


A magasvérnyomás-betegség gyógyszeres kezelése hatékonyságának értékelése perifériás vérből izolált fagocitasejtek kemilumineszcenciájának mérésével

Sipka Sándor dr.¹  ■ Nagy Andrea¹ ■ Baráth Sándor dr.²
Szöllősi Attila Gábor dr.³ ■ Bácsi Attila dr.³
Kovács Judit dr.⁴ ■ Sipka Sándor Jr. dr.⁵

¹Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Immunológiai Tanszék, Debrecen

²Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Intézet, Debrecen

³Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Immunológiai Intézet, Debrecen

⁴Debrecen Városi Egészségügyi Szolgálat, Debrecen

⁵Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kardiológiai Tanszék, Kardiológiai Intézet, Debrecen

Bevezetés: A nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH)-oxidáz enzim szuperoxid-anionokat termel, amelyekből kemilumineszcenciát okozó fotonok képződnek luminoltartalmú közegben. A szuperoxid-molekulák a reaktívoxigén-származékok (ROS) családjába tartoznak, és fontos szerepet játszanak a magas vérnyomás (hypertonia) kialakításában. A magas vérnyomást csökkentő gyógyszerek kettős hatásúak: a) hatnak speciális, vérnyomást csökkentő célpontokon, b) gátolják a ROS-molekulák képződését.

Célkitűzés: Vizsgálni kívántuk a gyógyszeres kezelés hatékonyságát 20, gyógyszerrel jól beállított magas vérnyomásos beteg, továbbá 20 nem beteg kontrollszemély perifériás vére fagocitasejtjeinek kemilumineszcencia-mérési értékei alapján, továbbá a „szuperoxid-” és a „ferri-peroxid komplex” eredetű kemilumineszcencia egymásra hatását.

Módszer: A kemilumineszcencia-mérések luminométerrel történtek, luminolos közegben. Az értékeket relatív lumineszcencia egység (RLU) formájában fejeztük ki, melyeknek két forrásuk volt: a) „szuperoxid-” molekulák, amelyek a zimozánrészcskék fagocitózisa során keletkeztek, b) „ferri-peroxid komplex” [$\text{Fe}^3\text{O}_2^{2-}$] molekulák, amelyek a citokróm c + H_2O_2 reakcióban képződtek. A zimozán opszonizációja minden személynél, egységesen, 10% magzati borjúszerűmot tartalmazó közegben történt.

Eredmények: A két különböző eredetű kemilumineszcencia-érték additív hatást mutatott a 40 donornál. A beteg és a nem beteg csoport kemilumineszcencia-értékei között nem volt szignifikáns különbség, bár a ROS-értékek a betegek csoportjában enyhén kisebbnek bizonyultak. A fő eredmény az volt, hogy a fagociták kemilumineszcencia-képzése a gyógyszerrel kezelt betegekben nem különbözött szignifikánsan a kontrollszemélyekétől, tükrözve aktuális jó klinikai állapotukat.

Következtetés: A ROS-képzésen alapuló fagocitakemilumineszcencia-mérés eredményei igazolták és megerősítették a gyógyszeres kezelés hatékonyságát a magas vérnyomásos betegeknél. Emellett a „ferri-peroxid komplex” molekulákban olyan új, eddig nem értékelt ROS-okat ismertünk fel, amelyek kismértékben bár, de hozzájárulhatnak a hipertonia kialakításához. A kemilumineszcencia-mérések kiegészítő jellegűek a hagyományos, eszközös vizsgálatok mellett, de alkalmasak a finomabb változások kimutatására is.

Orv Hetil. 2025; 166(35): 1383–1390.

Kulcsszavak: kemilumineszcencia, citokróm c, hidrogén-peroxid, emberi fagociták, hipertonia, ROS-molekulák

Chemiluminescence measurements on phagocytes isolated from peripheral human blood to evaluate the efficacy of drug therapy in patients with hypertension

Introduction: The increased activity of nicotinamid adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, which produces superoxide anions causing photon emission (chemiluminescence) in luminol milieu is a crucial factor in the pathogenesis of hypertension. Many antihypertension drugs have dual effects: a) acting on special targets to reduce hypertension, b) blocking of production of reactive oxygen species (ROS).

Objective: To test the efficacy of antihypertension therapy, two types of chemiluminescence measurements were performed on peripheral phagocytes from 20-20 donors with and without hypertension. In all patients, the blood pressure was in a well-controlled range. Furthermore, to analyze the interaction of “superoxide” anions and “ferryl peroxide complex” on the chemiluminescence values in peripheral phagocytes.

Method: A luminometer was used to measure chemiluminescence in luminol milieu (expressed in relative luminescence units, RLU) originated from a) superoxide molecules during zymosan phagocytosis, b) $[\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^{2-}]$ “ferryl peroxide complexes” from cytochrome c + H_2O_2 reaction. For the uniform opsonization of zymosan, 10% fetal calf serum milieu was used for each donor.

Results: The two chemiluminescence values showed additive effects, but no significant differences were found between the two groups. However, the RLU values of both types of ROS molecules were slightly lower in the hypertensive patients. The chemiluminescence producing capability of phagocytes from drug-treated patients did not differ significantly from that of controls, it reflected the actual good clinical states.

Conclusion: The measurements of phagocytic chemiluminescence verified and confirmed the efficacy of anti-hypertension therapy due ROS production, too. The molecules of “ferryl peroxide complex” are newly recognized weak but active components of ROS molecules which may also play some roles in hypertension. The chemiluminescence measurements can complete the results of traditional instrumental measurements. However, they are able to detect even slighter alterations, too.

