

*A neuropeptidek szerepe az ateroszklerózis  
patomechanizmusában*

*Dr. Kosztáczky Béla*

*Témavezetők: Dr. Paragh György  
egyetemi tanár*

*Dr. Fóris Gabriella  
tudományos tanácsadó*

*Debreceni Egyetem*

*Orvos- és Egészségtudományi Centrum*

*Általános Orvostudományi Kar*

*I. Belgyógyászati Klinika*

*Debrecen, 2007*

	<b>Rövidítésjegyzék</b>	<b>3</b>
<b>1.0</b>	<b>Bevezetés</b>	<b>4</b>
<b>2.0</b>	<b>Neuropeptidek hatása a kontroll és hiperkoleszterinemiás betegek fehérvérsejtjeiből származó szabadgyök képződésre</b>	<b>6</b>
<b>2.1.</b>	<b>Irodalmi előzmények</b>	<b>6</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Az angiotensin II</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Leptin</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Citokin-szerű receptorok</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4.</b>	<b>A NADPH oxidáz aktiválódása</b>	<b>10</b>
<b>2.2.</b>	<b>Közvetlen kísérleti előzmények és célkitűzés</b>	<b>13</b>
<b>2.3.</b>	<b>Alkalmazott módszerek</b>	<b>14</b>
<b>2.4.</b>	<b>Kísérleti eredmények</b>	<b>19</b>
<b>2.5.</b>	<b>Kísérleti eredmények megbeszélése</b>	<b>29</b>
<b>2.6..</b>	<b>A 2.0. fejezet összefoglalása</b>	<b>33</b>
<b>3.0.</b>	<b>Kapcsolat a neuropeptidekkel stimulált leukociták szabadgyök termelése és a sejtmembrán között</b>	<b>34</b>
<b>3.1.</b>	<b>Irodalmi előzmények</b>	<b>34</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Metabolikus szindróma</b>	<b>34</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Az obezitás jelentősége</b>	<b>36</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>A sejtmembrán változásai metabolikus szindrómában</b>	<b>38</b>
<b>3.1.4.</b>	<b>Az intracelluláris calcium homeosztázis</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Közvetlen kísérleti előzmények és célkitűzés</b>	<b>41</b>
<b>3.3.</b>	<b>Alkalmazott módszerek</b>	<b>42</b>
<b>3.4.</b>	<b>Kísérleti eredmények</b>	<b>48</b>
<b>3.5.</b>	<b>Kísérleti eredmények megbeszélése</b>	<b>61</b>
<b>3.6.</b>	<b>A 3.0. fejezet összefoglalása</b>	<b>65</b>
<b>4.0.</b>	<b>Neuropeptidek hatása a humán monociták endogén koleszterin szintézisére</b>	<b>66</b>
<b>4.1.</b>	<b>Irodalmi előzmények</b>	<b>66</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Az LDL receptorok</b>	<b>66</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>A scavenger receptorok</b>	<b>68</b>
<b>4.1.3.</b>	<b>Az intracelluláris koleszterin szintézis</b>	<b>69</b>
<b>4.1.4.</b>	<b>Citokinek hatása a SCAP-SREBP2 komplexre</b>	<b>73</b>
<b>4.2.</b>	<b>Közvetlen kísérleti előzmények és célkitűzés</b>	<b>73</b>
<b>4.3.</b>	<b>Alkalmazott módszerek</b>	<b>75</b>
<b>4.4.</b>	<b>Kísérleti eredmények</b>	<b>78</b>
<b>4.5.</b>	<b>Kísérleti eredmények megbeszélése</b>	<b>87</b>
<b>4.6.</b>	<b>A 4.0. fejezet összefoglalása</b>	<b>90</b>
<b>5.0.</b>	<b>Összefoglalás</b>	<b>91</b>
<b>6.0.</b>	<b>Irodalomjegyzék</b>	<b>94</b>
	<b>Köszönetnyilvánítás</b>	<b>108</b>

## Rövidítésjegyzék

**AA**=arachidonic acid; **ACAT**=acyl-CoA:cholesterol acyltransferase; **ACE**=angiotensin converting enzyme; **AngII**=angiotensinII; **AT1R**=angiotensin II 1 típusú receptor **AT2R**=angiotensin II 2 típusú receptor; **bFGF**=basic fibroblastic growth factor; **DAG**=diacyl glycerol; **DM**=diabetes mellitus; **EGF**= epidermal growth factor; **ER**= endoplasmic reticulum; **ERK**=extracellular signal-regulated kinase; **FAS**=fatty acid synthase; **FMLP**=formyl Met-Leu-Phe; **GDI**=guanosin diphosphate inhibitor; **GDP**= guanosin diphosphate; **GTP**=guanosin triphosphate; **HB-EGF**=heparin binding-epidermal growth factor; **HBSS**=Hanks balanced salt solution; **HC**=hypercholesterinaemia; **HC-25**=25-hydroxycholesterol; **HDL**=high density lipoprotein; **HMG CoA reductase**=3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase; **ICAM-1**=intracellular cell adhesion molecule-1; **IGF-1**= insulin-like growth factor-1; **IGF-1**=insulin-like growth factor-1; **IL1**=interleukin; **JAK**=Janus kinase; **LDL**=low density lipoprotein; **LOX-1 R**=lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1; **LPA<sub>2</sub>**=lipoprotein A<sub>2</sub>; **LT**=leukotriene; **MAPK**=p38 mitogen-activated protein kinase; **MCP-1**=monocyte chemoattractant protein-1; **Medium V**=Ca<sup>2+</sup>-free HBSS+3 mM EGTA + 10 µM Verapamil; **MS**=metabolikus szindróma; **MUFA**=monounsaturated fatty acid; **NFκB**=nuclear factor kappa B; **ObR= leptin** receptor;**PAI-I**=plasminogen activator inhibitor-I; **PDGF**=platelet driven growth factor; **PI3K**=phosphatidylinositol-3-kinase; **PKC**=protein kinaseC; **PLC**=phospholipase C; **PMA**=phorbol-12-myristate-13-acetate; **PTX**=pertussis toxin; **PUFA**=polyunsaturated fatty acid; **ROS**=reactive oxygen species;**SCAP**=SREBP cleavage activating protein; **SERCA**=sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase; **SFA**=saturated fatty acid; **SOCE**=store operated Ca<sup>2+</sup> channels; **SR-BI**= scavenger receptor class B type I **SR-BII**=scavenger receptor class B type II; **SRE**=sterol regulating element; **SREBP**=SRE binding protein; **STAT**=signal transducer and activator of transcription;**TF**=tissue factor; **TGF-β**=transforming growth factor;**TNF-α**=tumor necrosis factor-α;**VCAM-1**=vascular cell adhesion molecule-1; **VEGF**=vascular endothelial growth factor;**VSMC**=vascular smooth muscle cell;

## 1.0. Bevezetés

A civilizált világ egyik legnagyobb egészségügyi kihívása - a tumoros halálozás mellett - a kardiovaszkuláris halálozás nagy aránya. Az ateroszklerózis, amelynek mai tudásunk szerint legfontosabb rizikó faktorai a civilizációs életmód következményei (helytelen táplálkozás, mozgáshiány, elhízás, dohányzás), szorosan összefügg az u.n. metabolikus szindrómával. Ez a szindróma együttesen, de külön-külön entitásként is kialakulhat, mint az elhízás, a 2-es típusú diabetes mellitus, a hipertónia, és a diszlipidémiák. A magas szérum össz. koleszterin és LDL-C szint, különösen, ha ehhez alacsony HDL-C szint társul, szinte a kardiovaszkuláris összeomlás előszobáját jelenti. A koleszterin felvétel a táplálékkal, illetőleg az endogén koleszterin szintézis a sejtekben kulcskérdése az ateroszklerózis kialakulásának.

Az aterómás plakk képződésében a koleszterin homeosztázis felborulásán kívül jelentőséget tulajdonítanak még a calcium egyensúly zavarának, valamint a fokozott szabadgyök képződésnek. Így, az utóbbi 25-30 évben az ateroszklerózis kutatás egyre inkább sejtszintű kutatássá vált, sőt a molekuláris biológiai kutatások alapjait is éppen az ateroszklerózissal foglalkozó kutatók tették le.

A DEOEC I. Belgyógyászati Klinikáján működő munkacsoport szinte azonnal, 1981-től kezdve, az ateroszklerózis kutatásnak ezt az akkor még nagyon új vonalát követte. Ebben az időben már ismert volt Goldstein és Brown (1974) LDL receptorokkal kapcsolatos úttörő genetikai munkája, mely egyben az egész receptor kutatásnak - az ateroszklerózison túlmenően is - új lendületet adott. Ugyanebben az időben jelentek meg az első közlemények a receptorokról kiinduló jeltovábbítási útvonalokról is (Fain és Berridge, 1978; Fain és Berridge, 1979). A szignálok tisztázásának első fejezete azután Berridge és Irvine 1984-ben megjelent Nature közleményével zárult le. Az I. Belgyógyászati Klinikán a munkacsoport akkori alapkonceptiója az volt, hogy a nemrégiben felfedezett intracelluláris, és receptorokról kiinduló szignál útvonalak, amelyek szorosan összefüggnek a sejtek membránjának állapotával, anyagcsere megbetegedésekben nem működhetnek hibátlanul. Ebből a koncepcióból már logikusan következett az a feltételezés, mely akkor még újnak számított, hogy az LDL receptorok

száma, valamint a sejteknek az LDL részecskéket bekebelező és intracellulárisan lebontó képessége lehet még normális, míg a koleszterin homeosztázis intracelluláris regulációja már sérülhet a beteg egyéneknél. Ez annyit jelent, hogy elsősorban az LDL receptorok (akkor még ismeretlen) szignál útjai károsodnak hiperkoleszterinémiában.

Témaválasztásomat az indokolta, hogy a kísérletek egy részében, az LDL receptorok mellett - mivel a kísérletek a monocita-makrofág rendszer sejtjein történtek - kemotaktikus peptidekkel is folytak kísérletek a Gi-proteinhez kapcsolt receptorok működésének tisztázására. Ekkor derült ki, hogy az angiotensin II-vel és a különböző kemotaktikus peptidekkel stimulált sejtek szuperoxid anion termelése nagyobb a hiperkoleszterinémiában szenvedő betegekben. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy az LDL receptorok működése és az immunrendszer között szoros összefüggés lehet (Paragh és mtsai, 1986). A továbbiakban az is kiderült, hogy a neuropeptidekkel stimulált sejtekben a szuperoxid anion és leukotrién szintézis növekedése a mevalonát ciklus fokozódásán keresztül következik be, az isoprenyl szintézis eredményeként: ez adta azt az ötletet, hogy a neuropeptidekkel stimulált sejtekben a mevalonát ciklus is fokozottan működhet (Paragh és mtsai, 2002; Seres és mtsai, 2005). Végül az a tény, hogy a mevalonát ciklus fokozott működése a hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek nyugvó, tehát nem stimulált monocitáiban is megfigyelhető, továbbá az a megfigyelés, hogy ezekben a sejtekben az LDL receptorok szabályozó képessége is csökken, vagy éppen kiesik (Paragh és mtsai, 1998; Paragh és mtsai, 2003), további kérdéseket vetett fel. 1.) Vajon a két neuropeptid, az angiotensin II és a leptin, melyek káros hatása a metabolikus szindrómában jól ismert, milyen szerepet játszanak a szabadgyök képzés fokozódásának eredményeként a kóros folyamatokban? 2.) Milyen összefüggés található a metabolikus szindrómában szenvedő betegek sejtjeiben a stimulust követő megváltozott  $Ca^{2+}$  szignál és a sejtmembrán károsodása között? 3.) A metabolikus szindrómában szenvedő betegekben kimutatható-e olyan változás az LDL receptorok szignalizációjában, amely elvezet a fokozott endogén koleszterin szintézishez - és ebben a folyamatban a citokin-szerű receptorokkal rendelkező angiotensin II és leptin játszanak-e szerepet?

## **2.0. Neuropeptidek hatása kontroll és hiperkoleszterinémiás betegek keringő fehérvérsejtjeiből származó szabadgyök képződésére**

### **2.1. Irodalmi előzmények**

#### **2.1.1. Az angiotensin II**

Csaknem 30 éve ismeretes már, hogy az Ang II citokin-szerű hatást képes kifejteni a szervezetben (Goetzl és mtsai, 1980; Dezső és Fóris, 1981; Fóris és mtsai, 1983). Ennek a kezdetben csak elméleti érdekességgel bíró jelenségnek a jelentőségére azonban csak később, 1987 után eszméltek rá (Yilmaz és mtsai, 1987; Sweet, 1990). Kitént ugyanis, hogy az ACE inhibitorok nem csupán a renális hipertóniákban fejtenek ki igen jó hatást, de csökkenteni képesek az ateroszklerotikus plakk képződést és a szívizom károsodást is. A szerzők egyértelműen az Ang II-nek a szuperoxid anion termelését és az LT szintézist fokozó hatását teszik felelőssé a hormon káros hatásaiért (Canonica, 1989; Griendling és mtsai, 1994).

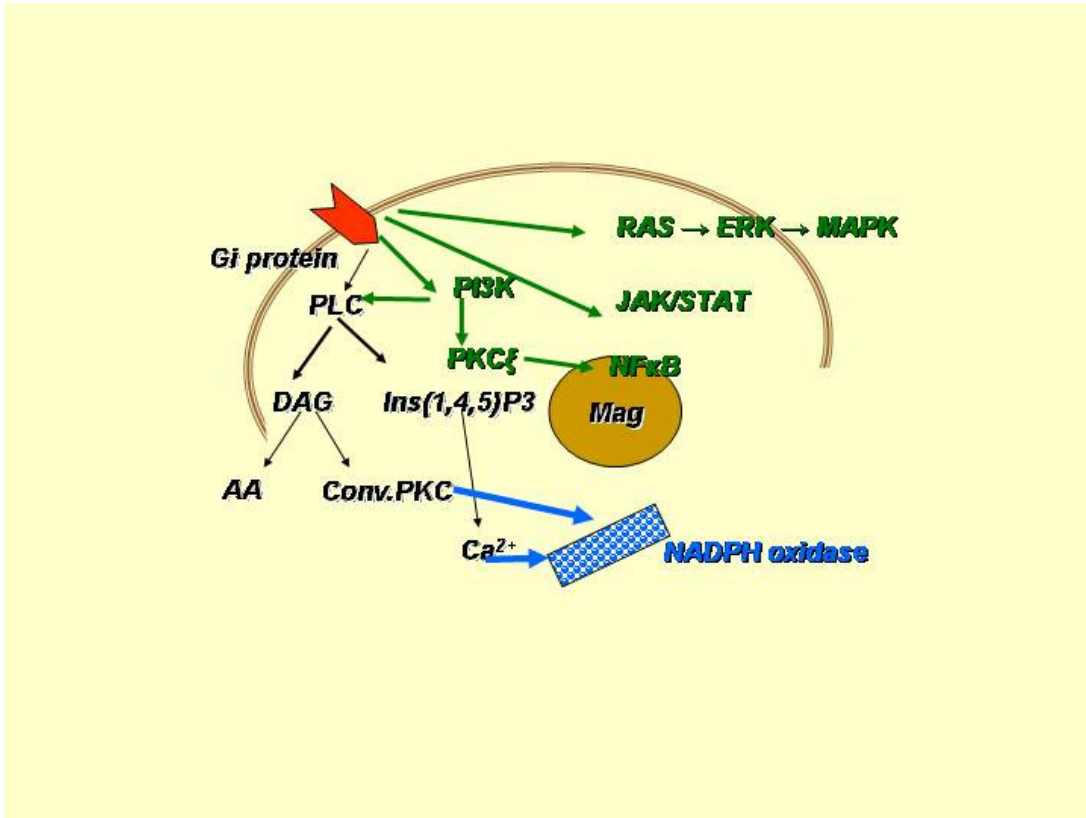
A továbbiakban az is kiderült, hogy az Ang II a klasszikus renin-angiotenzin szisztémától függetlenül - lokálisan is keletkezik, és részben lokálisan is fejti ki a hatását, pl. az érfal endotél és simaizomsejtjeire (Dezső és mtsai, 1988; Dezső és mtsai, 1989; Tonnesen és mtsai, 1982). Az Ang II hormon, ezt ma már biztosan tudjuk, igen fontos szerepet játszik, függetlenül vérnyomást emelő hatásától, az ateroszklerózis kialakulásában. Képes oxidálni a keringő LDL részecskéket, de ezen túlmenően fokozza az oxLDL megkötésében szerepet játszó LOX-1 receptor expressziót (Toba és mtsai, 2006). Fokozza a VSMCk-ben az ICAM-1, VCAM-1, és az E-selectin szintézisét, indirekt módon segíti elő az NF $\kappa$ B aktivációját. Az érendotélsejtekben és a VSMCk-ben fokozza az inflammációs faktorok szintézisét: ide tartoznak az IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, TGF- $\beta$ , PDGF, IGF-1, bFGF, HB-EGF, melyek a TGF- $\beta$  kivételével mind fokozzák a VSMC proliferációt (Schmidt-Ott és mtsai, 2000).

#### **2.1.2. A leptin**

Jóval később vált ismertté egy másik, 16 kDa súlyú peptidhormon, a leptin, mely a fehér zsírszövetben termelődik, hatását a hypothalamicus magvakban fejti ki, és a

testsúly, az étvágy és az energia felhasználás szabályozásában játszik fontos szerepet (Zhang és mtsai, 1994; Arora és Anubhuti, 2006; Ronti és mtsai, 2006). Később derült ki, hogy a leptin nem csupán „egy” az étvágyat szabályozó hormonok közül, de mint az egyik adipocitokin, fontos összekötőszerepet játszik a zsírszövet és az immunrendszer között (Tilg and Moschen, 2006; Fantuzzi, 2006). Tekintettel arra, hogy az ateroszklerózis patomechanizmusában jelen tudásunk szerint a citokinek rendkívül fontos szerepet játszanak, továbbá a metabolikus szindróma, köztük az obezitás és a kardiovaszkuláris megbetegedések között igen szoros az összefüggés, a leptin szerepét az ateroszklerózis kialakulásában igen fontos tényezőként tarthatjuk számon (Mathieu és mtsai, 2006). Az obezitás azonban nem csupán a metabolikus szindróma többi tünetének - a hipertóniának, a diszlipidémiának, az inzulinrezisztenciának, a diabetesnek - az egyik hirnöke lehet, de fontos prediszpozíciót jelent pl. az asztma, a tüdőrák és a nem alkoholos zsírmáj kialakulásához is. A zsírszövet mai tudásunk szerint fontos endokrin szerv, amennyiben az adipocitokinek termelődési helye, másrészt a zsírsejtek között elhelyezkedő immunsejtekből kontrollálatlanul szabadulnak fel az inflammatorikus citokinek is. Míg a biológiailag igen aktív adipocitokinek a leptin, a resistin, az adiponectin és a visfatin, nagy mennyiségben szabadulnak fel a zsírsejtekből, addig a TNF- $\alpha$ , az IL6 és IL1 (Tilg és Moschen, 2006) a zsírszövetben jelenlevő immunsejtek terméke. Az elsőként felfedezett adipocitokin (Saladin és mtsai, 1995) a leptin, egy 167 aminosavból álló fehérje, melyet az ob gén kódol, a citokin családnak tartozik, és génje a „7q31.3” locusban helyezkedik el (Geffroy és mtsai, 1995). Termelődésének szabályozásában nem csupán a tápláltsági állapot vesz részt, de szintézisét fokozzák olyan vazoaktív peptidek, mint az Ang II vagy a endothelin. Bár a leptin koncentráció a szérumban csupán néhány ng/mL, a lokális felszabadulás mennyiségéről és hatásáról nem sokat tudunk (Guzik és mtsai, 2006). A magas szérum leptin szint, akár az Ang II szint, reálisan előforduló lehetőség: az előbbi renális hipertóniában, az utóbbi a hypothalamus magvakban elhelyezkedő leptin receptorok rezisztenciája következtében. A hiperleptinémiával és insulin rezisztenciával szövődő, és a kardiovaszkuláris szövődmények szempontjából igen veszélyes obezitás pontos okát ma még nem ismerjük (Ahima, 2006; Ren, 2004). Mint említettük, a leptin, amely nagy mennyiségben szabadulhat fel lokálisan, ugyanúgy lokálisan fejthet ki bármilyen gyulladást

## 2/1. ábra. Jeltovábbítás leegyszerűsített útjai a citokin-szerű receptorokról



*Jól látható, hogy a receptorról (piros nyíl) a szignál sokféle úton haladhat. A fekete nyilak jelzik a “kanonikus utat”. Ez a Gi protein-PLC-DAG-AA kaszkád-PKC, ill. az Ins(1,4,5)P $_3$ - Ca $^{2+}$  szignál. A további szignál utak a sejtmagba vezetnek (zöld nyilak) : ilyenek a RAS-ERK-MAPK, a JAK/STAT szignál, továbbá a PI3K-Ins(3,4,5)PI $_3$ - PLC, a PI3K- PKC $\zeta$ -NF $\kappa$ B út vonal.*

folyamatot. Ugyanígy a leptin rezisztencia, meglehetősen bizonytalan fogalomnak tűnik, és csak egyik formája a receptorok hiánya vagy kóros működése a hypothalamicus magvakban. A leptin receptorok közül a „short isoform” szerepe a vér-agy gát barrier-en való transzport folyamatokban van. A rövid forma (Ob-Ra) azt jelenti, hogy a receptor citoplazmába érő része - a C terminális rész - rövidült meg. Az Ob-Re a cirkuláló plazmában mutatható ki, amikor a receptor lehasadt része a „truncated soluble receptor” kerül a keringésbe, jelentősége még nem teljesen tisztázott. Kétségtelen, hogy számunkra a hypothalamicus magvakban, az immunrendszer sejtjeinek felszínén, az endotheliális



sejteken, a pancreas B sejtjeinek felszínén elhelyezkedő „long type isoform”-nak, az ObRb -nek van jelentősége.

### **2.1.3. A citokin-szerű receptorok**

Az Ang II és a leptin pleiotrop in vitro - és feltételezhetően in vivo - hatásának magyarázata specifikus receptoraik különleges természetében rejlik. Az Ang II jelen tudásunk szerint 1. és 2. típusú (AT1 és AT2) receptorokkal rendelkezik az emberi szervezetben. Az AT2 receptorok valójában a magzati szövetben fordulnak elő nagy sűrűségben, míg a felnőtt szervezetben csak a központi idegrendszer, a mellékvesekéreg és velő, a méhizomzat bizonyos helyein mutathatók ki (Steckelings és mtsai, 2005). Nagy mennyiségben képesek azonban reexpresszálni kóros körülmények között, infarktus után a szívizomzatban, kardiovaszkuláris megbetegedésekben az erek simaizomzatában és tumoros szövetekben. Az AT2 receptor jelenlegi tudásunk szerint természetes antagonistákkal rendelkezik, és a szervezetben képes ellensúlyozni mindazt, amit az Ang II az AT1 receptorokon keresztül ki tud váltani. Így, az Ang II az AT2 receptorokon keresztül vazodilatációt okoz, fokozza a regenerációt, és a tumoros szövetekben a vaszkularizációt.

Az eddig leírtakból az világosan kitűnik, hogy számunkra a helikális struktúrával rendelkező és a cytokin I. „superfamily”-hez tartozó receptorok - azaz a hosszú leptin receptorok, az ObRb-k és az AT1 Ang II receptorok az izgalmasak. Ezeknek a receptoroknak a szignál útjait az **1. ábrán** tüntettük fel. Ez a sok útvonalon történő jeltovábbítás ennek a helikális struktúrájú receptor típusnak a tulajdonsága, a sok út egymással való kölcsönhatása, továbbá annak pontos ismerete, hogy melyik útvonal mikor, milyen sejten nyer prioritást, bár számtalan közleményben olvashatunk róluk, ma még nem tekinthető tisztázottnak. A leptin ObRb esetében Frühbeck (2006), míg az AT1 receptor esetében Touyz és Berry (2002), továbbá Hunyadi és Catt, 2006 összefoglaló közleményét vettük alapul. Az **1.** (leegyszerűsített) **ábra** megszerkesztése is az ő adataik alapján történt.

