers H, Mariampillay K, Dubourg O, et al. Anti-Jo-1 antibody-positive patients show a characteristic necrotizing perifascicular myositis. *Brain*. 2015 September 01;138(Pt 9):2485-92.

25. Fredi M, Cavazzana I, Franceschini F. The clinico-serological spectrum of overlap myositis. *Curr Opin Rheumatol*. 2018 November 01;30(6):637-43.
26. Zoske J, Schneider U, Siegert E, Kleefeld F, Preusse C, Stenzel W, et al. Performance of ENMC and EULAR/ACR classification systems applied to a single tertiary center cohort of dermatomyositis patients. *Neurol Res Pract*. 2021 November 15;3(1):59-4.
27. Albayda J, Khan A, Casciola-Rosen L, Corse AM, Paik JJ, Christopher-Stine L. Inflammatory myopathy associated with anti-mitochondrial antibodies: A distinct phenotype with cardiac involvement. *Semin Arthritis Rheum*. 2018 February 01;47(4):552-6.
28. Maeda MH, Tsuji S, Shimizu J. Inflammatory myopathies associated with anti-mitochondrial antibodies. *Brain*. 2012 June 01;135(Pt 6):1767-77.
29. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5997, Cholesterol. Retrieved April 1, 2022 [Internet]. []. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cholesterol>.
30. Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992 December 01;43(8):779-804.
31. Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 July 01;2(7):517-26.
32. Kannel WB. Risk Factors in the Development of Coronary Heart Disease. Six Year Follow-up Experience—The Framingham Study. *Annals of internal medicine*. 1961 May 01;54(5):1035.
33. Cybulska B, Klosiewicz-Latoszek L. Landmark studies in coronary heart disease epidemiology. The Framingham Heart Study after 70 years and the Seven Countries Study after 60 years. *Kardiol Pol*. 2019;77(2):173-80.
34. Terkeltaub RA. IL-10: An "immunologic scalpel" for atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 December 01;19(12):2823-5.
35. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*. 1997 May 01;336(18):1276-82.
36. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992 January 30;326(5):310-8.
37. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994 October 01;90(4):2126-46.
38. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009 March 01;73(3):411-8.

39. Pepine CJ. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 1998 November 19;82(10A):23S-7S.
40. Evans M, Rees A. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same? *Drug Saf.* 2002;25(9):649-63.
41. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA.* 2003 April 02;289(13):1681-90.
42. Alfirevic A, Neely D, Armitage J, Chinoy H, Cooper RG, Laaksonen R, et al. Phenotype standardization for statin-induced myotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 October 01;96(4):470-6.
43. mht\_szakmai\_iranyelv\_2018\_20190312.
44. Endo A. A gift from nature: the birth of the statins. *Nat Med.* 2008 October 01;14(10):1050-2.
45. Endo A. The origin of the statins. 2004. *Atheroscler Suppl.* 2004 October 01;5(3):125-30.
46. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(5):484-93.
47. Gyires Klára FZ. A farmakológia alapjai: III. A szív, az érrendszer és a vese gyógyszerterana, 246. oldal. 2.th ed. Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2011.
48. Statins: From Fungus to Pharma [Internet]. []. Available from: <https://www.americanscientist.org/article/statins-from-fungus-to-pharma>.
49. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005 February 01;19(1):117-25.
50. Gazzero P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, et al. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev.* 2012 January 01;64(1):102-46.
51. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001 May 11;292(5519):1160-4.
52. Plosker GL, Wagstaff AJ. Fluvastatin: a review of its pharmacology and use in the management of hypercholesterolaemia. *Drugs.* 1996 March 01;51(3):433-59.
53. Tsujita Y, Watanabe Y. Pravastatin Sodium: A Novel Cholesterol-Lowering Agent that Inhibits HMG-CoA Reductase. *Cardiovascular drug reviews.* 1989 Jun;7(2):110-26.
54. Haria M, McTavish D. Pravastatin. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical effectiveness in the management of coronary heart disease. *Drugs.* 1997 February 01;53(2):299-336.

55. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*. 2001 December 01;5(4):378-87.
56. Kitazawa E, Tamura N, Iwabuchi H, Uchiyama M, Muramatsu S, Takahagi H, et al. Biotransformation of pravastatin sodium (I). Mechanisms of enzymic transformation and epimerization of an allylic hydroxy group of pravastatin sodium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 April 30;192(2):597-602.
57. Garcia MJ, Reinoso RF, Sanchez Navarro A, Prous JR. Clinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003 August 01;25(6):457-81.
58. Bottorff MB. Statin safety and drug interactions: clinical implications. *Am J Cardiol*. 2006 April 17;97(8A):27C-31C.
59. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*. 1999 December 01;84(3):413-28.
60. Hamelin BA, Turgeon J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 1998 January 01;19(1):26-37.
61. Komai T, Shigehara E, Tokui T, Koga T, Ishigami M, Kuroiwa C, et al. Carrier-mediated uptake of pravastatin by rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Pharmacol*. 1992 February 18;43(4):667-70.
62. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990 February 01;343(6257):425-30.
63. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*. 2002 April 01;16(4):508-19.
64. Agarwal V, Phung OJ, Tongbram V, Bhardwaj A, Coleman CI. Statin use and the prevention of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2010 September 01;64(10):1375-83.
65. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest*. 1997 December 01;100(11):2671-9.
66. Chakrabarti R, Engleman EG. Interrelationships between mevalonate metabolism and the mitogenic signaling pathway in T lymphocyte proliferation. *J Biol Chem*. 1991 July 05;266(19):12216-22.
67. Cutts JL, Scallen TJ, Watson J, Bankhurst AD. Role of mevalonic acid in the regulation of natural killer cell cytotoxicity. *J Cell Physiol*. 1989 June 01;139(3):550-7.
68. Cutts JL, Bankhurst AD. Reversal of lovastatin-mediated inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin 2. *J Cell Physiol*. 1990 November 01;145(2):244-52.

69. Katznelson S, Wang XM, Chia D, Ozawa M, Zhong HP, Hirata M, et al. The inhibitory effects of pravastatin on natural killer cell activity in vivo and on cytotoxic T lymphocyte activity in vitro. *J Heart Lung Transplant*. 1998 April 01;17(4):335-40.
70. Kothe H, Dalhoff K, Rupp J, Muller A, Kreuzer J, Maass M, et al. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors modify the inflammatory response of human macrophages and endothelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation*. 2000 April 18;101(15):1760-3.
71. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*. 2000 December 01;6(12):1399-402.
72. Laufs U, Liao JK. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 May 01;10(4):143-8.
73. Palinski W. Immunomodulation: a new role for statins? *Nat Med*. 2000 December 01;6(12):1311-2.
74. Romano M, Diomedede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, et al. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest*. 2000 July 01;80(7):1095-100.
75. Rudich SM, Mongini PK, Perez RV, Katznelson S. HMG-CoA reductase inhibitors pravastatin and simvastatin inhibit human B-lymphocyte activation. *Transplant Proc*. 1998 June 01;30(4):992-5.
76. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 1997 November 01;30(5):1212-7.
77. Lutgens E, Daemen MJ. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002 January 01;12(1):27-32.
78. Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, Pelli G, Veillard NR, Burger F, et al. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res*. 2003 September 01;59(3):755-66.
79. Le NH, Kim CS, Tu TH, Choi HS, Kim BS, Kawada T, et al. Blockade of 4-1BB and 4-1BBL interaction reduces obesity-induced skeletal muscle inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:865159.
80. Dalakas MC. Toxic and drug-induced myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 August 01;80(8):832-8.
81. Nazir S, Lohani S, Tachamo N, Poudel D, Donato A. Statin-Associated Autoimmune Myopathy: A Systematic Review of 100 Cases. *J Clin Rheumatol*. 2017 April 01;23(3):149-54.
82. Walsh RJ, Amato AA. Toxic myopathies. *Neurol Clin*. 2005 May 01;23(2):397-428.