Keywords: chemiluminescence, cytochrome c, hydrogen peroxide, human phagocytes, hypertension, ROS molecules

Sipka S, Nagy A, Baráth S, Szöllösi AG, Bácsi A, Kovács J, Sipka S. Jr. [Chemiluminescence measurements on phagocytes isolated from peripheral human blood to evaluate the efficacy of drug therapy in patients with hypertension]. *Orv Hetil.* 2025; 166(35): 1383–1390.

(Beérkezett: 2025. június 10.; elfogadva: 2025. július 9.)

Rövidítések

ACEi = (angiotensin-converting enzyme inhibitors) angiotenzinkonvertálóenzim-gátlók; ARB = (angiotensin II receptor blockers) angiotenzin-II-receptor-gátlók; BMI = (body mass index) testtömegindex; Ca-PBS = foszfátpufferes fiziológiás sóoldat + 10^{-6} M CaCl_2 ; CKC = citokróm c; G/l = giga/liter, 10^9 /liter; M = mol/l; NADPH = (nicotinamid adenine dinucleotide phosphate) nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát; PBS = foszfátpufferes fiziológiás sóoldat; PMA = (phorbol-myristate-acetate) forbol-mirisztát-acetát; RLU = (relative luminescence unit) relatív lumineszcencia egység; ROS = (reactive oxygen species) reaktívoxigén-származékok; rpm = (revolutions/minute) fordulat/perc

A magasvérnyomás-betegség kialakulásában a következő tényezők a fő szereplők: a) renin–angiotenzin rendszer, amely a vese által végzi a folyadékterefogat szabályozását a szervezetben, b) érrendszer-állapot, c) központi idegrendszer, d) aldosteron, e) reaktívoxigén-származékok (ROS), f) gyulladásos és immunreakciók, g) só- és nátriumfelvétel [1]. Az összekapcsolódott „renin–angiotenzin–aldosteron–ROS” hálózat rugalmasan és dinamikus szabályozza a vérnyomást normális körülmények között. Kóros működésük egyik következménye a *hypertonia* betegség, a magas vérnyomás. Központi molekulája az angiotenzin-II, amely közvetlenül az erek simaizmainak összehúzódását okozza, továbbá fokozza az aldosterontermelést a mellékvese kéregsejtjeiben [2]. Az aldosteron szabályozza a test folyadék- és elektrolit-háztartását, szintjének emelkedése magas vérnyomást, szív-, érrendszeri és anyagcsere-megbetegedéseket okoz

[3, 4]. Továbbá nemcsak a károsodott nephronokban [5], hanem az endotheliumsejtben [6] is serkenti a ROS-molekulák képződését, ami „oxidatív stressz” állapotot idéz elő. Az angiotenzin-II közvetlenül aktiválja a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH)-oxidáz enzimet, amely szuperoxidot képez a simaizomsejtben [7], és megnöveli a vazomotoronust [8]. Emellett magas vérnyomásban a fagocitasejtek fagolizozómaiban is fokozott a szuperoxidgyökök képződése [9]. Ugyanakkor a mitokondriumok is folyamatosan fenntartják a fotonemissziót, a kemilumineszcenciát okozó szuperoxid-molekulák termelését [10]. A szuperoxid-dizmutáz enzim pedig H_2O_2 -molekulákat képez mindkét forrás szuperoxid-anionjaival. Ezek azonban a citokróm c (CKC) enzimmel további reakcióba léphetnek a mitokondriumokban [11], így a fagolizozómákban és a mitokondriumokban keletkező ROS-molekulák hathatnak egymásra. Ez a két jelenség még nem pontosan feltárt terület [12], ezért ebben a munkában próbáltuk megközelíteni ezt a helyzetet.

A kemilumineszcencia fogalma foton (fény) -kibocsátást jelent valamilyen sejtéből, amit kémiai reakció hoz létre. Az aktivált fagocita granulocytákból, monocytákból és alveolaris vagy peritonealis makrofágokban képződő, szuperoxidképzésen alapuló kemilumineszcencia-mérése diagnosztikai gyakorlattá vált [13]. A jelenség felismerése *Robert Allen és mtsai* érdeme [14, 15]. A mikrobákkal aktivált fagociták vizsgálata mellett [16] a gyakorlatban a *Saccharomyces cerevisiae* két származéka: a mannozim [17] és a zimozán [18] terjedt el a fagociták NADPH-oxidáz enzimének aktiválására és a keletke-

zett szuperoxidgyökökből származó kemilumineszcencia képzésére luminoltartalmú közegben [14]. A luminol főleg szuperoxid-anion által oxidálódik és okoz fényki-bocsátást [19].

A CKC és a H_2O_2 folyamatosan képződik a mitokondriumokban [10]. Egymás közti reakciójukból „ferri-peroxid” [$Fe^{3+}O_2^{2-}$] ROS-molekulák jöhetnek létre, amelyek fotonokat bocsátanak ki, és így kemilumineszcenciát képeznek sejtektől függetlenül is [20, 21]; ennek kimutatása – saját megfigyeléseink szerint – létrejöhet luminol nélkül is. Ugyanakkor a „ferri-peroxid komplex” nagyon erősen oxidálja a luminolt, és az így keletkező foton-emisszió növekedése elérheti a két nagyságrendet is (nem közölt adataink). Vizsgálatunk egyik célja lett ezeknek a molekuláknak a tanulmányozása a szuperoxid-anionokkal történő összefüggésben, fagocitasejteknél, luminoltartalmú közegben.