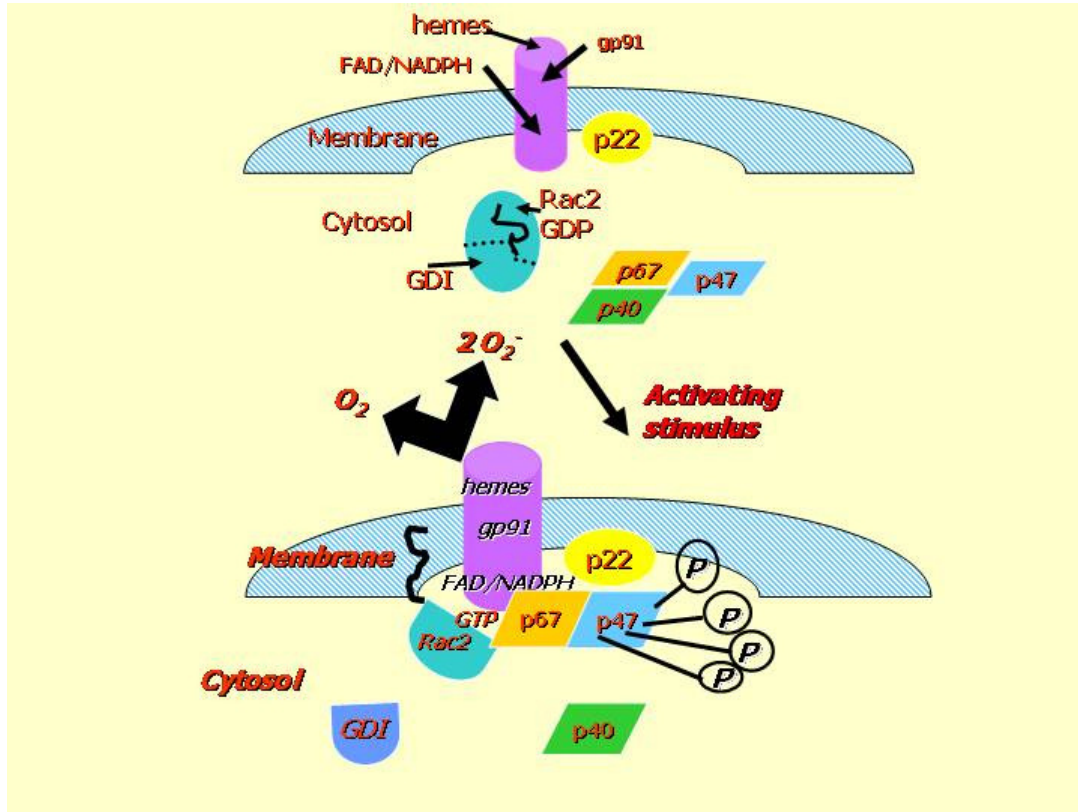
Ennek a bonyolult jeltovábbítási rendszernek a végállomása a magban van, ahol is a ligand által kiváltott stimuláció képes számos target gén amplifikációját elindítani, így igen mélyreható változásokat képesek létrehozni az anyagcserében. Másrészt, és ez rendkívül fontos tény az ateroszklerózis patomechanizmusában, a leptin és az Ang II

képes fokozni a szabadgyök képződést: részben az NADPH oxidáz, részben az PLA<sub>2</sub> aktiválása révén (Griendling és mtsai, 1994; Morduchowicz és mtsai, 1991).

#### **2.1.4. A NADPH oxidáz aktiválódás mechanizmusa fagocita sejtekben.**

Az világos, hogy a NADPH oxidáz aktiválódásához fagocita sejtekben az enzim alegységek összekapcsolódására (assembly) van szükség, melynek legfontosabb lépése a p47<sup>phox</sup> membránba való transzlokációja (Takeya és Sumimoto, 2003). Mint a **2 ábrán** is látszik, az oxidase katalitikus magja, a cytochrom b<sub>558</sub>, és a gp91<sup>phox</sup>, valamint a p22<sup>phox</sup> a membránba integrálódnak. A gp91<sup>phox</sup> direkt módon vesz részt a szuperoxid termelésében, mivel kötőhelyet tartalmaz a NADPH, a FAD és a hem számára. A resting sejtekben a gp91<sup>phox</sup> soha nem termel szuperoxidot, ehhez az kell, hogy a stimulus hatására a Rac small GTPase, a p47<sup>phox</sup> és a p67<sup>phox</sup> aktiválódjanak, és transzlokálódjanak a citoszólból a membránba. Az aktiválódást számos folyamat megindíthatja, így a Rac small GTPase-ről leválik az inhibitorként szereplő GDI, és az enzim konformációváltozás után GTP-vé alakul, majd a p67<sup>phox</sup>-al komplexet képezve kötődik a gp91<sup>phox</sup>-hoz. A ciklus akkor fejeződik be, amikor a GTP visszaalakul GDP-vé. A p47<sup>phox</sup> jelenléte nélkül a szuperoxid termelés nem indul meg, de ennek a molekulának inkább regulációs szerepe van. A stimulus szignálútjához - talán ez a leginkább ismert út, az ún. convencionális, PMA-val stimulálható, és Ca<sup>2+</sup>-függő PKC (α, βI, βII, γ) aktiválódás is elvezethet. A PKC ugyanis képes foszforilálni a p47<sup>phox</sup>-ot, amely mint regulátor része az enzimnek megindítja a szuperoxid termelést. Ez a mechanizmus vezet a szuperoxid termeléshez pl. a kemotaktikus peptidek esetében is, amikor a PTX-szenzitív Gi protein-PLC-Ins(1,4,5)P3 - Ca<sup>2+</sup> - DAG szignálút Ca<sup>2+</sup> szignált és PKC aktiválódást is eredményez (Tauber, 1987; Iaccio és mtsai, 2007, ). A NADPH oxidáz egyik leghatásosabb stimulusa azonban maga a Ca<sup>2+</sup> szignál, mint ez a munkacsoport régebbi munkájából is kiderül (Fülöp T Jr. és mtsai, 1988). Elvben, a Ca<sup>2+</sup> szignál szükséges lehet a Ca<sup>2+</sup> függő PKC aktiválásához is, és így feltételezhetjük, hogy a Ca<sup>2+</sup> szignál a PKC aktiváláson keresztül fejti ki hatását a NADPH oxidázra. A helyzet azonban éppen az újabb kutatások tükrében, kicsit bonyolultabb (Granfeldt és mtsai, 2002). Először is meg kell említeni, hogy nem kifejezetten fagocita sejtekben kimutatható Nox5-nek az N-terminális végén két Ca<sup>2+</sup> kötő hellyel is rendelkezik, és Banfi és mtsai, (2001) számos szövetben kimutattak Ca<sup>2+</sup>-al direkt aktiválható NADPH oxidázokat. Másrészt, a Ca<sup>2+</sup> aktiváló

2/2. ábra. A NADPH oxidase aktiválódásának egyszerűsített vázlatja



(Bokoch és Diebold, 2002, Blood 100:2692)

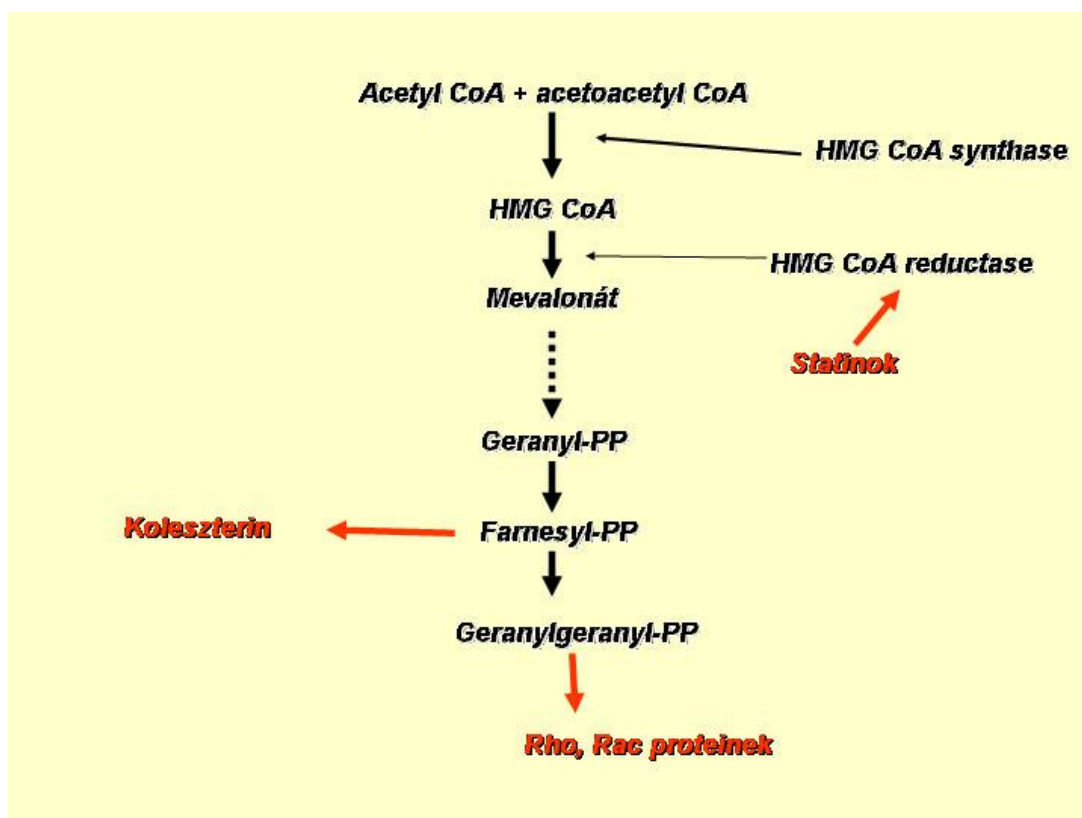
szerepéről szólva, egy újabban felmerülő kérdés is szóba jön. Nevezetesen, a fagocita sejtekben a NADPH oxidáz vagy a plazmamembránban helyezkedik el, és akkor stimuláció után szuperoxid “release” következik be, mely patológiás jelenségekhez vezet, vagy a a granulomok ill. a fagoszóma membránjához kötődve aktiválódnak, és a ROS produkció intracellulárisan jelentkezik. A citokinek által kiváltott stimulus esetében a NADPH mindkét lokalizációjában aktiválódik. Granfeldt és mtsai (2002) szerint az intracellulárisan felszabaduló ROS-t a  $Ca^{2+}$ -influx, míg az extracelluláris szuperoxid release-t az intracelluláris raktárakból felszabaduló  $Ca^{2+}$  szignál idézi elő.

Végül számunkra talán legfontosabb regulációs út, a NADPH oxidáznak az Rho “superfamily”-hez tartozó Rac által történő regulációja. A humán neutrofilekben a Rac2,

míg a monociták esetében a Rac1 tölti be a legfőbb regulátor szerepét (Zhao X és mtsai, 2003). A stimulus hatására a p21 Rac leválik a citoszólban a gátló hatású guanosin difoszfát inhibitorról (**2. ábra**), és így a guanosin difoszfát konformációváltozás után képes guanosintrifoszfáttá alakulni, majd ebben a formában a membránban a p67<sup>phox</sup>-hoz kapcsolódni (Bokoch és Diebold, 2002). A p21 Rac 1 vagy 2 isoprenylációja, pontosabban geranylgeranylációja a molekula membránba való kihorgonyozásához szükséges (Delbose és mtsai, 2002) .

Mint ismeretes, az isoprenylek a mevalonát cikluson keresztül szintetizálódnak, mely ciklus a koleszterin szintéziséhez is vezet, ezért a HMG CoA reduktáz kulcsenzim, melynek gátlása a statinokkal csökkenti a ROS képződést is. A **3 ábrán** a mevalonát ciklust tüntettük fel, a NADPH oxidáz aktivitás gátlásának jobb megértése érdekében. A

**2/3. ábra. A mevalonát ciklus vázlatos ismertetése**



vázlat megtekintésekor világossá válik, hogy a ROS képződés és a koleszterin szintézis szabályozása azonos úton történik.

## **2. 2. Közvetlen kísérleti előzmények és célkitűzés**

### **2.2.1. A munkacsoport kísérletei, melyek a jelen munkához elvezettek**

A munkacsoport kísérletei a neuropeptidekkel 25 éves múltra tekintenek vissza. Először 1981-ben mutatták ki, hogy az Ang II patkány peritoneális makrofágok immunfunkcióit képes a koncentrációtól függően csökkenteni vagy gátolni (Dezső és Fóris; 1981, Fóris és mtsai, 1983). A továbbiakban egy másik neuropeptid, a  $\beta$ -endorphin analóg Met-enkephalin immunaktivitását vizsgálták, és hasonló eredményeket kaptak (Fóris és mtsai, 1984; Fóris és mtsai, 1986). A továbbiakban az is kiderült, hogy a somatostatin, valamint a  $\kappa$ -elastin is rendelkezik immunstimuláns hatással (Fóris és mtsai, 1985; Fülöp és mtsai, 1986). Az Ang II káros hatása a kardiovaszkuláris megbetegedésekben - függetlenül vérnyomás emelő hatásától - aktuálissá tette az újabb vizsgálatokat, és ekkor kimutatták, hogy az Ang II humán neutrofilek intracelluláris killing aktivitását képes koncentrációtól függően fokozni vagy gátolni (Paragh és mtsai, 2002). A 10 nM Ang II hatására a szabadgyök képződés (szuperoxid és leukotrién) fokozódott, és ez a fokozódás szignifikánsan nagyobb volt azokban a sejtekben, melyeket hiperkoleszterinémiában szenvedő betegektől nyertek. Azt is kimutatták, hogy a PTX-szenzitív Ins(1,4,5)P3 szignál az Ang II-vel stimulált HC neutrofilekben kimarad, és a  $\text{Ca}^{2+}$  szignálért egy verapamil-érzékeny  $\text{Ca}^{2+}$ -influx a felelős. Figyelemre méltó azonban, hogy már előzetesen sikerült kimutani hasonló eltéréseket a jeltovábbításban, amennyiben hiperkoleszterinémiás, illetőleg 2 típusú diabetes mellitusban szenvedő betegek neutrofiljeit stimulálták formyl-Met-Leu-Phe kemotaktikus peptiddel (Foris és mtsai, 1998, Paragh és mtsai, 1999). Ezek a vizsgálatok arra utaltak, hogy mind HC-ben, mind 2 típusú DM-ben megváltozik a G-proteinhez kötődő receptorok jeltovábbítása a fehérvérsejtekben. Ez a megfigyelés megerősítette azokat a még régebben végzett vizsgálatokat, amelyekben kimutatásra került, hogy idős, egészséges emberek fehérvérsejtjeiben is megváltozik az intracelluláris szignalizáció (Fülöp és mtsai, 1989). Az intracelluláris jeltovábbítás káros változásai különböző anyagcsere

megbetegedésekben lényegében várható eredménynek is látszanak, mégis csak igen kevés tudományos eredmény látott napvilágot ezen a területen.

### **2.2.2. A jelen munka célkitűzései**

*Tekintettel arra, hogy az elmúlt években éppen a citokinek receptorainak a jeltovábbításáról egyre több, fontos adat vált ismertté, ezeket a már bonyolultabb rendszerben vizsgálható szignál utakat érintő változásokat kívántuk tisztázni hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek fehérvérsejtjeiben. Ebben a fejezetben a neuropeptidok által kiváltott szabadgyök képzésre ható változásokat vizsgáltuk, különös tekintettel a mevalonát ciklustól függő, a Rac szabályozása alatt álló, tehát statin-érzékeny szuperoxid termelődésre. Jelen ismereteink alapján az Ang II által kiváltott káros szabadgyök termelést egy másik, szintén aterogén hatásúnak tartott neuropeptid, a leptin hatásával hasonlítottuk össze.*

## **2.3 Alkalmazott módszerek**

### **2.3.1. Beteganyag**

A kontroll csoportokban a vért részben egészséges, önként jelentkező egészségügyi dolgozóktól, részben pedig a Véraló Állomás segítségével önkéntes véradóktól nyertük. A hiperkoleszterinémiás csoportok ugyancsak önkéntes, a véradás céljáról felvilágosított, az I. Belgyógyászati Klinika Anyagcsere Megbetegedések Tanszékének szakrendeléseinek először jelentkező betegek voltak, akik addig kezelésben még nem részesültek. A betegeken elvégeztük az LDL receptorok számának és funkciójának vizsgálatát Goldstein és Brown (1974) módszere szerint, továbbá megvizsgáltuk a monocitákon észlelhető, és 50 µg/mL LDL-proteinnel kiváltható negatív feed back reakciót is. Következésképpen az általunk vizsgálatra kiválasztott betegek nem szenvedtek LDL receptor hiányba és/vagy diszfunkcióban. A kontroll és HC betegek demográfiai adatait az **A., B. és C Táblázatokon** tüntettük fel. A táblázatokban feltüntetett vizsgálatokat a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében végezték el. Egy-egy kísérlet elvégzéséhez a vénás vérvétel (10-15 mL) 4-5 napos intervallumokban történt 6-8 HC betegtől és 3-4 kontroll véradótól. Az interassay coefficiens nem haladta meg a 15%-ot. A DEOEC etikai bizottságától az engedélyt kísérleteinkhez megkaptuk.

## A. Táblázat

Paraméterek	Kontroll (n=24)	HC (n=32)
Életkor	48.9±6.8	51.6±5.5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.8±3.1	23.1±3.3
WHR	0.86±0.11	0.89±0.14
Koleszterin (mmol/L)	4.4±0.49	9.5±1.5 <sup>a</sup>
Tg (mmol/L)	1.8±0.23	1.9±0.25
HDL-C (mmol/L)	1.34±0.14	1.26±0.21
LDL-C (mmol/L)	3.18±0.42	8.23±1.03 <sup>a</sup>

Adatok a 4-8. ábrához.. Rövidítések: HC= hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek;  
BMI=body mass index; WHR=waist-to-hip ratio; Tg=trigliceridek

## B. Táblázat

Paraméterek	Kontroll (n=24)	HC (n=22)
Életkor	56.3±6.3	54.2±5.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.3±3.4	22.61±4.1
WHR	0.88±0.1	0.89±0.18
Éhezési vércukor (mmol/L)	5.2±0.68	5.5±1.1
Insulin (mU/L)	20.5±3.4	21.8±5.8
HbA1C%	4.5±0.53	4.6±1.1
Koleszterin (mmol/L)	4.5±0.57	9.8±1.05 <sup>a</sup>
Tg (mmol/L)	1.82±0.23	2.05±0.38
HDL-C (mmol/L)	1.65±0.15	1.25±0.17
LDL-C (mmol/L)	3.88±0.43	8.78±1.0 <sup>a</sup>

Adatok a 9. és 10 ábrához.. Rövidítések: lásd A. Táblázat.

A C Táblázatban vizsgált betegek esetében a kísérletek nem önkontrollosak voltak. A HC+Flu csoportban a betegek 6 hétig részesültek 40 mg/nap fluvastatin (Lescol) kezelésben. A kezelés előtti értékekhez képest a változások a következők voltak: össz. koleszterin: - 17.4%; HDL-C:35.9%; trigliceridek... -9.6%; apolipoprotein A1: +6.2%; apolipoprotein B100: -18.3%; LDL/HDL: -28.1%; LDL-C: -24.6%.

## C. Táblázat

Paraméterek	Kontroll (n=14)	HC (n=28)	HC+Flu (n=21)
Életkor	58.2±6.3	55.7±6	59.2±6.8
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.8±3.2	22.6±3.5	24.1±3.8
WHR	0.86±0.11	0.95±0.15	0.92±0.13
Koleszterin (mmol/L)	4.6±0.51	8.7±1	5.9±0.68 <sup>a</sup>
Tg(mmol/L)	1.7±0.22	1.9±0.24	1.7±0.20
HDL-C (mmol/L)	1.35±0.15	1.31±0.15	1.40±0.16
LDL-C(mmol/L)	3.43±0.41	6.72±1.1	4.11±0.44 <sup>a</sup>

*Adatok a 11. és 12. ábrához.. Rövidítések: (lásd A. Táblázat)HC+Flu=HC betegek kezelése 6 hétig 40 mg/nap Lescol-al.*

### 2.3.2 Neutrofil és monocita izolálás

A **neutrofileket** a vérből Boyum (1968) módszere szerint izoláltuk Ficoll-Hypack sűrűség gradiensen. Az így nyert sejtszuszpenzió tisztasága 95%, míg az élő sejtek aránya mofológiai vizsgálattal (tripán-kék módszer) 96% volt.

A **monociták** izolálása kétféle módon történt: az első lépésben Boyum (1969) módszere szerint izoláltuk a mononukleáris sejteket, majd a továbbiakban Kumagai és mtsai (1978) szerint tisztítottuk a monocitákat. A mononukleáris sejtszuszpenziót előzőleg fetal calf serum-al előkezelt petri csészékbe helyeztük (90 mm diameter), majd EGTA-t tartalmazó jéghideg HBBS puffer oldatban felszuszpendáltuk a letapadt monocitákat. A végső, tisztított monocita szuszpenzió tisztasága 93-96 %-os tisztaságú, míg az élő sejtek aránya 90-95% volt.

Bizonyos esetekben a kontroll véradóktól nyert monocitákat azonban az előszeparálás után Wahl és mtsai (1984) módszere szerint counterflow elutriációval Beckman JE-6B centrifugán és Beckman standard elutriációs kamrát használva szeparáltuk. A sejtszuszpenzió tisztaságát anti CD14 markerrel igazoltuk..

### 2.3.3. In vitro kísérleti körülmények

A sejteket általában HBSS-ben szuszpendáltuk és a stimulációkhoz a következő agonistákat használtuk fel előzetes kísérletek után: 10 nM angiotensin II (Serva), 100 ng/mL leptin (Sigma), 10 nM formyl-Met-Leu-Phe (Serva), 100 nM PMA (Sigma), 1 µM



A23187 (Sigma). A gátlószereket a következő koncentrációkban és ideig alkalmaztuk: a PLC-t gátló 5  $\mu\text{M}$  neomycint (Sigma) 60 percig, a Gi proteint gátló 100 ng/mL pertussis toxint (Sigma) 120 percig, az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  transzlokációt gátló 1.0  $\mu\text{M}$  thapsigargin (Sigma) 60 percig, az angiotensin II AT1 receptorát gátló 1  $\mu\text{M}$  losartant (Merck) 20 percig, az AT2 receptorát gátló 1  $\mu\text{M}$  PD123319-t (Sigma and Aldrich) 20 percig, A PKC-t gátló 1.0  $\mu\text{M}$  H-7-t (Sigma) 60 percig, a PI3 kinase-t gátló 20 nM wortmannint (Sigma) 30 percig, a MAP kinase-t gátló 50  $\mu\text{M}$  PD98059-t (Sigma) 30 percig, a HMG CoA reductase-t gátló 5  $\mu\text{M}$  fluvastatin (Merck) 60 percig, és 20  $\mu\text{M}$  lovastatin 120 percig, a SCAP-SREBP komplex kialakulását gátló 25  $\mu\text{M}$  25-hydroxycholesterol-t (Sigma) methyl- $\beta$ -cyclodextrin komplexben 120 percig. Végül a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx gátlására a sejteket Medium V-ben inkubáltuk 60 percig. A Medium V 10  $\mu\text{M}$  verapamil ((Sigma) és 3 mmol/L EGTA-t tartalmazott  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes HBSS-ben.

#### **2.3.4. Szuperoxid anion meghatározás**

A szuperoxid anion generálódását Cohen és Chovaniék (1978) módszerével vizsgáltuk, amely a superoxide dysmutase-val gátolható ferricytocom C (Sigma) redukciójának spektrofotometriás mérésén alapszik. A felszabaduló szuperoxid mennyiségét  $\text{nmol O}_2^-/10^6$  sejt/30 min -ben fejeztük ki.

A kísérletek egy részében a mérést Varga és mtsai (2001) módszere szerint 96 lukú Nunclon microplate-ben végeztük és a spektrofotometriás leolvasás ELISA reader-ben (Antos Labtec, Wien, Austria) történt.

#### **2.3.5. Arahidonsav derivátumok kiáramlásának mérése**

Az arahidonsav kaszkád intenzitásának méréséhez Boraschi és mtsai (1985) módszerét használtuk, amely azon alapszik, hogy [ $^{14}\text{C}$ ]arachidonic acid-al (Amersham, 58.4 mCi/mmol) feltöltött sejtekből stimuláció hatására mértük a jelzett arahidonsav derivátumok kiáramlását. A kísérletekhez  $5 \times 10^5$  granulocitát 60 percig inkubáltunk 0.2  $\mu\text{Ci}$  jelzett [ $^{14}\text{C}$ ]arachidonic acid-al 37° C-n. Erőteljes mosás után megmértük a sejthez-kötött radioaktivitásokat, majd 20 perces stimulációs periódus után a sejteket centrifugáltuk és megmértük a felülúszók radioaktivitását. A mérések Packard 2200 CA szcintillációs számlálóban történtek. A spontán kiáramlás levonása után a kiáramló radioaktivitást a sejthez-kötött aktivitás százalékában fejeztük ki. A módszer alapján nem tudunk különbséget tenni a különböző arahidonsav származékok között, viszont jól jelzi,

hogy milyen esetekben érdemes a jóval drágább és munkaigényesebb leukotrién meghatározásokat is elvégezni.