83. Lane RJ, Mastaglia FL. Drug-induced myopathies in man. *Lancet*. 1978 September 09;2(8089):562-6.
84. Fichtl B, Kurz H. Binding of drugs to human muscle. *Eur J Clin Pharmacol*. 1978 December 18;14(5):335-40.
85. Davidson MH, Stein EA, Dujovne CA, Hunninghake DB, Weiss SR, Knopp RH, et al. The efficacy and six-week tolerability of simvastatin 80 and 160 mg/day. *Am J Cardiol*. 1997 January 01;79(1):38-42.
86. Pasnoor M, Barohn RJ, Dimachkie MM. Toxic myopathies. *Neurol Clin*. 2014 August 01;32(3):647,70, viii.
87. Evans M, Rees A. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same? *Drug Saf*. 2002;25(9):649-63.
88. Brown MS, Faust JR, Goldstein JL, Kaneko I, EA. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem*. 1978 February 25;253(4):1121-8.
89. Chin DJ, Luskey KL, Anderson RG, Faust JR, Goldstein JL, Brown MS. Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 February 01;79(4):1185-9.
90. Liscum L, Luskey KL, Chin DJ, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and its mRNA in rat liver as studied with a monoclonal antibody and a cDNA probe. *J Biol Chem*. 1983 July 10;258(13):8450-5.
91. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, Rosen P, Rosen A, Doering KR, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum*. 2011 March 01;63(3):713-21.
92. Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA, Srinivasan J, Katz J, Amato AA. Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. *Muscle Nerve*. 2010 February 01;41(2):185-90.
93. Kanbay M, Turgut F, Covic A, Goldsmith D. Statin treatment for dyslipidemia in chronic kidney disease and renal transplantation: a review of the evidence. *J Nephrol*. 2009 October 01;22(5):598-609.
94. Baker SK, Tarnopolsky MA. Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspectives. *Clin Invest Med*. 2001 October 01;24(5):258-72.
95. Kagan T, Davis C, Lin L, Zakeri Z. Coenzyme Q10 can in some circumstances block apoptosis, and this effect is mediated through mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:31-47.

96. Chariot P, Abadia R, Agnus D, Danan C, Charpentier C, Gherardi RK. Simvastatin-induced rhabdomyolysis followed by a MELAS syndrome. *Am J Med.* 1993 January 01;94(1):109-10.
97. Morita I, Sato I, Ma L, Murota S. Enhancement of membrane fluidity in cholesterol-poor endothelial cells pre-treated with simvastatin. *Endothelium.* 1997;5(2):107-13.
98. Nakahara K, Yada T, Kuriyama M, Osame M. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and cell damage in L6 rat myoblasts by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 August 15;202(3):1579-85.
99. Dreier JP, Endres M. Statin-associated rhabdomyolysis triggered by grapefruit consumption. *Neurology.* 2004 February 24;62(4):670.
100. Mancini GB, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, Genest J, et al. Diagnosis, Prevention, and Management of Statin Adverse Effects and Intolerance: Canadian Consensus Working Group Update (2016). *Can J Cardiol.* 2016 July 01;32(7 Suppl):35.
101. Radcliffe KA, Campbell WW. Statin myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2008 January 01;8(1):66-72.
102. Vaklavas C, Chatzizisis YS, Ziakas A, Zamboulis C, Giannoglou GD. Molecular basis of statin-associated myopathy. *Atherosclerosis.* 2009 January 01;202(1):18-28.
103. Sonoda Y, Gotow T, Kuriyama M, Nakahara K, Arimura K, Osame M. Electrical myotonia of rabbit skeletal muscles by HMG-CoA reductase inhibitors. *Muscle Nerve.* 1994 August 01;17(8):891-7.
104. Gadbut AP, Caruso AP, Galper JB. Differential sensitivity of C2-C12 striated muscle cells to lovastatin and pravastatin. *J Mol Cell Cardiol.* 1995 October 01;27(10):2397-402.
105. Hochgraf E, Levy Y, Aviram M, Brook JG, Cogan U. Lovastatin decreases plasma and platelet cholesterol levels and normalizes elevated platelet fluidity and aggregation in hypercholesterolemic patients. *Metabolism.* 1994 January 01;43(1):11-7.
106. Levy Y, Leibowitz R, Aviram M, Brook JG, Cogan U. Reduction of plasma cholesterol by lovastatin normalizes erythrocyte membrane fluidity in patients with severe hypercholesterolaemia. *Br J Clin Pharmacol.* 1992 November 01;34(5):427-30.
107. Lijnen P, Celis H, Fagard R, Staessen J, Amery A. Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport systems. *J Hypertens.* 1994 January 01;12(1):59-64.
108. Stenzel W, Goebel HH, Aronica E. Review: immune-mediated necrotizing myopathies--a heterogeneous group of diseases with specific myopathological features. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012 December 01;38(7):632-46.
109. Naci H, Brughts J, Ades T. Comparative tolerability and harms of individual statins: a study-level network meta-analysis of 246 955 participants from 135 randomized, controlled trials. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2013 July 01;6(4):390-9.