Korábban kimutattuk, hogy több, magas vérnyomás elleni szer gátolta a zimoján-fagocitózis során keletkezett kemilumineszcenciát *in vitro* [22]. Mostani munkánkban három kérdést kívántunk megválaszolni: 1) Van-e különbség a hatékonyan kezelt magas vérnyomásos betegek fagocitáinak kemilumineszcencia-értékei és a nem beteg személyek értékei között? 2) Miként hat egymásra a mitokondriumokban keletkező „ferri-peroxid komplexből”, továbbá a fagolizoszómákban képződő szuperoxid-molekulákból származó kemilumineszcencia? 3) Hogyan hat a hipertónia elleni gyógyszeres kezelés a „szuperoxid-” és a „ferri-peroxid komplex” molekulákból származó kemilumineszcencia képződésére a fagocitákban?

Donorok, anyagok és módszerek

Donorok

A 40 donor két csoportban vett részt a kísérletben: a) 20 fő (9 nő, 11 férfi) különböző súlyosságú, 1–3. fokozatú, de gyógyszerrel „jól karbantartott” magas vérnyomással; b) 20 fő (12 nő, 8 férfi) hipertónia nélkül. A betegek csoportjában 17 fő volt idősebb 60 évnél, a másikban csak 2. A testtömegindex- (body mass index – BMI) értékeket is mértük. A betegek eredményes kezelését és vizsgálati kiválasztását dr. Kovács Judit debreceni családorvos végezte. A betegek vérnyomásértékeit, klinikai állapotát ő tartotta számon évek óta, ő javasolta a részvételüket. A betegek pedig elfogadták, hogy vérnyomásbetegségük „jól karbantartott”. A kontrollszemélyek többsége egészségügyi dolgozó volt, akik önként jelentkeztek, nem volt vérnyomásbetegségük. Az általunk végzett laboratóriumi vizsgálatokhoz minden személytől két cső alvadásgátolt vér levételére került sor.

Etikai engedély: A Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatás-Értékelési Bizottsága engedélyezte a vizsgálatok elvégzését a beadott dokumentumok alapján. A protokoll azonosítója: DE RKEB/IKEB: 6707A-2023.

Beleegyező nyilatkozat: Minden donor, előzetes felvilágosítás után, aláírásával igazolta részvételi szándékát a vizsgálatban.

A munka során végig érvényesültek a Helsinki Nyilatkozat irányelvei.

Anyagok

A CKC (lószióból), a H_2O_2 , a zimoján (*S. cerevisiae* sejt-fal kivonat), a luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazadion), továbbá a magzati borjúsérum mind a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől származott. A PBS (foszfátpufferes fiziológiás sóoldat) és a Ca-PBS (foszfátpufferes fiziológiás sóoldat + 10^{-6} M $CaCl_2$) házilag készült.

A kemilumineszcencia mérése négy különböző rendszerben

A sejtek preparálása donoronként 1 db 8 ml-es, heparinos (zöld kupakos) vérvételi cső vérenek 3000 rpm/10 perc időtartamú centrifugálásával kezdődött mind a négy vizsgálati formában. Az eltávolított plazmarész helyére 8 ml-re kiegészítő 3,5–4 ml PBS hozzáadása történt. Minden vizsgálati rendszerben ebből a szuszpenzióból került sor 0,3 ml bemérésére minden csőbe. Ezután minden mintához 0,2 ml magzati borjúsérum hozzáadása történt a zimojánrészecskék azonos mértékű opszonizációjának biztosítására, ami 10%-os végkoncentrációt eredményezett. Közös volt még a négy rendszerben, hogy az általános puffer a Ca-PBS volt, mivel a Ca^{2+} kellett a fagocitózishoz, továbbá minden mérés 5×10^{-6} M végkoncentrációjú, luminoltartalmú közegben, 2 ml végtérfogatban történt. Egyidejűleg négy rendszer összeállítására került sor: I.: Sejtek; II.: Sejtek + zimoján; III.: Sejtek + CKC + H_2O_2 ; IV.: Sejtek + CKC + H_2O_2 + zimoján. A 300 $\mu g/ml$ töménységű zimoján törzsolatból 0,1 ml-t használtunk, míg 3×10^{-5} M CKC és 3×10^{-2} M H_2O_2 végkoncentrációt állítottunk be 0,2-0,2 ml térfogatok bemérésével. A reagensbemérések sorrendje a következő volt a IV-es (legbonyolultabb) rendszerben: sejtek, borjúsérum, CKC, zimoján, H_2O_2 , végül luminol.

A keletkezett kemilumineszcencia mérése Berthold AutoLumat Plus BL 953 (Berthold, Bad Wildbad, Németország) típusú luminométerben történt (spektrumszélesség: 380–630 nm). A kemilumineszcencia-értékeket RLU (relatív lumineszcencia egység) formájában, számszerűen értékeltük. A mérési idő minden esetben 60 perc volt szobahőn. Az 5 percenként ismételt mérések összegét értékeltük a sejtsuszpenziók fagocita-(neutrofil-monocyta) száma alapján 1 G/l sejtszámra vonatkoztatva. A sejtszám-meghatározás hematológiai automata készüléken történt a második cső alvadásgátolt vérből a Laboratóriumi Medicina Intézetben.

A donorok közül több személy perifériás fagocitasejtjeit korábban már vizsgálták, például „PMA + Ca-ionofor” által indukált kemilumineszcencia-mérésekben, mutatva a módszer használhatóságát más, fagocitaaktiváló anyagok esetében is [21].