### **2.3.6. Leukotrién B4 és C4 meghatározás**

Előkísérletekben a munkacsoport standardok segítségével a neuropeptidek által granulocitákban kiváltott leukotrién szintézist már megvizsgálta: standardok (Sigma, StLouis, MO) segítségével meghatározták a szintetizált LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> és LTE<sub>4</sub> mennyiségeket. Részben jelentőségük miatt, részben pedig a leglátványosabb növekedés miatt jelen kísérleteink során csak az LTB<sub>4</sub> és LTC<sub>4</sub> került meghatározásra. A meghatározások Jubiz és mtsai (1985) módszere szerint történtek Huwyler és Gut (1990) módosítása szerint. A granulocitákat HBSS-ben (10<sup>7</sup> sejt/mL) szuszpendáltuk és 37° C-n CO<sub>2</sub> inkubátorban állandó keverés mellett stimuláltuk 30 percig. A sejtszuspenzióból 100 µL mennyiséget adtunk 300 µL isopropanol tartalmú formilsavhoz és a végső pH-t 3.0-ra állítottuk be. Erős vortexelés közben 3-szoros mennyiségű dichloromethan-t adtunk hozzá, majd a fázisok különválasztása céljából 10 percig 10.000 g-n centrifugáltuk. Az alsó szerves fázishoz 25 µL ultra tiszta vizet adtunk állandó wortexelés közben, majd újra 10 000 g-n centrifugáltuk 2 percig. A minták volumenét 50°C-n nitrogén áram alatt csökkentettük 20-30 µL-re. A HPLC-be (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) juttatáshoz 20 µm hurokhoz illeszkedő Rheodyne 7125 szelepet használtunk. A szeparálás LiChroper 100.18 oszlopon történt (részecske méret: 5 µm; 5mm i.d.; 125mm hossz), az elució metanol:víz 60:40 arányú keverékével pH 7.4-n történt, mely pH-t 0.25% Na<sub>4</sub>EDTA-t (Merck) tartalmazó jégcettel állítottunk be. A leukotriének meghatározás reverz HPLC technikával, ultraibolya tartományban történt 280 nm-n (UV-VIS, L-4250 detektorral). Az egyes mintákban az LTB<sub>4</sub> és LTC<sub>4</sub> koncentrációját a retenciós idő és nemzetközi standardokkal kapott csúcsmagasságok segítségével a D6000 HPLC-Manager Software modell (Merck, Darmstadt, Germany) segítségével számoltuk ki.

### **2.3.7. Matematikai kiértékelés**

A paramétereket leíró statisztikával jellemeztük (átlag, szórás, esetszám). Az egyes betegcsoportok kontrollhoz viszonyított különbségét ANOVA teszttel illetve párosítatlan t-teszttel hasonlítottuk össze.

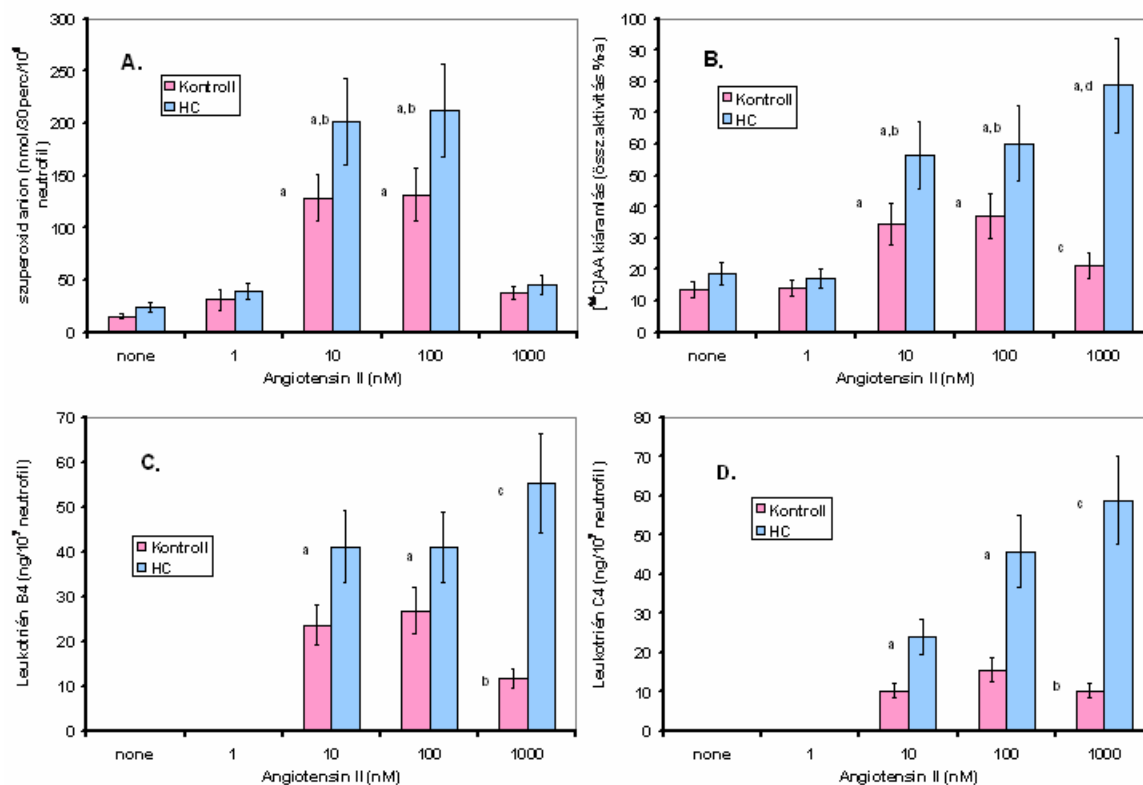
**Saját részvétel Intenzíven vettem részt a beteganyag kiválasztásában valalmint az eredmények kiértékelésében. A szuperoxid anion és a [<sup>14</sup>C]arahidonsav kiáramlás méréseiben a munkacsoport laboratóriumában irányítás mellett vettem részt a sejtek szeparálásában és a meghatározások kivitelezésében. A leukotrién meghatározásokat dr. Keresztes Tamás végezte el.**

### **2.4. Kísérleti eredmények**

Első kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk különböző Ang II koncentrációk hatását a humán neutrofilek szabadgyök termelésére (**4. ábra**). A szuperoxid termelést a 10-100 nM koncentrációk között észleltük, ennél kisebb és ennél nagyobb Ang II koncentrációk hatástalanok voltak. A HC sejtek által termelt szuperoxid mindkét esetben szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollok által termelt mennyiség. Amennyiben az Ang II hatását az AA kaszkád aktivitására vizsgáltuk, azt találtuk, hogy a [<sup>14</sup>C]AA-val feltöltött sejtek spontán leadása ugyancsak 10-100 nM Ang II által volt fokozható, míg 1000 nM hatására a kontroll csoportban a [<sup>14</sup>C]AA leadás a “none” csoporthoz képest csak kissé fokozódott (P<0.05). Ezzel szemben a HC neutrofilek izotóp leadása szignifikánsan nagyobb volt 1000 nM Ang II stimuláció után, mint a 100 nM hormon által kiváltott leadás (P<0.001). Ugyanez a koncentráció-függően fokozható reakció volt észlelhető HC neutrofilek esetében, ha az Ang II által kiváltott LTB<sub>4</sub> és LTC<sub>4</sub> termelést vizsgáltuk. A 10 -100 nM között észlelhető reakció maximum tehát csak a kontroll sejtekre volt érvényes akár a szuperoxid rilízt, akár az AA kaszkád intenzitását vizsgáltuk.

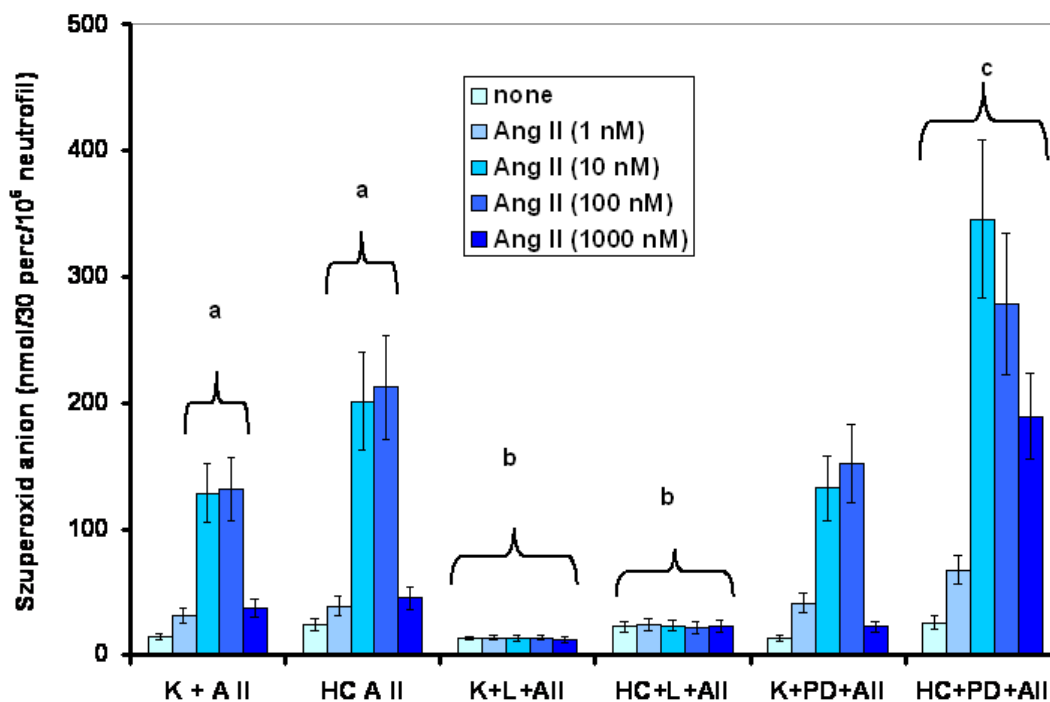
**2/4. ábra. Különböző angiotenzin II koncentrációk hatása kontroll és hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek neutrofiljeinek szuperoxid (A),**

arachidonsav származékok (B), leukotrién B4 (C) és leukotrién C4 (D) termelésére.



Rövidítés: AA=arachidonic acid. Minden érték 3 meghatározás átlaga±SD. A vizsgálathoz 8 kontroll véradó és 11 HC beteg vérért használtuk fel. **A.** <sup>a</sup> A “none” csoporthoz képest a növekedés szignifikáns ( $P<0.001$ ); <sup>b</sup> A kontroll és a HC csoport között a különbség szignifikáns ( $P<0.001$ ); **B.** <sup>a</sup> A “none” csoporthoz képest a növekedés szignifikáns ( $P<0.001$ ); <sup>b</sup> A kontroll és a HC csoport között a különbség szignifikáns ( $P<0.001$ ) <sup>c</sup> Az 1000 nM által okozott csökkenés szignifikáns volt ( $P<0.001$ ) <sup>d</sup> Az 1000 nM által okozott fokozódás szignifikánsan nagyobb volt mint a 100 nM hatása ( $P<0.001$ ). **C.** <sup>a</sup> A kontroll és a HC csoport között a különbség szignifikáns volt ( $P<0.001$ ); <sup>b</sup> A csökkenés a 10-100 nM-al kapott értékekhez képest szignifikáns volt ( $P<0.001$ ); <sup>c</sup> A fokozódás a 10-100 nM-al kapott értékekhez képest szignifikáns volt ( $P<0.001$ ). **D.** (lásd C pont)

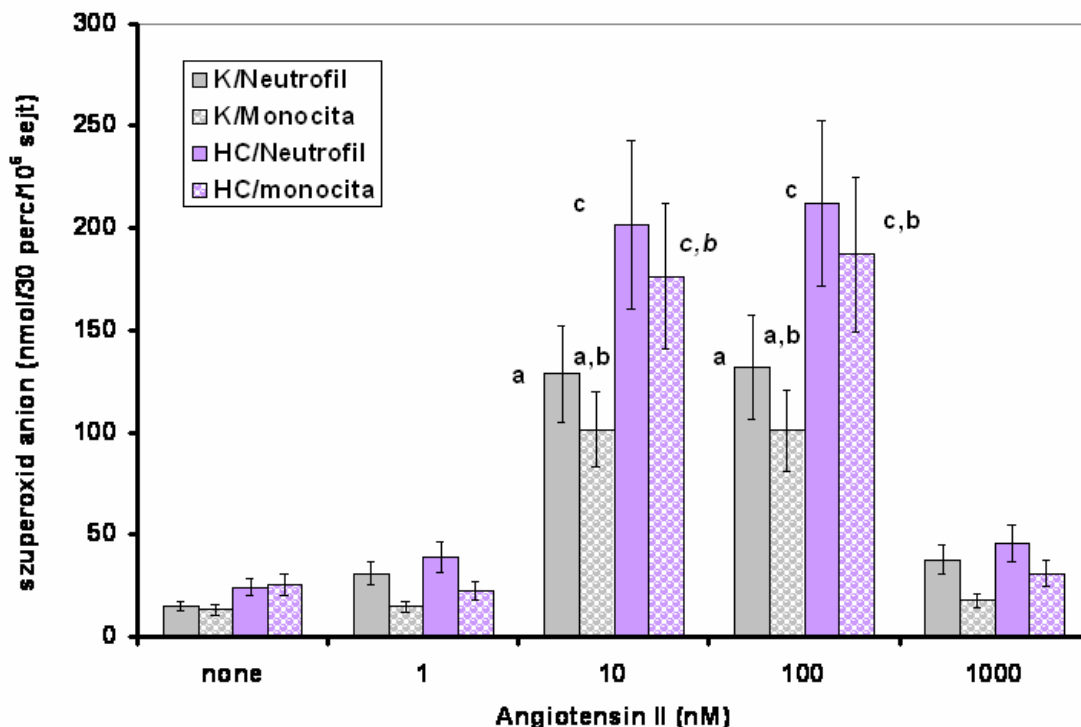
2/5. ábra. Losartan (L) és PD 123319 (PD) hatása az Ang II által kiváltott szuperoxid termelésre kontroll és HC neutrofilekben



A vizsgálatot 6 kontroll és 6 HC-ben szenvedő beteg neutrofiljeivel végeztük el. <sup>a</sup> A növekedés szignifikáns ( $P < 0.001$ ); <sup>b</sup> A gátlás szignifikáns ( $P < 0.001$ ); <sup>c</sup> A PD által okozott fokozódás szignifikáns ( $P < 0.001$ ). Rövidítések: K=kontroll, AII=angiotensin II, L=Losartan, PD=PD123319)

A következőkben Losartan és PD123319 előinkubáció segítségével megvizsgáltuk, hogy az Ang II szuperoxid termelést beindító hatásában mennyiben vesznek részt az AT1 és az AT2 receptorok (5. ábra). Kísérleteink szerint a kontroll és HC neutrofilekben az Ang II 10-100 nM koncentrációban fokozta a szuperoxid képződését, és ez egyértelműen gátlható volt Losartannal. Az AT2 receptorokat gátló PD123319 ezzel szemben a kontroll sejtekre nem fejtett ki hatást, míg a HC sejtekben az összes koncentrációban (10-1000 nM) fokozta az Ang II által kiváltott szuperoxid termelést. Ez utóbbi jelenség feltehetően arra vezethető vissza, hogy az AT2 receptorok csak a HC sejtek felszínén fordulnak elő számottevő sűrűségben, és gátlásuk esetén nem érvényesül az AT1 receptorokkal szembeni antagonizáló hatásuk.

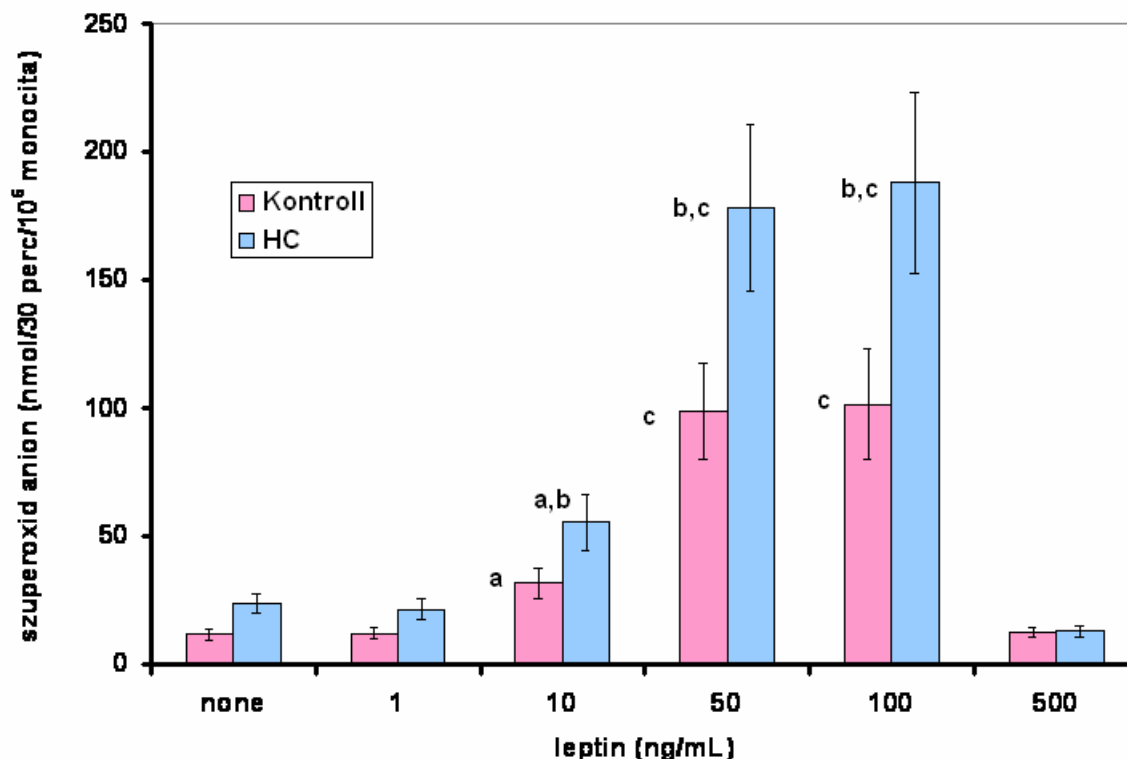
**2/6. ábra. Összehasonlító vizsgálatok kontroll és HC monociták és neutrofilek között**



A vizsgálatokban 11 kontroll és 10 HC beteg vett részt. <sup>a</sup> A fokozódás szignifikáns ( $P < 0.001$ ), <sup>b</sup> A különbség a neutrofil és a monocita értékek között szignifikáns ( $P < 0.001$ ), <sup>c</sup> A különbség a kontroll és HC csoportok között szignifikáns volt ( $P < 0.001$ ). Rövidítések: K=kontroll, HC= hiperkoleszterinémias)

A következő kísérletben a kontroll és HC betegek granulocitáinak és monocitáinak reakcióját hasonlítottuk össze a különböző Ang II koncentrációk hatására (6. ábra). A szuperoxid termelést a monociták esetében is a 10-100 nM koncentrációk fokozták csak, és a monociták esetében is magasabb volt a szuperoxid termelés a HC sejtekben. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a monociták szuperoxid termelése szignifikánsan alacsonyabb volt mind a kontroll, mind a HC csoportban, mint neutrofilekben. A továbbiakban a leptin 1-1000 ng/mL koncentrációinak hatását hasonlítottuk össze kontroll és HC monocitákban, és a szuperoxid termelést határoztuk meg (7 ábra). Eredményeink szerint a leptin 50-100 ng/mL koncentrációban képes volt fokozni a

**2/7. ábra. A leptin különböző koncentrációinak hatása kontroll és HC-ban szenvedő betegek monocitáiban a NADPH oxidáz aktiválására**

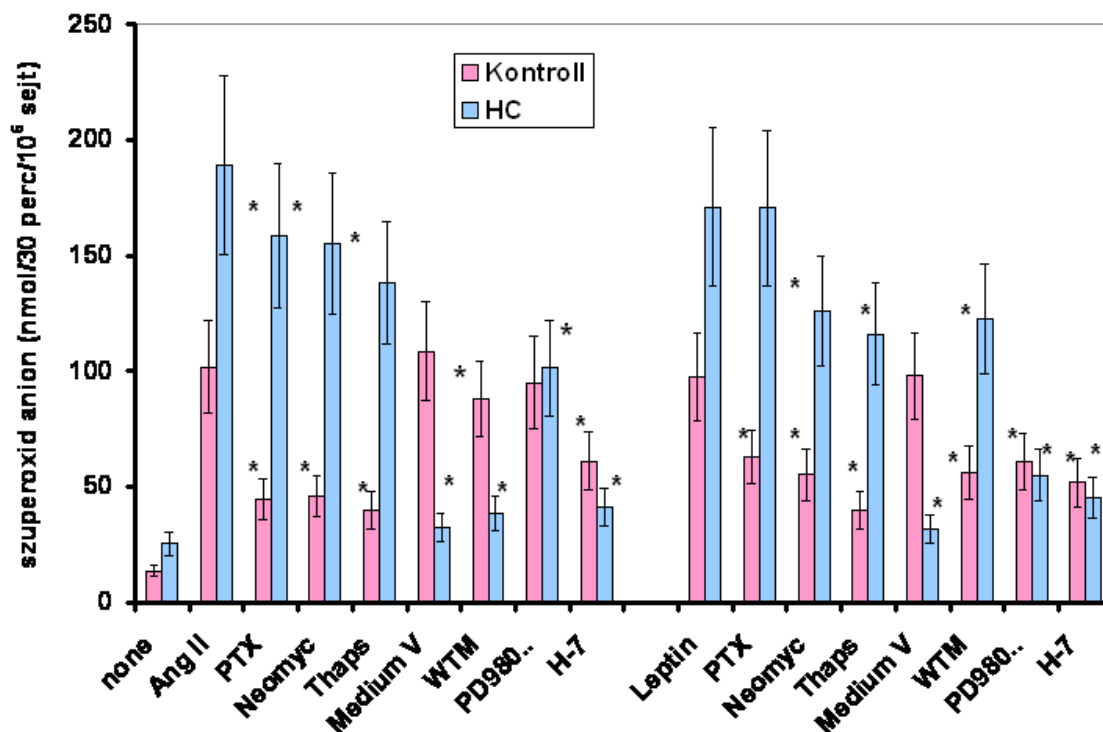


A kísérletben 8 kontroll és 8 HC beteg vett részt. <sup>a</sup> Az emelkedés szignifikáns ( $P < 0.05$ ), <sup>b</sup> A kontroll és HC csoport közti különbség szignifikáns ( $P < 0.001$ ), <sup>c</sup> Az emelkedés szignifikáns ( $P < 0.001$ ).

szuperoxid termelődést, és az Ang II-höz hasonlóan, a HC monocitákban a reakció szignifikánsan jelentősebb volt. A leptin  $< 50$  ng/mL, valamint  $> 250$  ng/mL koncentrációkban nem volt hatással a NADPH oxidáz aktiválódására.

A hasonlatosság az Ang II és a leptin in vitro hatásai között, felvetették azt a lehetőséget, hogy az egybevágó eredmények oka a már említett, az AT1R és az ObRb jeltovábbítása közötti hasonlóság, vagy éppen azonosság lehet. Ezért a következő kísérletben a monocitákat a “Módszerek” részben már ismertetett módon a Gi proteinek gátló PTX-el, a PLC-t gátló neomycinnel, az intracelluláris  $\text{Caaq1}^{2+}$  raktárakból a  $\text{Ca}^{2+}$ -t kiürítő,

**2/8.ábra. A NADPH oxidáz aktiválódás szignalizációs útjának vizsgálata kontroll és HC monocitákban az AT1 és a leptin receptorok esetében gátlószerek segítségével**



**Rövidítések:** *Ang II=angiotensin II, PTX=pertussis toxin, Neomyc=neomycin, Thaps=thapsigargin, WTM=wortmannin, PD980=PD98059* \*A gátlások szignifikánsak ( $P < 0.001$ ). A kísérletben 16 kontroll egyén és 14 HC beteg vett részt.