110. Gougeon ML, Melki MT, Saidi H. HMGB1, an alarmin promoting HIV dissemination and latency in dendritic cells. *Cell Death Differ.* 2012 January 01;19(1):96-106.
111. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med.* 2012 August 27;209(9):1519-28.
112. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 June 29;107(26):11942-7.
113. Tang D, Billiar TR, Lotze MT. A Janus tale of two active high mobility group box 1 (HMGB1) redox states. *Mol Med.* 2012 December 20;18:1360-2.
114. Deng M, Tang Y, Li W, Wang X, Zhang R, Zhang X, et al. The Endotoxin Delivery Protein HMGB1 Mediates Caspase-11-Dependent Lethality in Sepsis. *Immunity.* 2018 October 16;49(4):740,753.e7.
115. Li W, Deng M, Loughran PA, Yang M, Lin M, Yang C, et al. LPS Induces Active HMGB1 Release From Hepatocytes Into Exosomes Through the Coordinated Activities of TLR4 and Caspase-11/GSDMD Signaling. *Front Immunol.* 2020 April 03;11:229.
116. Andreeva L, Hiller B, Kostrewa D, Lassig C, de Oliveira Mann, C C, Jan Drexler D, et al. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. *Nature.* 2017 September 21;549(7672):394-8.
117. Porat A, Giat E, Kowal C, He M, Son M, Latz E, et al. DNA-Mediated Interferon Signature Induction by SLE Serum Occurs in Monocytes Through Two Pathways: A Mechanism to Inhibit Both Pathways. *Front Immunol.* 2018 December 11;9:2824.
118. Sun Q, Loughran P, Shapiro R, Shrivastava IH, Antoine DJ, Li T, et al. Redox-dependent regulation of hepatocyte absent in melanoma 2 inflammasome activation in sterile liver injury in mice. *Hepatology.* 2017 January 01;65(1):253-68.
119. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007 May 01;8(5):487-96.
120. Andersson U, Yang H, Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2018 March 01;22(3):263-77.
121. Andersson U, Yang H, Harris H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Semin Immunol.* 2018 August 01;38:40-8.
122. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, Yang H, et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum.* 2003 July 01;48(7):2052-8.