Statisztikai számítások

Az adatok normáloszlásának vizsgálata a Shapiro–Wilk-módszerrel történt. A Friedman- és a Dunn-féle post-hoc tesztet alkalmaztuk a CKC + H₂O₂, továbbá a zimozán által kiváltott kemilumineszcencia-értékek összehasonlításakor. Az életkor és a BMI RLU-értékeinek összehasonlítására a Mann–Whitney-módszert használtuk. A korrelációs számítás a Spearman-féle r (ró)-érték meghatározásával történt. A p < 0,05 értékeket tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 9.1.2 szoftver (Boston, MA, USA) felhasználásával végeztük.

Eredmények

Az összesített kemilumineszcencia-eredmények

Az 1. táblázat tartalmazza a 40 donor kemilumineszcencia-értékeit összesített formában: „Sejtek” (I.): 89,66; „Sejtek + zimozán” (II.): 3661,83; „Sejtek + CKC +

1. táblázat | Az összes beteg kemilumineszcencia-értéke (n = 40)

Magas vérnyomás	Év	Nem (F/N)	BMI	Sejt (RLU) I.	Sejt + zimozán (RLU) II.	Sejt + CKC + H ₂ O ₂ (RLU) III.	Sejt + CKC + H ₂ O ₂ + zimozán (RLU) IV.
-	27	N	26,6	54,3	3 498,7	76,3	6 515,4
-	28	N	20,7	69,8	1 873,3	90,8	2 660,3
-	30	F	22,1	60,7	669,2	73,8	968,9
-	31	N	23,4	88,1	522,6	95,3	816,3
-	35	N	20,2	122,5	4 062,5	132,0	4 533,4
-	37	N	27,1	78,3	1 061,5	121,1	1 671,9
-	39	N	20,2	179,6	829,0	183,1	1 134,0
-	41	F	25	107,0	912,7	168,7	1 619,2
-	43	F	26,8	131,7	1 440,7	150,2	2 125,0
-	45	N	25,3	128,4	1 568,8	135,0	1 647,1
-	46	N	24,6	51,3	10 383,0	68,9	13 584,1
-	48	N	21,6	161,0	15 112,0	177,0	14 553,5
-	48	F	24,2	50,8	4 889,3	66,5	6 777,3
-	51	N	40,3	61,6	5 861,0	74,4	6 268,3
-	51	N	24,6	55,1	7 596,3	100,1	7 976,8
-	54	N	20,6	79,45	7 509,3	60,1	8 805,4
-	55	N	22,1	89,6	735,6	92,2	1 575,1
-	58	F	27,7	103,7	7 379,4	263,9	8 420,0
-	67	F	23,3	70,8	615,5	82,2	900,6
-	81	F	21,9	41,4	502,4	49,5	603,0
+	68	N	32,8	214,6	3 763,1	213,6	4 330,1
+	70	F	39,2	101,1	3 063,4	109,2	3 788,6
+	70	N	27,2	85,7	4 438,8	75,5	4 725,3
+	73	F	27,5	71,1	597,8	87,4	1 088,5
+	75	N	27,7	84,5	11 111,8	86,8	11 761,5
+	75	F	33,9	180,6	2 912,8	182,7	2 862,8
+	75	N	27,7	113,9	642,5	117,3	821,7
+	76	N	24,6	89,8	1 269,0	99,6	1 674,6
+	76	N	25,8	64,7	1 027,2	67,2	1 226,6
+	77	F	33,4	164,0	2 646,0	162,0	2 542,5
+	78	N	27,1	53,7	7 420,7	56,8	8 843,6
+	78	F	22,2	55,1	4 808,7	61,5	6 828,0
+	78	F	25,6	40,6	472,7	63,5	677,5
+	79	F	21,8	56,5	6 656,3	50,4	6 683,1
+	79	F	30,8	84,1	956,4	88,1	1 325,0
+	79	N	29,7	63,2	167,9	68,6	266,1
+	80	F	25,9	68,1	1 248,5	77,2	2 184,6
+	46	N	23,6	61,4	326,5	86,2	743,2
+	55	F	43,0	67,7	6 024,4	78,4	5 679,3
+	51	F	37,3	80,8	9 895,7	101,6	10 974,2
Átlag				89,66	3 661,83	104,88	4 304,57
± 2 SD				41,78	3 627,35	48,77	3 876,64

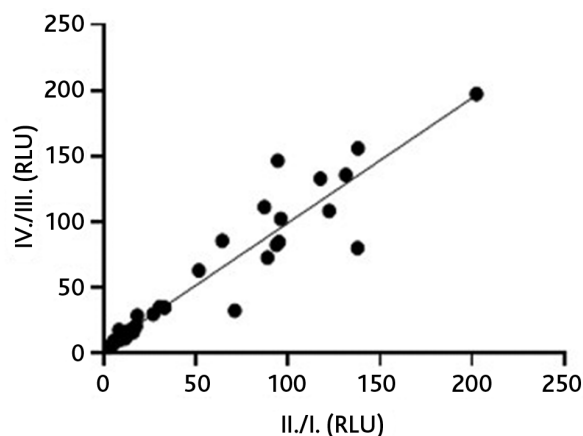
N = nő, F = férfi

BMI = testtömegindex; RLU = relatív lumineszcencia egység; SD = standard deviáció

H₂O₂” (III.): 104,88; „Sejtek + CKC + H₂O₂ + zimo-
zán” (IV.): 4304,57. A CKC + H₂O₂ molekulák jelenlé-
te mind a „Sejtek”, mind a „Sejtek + zimo-
zán” rendszer-
ben kismértékű, de nem szignifikáns emelkedést hozott
a kemilumineszcencia-értékekben.