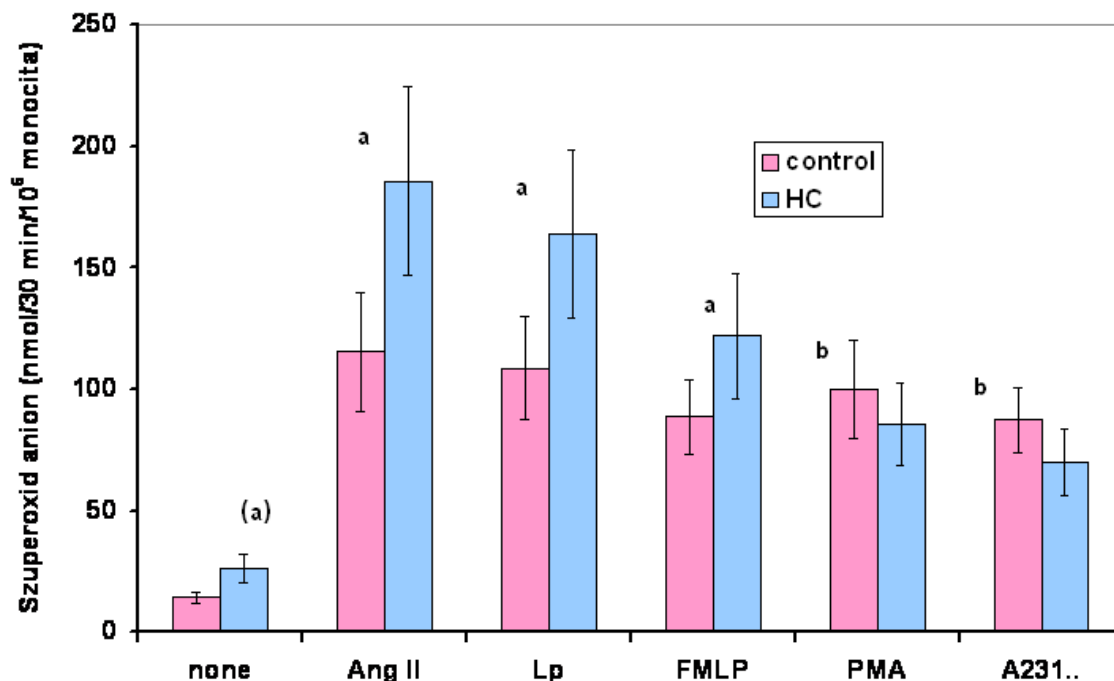
Ca-ATPase inhibitor thapsigarginnal, a mediumból történő  $\text{Ca}^{2+}$ -influx-ot gátló verapamil tartalmú Medium V-vel, a PI3K-t gátló WTM-el, a MAPK-t gátló PD98059-el, és a konvencionális PKC isoformokat gátló H-7-el kezeltük elő. Eredményeinket a **8. ábrán** foglaltuk össze. Mind az Ang II, mind a leptin esetében a kontroll monocitákban a szuperoxid generációt a PTX, a neomycin, a thapsigargin, a wortmannin és a H-7 voltak képesek csökkenteni, míg a medium V semmiféle hatást nem gyakorolt a NADPH oxidáz aktiválódására.. Ezzel szemben a HC monocitákban a legjelentősebb gátlást a Medium V-vel értük el. Ezen kívül gátló hatást fejtettek ki a wortmannin a PD98059 és a H-7, és kisebb mértékben a neomycin és a thapsigargin is. A HC sejtek esetében a PTX semmiféle hatást nem volt képes kifejteni. Az Ang II és a leptin okozta szuperoxid generáció érzékenysége között nem sok eltérés található: az figyelemre méltó, hogy a



MAPK-t gátló PD98059 a HC sejtekben mindkét peptid esetében gátolt, de a kontroll monociták szuperoxid termelésére Ang II stimulus után hatástalan volt, míg a leptin stimulust szignifikánsan gátolta. A kissé bonyolultnak tűnő eredmény magyarázata az lehet, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál a NADPH oxidáz legfontosabb aktivátora, és ennek eredetét a kontroll sejtekben az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak képezik, míg a HC sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$  az extracelluláris millióból származik, és a verapamil-szenzitív csatornákon keresztül jut be a sejtekbe. Fel kell azonban figyelni arra, hogy a HC monocitákban a szignalizáció - ha kis mértékben is - de egy másik, nevezetesen a  $\text{PI3K} \rightarrow \text{PLC} \rightarrow \text{thapsigargin-érzékeny } \text{Ca}^{2+}$  pool útvonalon is bekövetkezhet. Ennek a jelentősége azonban valószínűleg lényegesen kisebb a neuropeptidek által kiváltott káros jelenségekben.

A NADPH oxidáz aktiválódásában, mint ezt már említettük a legfontosabb szerepet a  $\text{Ca}^{2+}$  szignálon kívül a “mevalonát ciklus  $\rightarrow$  izoprenilek  $\rightarrow$  Rac1/Rac2 aktiválódás” játszhatja. Tudvalevő, hogy a mevalonát ciklus kulcsenzime a HMG CoA reductáz, és ennek inhibitorai a statinok, melyek a kardiovaszkuláris megbetegedésekben fontos gyógyszerként használatosak. Ezért a következő kísérletek során a két neuropeptid által kiváltott szuperoxid generálás függését kívántuk megvizsgálni az izoprenilációtól. Először is megvizsgáltuk, hogy az Ang II-n és a leptinen kívül más, közismerten NADPH oxidáz aktiválódást kiváltó stimulálószer hogyan hatnak a kontroll és HC monocitákra (**9. ábra**). A 9 ábra eredményei szerint az Ang II, a leptin és az FMLP esetében a HC sejtek szuperoxid termelése nagyobb, mint a kontroll sejteké, ezzel szemben a PKC-t aktiváló PMA, ill. a  $\text{Ca}^{2+}$  szignálon keresztül aktiváló Ca ionophor A23187 által kiváltott ROS képződés a kontroll monocitákban nagyobb. A **10. ábrán** a különböző stimulusok által kiváltott szuperoxid termelés lovastatinnal *in vitro* gátolható és nem gátolható arányát tüntettük fel. Már a kontroll csoportban azt találtuk, hogy csak a citokin-szerű hatással rendelkező három peptid (Ang II, leptin és FMLP) volt képes a lovastatinnal gátolható ROS képződést fokozni, a PMA és az A23187 ilyen hatással gyakorlatilag nem rendelkezett. A HC sejtekben ez a lovastatin-érzékeny ROS termelődés fokozottan érvényesült. Ebből azt a következtetést vonhattuk le, hogy az általunk használt

2/9.ábra. Különböző stimulálószer hatása kontroll és HC monociták szuperoxid anion termelődésére

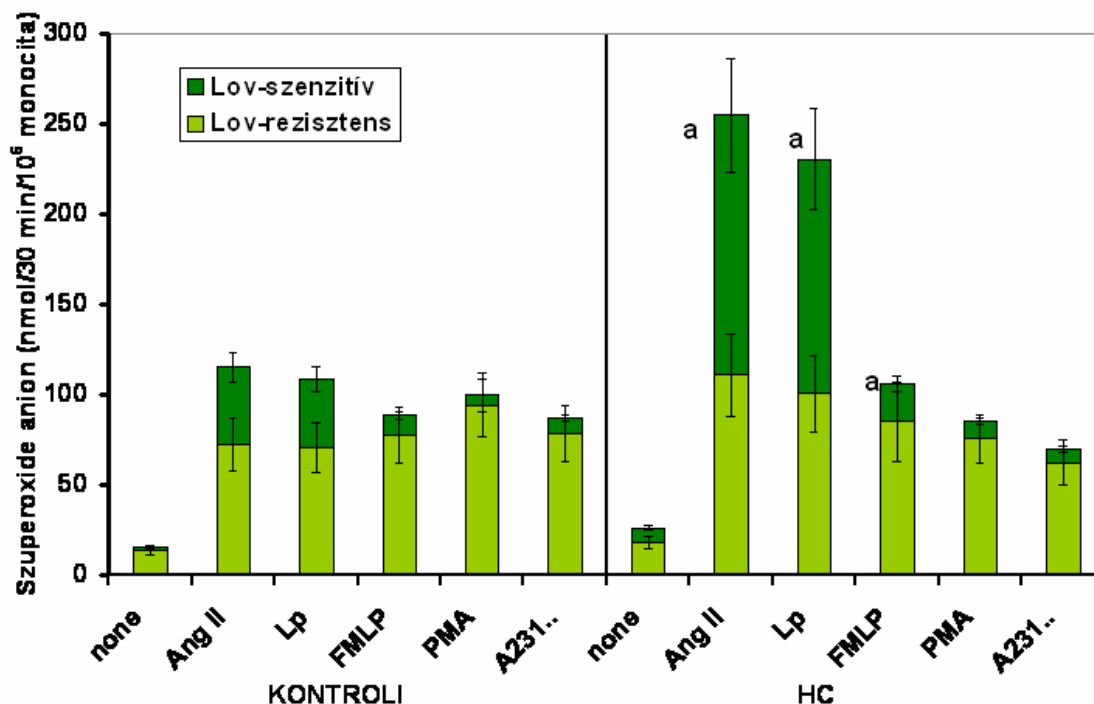


Rövidítések: HC=hiperkoleszterinémia, Ang II=angiotensin II, Lp=leptin, FMLP=formyl-Met-Leu-Phe, PMA=forbolmiristat actát, A231=A23187. <sup>a</sup> A HC sejtekben kiváltott szuperoxid termelés szignifikánsan nagyobb, mint a kontroll sejtekbe ( $P<0.001$ ), <sup>b</sup> A kontroll sejtekben kiváltott reakció szignifikánsan nagyobb, mint a HC monocitákban ( $P<0.05$ ).

neuropeptidek által kiváltott szuperoxid termelés egy része statinnal gátolható, és ez a mevalonát cikluson keresztül történő fokozódás a HC sejtekben sokkal jelentősebb.

Az eddigi eredmények mindenesetre felvetik azt a lehetőséget, hogy a statin terápia egyik fontos hatása a kardiovaszkuláris megbetegedésekben nem csupán a koleszterin szintézis gátlásán, de éppen a szabadgyök képződés csökkentésén keresztül valósul meg. Következő kísérletsorozatunkban kontroll egészséges véradók, HC-ben szenvedő 28 beteg, valamint HC-ben szenvedő és 6 hétig napi 40 mg fluvastatinnal kezelt 21 beteg 10 nM Ang II-vel stimulált neutrofiljeinek a szabadgyök képzését vizsgáltuk

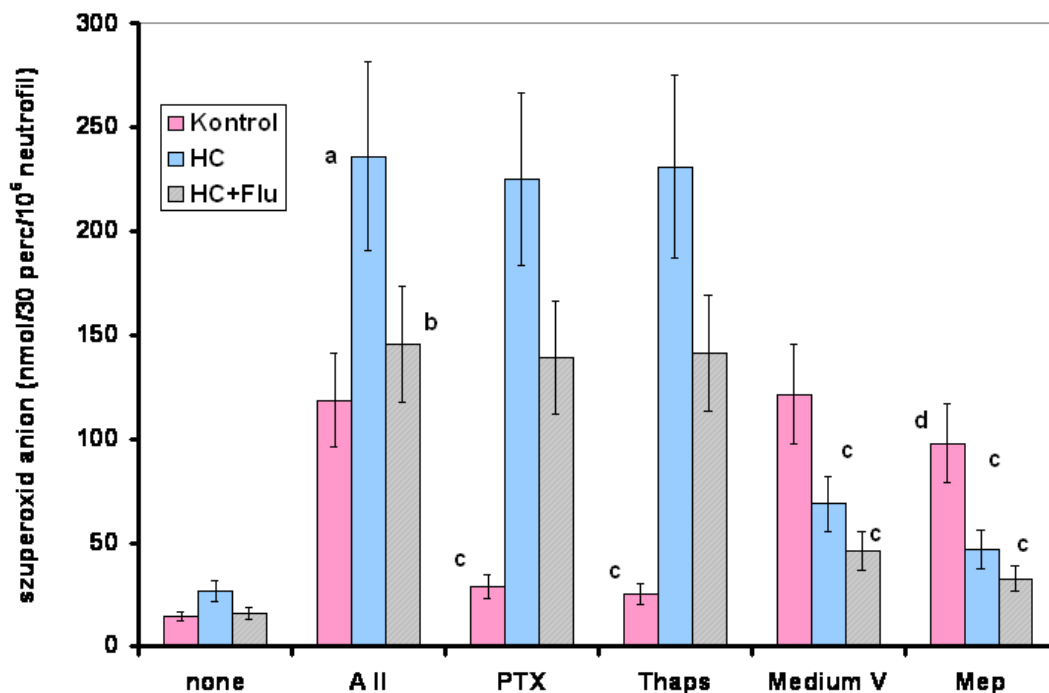
**2/10.ábra. Különböző stimulálószerrel kiváltott szuperoxid anion termelés lovastatin szenzitív és rezisztens részének alakulása kontroll és HC monocitákban**



*Rövidítések: Lov=lovastatin, Ang II=angiotensin II, Lp=leptin, FMLP= formyl-Met-Leu-Phe, PMA=phorbol ester, A231=A23187. <sup>a</sup> A Lov-szenzitív rész szignifikánsan nagyobb, mint a kontroll sejtekben ( $P<0.001$ ).*

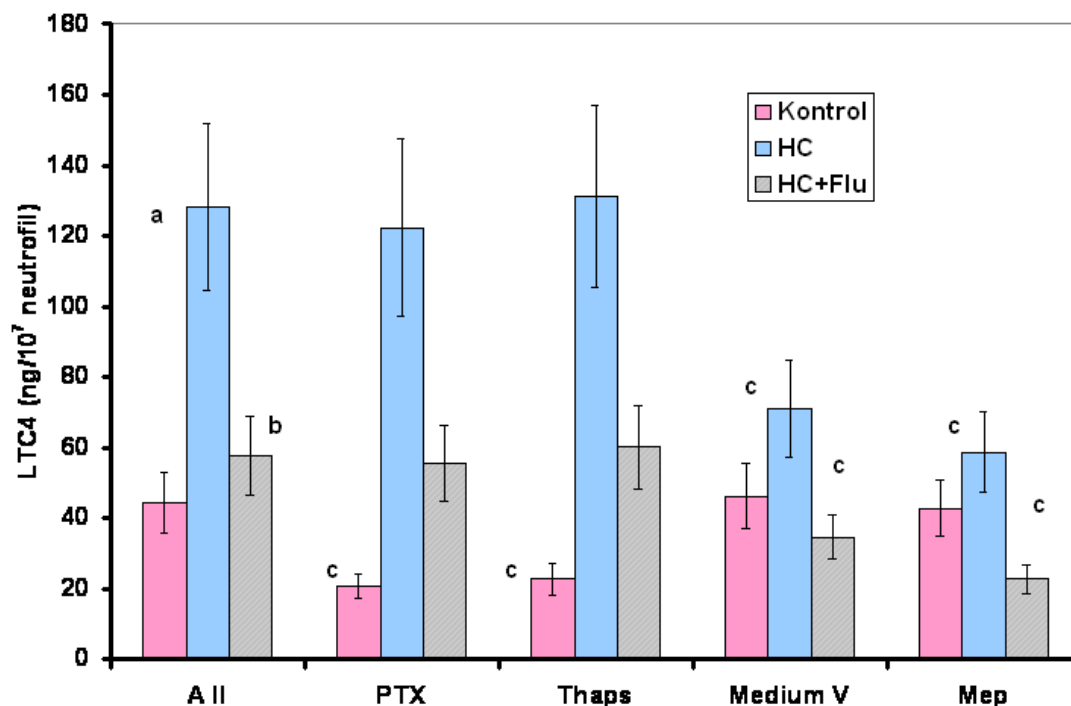
meg (11. ábra) Eredményeink szerint a fluvastatin kezelés szignifikánsan csökkentette a neutrofilek szuperoxid termelését a kezelésben nem részesült HC csoporthoz képest. A fluvastatin kezelés azonban nem változtatott azon a tényen, hogy a HC sejtekben a ROS képződést PTX-el nem, csak a Medium V-vel lehetett gátolni. A mepacrin iránti érzékenység is azonos volt a HC és a fluvastatinnal kezelt HC csoportokban. A 12 ábrán az Ang II által indukált LTC<sub>4</sub> szintéziseket tüntettük fel. A HC csoportban az Ang II által kiváltott LTC<sub>4</sub> szintézis szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll sejtekben, és a fluvastatin kezelés jelentősen csökkentette az LTC<sub>4</sub> mennyiségét. A gátlások jellegén azonban a fluvastatin terápia nem változtatott, amennyiben a kezelés ellenére a nem-kezelt HC csoporthoz hasonlóan csak a Medium V és a mepacrin volt hatásos.

2/11.ábra. Ang II (10 nM) hatása a szuperoxid anion termelésre egészséges kontroll egyének, HC-ben szenvedő kezeletlen és fluvastatinnal kezelt betegek neutrofiljeiben.



Rövidítések: HC=hyperkoleszterinémiában szenvedő betegek, HC+Flu=fluvastatinnal kezelt HC betegek, AII=angiotensin II, PTX=pertussis toxin, Thaps=thapsigargin, Medium V= verapamil tartalmazó Ca<sup>2+</sup> mentes medium, Mep=mepacrin. <sup>a</sup>A szuperoxid termelés nagyobb, mint a kontroll és <sup>b</sup>Flu+HC csoportban (P<0.001), <sup>b</sup>A szuperoxid termelés nagyobb, mint a kontroll csoportban (P<0.001), <sup>c</sup>A gátlás szignifikáns (P<0.001), <sup>d</sup>A gátlás szignifikáns (P<0.05).

2/12.ábra. Ang II (10 nM) hatása a leukotrién C4 szintézisre egészséges kontroll egyének, HC-ben szenvedő kezeletlen és fluvastatinnal kezelt betegek neutrofiljeiben.



Rövidítések: LTC<sub>4</sub>=leukotriénC<sub>4</sub>, Flu=fluvastatin terápia alkalmazása, AII=angiotensin II, PTX=pertussis toxin, Thaps=thapsigargin, Medium V=varapamil tartalmazó Ca<sup>2+</sup> mentes tápfolyadék, Mep=mepacrin. <sup>a</sup> A HC csoportban az LTC<sub>4</sub> termelés szignifikánsan magasabb, mint a kontroll és fluvastatinnal kezelt csoportokban (P<0.001), <sup>b</sup> Az LTC<sub>4</sub> termelés szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoportban (P<0.05), <sup>c</sup> A gátlás szignifikáns (P<0.001).

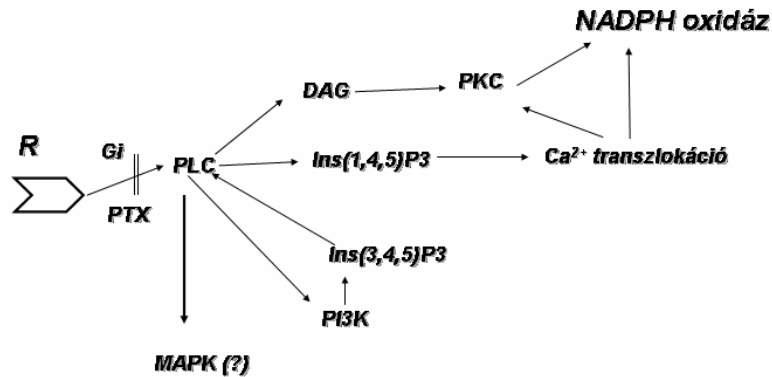
## 2.5. A kísérleti eredmények megbeszélése

Lényegében először vizsgáltuk meg az Ang II koncentráció függő és bifázisos hatását a szabadgyök képződésre. A szuperoxid termelődés esetében ez természetesen nem értékelhető, mivel a nyugvó granulocitákban a NADPH oxidáz inaktív, disszociált állapotban van jelen, és a mérhető érték csak 10-15 nmol/30 min/10<sup>6</sup> sejt. A nyugvó HC

sejtekben mérhető aktivitás ennek kb. a kétszerese. Ezt a tényt mi nem értékelnénk túl, hiszen a nyugvó sejtekben mérhető „alapjárat” feltehetően csak műtermék, ami a sejtseparálás során kialakuló és elkerülhetetlen sejtpusztulás, és az azt követő autofagocitózis eredménye. Ezért nem tudunk egyetérteni Mohácsi és mtsai (1996) véleményével, akik szerint ateroszklerózisban a resting granulociták szuperoxid termelése fokozott. Azzal sem tudunk egyetérteni, hogy a FMLP-vel stimulált HC granulociták szuperoxid termelése alacsonyabb, mint a kontroll sejteké (Harangi és mtsai, 2002). Ennek különben ellentmondanak Bonneaut és mtsai, (1996) vizsgálatai is, akik kimutatták, hogy LDL jelenlétében a granulociták FMLP-vel kiváltott szuperoxid termelése éppen fokozódik, feltehetően a sejtek membrán-koleszterin tartalmának növekedése következtében. Visszatérve az Ang II koncentráció függő in vitro hatásához, úgy tűnik, hogy a hormon a szuperoxid termelést csak egy viszonylag szűk tartományban - 10 - 100 nM koncentrációban - képes fokozni, a nagyobb koncentrációk lényegében hatástalanok maradnak. Ezekben a kísérletekben megerősítettük azt a régebbi eredményünket, hogy a HC neutrofilek szuperoxid termelése kb. 75%-os emelkedést mutat. Ezzel szemben a hormon PLA<sub>2</sub>-t aktiváló hatása esetében a > 100 nM koncentrációk esetében kontroll sejtekben csökken az AA kaszkád aktivitása, ill. az LT szintézis. Fontos eredménynek tartjuk, hogy a koncentráció emelésével a HC sejtekben arányosan nő a leukotrién szintézis mértéke. Ennek oka feltehetően az enzimaktiválódás eltérő voltában kereshető. Azt fontosnak tartjuk azonban kiemelni, hogy mivel a lokálisan termelődő Ang II koncentrációjáról a szervezetben fogalmunk sincs, az önszabályozóként is ható koncentráció-függés az AA-kaszkád esetében, éppen a HC-ben szenvedő betegekben nem működik.

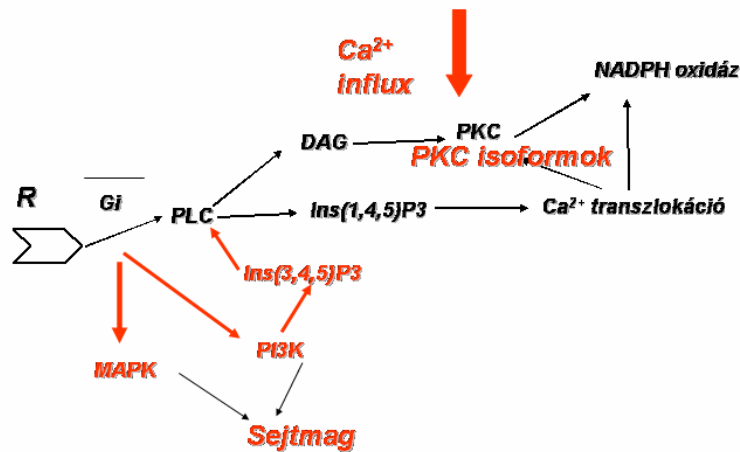
A továbbiakban azt is sikerült tisztáznunk, hogy a 10 µM losartan szinte teljesen kivédi az Ang II hatását mind a kontroll, mind a HC sejtekben, míg az AT<sub>2</sub> receptor gátló PD123319 a kontroll sejtekben hatástalan, de a HC sejtekben fokozza az Ang II hatását. Ez azt jelenti, hogy a már említett irodalmi adatok alapján, (Steckelings és mtsai, 2005) az AT<sub>2</sub> receptorok a kardiovaszkuláris megbetegedésben szenvedők neutrofiljein is jelen vannak, és védő receptorként működnek. Gátlásuk esetén, az AT<sub>1</sub> receptoron keresztül érvényesülő káros ROS képződés így csak fokozódik.

A következőkben a leptinnek a NADPH oxidáz aktiválásra kifejtett hatását vizsgáltuk, és ehhez csak monocitákat tudtunk használni, mivel Zarkesh-Esfahani és mtsai (2004) szerint a granulocitákra a hormon csak indirekt hatást képes kifejteni. Az Ang II-vel stimulált kontroll és HC monociták teljesen azonos módon reagáltak, mint a neutrofilek, csak kb. 15-20%-al kisebb volt az aktivitásuk. A leptinnel elérhető NADPH oxidáz aktiválás hasonló volt az Ang II hatásához: egy bizonyos 50-100 ng/ml koncentrációban fokozta a szuperoxid termelést és a HC sejtekben ez a hatás nagyobb volt. A különböző gátlószerek alkalmazásával meghatározott szignál utak esetében azt találtuk, hogy a kontroll és a HC monocitákban a jeltovábbítás eltért egymástól, míg az Ang II és a leptin szignalizáció lényegében nem különbözött. A gátlásos in vitro kísérletek eredményeként a kontroll monocitákban az alábbi jeltovábbítást tartjuk lehetségesnek:



A régebbi elképzelésektől ez a modell annyiban tér el, hogy a WTM esetében is találtunk gátló hatást, ezért feltételezzük, hogy ez az enzim a keltkező Ins(3,4,5)P3 révén részben a PLC, részben pedig a PKCξ aktiválásán keresztül is képes hatni a NADPH oxidázra.

A HC monociták jeltovábbítását illetően az alábbi modellt tartjuk lehetségesnek.



A feketével jelzett útvonal nem a PTX-szenzitív Gi proteinen keresztül halad, mivel ez a HC sejtekben nem működik. A Ca<sup>2+</sup> transzlokáció az intracelluláris raktárakból a WTM-érzékeny PI3K aktiválódásának és a felszabaduló Ins(3,4,5)P3 PLC-t aktiváló hatásának az eredménye. A pirossal jelzett Ca<sup>2+</sup>-influx a verapamil-szenzitív csatornákon keresztül a HC sejtekben kétségtelenül a legjelentősebb szignalizáció: ezenkívül még megemlíthető a PKC inhibitor H-7 és a MAPK inhibitor PD98059 erős gátló hatása is.