123. Yuan H, Jin X, Sun J, Li F, Feng Q, Zhang C, et al. Protective effect of HMGB1 a box on organ injury of acute pancreatitis in mice. *Pancreas*. 2009 March 01;38(2):143-8.
124. Ferrara M, Chialli G, Ferreira LM, Ruggieri E, Careccia G, Preti A, et al. Oxidation of HMGB1 Is a Dynamically Regulated Process in Physiological and Pathological Conditions. *Front Immunol*. 2020 June 24;11:1122.
125. Zandarashvili L, Sahu D, Lee K, Lee YS, Singh P, Rajarathnam K, et al. Real-time kinetics of high-mobility group box 1 (HMGB1) oxidation in extracellular fluids studied by in situ protein NMR spectroscopy. *J Biol Chem*. 2013 April 26;288(17):11621-7.
126. Campana L, Santarella F, Esposito A, Maugeri N, Rigamonti E, Monno A, et al. Leukocyte HMGB1 is required for vessel remodeling in regenerating muscles. *J Immunol*. 2014 June 01;192(11):5257-64.
127. De Mori R, Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, Pompilio G, Palumbo R, et al. Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 November 01;27(11):2377-83.
128. Dormoy-Raclet V, Cammas A, Celona B, Lian XJ, van der Giessen K, Zivojnovic M, et al. HuR and miR-1192 regulate myogenesis by modulating the translation of HMGB1 mRNA. *Nat Commun*. 2013;4:2388.
129. Tirone M, Tran NL, Ceriotti C, Gorzanelli A, Canepari M, Bottinelli R, et al. High mobility group box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR4. *J Exp Med*. 2018 January 02;215(1):303-18.
130. Reeves R. Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*. 2010;1799(1):3-14.
131. Stros M, Launholt D, Grasser KD. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2007 October 01;64(19-20):2590-606.
132. Malarkey CS, Churchill ME. The high mobility group box: the ultimate utility player of a cell. *Trends Biochem Sci*. 2012 December 01;37(12):553-62.
133. Yang H, Wang H, Ju Z, Ragab AA, Lundback P, Long W, et al. MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling. *J Exp Med*. 2015 January 12;212(1):5-14.
134. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis*. 2015 May 01;15(5):581-614.
135. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 February 23;315(8):801-10.
136. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999 July 09;285(5425):248-51.

137. Aneja RK, Tsung A, Sjodin H, Geftter JV, Delude RL, Billiar TR, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. *J Leukoc Biol.* 2008 November 01;84(5):1326-34.
138. Robert SM, Sjodin H, Fink MP, Aneja RK. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipoteichoic acid (LTA) tolerance. *J Immunother.* 2010 September 01;33(7):663-71.
139. Xu J, Jiang Y, Wang J, Shi X, Liu Q, Liu Z, et al. Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. *Cell Death Differ.* 2014 August 01;21(8):1229-39.
140. Gregoire M, Tadie JM, Uhel F, Gacouin A, Piau C, Bone N, et al. Frontline Science: HMGB1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock. *J Leukoc Biol.* 2017 June 01;101(6):1281-7.
141. Patel VS, Sitapara RA, Gore A, Phan B, Sharma L, Sampat V, et al. High Mobility Group Box-1 mediates hyperoxia-induced impairment of *Pseudomonas aeruginosa* clearance and inflammatory lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 March 01;48(3):280-7.
142. Wild CA, Bergmann C, Fritz G, Schuler P, Hoffmann TK, Lotfi R, et al. HMGB1 conveys immunosuppressive characteristics on regulatory and conventional T cells. *Int Immunol.* 2012 August 01;24(8):485-94.
143. Ling Y, Yang ZY, Yin T, Li L, Yuan WW, Wu HS, et al. Heparin changes the conformation of high-mobility group protein 1 and decreases its affinity toward receptor for advanced glycation endproducts in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2011 February 01;11(2):187-93.
144. Liu R, Mori S, Wake H, Zhang J, Liu K, Izushi Y, et al. Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding. *Acta Med Okayama.* 2009 August 01;63(4):203-11.
145. Cseri J, Szappanos H, Szigeti GP, Csernatony Z, Kovacs L, Csernoch L. A purinergic signal transduction pathway in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Pflugers Arch.* 2002 March 01;443(5-6):731-8.
146. Kistamas K, Ruzsnavszky O, Telek A, Kosztka L, Kovacs I, Dienes B, et al. Expression of anti-Mullerian hormone receptor on the appendix testis in connection with urological disorders. *Asian J Androl.* 2013 May 01;15(3):400-3.
147. Vincze M, Danko K. Idiopathic inflammatory myopathies. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2012 February 01;26(1):25-45.
148. Salomonsson S, Grundtman C, Zhang SJ, Lanner JT, Li C, Katz A, et al. Upregulation of MHC class I in transgenic mice results in reduced force-generating capacity in slow-twitch muscle. *Muscle Nerve.* 2009 May 01;39(5):674-82.
149. Ulfgren AK, Grundtman C, Borg K, Alexanderson H, Andersson U, Harris HE, et al. Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility

- group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids. *Arthritis Rheum.* 2004 May 01;50(5):1586-94.
150. Stenzel W, Goebel H-, Aronica E. Review: Immune-mediated necrotizing myopathies - a heterogeneous group of diseases with specific myopathological features. *Neuropathology and applied neurobiology.* 2012 Dec;38(7):632-46.
151. Nag AC, Foster JD. Myogenesis in adult mammalian skeletal muscle in vitro. *J Anat.* 1981 January 01;132(Pt 1):1-18.
152. Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dalla Libera L, et al. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 November 02;216(1):49-53.
153. Dort J, Fabre P, Molina T, Dumont NA. Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. *Stem Cells Int.* 2019 July 14;2019:4761427.
154. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003 December 08;163(5):1133-43.
155. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 May 01;298(5):1173.
156. Wosczyzna MN, Rando TA. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev Cell.* 2018 July 16;46(2):135-43.
157. Carson JA, Baltgalvis KA. Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. *Exerc Sport Sci Rev.* 2010 October 01;38(4):168-76.
158. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardi M, Munoz-Canoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 2008 January 01;7(1):33-44.
159. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013 January 01;93(1):23-67.
160. Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve.* 1999 June 01;22(6):724-32.
161. Pillon NJ, Bilan PJ, Fink LN, Klip A. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 March 01;304(5):453.
162. Wang X, Wu H, Zhang Z, Liu S, Yang J, Chen X, et al. Effects of interleukin-6, leukemia inhibitory factor, and ciliary neurotrophic factor on the proliferation and

differentiation of adult human myoblasts. *Cell Mol Neurobiol*. 2008 January 01;28(1):113-24.

163. Walsh RJ, Amato AA. Toxic myopathies. *Neurol Clin*. 2005 May 01;23(2):397-428.

164. Fu H, Alabdullah M, Grossmann J, Spieler F, Abdosh R, Lutz V, et al. The differential statin effect on cytokine production of monocytes or macrophages is mediated by differential geranylgeranylation-dependent Rac1 activation. *Cell Death Dis*. 2019 November 21;10(12):880-9.

165. Loppnow H, Zhang L, Buerke M, Lautenschlager M, Chen L, Frister A, et al. Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J Cell Mol Med*. 2011 April 01;15(4):994-1004.

166. Fuzi M, Palicz Z, Vincze J, Cseri J, Szombathy Z, Kovacs I, et al. Fluvastatin-induced alterations of skeletal muscle function in hypercholesterolaemic rats. *J Muscle Res Cell Motil*. 2012 March 01;32(6):391-401.

167. Vincze J, Jenes A, Fuzi M, Almassy J, Nemeth R, Szigeti G, et al. Effects of fluvastatin and coenzyme Q10 on skeletal muscle in normo- and hypercholesterolaemic rats. *J Muscle Res Cell Motil*. 2015 June 01;36(3):263-74.

168. Grunwald SA, Popp O, Haafke S, Jedraszczak N, Grieben U, Saar K, et al. Statin-induced myopathic changes in primary human muscle cells and reversal by a prostaglandin F2 alpha analogue. *Sci Rep*. 2020 February 07;10(1):2158-2.

169. Ghosh SS, Ghosh S. HMGB1 (High-Mobility Group Box-1): A Common Link Determining the Consequences of Tissue Injury, Sterile/Microbial and Low-Grade Chronic Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 November 01;40(11):2561-3.

170. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*. 2000 August 21;192(4):565-70.

171. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 January 31;8(4):195-202.