*Korreláció a „Sejtek + zimo-
zán/Sejtek” és
a „Sejtek + CKC + H₂O₂ + zimo-
zán”/„Sejtek +
CKC + H₂O₂” rendszer kemilumineszcencia-
értékei között*

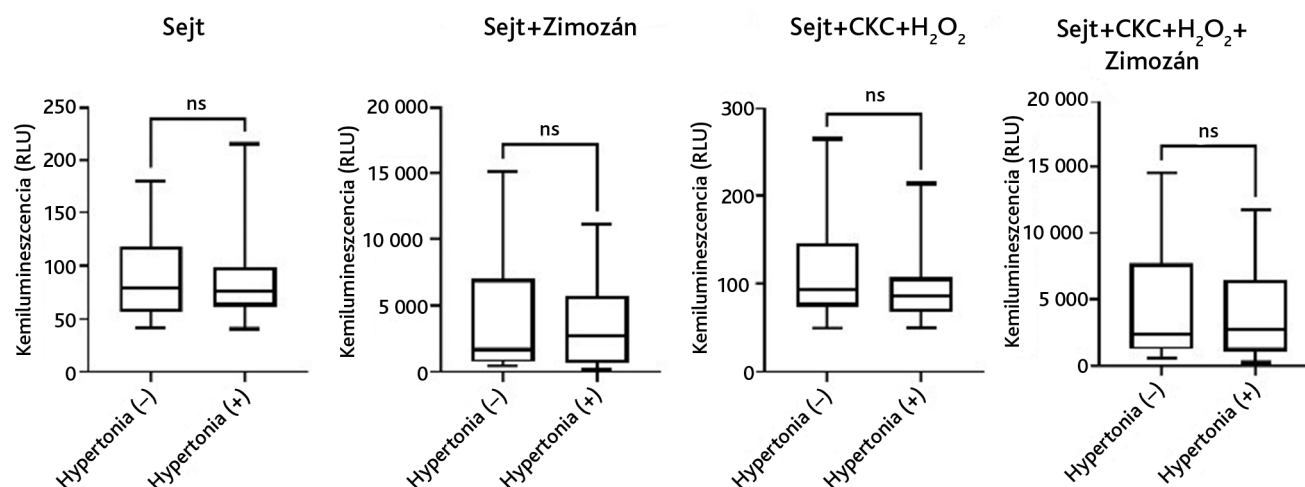
Kísérleti rendszerünkben a „Sejtek + CKC + H₂O₂” re-
akcióban a „ferri-peroxid komplex” molekulák részben
már a sejteken kívül létrejöhetnek, valamint az ugyancsak
sejten belülről kerülő CKC- és H₂O₂-molekulákkal
együtt, a mitokondriumok hasonló molekuláihoz társul-
va, kemilumineszcenciát képző további „ferri-peroxid
komplex” molekulák képződését eredményezhetik. Ez-
zel szemben a zimo-
zánrészecskek bekebelezése során a
szuperoxidgyökök a fagocitasejtek fagolizozómáiban
képződnek, de belőlük a szuperoxid-dizmutáz enzim
gyorsan hidrogén-peroxidot hoz létre, amely azonban
tovább reagálhat a CKC-molekulákkal a mitokondriu-
mokban, „ferri-peroxid komplexet” képezve. Kérdés,
hogy a mitokondriumokban és a fagolizozómákban egy
időben képződő, de más eredetű kemilumineszcencia-
típusok hatnak-e egymásra, és ha igen, akkor miként.
A számítások azt mutatják, hogy a két rendszer értékei
között nagyon szignifikáns korreláció van ($r = 0,948$,
 $p < 0,0001$). A két rendszerben a kemilumineszcencia-
képzés additív módon, de egymástól függetlenül zajlik a
fagocitákban. Két, egymástól eltérő típusú, de luminollal
amplifikálható reakció zajlik egy időben, de különböző
sejtkompartimentben, összeadott kemilumineszcencia-
értékekkel, miként azt az 1. ábra mutatja.



1. ábra | Korreláció a „Sejtek + zimo-
zán/Sejtek” (II. csoport/I. cso-
port) és a „Sejtek + CKC + H₂O₂ + zimo-
zán”/„Sejtek + CKC
+ H₂O₂” (IV. csoport/III. csoport) rendszer kemilumineszcen-
cia-értékei között
 $r = 0,948$, $p < 0,0001$, szignifikancia: nagyon erős, ****
RLU = relatív lumineszcencia egység

*A kezelt hypertoniás betegek és a nem beteg
kontrollszemélyek kemilumineszcencia-
értékeinek összehasonlítása*

A betegek ($n = 20$) és a kontrollok ($n = 20$) csoportjának
értékei között nem voltak szignifikáns különbségek. Ezt
a 2. ábra adatai mutatják: „Sejtek + zimo-
zán”: 3473 versus 3851; „Sejtek + CKC + H₂O₂”: 96,69 versus 113,10”;
továbbá „Sejtek + CKS + H₂O₂ + zimo-
zán”: 3951,00
versus 4658,00. A hypertoniás csoportban a kemilumi-
neszcencia-értékek kismértékben, de nem szignifikánsan
alacsonyabbak voltak. Náluk az életkor és a BMI is szig-
nifikánsan magasabb értéket mutatott. Az eredményeket
„boxplot” (dobozdiagram) formában mutatjuk be.



2. ábra | A kezelt hypertoniás betegek és a nem beteg kontrollszemélyek kemilumineszcencia-értékeinek összehasonlítása
RLU = relatív lumineszcencia egység

Megbeszélés

Ez az első megfigyelés egy olyan jelenségről, amelyben a fagocitózis során keletkező „szuperoxid-” molekulákból származó kemilumineszcencia értéke egyidejűleg került összehasonlításra – luminolos közegben – a sejtek egy másik részében keletkező, más típusú ROS-molekulákból származó, „ferri-peroxid komplex” jellegű fotonemisszióval, azaz kemilumineszcenciával, amelyet a luminol szintén felerősít. Összhatásuk additív.