További kísérleteinkben a Rac1 szabályozó hatását vizsgáltuk meg különböző NADPH oxidázt aktiváló stimulusok hatására kontroll és HC monocitákban, és eredményeink szerint csak az Ang II és a leptin által létrehozott szuperoxid generáció köszönhető számottevően a lovastatinnal gátolható Rac1 isoprenilációnak. Egy kislekció, éppen szignifikáns Rac isopreniláció mutatható ki a kemotaktikus peptid FMLP-stimulus után, de a PMA-val, ill. az A23187-el stimulált sejtekben a lovastatin semmiféle gátló hatást nem fejt ki. Fontos adat volt számunkra, különösen a munka folytatása szempontjából, hogy a HC monocitákban a Rac1-en keresztül történő szuperoxid termelés fokozódás lényegesen nagyobb volt, mint a kontroll sejtekben. Eredményeinkből az is kiderült, hogy a HC sejtekben mért fokozott szuperoxid kiáramlás főleg az Ang II és a leptin stimulusok után volt mérhető, míg az FMLP-stimulus után



csak kisfokú volt a HC sejtek hiperreaktivitása. A PMA és Ca ionofór esetében tényleg a kontroll sejtekben mértünk magasabb szuperoxid produkciót.

A statinok hatását a HC sejtekben talált fokozott szuperoxid termelésre ex vivo kísérleteinkkel is alá tudtuk támasztani, amikor fluvastatinnal 6 hétig kezelt betegekben hasonlítottuk össze az Ang II-stimulus által kiváltott szuperoxid és a LTC<sub>4</sub> termelődést. A fluvastatin ugyan csökkentette a szabadgyök képződést, de a kóros jeltovábbítási útvonalon nem volt képes változtatni. Mind a HC, mind fluvastatinnal kezelt HC csoportban a szignalizációban a Ca<sup>2+</sup>-influx és a PLA<sub>2</sub> aktiválódás játszott szerepet a NADPH oxidáz aktiválódásában.

## **2.6. A 2. fejezet összefoglalása**

*Az Ang II humán granulocitákban és monocitákban, míg a leptin monocitákban in vitro képes fokozni a szabadgyök termelődést. Ez a hatás koncentráció függő, és a HC sejtekben jelentősebb, mint a kontroll sejtekben. Ennek feltételezhető oka, hogy a HC sejtekben a Rac1/Rac2 mevalonát cikluson keresztül történő isoprenilációja sokkal jelentősebb szerepet játszik a HC leukocitákban, mint a kontrollokban. Erre vezethető vissza a statin-kezelés sikeres alkalmazása is. A jeltovábbítás útja a HC sejtekben megváltozik, mégpedig az Ang II és a leptin esetében azonos módon. A HC sejtek szignalizációjában a verapamil-szenzitív Ca<sup>2+</sup> csatornákon keresztüli Ca<sup>2+</sup>-influx, az PI3K aktiválódásán keresztül érvényesülő kerülőútvonal, valamint a Rac1/Rac2 aktiválódás játszik fontos szerepet a NADPH oxidáz aktiválódásában.*

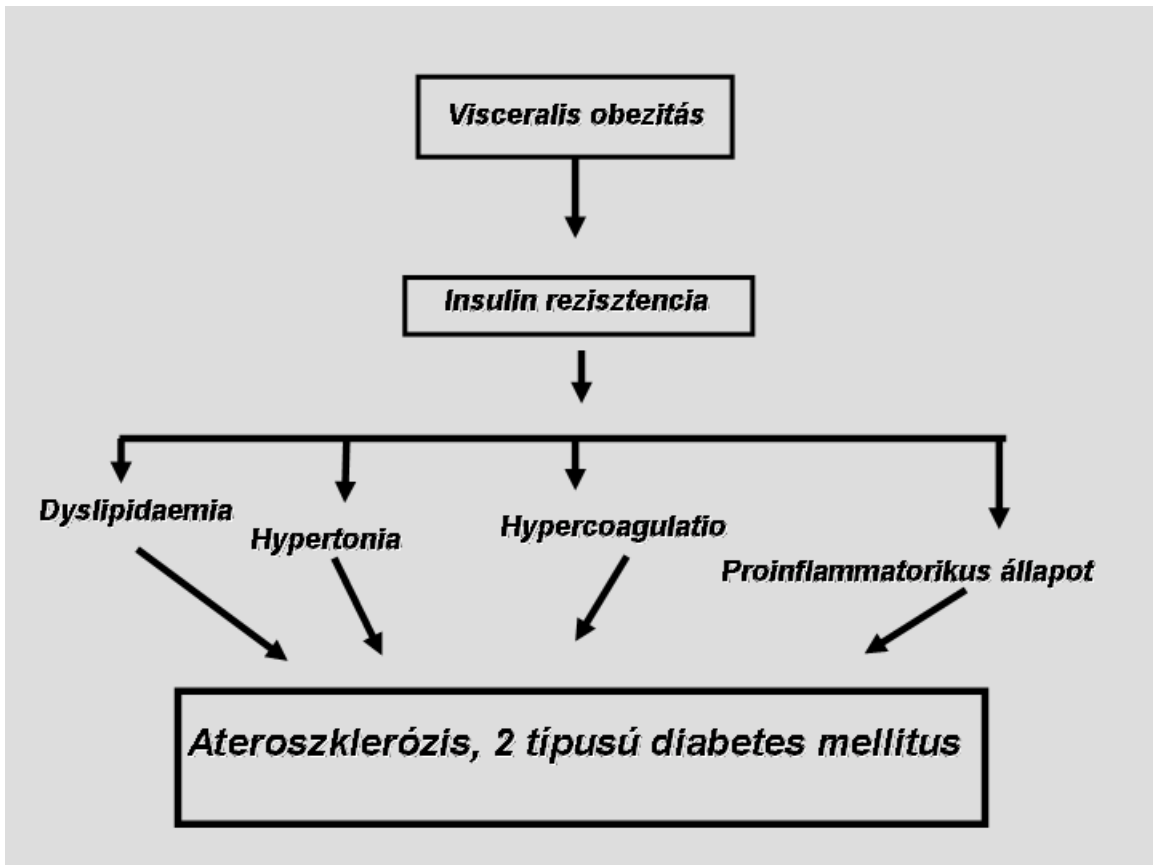
## **3.0. Kapcsolat a neuropeptidekkel stimulált leukociták szabadgyök termelése és a sejtmembrán között**

### **3.1. Irodalmi előzmények**

#### **3.1.1. A metabolikus szindróma (MS)**

A metabolikus szindróma elnevezést Reaven (1988) használta először, bár a gondolat már az 1920-as évektől fogva ismert volt (Kylin, 1923). Az egyes faktorok sorrendje, jelentősége időnként és leírójukként változik, de a lényeg megmarad. Nevezetesen, a diabetes, a magasvérnyomás, az abdominális obezitás, a diszlipidémia és a trombótikus hajlam, amely együtt jár a hiperinsulinémiával és az insulin rezisztenciával. Függetlenül attól, hogy mi a legmegfelelőbb sorrend, ezeket az entitásokat az is egyesíti, hogy direkt rizikó faktorai az ateroszklerózisnak és a myocardialis infarctusnak. Éppen ebből az okból az MS ma az egyik legfontosabb népegészségügyi probléma (Fülöp és mtsai, 2006). A WHO szerint az MS diagnosztikus kategória, melynek középpontjában a glükóz anyagcsere áll (WHO, 1999). Az MS patogenezisének a meghatározása azért olyan nehéz, még ennyi éves intenzív kutatás után is, mivel multietiológiás megbetegedés lévén, kialakulásában szerepet játszik a környezet, a táplálkozási szokások, az életmód és a genetika. Mégis, jelenleg kialakult egy olyan nézet, hogy a középpontban az insulin rezisztencia és az abdominális típusú elhízás áll (Carr és mtsai, 2004). Az insulin rezisztencia következménye a hiperinsulinémia, amely egyenes úton vezet a diszlipidémiához (Taskinen, 2005), a vérnyomás emelkedéséhez a nitrogénoxid szintézis csökkenésén keresztül, valamint a véralvadás fokozódásához (Montagnani és mtsai, 2002). Így, az **1. ábrán** csak egy lehetséges variációját tüntettük fel az okozati összefüggéseknek (Fülöp és mtsai, 2006). Számunkra az MS különböző entitásainak vizsgálata azért volt olyan fontos, hiszen a munkacsoport régebbi vizsgálatain során pl. 2 típusú diabetes mellitusban szenvedő normolipémiás valamint nem diabeteses diszlipidémiás betegek fehérvérsejtjeinek intracelluláris jeltovábbításában ugyanazokat az eltéréseket találta (Fóris és mtsai, 1999, Paragh és mtsai, 2001, Paragh és mtsai, 2002).

3/1. ábra. A metabolikus szindróma kialakulásának egyik lehetősége - vázlatosan

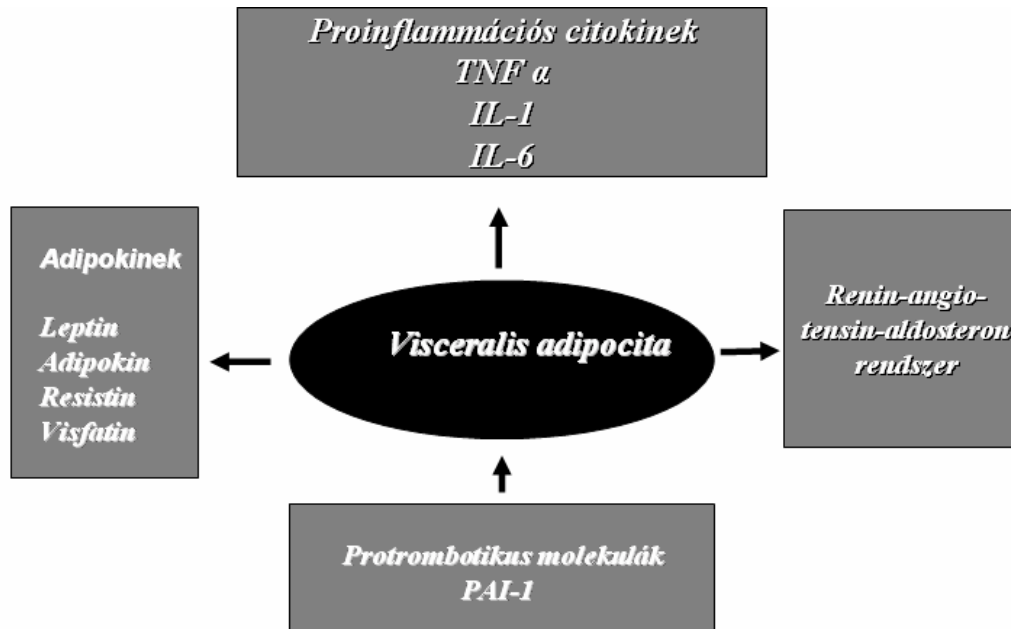


Meg kell állapítanunk, hogy pillanatnyilag, ez a civilizált világban már epidemiológiai szempontból is kiemelkedő fontosságú népbetegség, etiológiai szempontból bizonytalan. Azt is mondhatjuk, hogy az MS talán inkább egy koncepció, amely mindenesetre ilyen szempontból a klinikumban is jól használható. Még hasznosabb azonban ez a koncepció a kutatómunkában, hiszen ha ezek a kórképek valamilyen szinten, de közös nevezővel rendelkeznek, az igazán hatásos terápia beavatkozásnak ezt, vagy ezeket a pontokat kellene megcéloznia.

### 3.1.2. Az obezitás jelentősége

A metabolikus szindróma kialakulásában csaknem az összes teória igen előkelő pozícióban foglalkozik az obezitással, konkrétan a visceralis típusú elhízással. Több mint félszáz éve ismert, hogy a zsírszövet, mint endokrin szerv, szabályozója a táplálékfelvételnek (Kennedy, 1953). A visceralis zsírszövet adipocitái ugyanis különös módon, lényegében endokrin szervként működnek. Az általuk termelt hormonok - vagy faktorok egy része kizárólag, vagy legalább értékelhető mennyiségben a zsírszövetben keletkezik, míg pl. az általuk termelt proinflammációs citokinek általában az immunrendszer termékei, amelyeket a zsírszövet is képes termelni (2. ábra).

**3/2. ábra. A visceralis adipociták által termelt hormonhatású faktorok**



Az adipociták rendkívül fogékonyak a különböző akut és krónikus gyulladások során felszabaduló „cytokine I superfamily” tagjaival szemben és ezeknek hatására a zsírszövetben további proinflammációs faktorok szabadulnak fel, melyek az érfalat károsító hatásuknál fogva maguk is résztvesznek az ateroszklerózis kialakulásában (Berg és Scherer, 2005). Ezek a faktorok többek között az IL-1, IL-6, C-reactive protein, TNF $\alpha$ , P-selectin, PAI-I, ICAM-I, VCAM-I, Ang II, VEGF, serum amyloid A3 (SAA3). Ezek a

faktorok direkt vagy indirekt úton mind résztvesznek az ateroszklerózis és nem kevésbé az insulin rezisztencia kialakulásában (Ziccardi P és mtsai, 2002; Kern és mtsai, 2001). Nem elhanyagolható, hogy a zsírszövetben termelődnek a renin-angiotensin rendszer tagjai is (Fleming és mtsai, 2006), melyek közül az AT1 receptoron keresztül ható hormon káros hatásait kardiovaszkuláris megbetegedésekben a **2.1.1 fejezetben** már tárgyaltuk.

Az adipokinek közül legelőször a leptint fedezték fel, mely hormon már szintén tárgyalásra került a **2.1.2. fejezetben**. A leptin, valamint a zsírszövetben is termelődő többi káros hatású és előbb felsorolt citokinnel együtt a resistin, és az adiponutrin is fokozni képesek az insulin rezisztenciát, a hipertóniát, a diszlipidémiát, egyszóval képesek arra, hogy az obezitás talaján előkészítsék az ateroszklerózis kialakulását. A leptin mennyisége a keringésben arányos a zsírszövet mennyiségével, és kifejezetten proinflammatorikus hatást fejt ki (Lau és mtsai, 2005). Ki kell azonban emelni, hogy az adiponectin, mely szintén a zsírszövetben termelődik, éppen ellentétes hatást vált ki: először is szérumkoncentrációja ellentétesen változik a zsírszövet mennyiségével, vazodilatációt és az insulin iránti érzékenység fokozódását segíti elő (Higashiura és mtsai, 2004). Hasonló, kifejezetten a kardiovaszkuláris megbetegedésekkel szemben védőhatást biztosító hormonnak tekinthető az apelin, és a viszonylag újonnan felfedezett hormon, a visfatin (Tatemoto és mtsai, 1998; Fukuhara és mtsai, 2005).

Az elmondottak alapján tényleg jogosnak látszik az obezitás káros, és egyben centrális szerepének a hangsúlyozása az ateroszklerózis patomechanizmusában. Ez annál is inkább fontos kérdés, mivel a civilizációs táplálkozás és életvitel újabban Európa és Amerika legtöbb államában súlyos problémaként veti fel az elhízást, sajnos már nemcsak fiatal felnőtt, de gyermekkorban is. Az obezitás elleni küzdelemben, nemrég a Zemel munkacsoport kutatásai (Zemel és mtsai, 2000) vetettek fel egy új lehetőséget, mely egyben a calcium anyagcsere és az obezitás szoros kapcsolatára is ráirányította a figyelmet. A fokozott calcium bevitel fogyaszt előidéző hatásának az alapja, hogy a keringésben jelenlevő 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> szintje szabályozni képes a szövetekben a zsírraktározást (Shi és mtsai, 2001). Ez a vitamin specifikus receptorokkal rendelkezik az adipociták felszínén, és képes fokozni a Ca<sup>2+</sup> beáramlást a sejtekbe. A szerzők szerint ez az oka annak, hogy obezitásban az adipociták [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> szintje jelentősen megnő. A

vitamin receptorainak expressziója megtalálható a monocita/makrofág rendszer sejtjeinek felszínén is, és fontos szerepet játszanak pl. az osteoclastok kialakulásában (Kreutz és mtsai, 1993). A magas  $[Ca^{2+}]_i$  szint ugyanakkor szimulálni tudja az agouti gén által regulált agouti protein hatását, azaz jelentősen képes gátolni az adipocitákban a lipolízist és fokozni a fatty acid synthase (FAS) aktivitását. Ez együttesen fokozott zsírlerakódást idéz elő a zsírszövetben (Shi és mtsai, 2001). A Zemel munkacsoport szerint azonban a magas calcium tartalmú diéta, különösen ha a calcium a tejtermékekkel jut a szervezetbe, jelentősen képes csökkenteni az 1,25-dihydroxy  $D_3$  szintet a szervezetben, és így az  $[Ca^{2+}]_i$  szintet is a zsírsejtekben melynek eredményeként nő a lipolízis és csökken a FAS aktivitás (Sun és Zemel, 2004). A Zemel munkacsoport kísérleteinek további jelentősége, hogy az obese egyének egyéb sejtjeiben is megemelkedett  $[Ca^{2+}]_i$  szintén kóros reakciókat vonhat maga után, melyek jelentősége jelenleg még részben ismeretlen.

### **3.1.3. A sejtmembrán változásai metabolikus szindrómában**

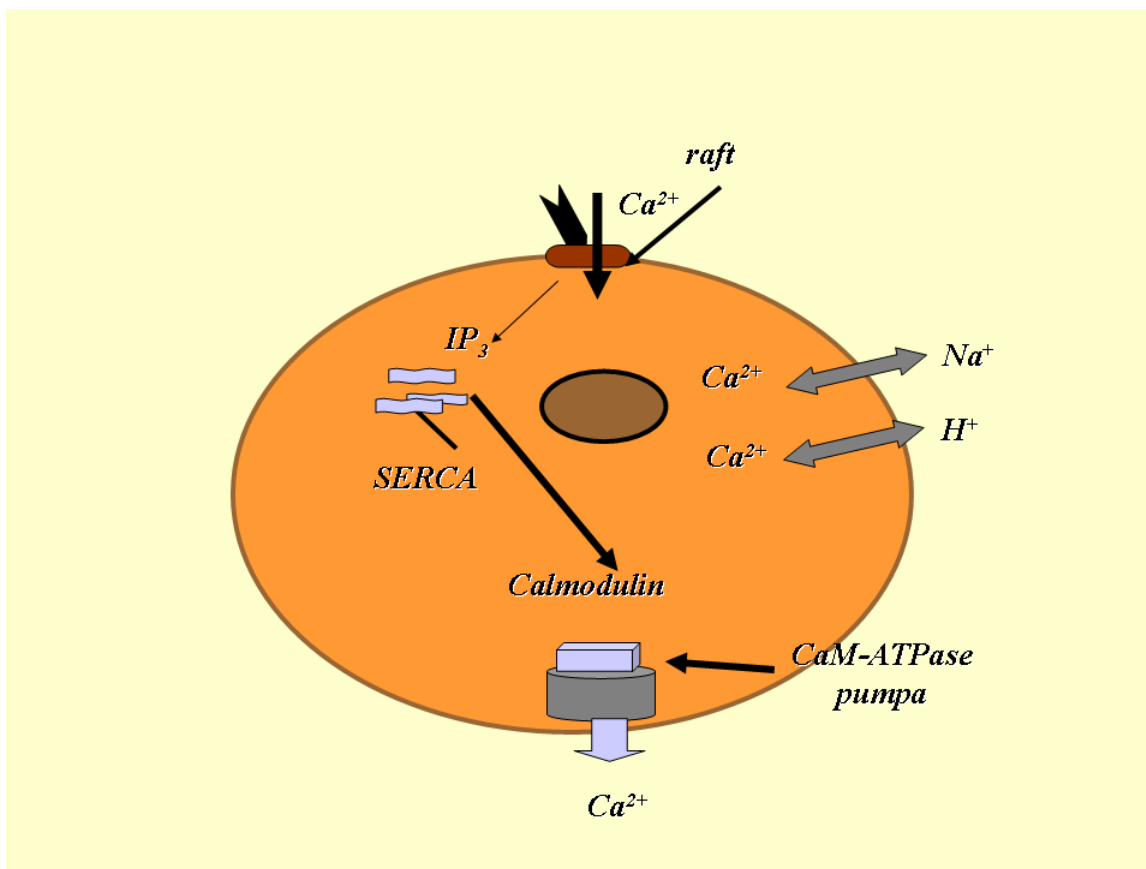
Régóta ismert az a tény, hogy a kardiovaszkuláris megbetegedésekben szenvedő betegek keringésében a fehérvérsejtek, vörösvérsejtek és trombociták membránjában jellemző változások következnek be. Ezek a változások elsősorban a membránban jelenlevő, koleszterinből és szfingolipidekből álló ún. „raft”-oknak az átalakulásából származnak. Ezek a lipid raft-ok magukba foglalnak számos G proteinhez kötődő receptort, mint amilyen az FMLP kemotaktikus peptidé, az Ang II-é és a leptiné is (Ma és mtsai, 2007). Az átalakulás lényege, hogy atherosclerosisban illetőleg „aging”-ben a sejtek membránjának lipid raft-jaiban a koleszterin tartalom megnő, és ez a citokin, és citokinszerű receptorok szignalizációját megváltoztatja (Fülöp és mtsai, 2004; Fülöp és mtsai, 2006). A lipid raft-ok koleszterin tartalmának növekedése, pl. hiperkoleszterinémiában, gátló hatása a szignál transzdukcióra abban jut kifejezésre, hogy megszűnik a  $Ca^{2+}$  mobilizáció az intracelluláris raktárakból, és ehelyett a  $Ca^{2+}$ -influx következik be az agonista hatására (Kannan és mtsai, 2007).

### **3.1.4. Az intracelluláris calcium homeosztázis**

Az intracelluláris calcium homeosztázis szerepe azonban a metabolikus szindrómában sokkal fontosabb és bonyolultabb folyamat eredménye. Amennyiben elmondhatjuk, hogy az intracelluláris szignalizáció legfontosabb eredményei a Berridge-

Irvine iskola, a NADPH oxidáz szabályozása Bokoch és mtsai, az obezitás és a calcium bevitel kérdése a Zemel munkacsoport tevékenységének köszönhető, akkor joggal mondhatjuk el, hogy amit ma az intracelluláris szabad calcium szabályozásának szerepéről tudunk az a Carafoli munkacsoport eredménye. A nem vezető membránnal rendelkező sejtekben, mint amilyenek az általunk vizsgált monociták vagy neutrofilek is, az intracelluláris szabad calcium szint viszonylag alacsony ~ 100-200 nM koncentráció körül oszcillál. A  $[Ca^{2+}]_i$  egyensúly szabályozását és ennek jelentőségét a szervezetben éppen a Carafoli munkacsoport eredményei alapján kíséreljük meg számunkra legfontosabb elemeiben összefoglalni (Carafoli, 2005; Guerini és mtsai, 2005). Az  $[Ca^{2+}]_i$  megemelkedése gyors folyamat, amelyet különböző stimulusok váltanak ki. Azok a receptorok, melyek  $G_i$  proteinnel kötődnek a PLC-hez, ennek az enzimnek az aktiválódása révén Ins(1,4,5)P3-t szabadítanak fel (Berridge és Irvine, 1989). Az Ins(1,4,5)P3 specifikus receptoraihoz kötődve, melyek az endoplasmás reticulum membránján helyezkednek el, képesek csatornát nyitni, és a  $Ca^{2+}$  rilízt előidézni ebből a legfőbb intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktárból. Amennyiben az intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktárak kiürülnek, a sejtek felszíni membránjában elhelyezkedő un. L ( $\alpha 1$ ) csatornák nyílnak meg, és a  $Ca^{2+}$  az extracelluláris térből áramlik be a sejtbe. A nem-vezető membránnal rendelkező sejtekben ez a folyamat nem teljesen tisztázott, feltehetően egy segédfehérje képes a folyamatot elősegíteni. A citoplazmában a  $Ca^{2+}$  -t egy fehérje - a calmodulin köti meg, mely egyben szabályozója is annak, hogy a sejtben tartósan ne haladjon meg az  $[Ca^{2+}]_i$  szint a szokásos mértéket. A tartósan magas  $[Ca^{2+}]_i$  szint ugyanis apoptotikus hatással rendelkezik. A nem-vezető membránnal rendelkező sejtekben egy finom mechanizmus gondoskodik a szignál után a  $Ca^{2+}$  extrusio-ról, és ez a calmodulin-dependens  $Ca^{2+}$ -ATPase. Ez a pumpa nagy affinitással tud  $Ca^{2+}$ -t kötni, de a kapacitása kicsi, és csak finom kiegyenlítésekre képes. Ezzel szemben a membrán belső oldalához kötött  $Na^+/Ca^{2+}$ , ill a  $H^+/Ca^{2+}$  exchange protein nagy teljesítménnyel képes a  $Ca^{2+}$  eltávolítására, ezzel szemben az affinitása kisebb, csak akkor képes működni, ha legalább 1  $\mu M$  a membránközeli  $Ca^{2+}$  koncentrációja. Ez pedig leginkább a vezető membránnal bíró sejtekben fordul elő, tehát ezeknek az exchange proteineknek is ott van a legfontosabb szerepük. Az  $[Ca^{2+}]_i$  egyensúly fenntartásában részvevő komponensek vázlatos rajzát a **3. ábrán** tüntettük fel.