172. Grundtman C, Bruton J, Yamada T, Ostberg T, Pisetsky DS, Harris HE, et al. Effects of HMGB1 on in vitro responses of isolated muscle fibers and functional aspects in skeletal muscles of idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J*. 2010 February 01;24(2):570-8.

## Kulcsszavak

izomregeneráció, izomgyulladás, makrofágok, sztatinok, HMGB1, izomfájdalom, kokultúra, interleukin-6, koleszterin

## Keywords

muscle regeneration, muscle inflammation, macrophages, statins, HMGB1, myopathy, coculture, IL-6, cholesterol

## Függelék



Nyilvántartási szám: DEENK/6/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Cseri Karolina

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10055321

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Cseri, K.**, Szentesi, P., Csernoch, L.: IL-6 production of C2C12 cells is enhanced in the presence of macrophages and pravastatin.  
*Gen. Physiol. Biophys.* 40 (4), 307-315, 2021.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.4149/gpb\\_2021017](http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2021017)  
IF: 1.512 (2020)
2. **Cseri, K.**, Vincze, J., Cseri, J., Fodor, J., Csernátóny, Z., Csernoch, L., Dankó, K.: HMGB1 expression and muscle regeneration in idiopathic inflammatory myopathies and degenerative joint diseases.  
*J. Muscle Res. Cell Motil.* 36 (3), 255-262, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-015-9411-7>  
IF: 2.071

### További közlemények

3. Csóka, B., Törő, G., Vindeirinho, J., Varga, Z. V., Koscsó, B., Németh, Z. H., Kókai, E., Antonioli, L., Suleiman, M., Marchetti, P., **Cseri, K.**, Deák, Á., Virág, L., Pacher, P., Bai, P., Haskó, G.: A2A adenosine receptors control pancreatic dysfunction in high-fat-diet induced obesity.  
*Faseb J.* 31 (11), 4985-4997, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201700398R>  
IF: 5.595
4. Pellegrini, C., Fornai, M., Colucci, R., Tirota, E., Blandini, F., Levandis, G., Cerri, S., Segnani, C., Ippolito, C., Bernardini, N., **Cseri, K.**, Blandizzi, C., Haskó, G., Antonioli, L.: Alteration of colonic excitatory tachykininergic motility and enteric inflammation following dopaminergic nigrostriatal neurodegeneration.  
*J Neuroinflammation.* 13 (1), 146-159, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0608-5>  
IF: 5.102





5. Csóka, B., Németh, Z. H., Törő, G., Idzko, M., Zech, A., Koscsó, B., Spolarics, Z., Antonioli, L., **Cseri, K.**, Erdélyi, K., Pacher, P., Haskó, G.: Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. *Faseb J.* 29 (9), 3626-3637, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.15-272450>  
IF: 5.299
6. Töröcsik, D., Kovács, D., Camera, E., Lovászi, M., **Cseri, K.**, Nagy, G. G., Molinaro, R., Rühl, R., Tax, G., Szabó, K., Picardo, M., Kemény, L., Zouboulis, C. C., Remenyik, É.: Leptin promotes proinflammatory lipid profile and induces inflammatory pathways in human SZ95 sebocytes. *Br. J. Dermatol.* 171 (6), 1326-35, 2014.  
IF: 4.275
7. Griger, Z., Nagy-Vincze, M., Bodoki, L., **Cseri, K.**, Hortobágyi, T., Dankó, K.: Nekrotizáló autoimmun myopathia esete. *Metabolizmus.* 11 (5), 379-382, 2013.
8. Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Griger, Z., Csonka, T., **Cseri, K.**, Hortobágyi, T., Dankó, K.: Rituximabkezelés idiopathiás inflammatorikus myopathiákban. *LAM.* 23 (1), 16-21, 2013.
9. Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Hortobágyi, T., Griger, Z., **Cseri, K.**, Szöllősi, L., Dankó, K.: Nekrotizáló autoimmun myopathia. *Orv. Hetil.* 153 (38), 1502-1507, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2012.29450>

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,854**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
3,583**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.01.05.