Ennek van elméleti és gyakorlati jelentősége egyaránt. Rendszerünkben a CKC + H₂O₂ rendszer vizsgálata párhuzamosan történt a zimozánrészecskék fagocitózisával. Különbőség volt közöttük azonban, hogy míg a „ferri-peroxid-” molekulák, amelyek a CKC + H₂O₂ reakcióban képződtek, csak enyhe emelkedést okoztak a kemilumineszcencia-értékekben még luminol jelenlétében is, addig a zimozán jelentős fotonkibocsátást idézett elő a luminoltartalmú közegben. Ugyanakkor nagyon szignifikáns korreláció volt a két rendszerben mért kemilumineszcencia-értékek emelkedésének mértékében az egyes egyénekben. A „ferri-peroxid komplex” kismértékben, de additív módon emelte tovább a zimozánrészecskék fagocitózisa során képződött kemilumineszcencia-értékeket a vizsgált 40 személynél. Sem egymást serkentő, sem gátló hatás nem érvényesült. A sejtek mitokondrium- és fagolizoszóma-kompartimentjeiben képződött kemilumineszcencia egymástól függetlenül keletkezett és képzett arányosan összeadódó, végső fotonemissziós értékeket. Feltételezhető ugyanakkor, hogy a „ferri-peroxid komplex” molekulák egy része már létrejött sejten kívül, és diffúzióval bekerült a sejtekbe a mitokondriumokhoz, és társult az itt képződő hasonló molekulákhoz, míg a külső H₂O₂ bejuthatott a sejtekbe az akvaporin-receptorokon keresztül is [23], és a mitokondriumokban működő CKC-molekulákkal együtt képezhettek „ferri-peroxid komplexet”. A sejten *belüli* „ferri-peroxid komplex” képződését erősítik azok a mérési adatok, hogy a „ferri-peroxid komplex” RLU-értékei egyéni különbségeket mutatnak. Ha nem lenne sejten belüli, egyénileg különböző mértékű belső képződés, akkor mindenkinél ugyanazt az RLU-értéket kellene mérni, mivel a két alapvegyület külső koncentrációja azonos. Ugyanakkor az sem zárható ki, hogy a sejtekből CKC áramlik *kifelé*, ami megemeli a sejten kívüli CKC-szintet, és ez kemilumineszcenciát fokozó hatás lehet. Biztosan az állítható, hogy a *fagocitasejtekhez köthető*, „ferri-peroxid komplex” típusú, kis mennyiségű kemilumineszcencia-növekedés történik a kísérleti rendszerekben a CKC + H₂O₂ hozzáadás után, és ez elkülönül a fagolizoszómákban képződött fotonoktól a luminoltartalmú közegben. Feltételezzük, hogy a két erős kémiai reakció együttes hatása a sejtek számára hatalmas megterhelés lehet, amelybe bele is „pusztulhatnak”, *apoptosis* vagy *necrosis* lép fel. Az a tény, hogy a luminol fotonemissziót emelő hatása nem érvényesült a sejtek között úgy, mint azt a sejtmentes CKC + H₂O₂ rendszerben

tapasztaltuk, a „sejtes érintettség” valószínű jele. A vérnyomáscsökkentő gyógyszerek ROS-gátló, sejtvédő komplex hatása a fagocitasejt-funkciók jobb megőrzésében, a kisebb kemilumineszcencia-értékekben nyilvánult meg egyénenként, különböző mértékben.

A 20, magas vérnyomásos kezelt beteg és a 20 nem beteg kontrollszemély kemilumineszcencia-értékeiben nem volt szignifikáns különbség, bár a betegek csoportjában az RLU-értékek enyhén alacsonyabbak voltak, amiben közrejátszhatott a magasabb életkoruk is [24]. Ugyanakkor a közel azonos RLU-értékek a két csoportban arra mutattak, hogy a hipertonia eredményes gyógyszeres kezelése a kemilumineszcencia-mérésekkel is igazolható volt, mivel ezek a gyógyszerek ROS-gátlást is eredményeztek, és mindkét ROS-formára. A következő, ROS-gátlást is okozó gyógyszereket alkalmazták a betegeknél: a) adrenerg receptorokra hatók (alfa, béta, alfa-béta) [25], b) angiotenzinkonvertálóenzim-gátlók (ACEi) [26], angiotenzin-II-receptor-gátlók (ARB) [27], kalciumcsatorna-blokkolók [28]. Emellett több beteg kapott valamilyen, szintén ROS-gátló sztatinkészítményt [29] a magas koleszterinszintje miatt. Két kivétellel minden beteg szedett vagy ACEi- vagy ARB-szert [30]. A 2. táblázat mutatja a 20 betegnél a hipertonia 1–3. fokozatát [31], továbbá az alkalmazott gyógyszereket, amelyekkel a „jól beállított” klinikai állapot elérhető volt a családorvos által. Az látszott, hogy minél súlyosabb volt a betegség fokozata, annál összetettebb gyógyszerek alkalmazására volt szükség az eredményes kezeléshez. A betegség súlyossága tükröződött a gyógyszerelés erősségében is. Ez a tény mutatja, hogy a kemilumineszcencia csökkentése a betegek sejteiben a gyógyszerekhez, és nem az idősebb korhoz kötődött.