**3/3. ábra. Az intracelluláris szabad calcium egyensúly megtartásának egyszerűsített vázlata nem-vezető membránnal rendelkező sejtekben**



Itt kell megemlítenünk egy általunk is gyakran használt gátlószer, a thapsigargin jelentőségét a nem-vezető membránnal rendelkező sejtek calcium homeosztázisának kutatásában. A thapsigargin, melyet egy *Thapsia garganica* L nevű növényből állítotak elő, eredetileg tumor promoterként volt ismeretes, és csak 1985-ben fedezték fel SERCA gátló természetét (Ali et al., 1985). További kísérletek során tisztázták, hogy a thapsigargin a nem-vezető membránnal rendelkező sejtekben gátolja az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak membránjának SERCA aktivitását, és ennek eredményeként az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak kiürülnek. Ennek a kiürülésnek a következménye a „store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry”, mely a sejtmembránban az L típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák megnyílását, és



egy gyors  $\text{Ca}^{2+}$  szignált eredményez. Ezt követi, mint következmény egy ugyancsak gyors szuperoxid anion rilíz a fagocita sejtekből (Treiman és mtsai, 1998; Jin és mtsai, 2006). Az a tény, hogy hiperkoleszterinémiával járó kórképekben az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint a trombocitákban megemelkedik, régóta ismert tény (Le Quan-Sang és mtsai, 1987). Legújabbban viszont Kannan és mtsai (2007) azt mutatták ki, hogy ateroszklerózisban a koleszterinben feldúsult raft-okban olyan  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák képesek megnyílni a plazmamembránban, amelyek a citokinszerű receptorok aktiválódásakor az agonisták hatására nagymennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  influx-ot eredményeznek.

Az ma már ismeretes, hogy az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  egyensúlyért felelős enzimek, fehérjék, pumpák és csatornák rendkívül érzékenyek a szabadgyökökkel, különösen a szuperoxid anionnal szemben (Kourie, 1998).

### **3. 2. Közvetlen kísérleti előzmények és célkitűzés**

#### **3.2.1. A munkacsoport kísérletei, melyek a jelen munkához elvezettek**

A munkacsoport első intracelluláris calcium-egyensúlyal foglalkozó dolgozatai már 1987-ben megjelentek: ezeknek a munkáknak talán egyik legfontosabb eredménye volt, hogy idős (> 65 éves) egészséges emberek resting monocitáiban már kimutatták a megemelkedett  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintet, valamint azt is, hogy a spontán, és a  $\text{Ca}^{2+}$  szignált követő  $\text{Ca}^{2+}$  extrusio a sejtől az idős csoportban csökken (Fülöp és mtsai, 1987; Fülöp és mtsai, 1987). Később ezt a jelenséget mutatták ki alkoholos májcirrhosis-ban szenvedő betegek neutrofiljeiben is (Baffy és mtsai, 1990). A munka folytatásaként, inkább az agonisták (FMLP, Ang II) okozta  $\text{Ca}^{2+}$  szignál in-put oldalát tanulmányozták, és azt találták, hogy bár 2 típusú DM-ben és diszlipidémiában is magas a nyugvó granulociták  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintje, de a stimulust követő szignál csúcsa kisebb, és időben elhúzódó. Ezenkívül a  $\text{Ca}^{2+}$  szignált az Ins(1,4,5)P3 szignált gátló PTX-el nem lehet kivédeni, csak a verapamil is tartalmazó Medium V-vel. Ez arra utalt, hogy a metabolikus szindrómában szenvedő betegek esetében a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál eredete az extracelluláris milliő (Foris és mtsai, 1998; Paragh és mtsai, 1999; Paragh és mtsai, 2002).

### 3.2.2. A jelen munka célkitűzései

*Jelen munkánknak több célja is volt. 1.) Elsősorban tisztázni kívántuk, hogy a metabolikus szindrómában szenvedő betegek viszonylag tisztán előforduló formáiban milyen különbségeket találunk granulocitákban az agonista által kiváltott szabadgyök képzésben. 2.) Milyen elváltozásokat tudunk kimutatni a granulociták membránjában, melyek a kontroll sejtektől eltérők? 3.) Ezek az eltérések mennyiben vezethetők vissza az eltérő szabadgyök képződésre? 4.) A zavart  $[Ca^{2+}]_i$  egyensúly mennyiben jellemzi a metabolikus szindrómában szenvedő betegek monocitáit/granulocitáit, ennek mi a magyarázata, és mennyiben függ össze a fokozott szabadgyök képződéssel? Ennek az utóbbi kérdésnek a vizsgálatokor különös tekintettel voltunk az obezitás és az  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedés összefüggésére.*

## 3.3. Alkalmazott módszerek

### 3.3.1. Beteganyag

A beteganyagra vonatkozó általános leírásokat lásd a 2.3.1. fejezetben. A táblázatokban feltüntetett vizsgálatokat a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében végezték el.

#### A. Táblázat

Paraméterek	Kontroll (n=12)	Obez (n=11)	2 típusú DM (n=10)	HC (n=12)
Életkor (év)	55.6±6.3	54.2±6.0	56.5±6.3	52.8±5.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.8±3.4	31.1±4.4 <sup>a</sup>	26.8±3.6	24.1±2.8
WHR	0.85±0.1	1.30±0.22 <sup>a</sup>	0.96±0.17	1.01±0.15
Éhgyomri vércukor*	5.1±0.68	5.3±0.78	8.9±1.1 <sup>a</sup>	5.4±0.76
Insulin (mU/L)	22.7±3.4	21.5±3.6	38.3±5.01 <sup>a</sup>	22.6±3.6
HbA <sub>1c</sub> %	4.9±0.53	5.0±0.59	7.8±0.98 <sup>a</sup>	4.9±0.61
Koleszterin*	4.5±0.57	5.1±0.87	4.9±0.87	9.8±1.05 <sup>a</sup>
Tg*	1.71±0.23	2.58±0.38 <sup>a</sup>	1.85±0.24	1.78±0.22
HDL-C*	1.45±0.15	1.52±0.21	1.38±0.18	1.15±0.17 <sup>a</sup>
LDL-C*	3.27±0.43	3.81±0.65	3.4±0.66	8.44±1.0 <sup>a</sup>

*Rövidítések: HC= hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek; DM = diabetes mellitus; BMI=body mass index; WHR=waist-to-hip ratio; Tg=triglicridek \*A paraméter dimenziója: mmol/L. <sup>a</sup> Az értékek a kontrollokban mért értékektől szignifikánsan eltérnek (P<0.01).*

Egy-egy kísérlet elvégzéséhez a vénás vérvétel (10-15 mL) 4-5 napos intervallumokban történt 6-8 HC betegtől és 3-4 kontroll véradótól. Az interassay coefficiens nem haladta meg a 15%-ot. A DEOEC etikai bizottságától engedélyt a kísérletekhez megkaptuk.

Az **A Táblázatban az 1. és 2 Táblázatra**, valamint a **4-7. ábrára** vonatkozó demográfiai adatokat foglaltuk össze. Az **A Táblázat** adataiból is látható, hogy a betegek kiválasztásakor önálló entitásként jelentkező obezitást, diabetest és HC-t kívántunk egymás mellett vizsgálni.

### B Táblázat

Paraméterek	Kontroll (n=26)	Obez (n=21)
Életkor (év)	40.5±5.8	42.2±5.5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.1±1.5	29.7±4.8 <sup>a</sup>
WHR	0.81±0.11	1.32±0.15 <sup>a</sup>
Éhgyomri vércukor (mmol/L)	5.2±0.5	5.5±1.0
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	122.7±15.3	125.5±15.5
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	76.4±10.1	80.3±12.5
Éhgyomri insulin (mU/L)	20.8±3.6	21.6±4.0
Leptin (ng/mL)	12.6±2.1	39.7±8.6 <sup>a</sup>
HbA1c (%)	4.5±0.8	4.7±0.9
Koleszterin (mmol/L)	4.1±0.6	5.0±0.8
Triglicerid (mmol/L)	1.64±0.18	2.71±0.35 <sup>a</sup>
HDL-C (mmol/L)	1.55±0.25	1.50±0.25
LDL-C (mmol/L)	3.48±0.65	4.91±0.68 <sup>a</sup>

*Rövidítések: BMI=body mass index; WHR=waist-to-hip-ratio; HbA1C =glycosilated Hgb. <sup>a</sup> A kontrolltól való eltérések szignifikánsak (P<0.01)*

A **B Táblázatban** foglalt adatok a **3. és 4. Táblázatra**, valamint **8-11 ábrára** vonatkozó demográfiai adatokat foglaltuk össze.

### **3.3.2 Sejtek izolálása**

A granulociták és monociták vérből való izolálására vonatkozó leírásokat lásd a **2.3.2 fejezetben**.

### **3.3.3. In vitro kísérleti körülmények**

A sejteket általában HBSS-ben szuszpendáltuk és a stimulációkhoz a következő agonistákat használtuk fel előzetes kísérletek után: 10 nM angiotensin II (Serva), 100 ng/mL leptin (Sigma). A gátlószereket a következő koncentrációkban és ideig

alkalmaztuk: a PLC-t gátló 5  $\mu\text{M}$  neomycint (Sigma) 60 percig, a Gi proteint gátló 100 ng/mL pertussis toxint (Sigma) 120 percig, az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  transzlokációt gátló 1.0  $\mu\text{M}$  thapsigargin (Sigma) 60 percig, a PI3 kinase-t gátló 20 nM wortmannint (Sigma) 30 percig, a MAP kinase-t gátló 50  $\mu\text{M}$  PD98059-t (Sigma) 30 percig, a HMG CoA reductase-t gátló 5  $\mu\text{M}$  fluvastatin (Merck) 60 percig, a  $\text{PLA}_2$ -t gátló 1  $\mu\text{M}$  mepacrint (Sigma) 60 percig. Végül a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx gátlására a sejteket Medium V-ben inkubáltuk 60 percig. A Medium V 10  $\mu\text{M}$  verapamil (Sigma) és 3 mmol/L EGTA-t tartalmazott  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes HBSS-ben.

### **3.3.4. Szuperoxid anion meghatározás**

A szuperoxid anion generálódását Cohen és Chovaniek (1978) módszerével vizsgáltuk, de a kísérletek egy részében a mérést Varga és mtsai (2001) módszere szerint 96 lukú Nunclon microplate-ben végeztük. A felszabaduló szuperoxid mennyiségét nmol  $\text{O}_2^-/10^6$  sejt/30 min -ben fejeztük ki. A részletesebb leírást lásd **2.3.4. fejezetben.**

### **3.3.5. Arahidonsav derivátumok kiármalásának mérése**

Az arahidonsav kaszkád intenzitásának méréséhez Boraschi és mtsai (1985) módszerét használtuk. A részletesebb leírást lásd a **2.3.5. fejezetben.**

### **3.3.4. Leukotrién C4 meghatározás**

A meghatározások Jubiz és mtsai (1985) módszere szerint történtek Huwyler és Gut (1990) módosítása szerint. A részletesebb leírást lásd a **2.3.6. fejezetben.**

### **3.3.5. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ meghatározás**

Az intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$  meghatározásokat Mc Cormach és Cobbold (1990) módszere szerint végeztük: a HBSS-ben szuszpendált  $5 \times 10^6$  fehérvérsejthez 20  $\mu\text{L}$  Indo1/AM -t (Calbiochem) adtunk és a festékfelvétel  $37^\circ\text{C}$ -n 30 percig történt állandó keverés közben. Erős mosás után 2 mL HBSS-ben  $10^6$  sejtszuszpenzió képezte a végső keveréket. A mérés spektrofotometriásan történt (Hitachi, F-4500) 405 és 485 nm-on,  $37^\circ\text{C}$ -n állandó keverés közben. A különböző gátlószerekkel történő előinkubációk során a leghosszabb inkubációs időhöz igazodva, legalább 120 percig inkubáltuk a sejteket HBSS-ben, majd a **3.3.3. fejezetben** feltüntetett időpontoknak megfelelően adtuk a rendszerhez stimuláció előtt a gátlószereket, és ezek a gátlószerek a mosófolyadékban, valamint a végső szuszpenzióban is jelen voltak. A gátlószerek az Indo1/AM felvételét

nem befolyásolták. A stimuláció már a küvettában történt leptinnel, ill. angiotensin II-vel, a gátlószer jelenlétében. Egyes esetekben a mérések Medium V-ben történtek: a  $\text{Ca}^{2+}$  mentesen elkészített HBSS puffer 10  $\mu\text{M}$  verapamil (Sigma) és 3 mM EGTA-t tartalmazott. A méréseket 6 percen keresztül folytattuk és az értékeket areas under time-curves (AUC)-ban fejeztük ki.

### **3.3.6. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> meghatározás**

A meghatározást Shayman és BeMeut (1988) által módosított eredetileg Dillon és mtsai (1987) által kidolgozott, valamint Patthy és mtsai (1990) módszerének segítségével „reverse phase ion-pair” chromatográfiával végeztük. A  $10^7/\text{mL}$  sejtszuszpenziót HBSS-ben 4 órán át inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -n  $\text{CO}_2$  inkubátorban, állandó rázás közben, 25  $\mu\text{M}$  myo[ $^3\text{H}$ ]inositol (Amersham) és  $\text{LiCl}_3$  jelenlétében. Mosás után meghatároztuk a sejthez kötött radioaktivitást, mely legalább 50 %-a volt a total aktivitásnak. A sejteket stimulálás után 20 másodperccel perklósavval kezeltük, majd telített  $\text{KHCO}_3$  oldattal neutralizáltuk az elegyet. A különböző gátlószereket a **3.3.3 fejezetben** ismertetett koncentrációban és idővel a stimuláció előtt adtuk a sejtekhez, és ezek a gátlószer a mosófolyadékban és a végső sejtszuszpenzióban is jelen voltak. A precipitátumot centrifugáltuk, 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filteren szűrtük. Az Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mennyiségét belső standard (Amersham) segítségével mértük reverse phase ion-pair kromatográfiás módszerrel. A frakcionálást követően a radioaktivitásokat Packard 2200 CA liquid scintillációs számlálóban határoztuk meg. Az Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mennyiségét pmol/mg protein-ként adtuk meg.

### **3.3.7. Protein kinase C aktivitás meghatározása**

A módszer kidolgozásához Bell és mtsai (1986) valamint Gopalakrishna és mtsai (1986) által leírt módszereket vettük alapul. A sejtekből  $5 \times 10^6$  szuszpenziót készítettünk HBSS-ben, majd  $4^\circ\text{C}$ -n gyors centrifugálás után a sejteket felszuszpendáltuk jéhideg HBSS-ben, amely EGTA-t, phenyl-methylsulfonylfluorid-ot (Sigma), leupeptint (Sigma) tartalmazott. Ebben az elegyben a sejteket ultrahangosan feltártuk (Branson Sonifier 450), 100 000 g-vel centrifugáltuk 45 percig  $4^\circ\text{C}$ -n (Beckman L5-65B). Mind a szupernatant, mely a citoszólban levő enzimet tartalmazta, mind az üledéket, mely a membránhoz kötött PKC aktivitást hordozta Chaps-al (Sigma) és 1 %-os Nonidet P-40-el (Sigma) szolubilizáltuk. A membrán frakció PKC aktivitását oly módon határoztuk meg, hogy a  $^{32}\text{P}$  beépülését mértük [ $^{32}\text{P}$ ]ATP (Amersham)-ből 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  histone III-S-be (Sigma).

Az elegy tartalmazott  $MgCl_2$ -t,  $CaCl_2$ -t, L-phosphatidyl-L-serine-t (Sigma), 100-200 cpm [ $^{32}P$ ]ATP-t, oleoyl-2-actyl-sn-glycerol-t (Sigma), és ATP-t (Sigma). A reakciót 10 perc múlva jéghideg triklórecetsavval állítottuk le, bovin serum albumin, mint carrier jelenlétében. A precipitátumot 0.45  $\mu m$  Millipore HA filteren szűrtük, majd hideg triklórsavval mostuk, a filtereket toluol cocktail-ban oldottuk és Packard CA liquid scintillációs számlálóban meghatároztuk a radioaktivitásokat. A PKC aktivitásokat az inkorporált  $^{32}P$  pmol/min/mg protein egységben fejeztük ki.

### **3.3.8. Membrán fluiditás meghatározása**

A membrán fluiditást Shinitzky és Yuli (1984) módszere szerint határoztuk meg. A fluoreszcens polarizációhoz 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatreine (DPH, Sigma) diszperziót (2.15  $\mu mol/L$ ) használtunk amelyet 1:1 arányban kevertünk össze a  $10^6/mL$  sejtszuszpenzióval. A 30 perces  $37^\circ C$ -n, sötétben történő inkubáció és mosás után a sejtek fluoreszcens polarizációját megmértük Hitachi F4500 spektrofluorimeterben, polarizációs feltét segítségével  $37^\circ C$  hőmérsékleten. Az excitációt 355, míg az emissiót 430 nm-en mértük. Az eredményeket, mint polarizációs értékeket adtuk meg (P), mely inverz módon adja meg a sejtmembrán fluiditását.

### **3.3.9. Membránhoz kötött koleszterin meghatározás**

A sejtek membránhoz kötött koleszterin tartalmát Goh és mtsai (1990) módszere szerint határoztuk meg. A membrán szeparálást a PKC aktivitás mérésénél (**3.3.7 fejezet**) ismertetett módon végeztük el. A lecentrifugált membrán preparátumot natrium dodecyl sulfát és EDTA tartalmú Tris pufferban oldottuk, majd ebből az elegyből 400  $\mu L$ -nyi mennyiséghez adtunk 100  $\mu L$  mennyiséget a következő elegyből: natrium foszfát (pH 7.3), natrium taurocholat, polyethilen glycoll, 0.2 U. cholesterol oxidase (Sigma), 0.4 U. horse radish peroxidase type IV (Sigma), valamint P-hydroxyphenyl acetic acid. 60 perces  $30^\circ$ -n történő inkubáció után az elegyet 2 mL 50 mM natrium phosphat-al (pH 7.4) feltöltöttük, és a fluoreszcenciát mértük Hitachi F-4500 spektrofluorimeterben 325 nm hullámhosszon az extinkciót és 415 nm-en az emissziót.

### **3.3.10.1. A membrán zsírsav (FA) tartalmának meghatározása**

A meghatározáshoz Chenery és McLean (1979) módszerét alkalmaztuk, Varga és mtsai (1997) módosítása szerint. A lipideket  $5 \times 10^6$  sejtől extraháltuk chloroform:methanol 2:1 v/v keverékével Bligh és Dyer (1959) módszere szerint. Az organikus fázist összegyűjtöttük, három részletre osztottuk, majd  $N_2$  áram alatt beszárítottuk. Az extraktumot savas közegben hidrolizáltuk és a szabad zsírsavakat metiláltuk (100 °C, 60 min), a reakciót 1 ml desztilláltvíz hozzáadásával állítottuk le. A zsírsav-metilésztereket n-hexán-al extraháltuk. A zsírsav-metilészterek elválasztása Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) gázkromatográfval, a detektálás 5970 típusú tömeg-szelektív detektorral történt. A mintákban levő zsírsavakat (telített zsírsavak: saturated fatty acids (SFA), egyszerűen telítetlen zsírsavak: monounsaturated fatty acids (MUFA), és többszörösen telítetlen: polyunsaturated fatty acids (PUFA) kontroll zsírsavak (Sigma Co. St. Luis, MO, USA) segítségével azonosítottuk. Az egyes típusba tartozó zsírsavak mennyiségét a totál zsírsav tartalom mol%-ában adtuk meg.

### **3.3.10.2. A membrán konjugált dién tartalmának meghatározása**

A meghatározás Balla és mtsai (1991) módszere szerint történt. A fentiekben leírt extrahálással kapott,  $N_2$  áramban bepárolt lipid extraktum egy részét cyclohexánban oldottuk, majd egy rövid centrifugálás után a szerves fázis optikai densitását 234 nm-en leolvastuk. Az eredményeket optikai densitás (o.d)/ $10^6$  sejt egységben adtuk meg.

### **3.3.10.3. A membrán lipid hidroperoxid tartalmának meghatározása**

A membrán lipid extraktumának hidroperoxid tartalmát jodometriás módszerrel határoztuk meg Balla és mtsai (1991) módszere szerint. A bepárolt extraktum egy részét kloroformban oldottuk. Az organikus fázist ecetsav jelenlétében KI-vel hoztuk össze és 5 perces sötétben történő inkubáció után a reakciót kadmium-acetát hozzáadásával állítottuk le. A vizes fázist 10 percig 2000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszókat spektrofotometriásan 353 nm-on analizáltuk. Az eredményeket nmol hidroperoxid/ $10^6$  sejt-ben fejeztük ki a következő moláris extinkciós koefficiens segítségével  $I_3^-$ :  $2,19 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ .

### **3.3.11. Matematikai kiértékelés**

A paramétereket leíró statisztikával jellemeztük (átlag, szórás, esetszám). Az egyes betegcsoportok kontrollhoz viszonyított különbségét ANOVA teszttel illetve párosítatlan

t-teszttel hasonlítottuk össze. A 6 percig tartó  $[Ca^{2+}]_i$  meghatározások során a görbe alatti területeket (area under curves (AUC)) szintén ANOVA segítségével hasonlítottuk össze, a részletes összevetésekhez pedig a Newman-Keuls tesztet használtunk kiegészítésként. Az elemzések során  $p \leq 0.05$  valószínűségi szintet tekintettük szignifikánsnak.

**Saját munka:** A betegek kiválasztásában, a kísérletek megtervezésében és kiértékelésében valamint a laboratóriumi munka egyes fázisaiban vettem részt. A leukotrién és 3.3.10.1-3 fejezetekben ismertetett meghatározásokat Dr. Keresztes Tamás és Dr. Varga Zsuzsa végezték el.