A betegek csoportjában mind a BMI, mind az életkor átlaga szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrolloknál. Mindkét tényező magas vérnyomást indukál [24, 32]. Kapcsolódó hatásuk tükröződött a hipertóniák fokozataiban, amelyek alapján esetenként gyengébb vagy erősebb terápiákra volt szükség. Pontosan ez a szoros kapcsolódás mutatja a gyógyszeres terápia kemilumineszcencia-gátló hatásainak közvetlen összefüggését a vérnyomáscsökkentő hatásukkal. A magas BMI és a magas kor magas vérnyomást és magas fagocita-kemilumineszcenciát idéz elő. Ez arányos erősségű hipertonia-csökkentő gyógyszeres terápiát igényel, amelynek „pozitív mellékhatása” a fagocita-kemilumineszcencia csökkentése. Ez a megfigyelés jelenlegi munkánk egyik lényege. Emellett elméletileg fontos kérdés lehet az is, hogy miért nem adtunk meg egyetlen, közvetlen vérnyomásmérési adatot a donoroknál. Valóban, mi a családorvos és a beteg szoros, funkcionális kapcsolatában kialakított közös vélemény alapján soroltunk egy beteget a „jól beállított állapotú” csoportba, és nem egyetlen, napszaki ingadozást mutató és bizonytalanul értékelhető vérnyomásmérés alapján. Mivel a nemi arány mindkét csoportban közel azonos volt, az eredmények nem köthetők nemi különbségekhez. A hyperaldosteronismus betegség

2. táblázat | A hipertónia fokozatai és az eredményes terápia gyógyszerei

Betegek	Év	Nem	BMI	A hipertónia fokozata	Az alkalmazott gyógyszerek
KJ	68	N	32,8	3.	ACEi, ANG II, α 1, β , Ca^{2+}
BT	70	F	39,2	3.	ACEi, β , Ca^{2+} , St
KANE	70	N	27,2	2.	ACEi, β , Ca^{2+}
AJ	73	F	27,5	2.	ANG II
TMS	75	N	27,7	2.	ANG II, β , St
TI	75	F	33,9	2.	α 1, α 2, β , Ca^{2+} , St
AJNE	75	N	27,7	1.	ANG II
VV	76	N	24,6	1.	ACEi, β , St
DLNE	76	N	25,8	1.	β
SS	77	F	33,4	2.	ANG II, α 1, Ca^{2+} , St
ILNE	78	N	27,1	2.	ANG II, Ca^{2+} , St
DL	78	F	22,2	2.	ACEi, Ca^{2+}
KI	78	F	25,6	1.	ACEi
IL	79	F	21,8	2.	ANG II, β , Ca^{2+}
SS	79	F	30,8	3.	ANG II, α 1, Ca^{2+} , St
PDNE	79	N	29,7	2.	ANG II, β
SI	80	F	25,9	1.	ANG II, St
GYA	46	N	23,6	1.	ACEi, Ca^{2+}
SZI	55	F	43,0	2.	ACEi
RZ	51	F	37,3	2.	ACEi

N = nő, F = férfi

BMI = testtömegindex; ACEi = angiotenzinkonvertálóenzim-gátlók; ANG II = angiotenzin-II-receptor-gátlók; Ca^{2+} = kalciumcsatorna-blokkolók; St = sztatin; α , β = adrenergereceptor-blokkolók

laboratóriumi diagnosztikájában a kemilumineszcencia-módszer már hasznosnak bizonyult [33]. Ez az eredmény megerősíti és hitelesíti méréseink adatait, amelyek azt mutatják, hogy a fagocitasejtek kemilumineszcencia-vizsgálata felhasználható a hatékony gyógyszeres terápia ellenőrzésére, természetesen kiegészítő vizsgálatként az eszközös vérnyomásmérés mellett, mivel a kezeletlen hypertóniás betegekben magasabb a NADPH-oxidáz-aktivitást serkentő, keringő aldosteron szintje [6]. Bár a kemilumineszcencia-vizsgálat speciális laboratóriumi háttérrel igényel, a kapott eredmények alapján finomabb különbségek kimutatására alkalmas, mint az eszközös vérnyomásmérés. Különösen jól alkalmazható tudományos, farmakológiai kísérletekben (2. táblázat).

Következtetés

Új eredmény, hogy a fagocitákban képződő ROS-molekulák között a „ferri-peroxid komplex” molekulák kemilumineszcenciát képző szereplők lehetnek, „additív” módon, más ROS-molekulákhoz társulva. A magas vérnyomásos betegeknél a fagocitasejtjeik kemiluminesz-

cencia-képző képességének mérése érzékeny, kiegészítő módszer lehet a gyógyszeres terápia hatékonyságának mérésére az eszközös vérnyomásmérés mellett. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a magas vérnyomás kezelésében használt speciális, *hypertonia* célpontú készítményeknél a *társuló ROS-gátló hatás* az „összetett oki” terápia szerencsés eleme, amely vizsgálható és minősíthető kemilumineszcencia-mérésekkel. Végül, de nem utolsósorban, a most figyelembe került „ferri-peroxid komplex” molekulák, ha kismértékben is, de új tényezők lehetnek a hipertónia kialakításában.

Anyagi támogatás: Ez a munka külső anyagi támogatást nem kapott.

Szerzői munkamegosztás: S. S., S. S. Jr.: Konceptió, irodalomkutatás, értékelés, a cikk megírása. S. S., N. A., K. J., B. A., Sz. A. G.: Módszer. B. S.: Statisztika. N. A.: Formai kivitelezés. A közlemény végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta. A szerzők között nincs semmilyen érdekütközés.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak dr. *Tóth Attila* professzornak a közlemény kritikai véleményezéséért.