### **3.4. Kísérleti eredmények**

#### **3.4.1 Metabolikus szindrómában szenvedő betegek neutrofiljeinek kóros membrán elváltozásai**

Az jól ismert tény, hogy HC-ben szenvedő betegek leukocitáinak membránját a magas koleszterinszint, továbbá a fokozott membránrigiditás jellemzi. Saját régebbi vizsgálataink szerint azt is tudtuk, hogy pl. a membránhoz kötött konvencionális PKC aktivitás is fokozott 2 típusú DM-ben. Éppen az előző fejezetben tárgyalt szignálváltozások a HC sejtekben hívták fel a figyelmet arra is, hogy a  $Ca^{2+}$  szignált a  $Ca^{2+}$  beáramlás a verapamil-szezitív csatornákon keresztül szolgáltatja ezekben a sejtekben. A stimulus követő fokozott szabadgyök képződés is bizonyított volt előző kísérleteink során, így két kérdést kellett tisztáznunk: 1. van-e egyáltalán kimutatható károsodás az MS-ben szenvedő betegek leukocita membránjában, és 2. ha igen, akkor ez kapcsolatban állhat-e a fokozott szabadgyök képződéssel? Elsősorban tehát megvizsgáltuk az MS-ben szenvedő betegek neutrofiljeinek membránjában néhány jellemző paraméter alakulását. A csoportokat úgy válogattuk össze, hogy a három csoportban az obezitás, a 2 típusú DM és a HC viszonylag izoláltan fordult elő, tehát a vizsgálatokból azokat a betegeket kihagytuk, akiknél ezek a szimptómák keveredve fordultak elő. Az **1. Táblázatban** az egyes betegcsoportok neutrofiljeiben a 10 nM Ang II-vel kiváltott verapamil-szenzitív  $Ca^{2+}$  szignálokat, továbbá a resting sejtekben mérhető



**3/1. Táblázat. Metabólikus szindrómában szenvedő betegek neutrofiljeinek membránját jellemző adatok**

Kísérleti csoportok	V-szenzitív Ca <sup>2+</sup> szignál ( AUC) <sup>†</sup>	mPKC aktivitás <sup>‡</sup> (pmol <sup>32</sup> P/min/mg protein)	Fluoreszcencia <sup>‡</sup> (P)
Kontroll	497±178	286±38	0.313± 0.09
Obez	2567±511*	1088±186*	0.501± 0.1*
2 típusú DM	3627±701*	1657±278*	0.54± 0.15*
HC	3290±653*	2055±376*	0.58± 0.13*

*Minden adat átlag±SD érték. Rövidírések: AUC= area under curves; V-szenzitív= a Ca<sup>2+</sup> szignált 10 µM verapamillal gátoltuk; mPKC=membránhoz kötött protein kinase C; DM= diabetes mellitus. <sup>†</sup> A neutrofileket 10 nM Ang II-vel stimuláltuk; <sup>‡</sup> Az értékek resting neutrofilekre vonatkoznak; \* Az eltérés a kontroll csoporttól szignifikáns (P<0.001).*

membránhoz kötött PKC aktivitásokat és a resting sejtekben mért membrán rigiditásokat tüntettük fel. Eredményeink szerint az obezitás, a 2 típusú DM és a HC mindhárom vizsgált paramétert szignifikánsan fokozta. Arra a kérdésre tehát választ kaptunk, hogy mindhárom betegcsoportban, ha különböző mértékben is, de a kontroll értékektől eltérő membránhoz kötött Ca<sup>2+</sup> csatorna működés, mPKC aktivitás és membrán rigiditás mutatható ki. Mindhárom paraméter esetében az elváltozásokat a kontroll<Ob<DM<HC sorrend jellemezte. Azt is fontos eredménynek tartjuk, hogy a nyugvó sejtek mPKC aktivitása esetében 5-10-szeres emelkedéseket mértünk. A következőkben tovább vizsgáltuk kémiai módszerekkel a három betegcsoportban a neutrofilekre jellemző tulajdonságokat, és az adatokat a **2. Táblázatban** foglaltuk össze. Az általunk vizsgált MS betegek sejtjeinek membránjában nőtt a telített zsírsavak (SFA), a PUFA, a konjugált

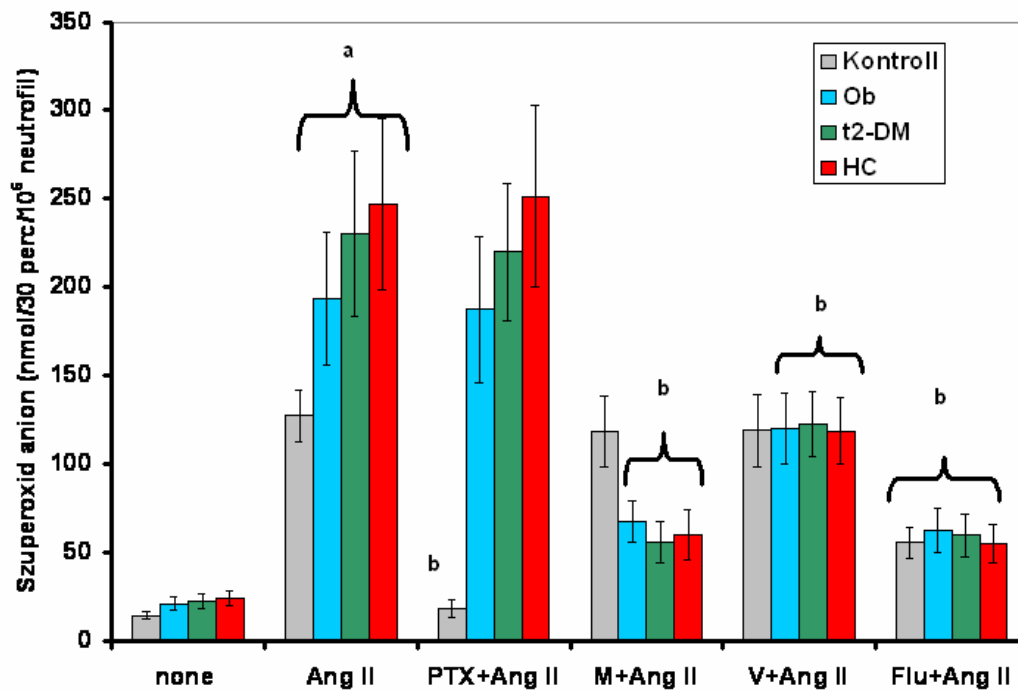
**3/2. Táblázat. Metabolikus szindrómában szenvedő betegek neutrophiljainak lipid összetételét és lipid oxidációját jellemző paraméterek**

Paraméterek	Kontroll	Obez	2 típusú -DM	HC
Membránhoz kötött				
koleszterin ( $\mu\text{g}/10^7$ neutrofil)	5.12 $\pm$ 0.98	5.25 $\pm$ 1.1	4.98 $\pm$ 0.78	10.1 $\pm$ 2.01*
SFA (mol %)	50.99 $\pm$ 10.1	61.1 $\pm$ 8.8*	59.8 $\pm$ 10.1*	64.3 $\pm$ 6.8*
MUFA (mol %)	21.96 $\pm$ 3.6	19.8 $\pm$ 3.3	21.1 $\pm$ 3.9	20.69 $\pm$ 7.5
PUFA (mol%)	27.6 $\pm$ 2.3	15.5 $\pm$ 3.1*	15.1 $\pm$ 2.7*	14.68 $\pm$ 3.2*
US/SFA	0.97	.057*	0.61*	0.55*
Conjugált dien ( $A_{234}/\text{ml} \times 10^6$ sejt)	0.014 $\pm$ 0.0013	0.048 $\pm$ 0.0065*	0.051 $\pm$ 0.015*	0.052 $\pm$ 0.01*
Lipid hidroperoxid (nmol/ $10^6$ sejt)	0.143 $\pm$ 0.022	0.198 $\pm$ 0.035*	0.211 $\pm$ 0.04*	0.226 $\pm$ 0.03*

*Minden adat az átlag $\pm$ SD-t jelenti. Rövidítések: DM=diabetes mellitus; SFA = saturated fatty acid; MUFA = monounsaturated fatty acid; polyunsaturated fatty acid =PUFA. \* A kontroll csoporttól való eltérés szignifikáns (P<0.001).*

diének és a lipid hidroperoxidok mennyisége, míg csökkent a UFA/SFA aránya. Ezzel szemben a membránhoz kötött koleszterin mennyisége csak a HC csoportban fokozódott. A membrán rigiditás növekedése és a funkcionális paraméterek változása, melyeket az 1 Táblázatban tüntettünk fel, tehát nem írhatók obezitásban vagy 2 típusú DM-ben a sejtekben felszaporodott koleszterin számlájára. Sokkal valószínűbbnek látszik, hogy a kóros változásokért a membránban lezajló lipidperoxidáció a felelős. Emellett szólnak a **4. ábra** adatai is, amennyiben az Ang II által kiváltott szuperoxid generálás mindhárom betegcsoportban fokozódott. Eredményeink szerint a szignalizációs utak is azonos

3/4. ábra. Angiotensin II (10 nM) hatása a metabolikus szindrómában szenvedő betegek neutrofiljeinek szuperoxid termelésére

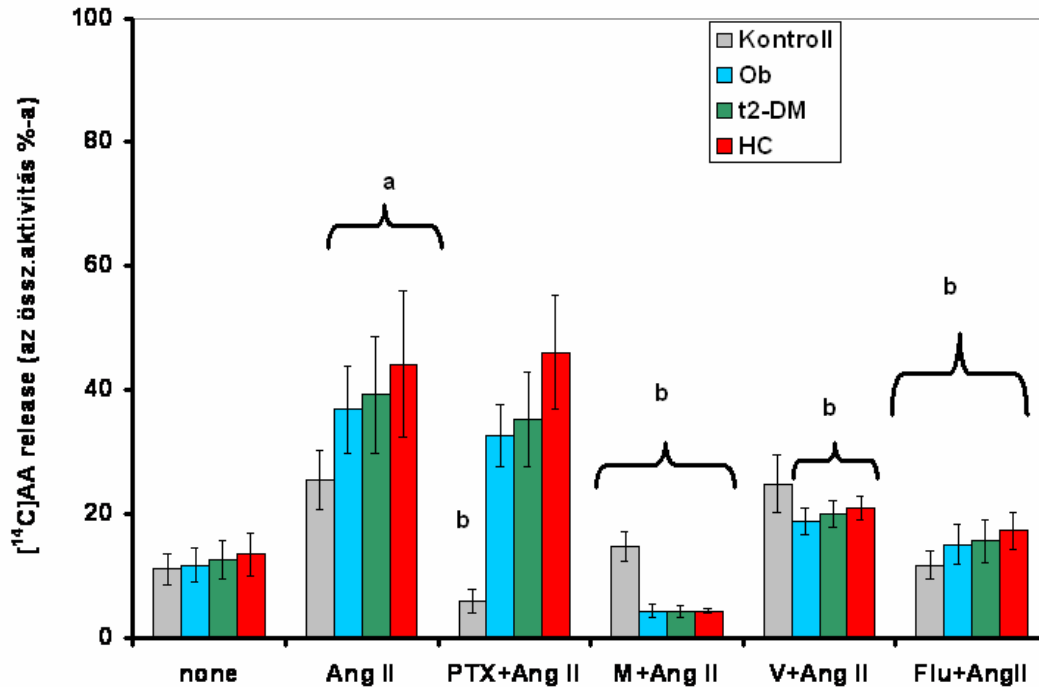


Rövidítések: PTX= pertussis toxin; M=mepacrin; V=Medium V; Flu=fluvastatin

<sup>a</sup> Az Ang II által kiváltott szuperoxid rilíz a kontrollhoz képest fokozott ( $P < 0.001$ ); <sup>b</sup> A gátlás szignifikáns ( $P < 0.001$ )

módon változtak MS-ben, amennyiben a kontroll csoporttal szemben hatásos gátlást csak a PLA<sub>2</sub>-t gátló mepacrin és a Ca<sup>2+</sup>-influxot gátló Medium V fejtett ki. A fluvastatin természetesen mind a kontroll, mind a három MS csoportban gátolta a szuperoxid termelést, de az MS csoportokban a gátlás abszolút értékben és arányaiban is nagyobb volt mint a kontroll sejtekben. Meg kell még említeni, hogy bizonyos fokozatosságot észleltünk a kontroll csoport és az egyes kórképek esetében, és a sorrend alakulását a következő módon tudjuk érzékelteni: C<Ob<t2DM<HC. Hasonló arányt találtunk, ha a [<sup>14</sup>C]AA-val feltöltött sejteket stimuláltuk Ang II-vel, és az AA átalakulási termékek kiáramlását mértük a sejtekből (5. ábra). Következtetéseket lehet levonni abból az adatból a jeltovábbítás megváltozására vonatkozóan, hogy a mepacrin ugyan jelentősen gátolta a kiáramlást a kontroll sejtekből is, de ez nem volt olyan jelentős, mint az MS csoportokban. Végül a fluvastatin esetében észlelt jelentős gátlás megerősítette azt a

**3/5. ábra. Angiotensin II (10 nM) hatása a metabolikus szindrómában szenvedő betegek neutrofiljeinek arahidonsav metabolitokat szintetizáló képességére**



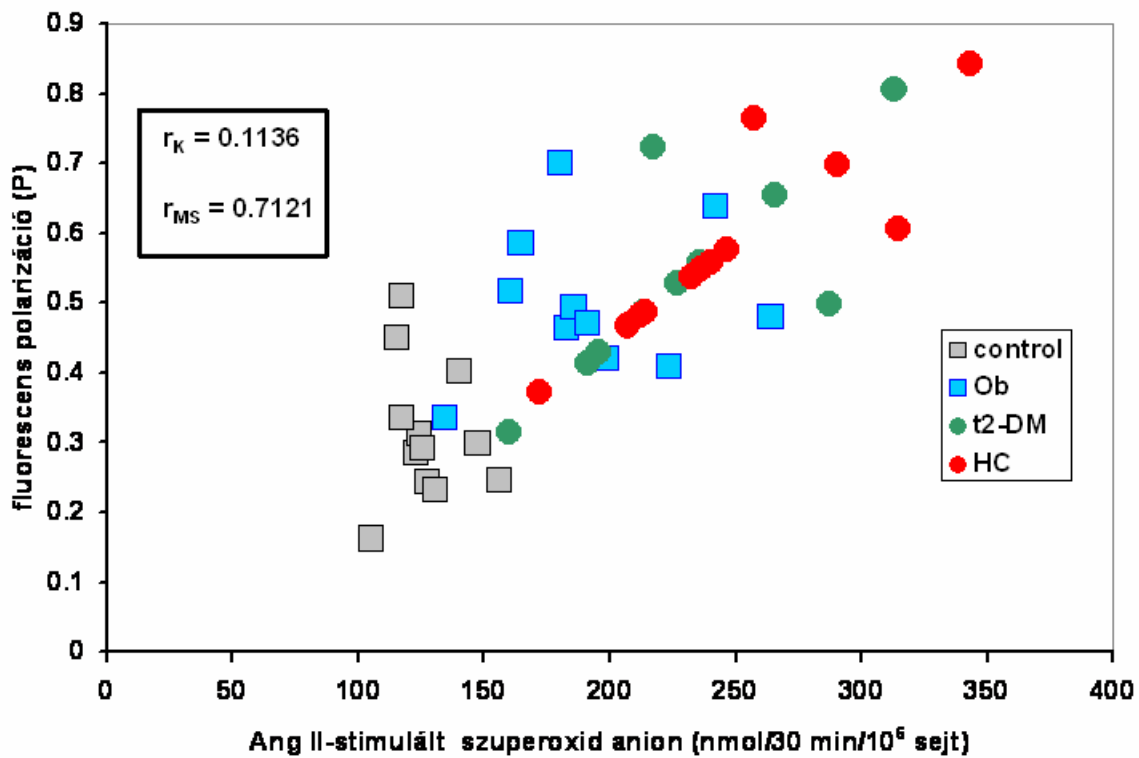
*Rövidítések: PTX= pertussis toxin; M=mepacrin; V=Medium V; Flu=fluvastatin*

<sup>a</sup> Az Ang II által kiváltott [<sup>14</sup>C] AA derivátum rilíz a kontrollhoz képest fokozott( $P<0.001$ ); <sup>b</sup> A gátlás szignifikáns ( $P<0.001$ ).

tényt, hogy a mevalonát ciklus fontos szerepet játszik az AA kaszkád aktiválásában is. Eredményeinket összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a HC-ban szenvedő betegek granulocitáin kívül a csak obezitásban, vagy csak diabetesben szenvedő betegek sejtjei a stimulus hatására fokozottabban termelnek mind szuperoxidot, mind pedig AA termékeket, és ez oka lehet a membránban észlelhető lipid peroxidációnak, és fokozott membrán rigiditásnak, már a betegektől nyert nyugvó granulociták membránjában is. A folyamat tehát úgy képzelhető el, hogy a proinflammatorikus citokinek, Ang II, leptin és még számos tényező, mint pl. az antioxidáns hatású HDL-hez kötött PON aktivitás csökkenésének hatására, a szervezetben eltolódik a redox-állapot, és a megváltozott granulocita membrán következtében az újabb stimulus hatására ezekben a sejtekben a szabadgyök képzés mintegy „circulus vitiosus”-ként fokozottan érvényesül. Ezt az

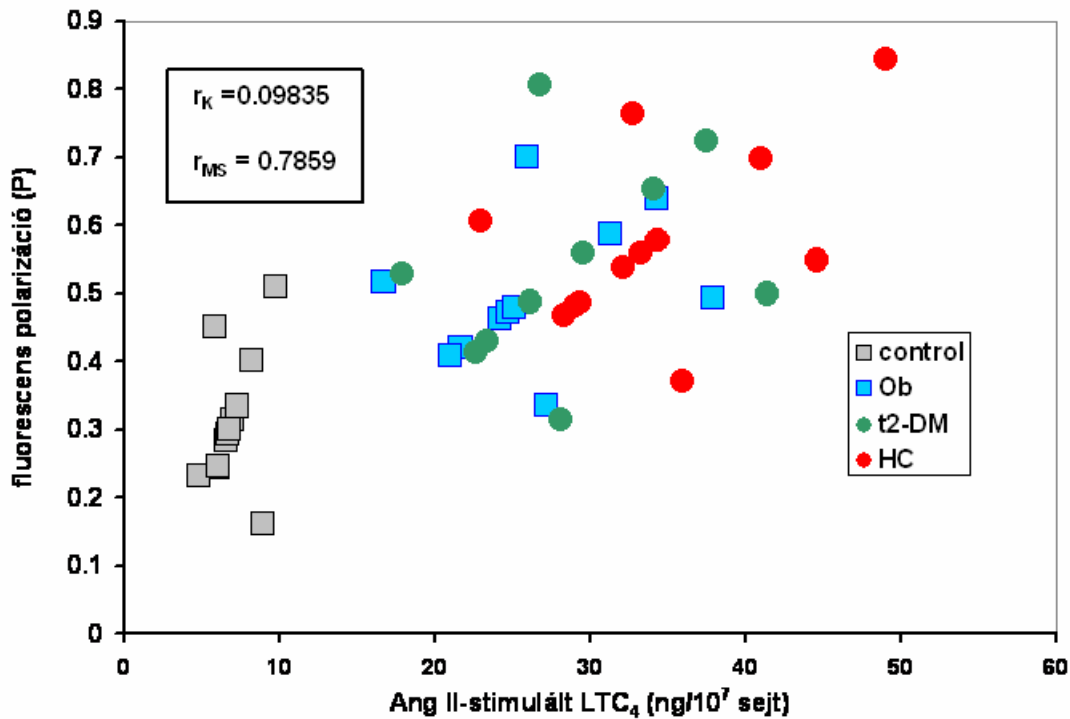
elképzelést megerősíti az a tény, hogy ha megvizsgáltuk a kontroll és a három beteg csoport sejtjeiben a nyugvó sejtek membrán rigiditása és az Ang II által kiváltott szuperoxid képződés, illetőleg az LTC<sub>4</sub> szintézis közötti korrelációt, akkor az összes MS beteg értékeivel számolva mindkét esetben szoros pozitív korrelációt tudtunk kimutatni (6. és 7. ábra). Ilyen korreláció a kontroll granulocitákon nem volt kimutatható.

**3/6. ábra. Korreláció a nyugalmi membrán fluiditás és az angiotensin II által stimulált szuperoxid termelés között**



*Rövidítések:  $r_K$  = Korrelációs együttható a kontroll csoportban;  $r_{MS}$  = Korrelációs együttható a három metabolikus szindrómában. Az  $r_{MS}$  szignifikáns ( $P < 0.001$ ).*

**3/7. ábra. Korreláció a membrán fluiditás és az angiotensin II -vel stimulált neutrofilek által szintetizált LTC<sub>4</sub> között**



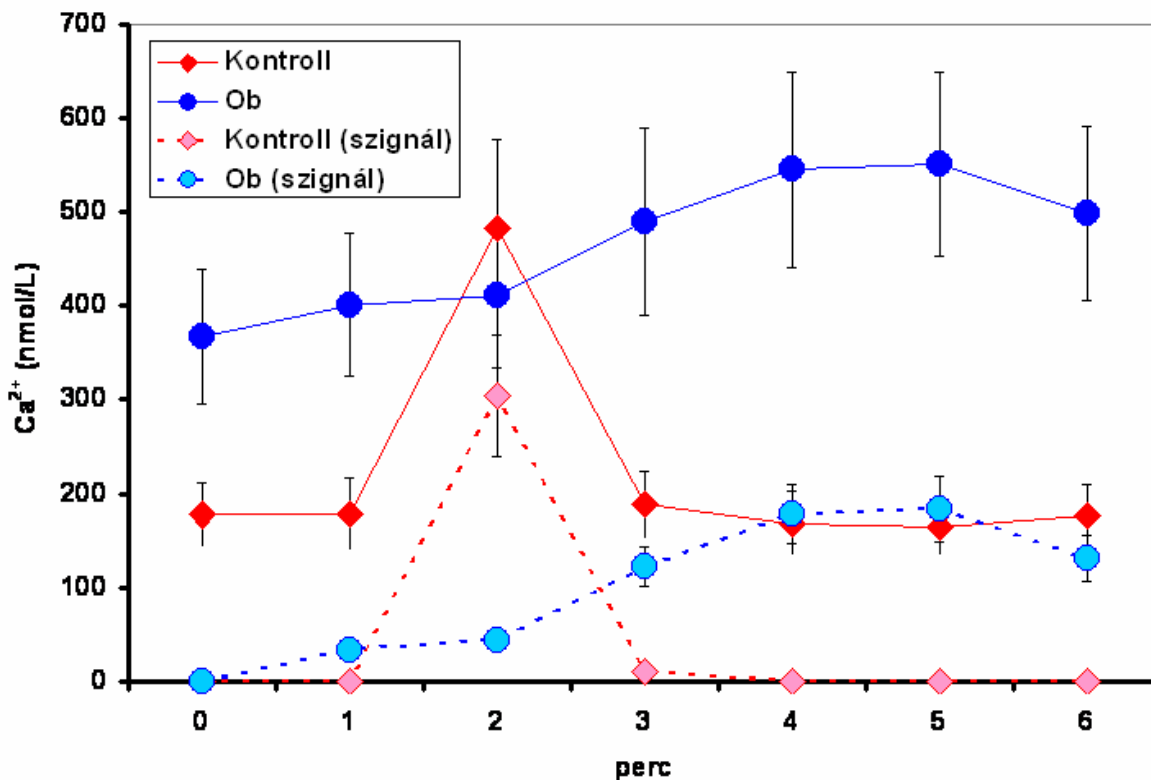
*Rövidítések:  $r_K$  = Korrelációs együttható a kontroll csoportban;  $r_{MS}$  = Korrelációs együttható a három metabolikus szindrómában. Az  $r_{MS}$  szignifikáns ( $P < 0.001$ ).*

### **3.4.2. Obez egyének monocitáinak és hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek granulocitáinak kóros Ca<sup>2+</sup> homeosztázisa**

Az MS betegek granulocitáin tapasztalt eltérések, a membrán változások és az Ang II hatására történő szabadgyök képzés jelentős fokozódása, két irányban is felkeltette az érdeklődésünket: 1. Az obezitás, amely esetében felmerül az inkább teoretikus, mint gyakorlati kérdés, hogy mennyiben tekinthető már manifeszt betegségnek maga az obezitás? 2. A leptin, amely az előző fejezetek adatai alapján

citokin-szerű hatással rendelkezik, és amely az obezitások bizonyos fajtáiban fokozottan termelődik a zsírszövetben, játszhat-e valamilyen szerepet az obez állapot romlásában ?