Irodalom

- [1] Harrison DG, Coffman TM, Wilcox CS. Pathophysiology of hypertension. The mosaic theory and beyond. *Circ Res.* 2021; 128: 847–863.
- [2] Griendling KK, Camargo LL, Rios F, et al. Oxidative stress and hypertension. *Circ Res.* 2021; 128: 993–1020.
- [3] Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens.* 1999; 12(S9): 205S–213S.
- [4] Ferreira NS, Tostes RC, Paradis P, et al. Aldosterone, inflammation, immune system, and hypertension. *Am J Hypertens.* 2021; 34: 15–27.
- [5] Yu L, Bao HF, Self JL, et al. Aldosterone-induced increases in superoxide production counters nitric oxide inhibition of epithelial Na channel activity in A6 distal nephron cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293: F1666–F1677.
- [6] Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, et al. Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology* 2008; 149: 1009–1014.
- [7] Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; 74: 1141–1148.
- [8] Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1916–1923.
- [9] Moreno MU, San Jose G, Pejenaute AP, et al. Association of phagocytic NADPH oxidase activity with hypertensive heart disease: a role for cardiotrophin-1? *Hypertension* 2014; 63: 468–474.

- [10] Pasdois P, Parker JE, Griffiths E, et al. The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischemia. *Biochem J.* 2011; 436: 493–505.
- [11] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009, 417: 1–13.
- [12] Koju N, Taleb A, Zhou J, et al. Pharmacological strategies to lower crosstalk between nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and mitochondria. *Biomed Pharmacother.* 2019; 111: 1478–1498.
- [13] Van Dyke K. Introduction to cellular chemiluminescence, neutrophils, macrophages and monocytes. In: Van Dyke K, Cas-tranova V. (eds.) *Cellular Chemiluminescence. Vol 1.* CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1987; pp. 3–24.
- [14] Allen RC, Stjernholm RI, Steele RH. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972, 47: 679–684.
- [15] Allen RC, Loose LD. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 69: 245–252.
- [16] Fromtling RA, Abruzzo GK. Chemiluminescence as a tool for the evaluation of antimicrobial agents: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1985; 7: 493–500.
- [17] Sipka S, Ábel G, Csongor J, et al. Effect of mannozym on the chemiluminescence of phagocytes. *Acta Microbiol Hung.* 1986; 33: 263–270.
- [18] Gridley DS, Lau BH, Tosk JH. Phagocytic cell chemiluminescence using different zymosan preparations. *J Clin Lab Anal.* 199; 5: 101–105.
- [19] Bedouhène S, Moulti-Mati F, Hurtado-Nedelec M, et al. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *Am J Blood Res.* 2017; 7: 41–48.
- [20] Slawinski J, Galezowski W, Elbanowski K. Chemiluminescence in the reaction of cytochrome c with hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Acta* 1981; 637: 130–137.
- [21] Sipka S, Keresztes T, Kovács I, et al. Effects of L-amino acids on human peripheral neutrophil granulocyte activation. *Open Nutr J.* 2014; 8: 1–7.
- [22] Sipka S, Nagy A, Szentmiklósi J, et al. *In vitro* study of the effect of anti-hypertensive medication with anti-oxidant side effect on the chemiluminescence of peripheral blood phagocytes in patients with hypertension and healthy individuals. [Egyes anti-oxidáns mellékhatású „vérnyomás” gyógyszerek hatása magas vérnyomásban szenvedő és egészséges személyek vérszójteinek fagocitakemilumineszcenciájára *in vitro.*] *Orv Hetil.* 2020; 161: 1908–1913. [Hungarian]
- [23] Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 15681–15686.
- [24] Braga PC, Sala MT, Dal Sasso M, et al. Age-associated differences in neutrophil oxidative burst (chemiluminescence). *Exp Gerontol.* 1998; 33: 477–484.
- [25] Albiñana V, Recio-Poveda L, González-Peremato P, et al. Blockade of β 2-adrenergic receptor reduces inflammation and oxidative stress in clear renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 1325.
- [26] Landmesser U, Drexler H. Oxidative stress, the renin-angiotensin system, and atherosclerosis. *Eur Heart J Suppl* 2003; 5(Suppl A): A3–A7.
- [27] Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, et al. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertens.* 2007; 21: 20–27.
- [28] Sung JY, Choi HC. Nifedipine inhibits vascular smooth cell proliferation and reactive oxygen species production through AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Vascul Pharmacol.* 2012; 56: 1–8.
- [29] Wang A, Lin Y, Liang B, et al. Statins attenuate cholesterol-induced ROS inhibiting NOX2/NOX4 and mitochondrial pathway in collecting ducts of the kidney. *BMC Nephrol.* 2022; 23: 184.
- [30] Simonyi G, Ferenci T, Finta E, et al. One-year persistence of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors fixed drug combinations in hypertensive patients. [Renin-angiotenzin-aldoszteronrendszer-gátlók fix gyógyszer-kombinációinak egyéves perzisztenciája hipertóniás betegekben.] *Orv Hetil.* 2023; 164: 1337–1341. [Hungarian]
- [31] Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018; 39: 3021–3104.
- [32] Landi F, Calvani R, Picca A, et al. Body mass index is strongly associated with hypertension: results from the longevity check-up 7+ study. *Nutrients* 2018; 10: 1976.
- [33] Lin W, Li Y, Chen D, et al. High efficiency and problems of chemiluminescence assay-detected aldosterone-to-renin ratio in practical primary aldosteronism screening. *Int J Hypertens.* 2020; 2020: 3934212.

(Sipka Sándor dr.,
Debrecen, Móricz Zs. u. 22., 4032
e-mail: sipka.sandor45@gmail.com)