**3/8. ábra. Leptin (50 ng/mL) által kiváltott intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$  szintek alakulása kontroll és obez egyének granulocitáiban**



Az, mint az irodalmi bevezetésben már szó volt róla, kezdettől fogva világos volt számunkra, hogy a sejtek magas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintje az obezitás kialakulásának, illetőleg romlásának kérdésében rendkívül fontos jelenség. Kérdéses volt tehát, hogy az obez egyének esetében a leptin hogyan hat a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál alakulására (**8. ábra**). Ezekhez a kísérletekhez a normás súlyú és obez egyének monocitáin végeztük a kísérleteket, és a sejteket 50 ng/mL leptinnel stimuláltuk. Eredményeink szerint, az obez egyének nyugvó, bazális  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintje csaknem kétszerese volt a kontroll sejtekének. Ezzel szemben, a leptin által indukált  $\text{Ca}^{2+}$  szignál csúcsa alacsonyabb volt és csak késve, a mérés 2-ik perce helyett, csak a 4-5-ik percben jelentkezett. Ha azonban, mint a **8. ábrán** ezt

feltüntettük, a leptin által stimulált értékekből kivontuk a bazális  $[Ca^{2+}]_i$  értékeket, feltünt, hogy a késői normalizálódás eredményeként az obez csoportban a görbe alatti

**3/3. Táblázat. A leptinnel indukált  $Ca^{2+}$  szignálok gátolhatósága normál és obez férfiak neutrofiljeiben**

Preinkubációk	Kontroll	Obese	Kontroll	Obese
	Ca <sup>2+</sup> szignál (AUC)		A gátlások %-a	
Leptin	1497±178	3309±489 <sup>a</sup>	-	-
PTX + Leptin	1455±267	3325±628	0	0
Neomycin + Leptin	768±145 <sup>b</sup>	2677±555 <sup>b</sup>	48.7±8.1	19.1±3.2
Thaps + Leptin	590±121 <sup>b</sup>	2285±467 <sup>b</sup>	60.6±11.5	30.9±5.5
WTM + Leptin	688±142 <sup>b</sup>	2773±548 <sup>b</sup>	54.0±10.2	16.2±3.1
Medium V + Leptin	1511±311	894±185 <sup>b</sup>	0	73.0±13.2

*Minden adat az átlag±SD értéket jelenti. Rövidítések: AUC = Areas under Ca<sup>2+</sup> curves; PTX= pertussis toxin; Thaps = thapsigargin; WTM = Wortmannin; Medium V= preinkubáció Ca<sup>2+</sup> mentes mediumban + 10 µM verapamil.preincubation in Ca<sup>2+</sup> free medium containing 3 mM EGTA, 10 µM verapamil..<sup>a</sup> AUC értékek szignifikánsan különböznek a kontroll értékektől (P< 0.001),*

*<sup>b</sup> A gátlások szignifikánsak (P<0.001).*

terület a 6 perces mérési idő alatt nagyobb értéket ad, mint a kontroll sejtekben. Az „areas under curves”, a továbbiakban AUC értékekkel számolva, ezt számszerűen is ki tudtuk fejezni (**3. Táblázat**). Elsősorban ki kell emelnünk, hogy az obez csoportban a leptin által kiváltott szignál AUC-ban szignifikánsan nagyobb volt az obez, mint a kontroll csoportban. Különböző gátlószereket alkalmazva, az találtuk, hogy a kontroll monociták esetében a PLC-t gátló neomycin, az intracelluláris raktárakból történő Ca<sup>2+</sup> kiáramlást gátló thapsigargin, valamint a PI3K-t gátló wortmannin voltak képesek gátolni



a szingálok AUC értékeit. Az így elérhető gátlások mértéke 50-60 % volt. Ezzel szemben az obez monocitákban ugyanezekkel a gátlószerekkel csak 15-30 %-os gátlásokat tudtunk elérni. A  $\text{Ca}^{2+}$  mentes és 10  $\mu\text{M}$  verapamil tartalmazó Medium V a

**3/4. Táblázat. A leptin (50 ng/mL) kiváltott Ins(1,4,5)P3szignál kontroll és obez egyének monocitáiban**

Preinkubáció	Kontroll	Obez
	Ins(1,4,5)P3 (pmol/mg protein)	
None	25.7±4.5	36.8±7 <sup>a</sup>
Leptin	98.6±21 <sup>b</sup>	50.4±11 <sup>b</sup>
PTX + Leptin	101.2±22	53.1±11
Neomycin + Leptin	56.8±12 <sup>c</sup>	31.1±6.5 <sup>d</sup>
WTM + Leptin	65.5±13.5 <sup>c</sup>	30.5±6 <sup>d</sup>

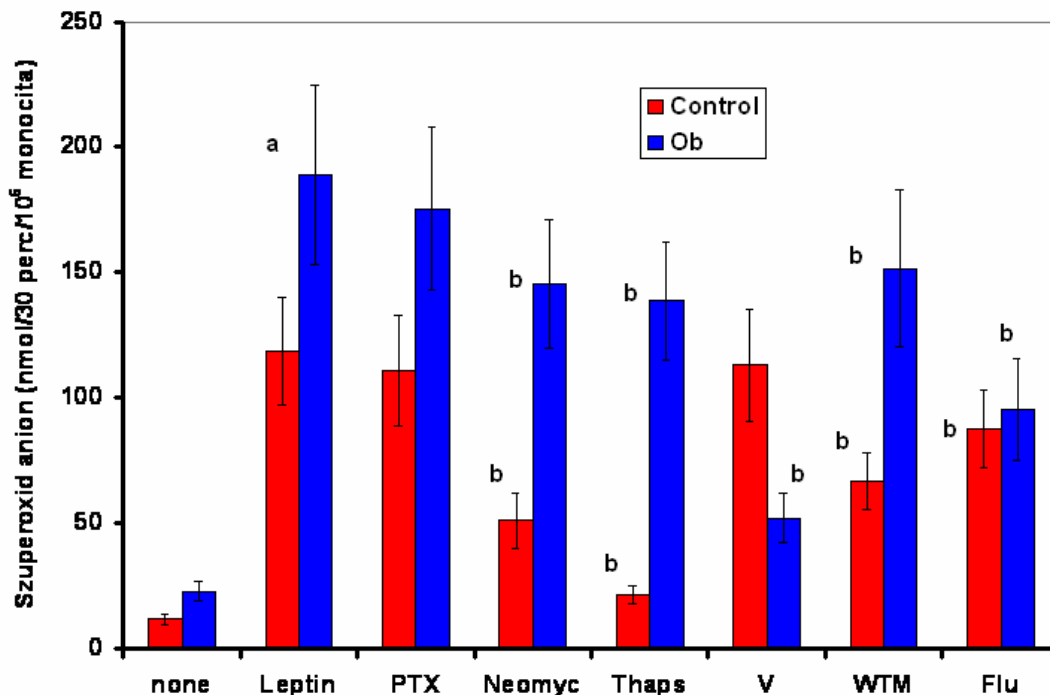
**Rövidítések:** *Ins(1,4,5)P3 = inositol(1,4,5)trisphosphate; PTX = pertussis toxin; WTM = Wortmannin. Minden adat az átlag±SD értéket jelenti.. <sup>a</sup> A bazális érték szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll monocitákban ( $P<0.001$ ); <sup>b</sup> A leptin által kiváltott emelkedés szignifikáns ( $P<0.001$ ); <sup>c</sup> A gátlás szignifikáns ( $P<0.001$ ) és <sup>d</sup> ( $P<0.05$ ).*

kontroll sejtekben semmiféle hatást nem váltott ki, jelezve, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál az intracelluláris raktárakból származik, míg az obez monocitákban a leptin által indukált  $\text{Ca}^{2+}$  szingál több mint 70 %-os gátlását eredményezte. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a manifest HC-ben nem szenvedő obez egyének esetében is érvényes az előző fejezetben már kimutatott megváltozott szingalizációs út, mely szerint a beteg egyénektől származó sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás a verapamil-érzékeny  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon keresztül képezi azt a szignált, amely pl. a szabadgyökök fokozott képzéséhez is elvezet.

A **4. Táblázatban** a leptin által kiváltott Ins(1,4,5)P3 szignálokot tüntettük fel, annak eldöntésére, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál intracelluláris eredetének hiánya, vagy csökkenése mennyiben származik abból a jelenségből, hogy már az Ins(1,4,5)P3 szignál megjelenése is zavartan működik. A **4. Táblázatban** feltüntetett adatok lényegében nem hoztak

váratlan eredményt számunkra, mivel a „resting” obez monocitákban az Ins(1,4,5)P3 szint bár magasabb, mint a kontrollokban, a leptin stimulust követő szignál alacsonyabb. Mindkét csoportban jellemző, hogy a szignál PTX-el nem gátolható, míg neomycin, és

**3/9. ábra. Leptin (50 ng/mL) által kiváltott szuperoxid anion termelődés normál és obez egyének monocitáiban**

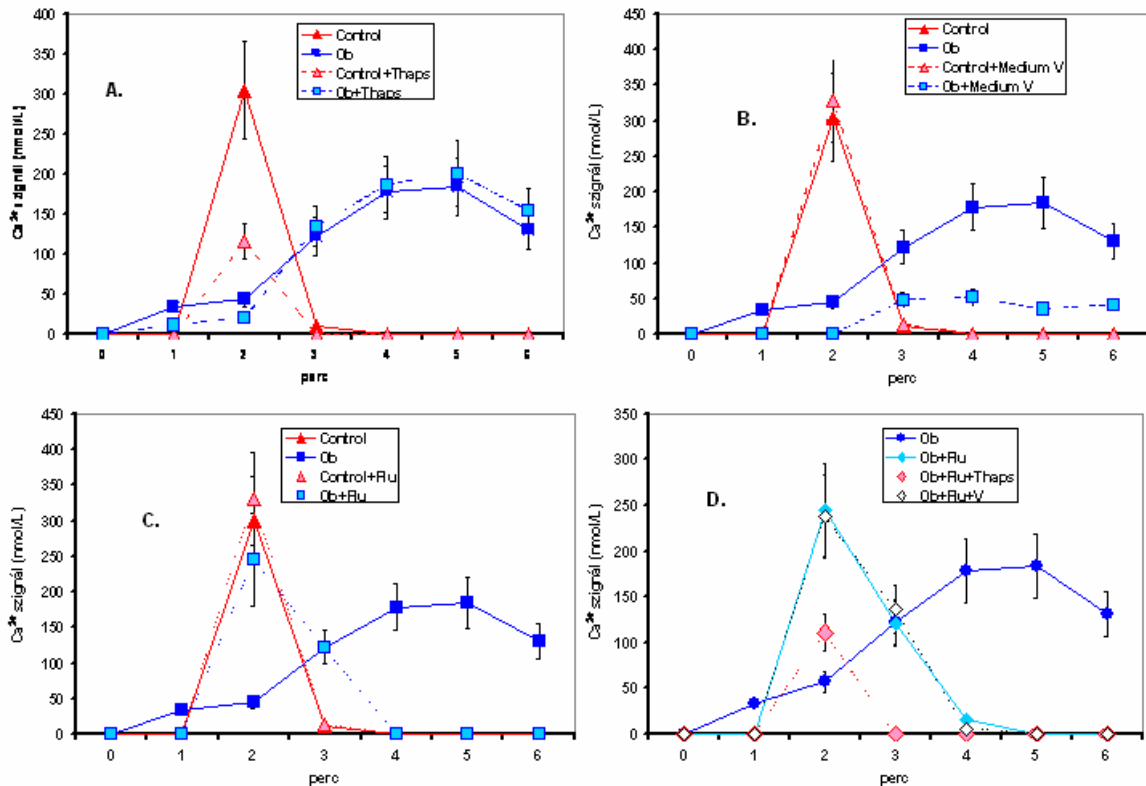


*Minden adat az átlag±SD értékét jelenti. Rövidítések: Ob=obez; PTX=pertussis toxin; Neomyc=neomycin; Thaps=thapsigargin; V=Meidum V; WTM=wortmannin; Flu=fluvastatin. <sup>a</sup> A leptin által kiváltott szuperoxid rilíz a kontrollokhoz viszonyítva nagyobb (P<0.001); <sup>b</sup> A gátlás szignifikáns (P<0.001)*

wortmannin a kontrollokban nagyobb, az obezek sejtjeiben kisebb gátlást fejt ki. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az obez monocitákban a kis Ins(1,4,5)P3 szignál csak részben járul hozzá a Ca<sup>2+</sup> szignálhoz, annak nagyobb része a verapamil szenzitív Ca<sup>2+</sup> csatornákon keresztül a médiumból kerül be a sejtbe. A megnőtt és időben elhúzódó Ca<sup>2+</sup> szignál, valamint az emelkedett [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> szint a nyugvó obez sejtben, csak részben magyarázható a csatornákon keresztül történő Ca<sup>2+</sup>-influx kimutatásával.

Figyelembe kell venni azt a tényt is, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál és a NADPH oxidáz aktiválódás szoros kölcsönhatásban áll egymással. Ez azt jelenti, hogy a magas  $\text{Ca}^{2+}$  szint aktiválja, mint erről az előző fejezetben már szó esett, direkt és indirekt úton - a PKC aktiváláson

**3/10. ábra. A leptin által indukált  $\text{Ca}^{2+}$  szignál görbék alakulása normál égyének monocitáiban különböző gátlószerek jelenlétében**

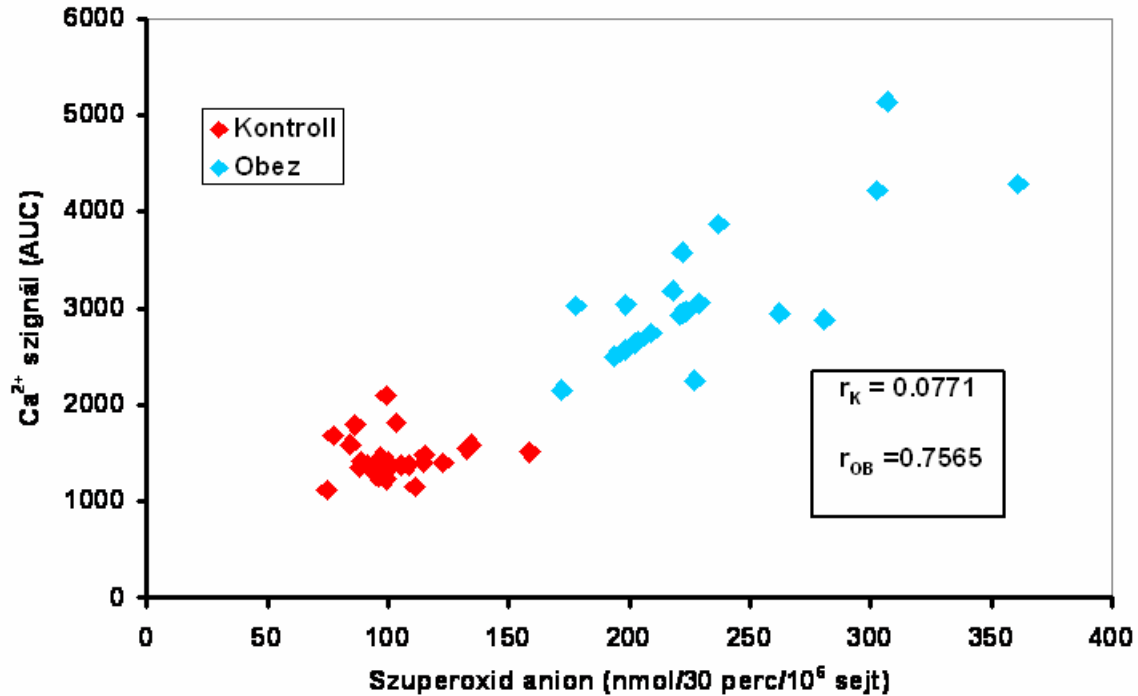


keresztül - a NADPH oxidáz enzimet. Másrészt a ROS képződés jelentősen károsítja a sejtmembrán iontranszportért felelős csatornáit. A **9. ábrán** a leptin által indukált szuperoxid képződést, valamint annak gátlhatóságát tüntettük fel normál és obez egyének monocitáiban. Eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze: 1. A leptin által kiváltott „oxidative burst” nagyobb az obez csoportban, mint a kontroll sejtekben. 2. A PTX rezisztencia mindkét csoportban arra utal, hogy a PTX-érzékeny  $G_i$  protein a leptin esetében nem vesz részt a szignalizációban. 3. Az alternatív utat jelentő „PI3K  $\rightarrow$  Ins(3,4,5)P3  $\rightarrow$  PLC  $\rightarrow$  Ins(1,4,5)P3  $\rightarrow$   $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás” leptin stimulus után mind a

kontroll, mind az obez sejtekben működik, de az utóbbiak esetében jóval kisebb a jelentősége. Erre utal, hogy a Medium V-vel csak az obez sejtekben tudtuk a ROS képződést gátolni. A fluvastatinnal elért gátlás az obez monociták esetében nagyobb volt, ez lényegében arra mutat, hogy ismeretlen okból, de a Rac-reguláció szerepe az obez monocitákban nagyobb, mint a kontroll sejtekben. A **10. ábrán** a 6 perces mérések során kialakult  $\text{Ca}^{2+}$  szignál görbéket ábrázoltuk leptin stimuláció után normál és obez egyének monocitáiban. A **10A. ábra** a thapsigargin jelenlétében kialakult változásokat mutatja, amennyiben a thapsigargin csak a kontroll sejtekben volt képes gátolni a  $\text{Ca}^{2+}$  szignált. Ezzel szemben a **10B. ábra** adatai szerint az obez sejtekben észlelhető, időben elhúzódó szignált a Medium V gátolta, míg a kontroll sejtekben mért görbékre hatástalan volt. Érdekesnek tartjuk azt az eredményünket, amelyet a **10C. ábrán** tüntettünk fel, nevezetesen, hogy a HMG CoA reductáz gátló fluvastatinnal előkezelt kontroll sejtekben a statin semmiféle hatást sem fejtett ki, míg az obez monocitákban képes volt a korai csúcs és a gyors normalizálódás helyreállítására. Ezt az eredményt jól értelmezi az a tény, melyet a **10D. ábrán** tüntettünk fel: a fluvastatinnal kezelt obez sejtekben a kontrollokéhoz hasonló állapot alakult ki, amennyiben ezekben a sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$  szignált az intracelluláris raktárakból való  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizációt gátló thapsigarginnal tudtuk csökkenteni.

Mindez arra utal, hogy a fluvastatin hatására, feltehetően a ROS képződés csökkentésén keresztül, helyreállítható az obez monocitákban az egészséges intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis. Mindenesre a leptin által indukált  $\text{Ca}^{2+}$  szignál növekedés és a szuperoxid termelődés közötti szoros korreláció, melyről a **11. ábra** tanúskodik, megerősíti azt az elképzelésünket, hogy obezitásban a leptin - esetleg a lokálisan termelődő leptin - és az általa indukált szabadgyök képződés hozzájárul obezitásban a calcium homeosztázis felbillenéséhez.

3/11. ábra. Korreláció a leptin-indukálta  $\text{Ca}^{2+}$  szignál és szuperoxid rilíz között kontroll és obez egyénektől származó monocitákban



Rövidítések:  $r_K$  = Korrelációs koefficiens a kontroll csoportban;  $r_{OB}$  = Korrelációs koefficiens az obez csoportban (szignifikancia:  $P < 0.001$ )

### 3.5 A kísérleti eredmények megbeszélése

A metabolikus szindrómában szenvedő betegek granulocitáival végzett kísérleteinkben az egyik legnagyobb gondot a viszonylag önálló entitást képviselő beteganyag kiválasztása jelentette. Az eredmények alapján a membrán kóros állapotára jellemző elváltozások mindegyike jelen volt mindegyik entitás esetén. Az 1 és 2 Táblázat eredményeit összevetve azonban azt megállapíthatjuk, hogy ezek a változások nem a membránhoz kötött koleszterin mennyiségének növekedésétől függenek. A V-szenzitív

csatornákhöz kötött  $\text{Ca}^{2+}$  szignálok növekedése Kannan és mtsai (2007) vizsgálatai szerint lehet a raftokban felszaporodó koleszterin eredménye is, és ennek csak részben mond ellent az a tény, hogy az Ang II által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás az obez és a DM-es betegek granulocitáiban is megnőtt. Figyelembe kell venni, hogy a membrán rigiditás, valamint az SFA, conjugált diének és a lipid hidroperoxidok mennyiségének növekedését, valamint a PUFA csökkenését ezekben a beteg csoportokban is kimutattuk. A fokozott szabadgyök képződés, és a következményes membrán rigiditás, amely mint ezt kimutattuk, a metabolikus szindrómában szenvedő betegek sejtjeire általában jellemző volt, eredményezhette a raftok átrendeződését ezekben a csoportokban is (Ayuyan és Cohen, 2006; Lu és mtsai, 2007). A PUFA mennyiségi csökkenése a sejtmembránban önmagában is fontos komponense a raftok átalakulásának (Ma és mtsai, 2004). Az oxidáció membránt károsító hatása tehát nem kétséges, és saját vizsgálataink alapján azt is megállapíthatjuk, hogy a metabolikus szindrómában szenvedő betegek granulocitái - legalább is bizonyos agonisták hatására - mint az Ang II - fokozottan képesek szuperoxidot és arahidonsav derivátumokat termelni. Az is bizonyos, hogy az Ang II stimulus szignalizációja megváltozik, nem csak a HC, de az obez és a DM-es csoportokban is, amennyiben a  $\text{Gi}$  proteint gátló PTX hatástalan, míg a Medium V, mely a  $\text{Ca}^{2+}$ -influxot gátolja, szignifikánsan csökkenti a NADPH oxidáz és az arahidonsav kaszkád aktiválódását. A HMG CoA reduktázt gátló statin, a fluvastatin gátló hatása az összes beteg csoportban, arra utal, hogy a 2, fejezetben ismertetett Rac2 aktiválódás kimaradása jelentősen képes csökkenteni nemcsak a HC, de az obez és a DM csoportokban is a szabadgyök képződést. A szabad gyökök membránt károsító hatásának nem elhanyagolható vonatkozása az a tény, miszerint a szabadgyökök képesek károsítani a membránhoz kötött ion csatornák, pumpák működését. Ennek eredménye a nyugvó sejtekben mérhető magas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint, továbbá a magas intracelluláris  $\text{Na}^+$  és alacsony pH érték is (Kourie, 1998; Stark, 2005). A reaktív oxidációs termékek (ROS) által létrehozott iontranszport gátlás fő támadáspontja a csatornák és a pumpák szabad SH csoportjai, melyeken az oxidáció keresztkötéseket hoz létre (Rohn és mtsai, 1996). Másrészt az immunsejtekben a legfontosabb calcium szignál szabályozó calmodulin is kárt szenved az oxidáció folyamán (Chen és mtsai, 2005). A calmodulin molekulában a 144-145 metionin oxidálódik, melynek eredményeként a molekula helikális struktúrája

megváltozik, és a 20S proteosomában több lépcsőben hasad. Ennek eredménye részben szignalizációs zavar, másrészt a csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  extrusio a sejtől a CaM-függő  $\text{Ca}^{2+}$  pumpákon keresztül. A CaM-függő  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase működésének zavara nem-vezető membránnal rendelkező sejtekben azért jár súlyos következményekkel, mert ez az egyetlen módja a fölösleges  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolításának a sejtekből (Guerini és mtsai, 2005). A tartósan magas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint az immunsejtek gyulladási állapotát jellemzi, és apoptosishoz vezet, (Carafoli, 2005). Az obez betegek monocitáiban leptinnel előidézett  $\text{Ca}^{2+}$  görbék arra utalnak, hogy bár a betegek sejtjeiben a szignál csúcsok alacsonyok, az elhúzódó normalizáció miatt a szignál jelentősebb, mint a kontroll sejtekben. Rendkívül eredményesnek tartjuk, hogy a következtetések levonásához 6 perces mérés után a calcium görbék alatti területtel (areas under curves) számoltunk, mint ezt a metodikai részben már leírtuk. Ez adott lehetőséget arra, hogy az agonisták által stimulált sejtekben a károsodás mechanizmusát bővebben és hatásosan elemezzük.

Különös jelentőségűnek tartottuk az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintek kóros szabályozását obezitásban, ahol is ennek különös jelentősége van az adipocitákban, mint ezt Sun és Zemmel (2004) vizsgálataiból tudjuk. Az bizonyos, hogy obezitásban, ha nem is kvantitatíve, de az elváltozások irányát tekintve mindaz a sejtszintű szignalizációs zavar kimutatható, mint a súlyos diszlipidémiákban (HC csoport). Az is bizonyos, hogy obez betegekben a viszcerális zsírszövet által termelt adipokinek, többek között a leptin is, gyulladási tüneteket váltanak ki az immunsejtekben. Ennek az eredménye, hogy az obez egyénektől nyert monociták az agonista stimulus hatására hasonló módon reagálnak, mint a HC csoportban. Mi konkrétan obez egyének monocitáiban a leptin hatására bekövetkező  $\text{Ca}^{2+}$  szignál változásokat hasonlítottuk össze a kontroll sejtek reakcióival. Kísérleteinkhez 50 ng/mL koncentrációban használtuk a leptint, ami lényegében egy jelentős mértékű hiperleptinémiának felel meg. Mint ezt már előzőleg említettük, a leptin esetében a szérumban mérhető leptin koncentráció nem mond ebben a vonatkozásban túl sokat, mivel a lokálisan felszabaduló, és nem meghatározható leptin koncentrációk alapján tudnánk csak véleményt mondani az in vitro használt koncentrációk jelentőségéről (Ren, 2004). Vizsgálataink alapján a leptin  $\text{Ca}^{2+}$  szignált vált ki a monocitákban, és ez különösen jelentős az obez csoportban. A gátlószerekkel végzett vizsgálatok alapján kimondhatjuk, hogy a PTX hatástalan volt, míg mind a kontroll, mind

az obez sejtekben gátlást tudunk elérni a PLC-t gátló neomycinnel, a SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase gátló és raktárt kiürítő thapsigargin előkezeléssel, valamint a PI3K-t gátló wortmanninnal. Ezeknek a gátlószereknek a hatása lényegesen kisebb volt az obez sejtekben, ahol igazi gátlást akkor kaptunk, ha a mérést verapamil tartalmazó  $\text{Ca}^{2+}$  mentes médiumban végeztük. A szuperoxid meghatározások során ugyanezt a gátlásrendet találtuk, amelynek a lényege, hogy a kontroll monociták leptin-szignalizációjában egy PTX-rezisztens  $\text{IP}_3$  szignálon keresztül indul meg a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, amelyben a PI3K is részt vesz. Ez az út az obez sejtekben kisebb mértékben, de részt vesz a szignalizációban, bár itt a legfontosabb szignál út egy verapamil szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Az  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  szignál mérésekor szintén azt találtuk, hogy megjelenése PTX-független, de gátolható mindkét csoportban neomycinnel és wortmanninnal. Tekintettel arra, hogy az egyes gátlószerek hatása magyarázatra szorul, először is a thapsigargin hatását kell megmagyaráznunk: a thapsigargin egy növényi eredetű terpén-lakton származék, amely tumor-promoter természetéről ismert (Thastrup, 1990). Hatásának lényege, hogy kiüríti az ER-ben levő  $\text{Ca}^{2+}$  raktárakat, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gátlásával, egyben gátolja a  $\text{Ca}^{2+}$  „re-uptake”-ot (Lytton és mtsai, 1991). Ezért, 60 perces előkezelés után,  $\text{Ca}^{2+}$  mentes médiumban az újabb, agonista stimulusra, a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál csökken, vagy nem is mérhető. Ezzel szemben pl. az obez egyének monocitáiban, ahol a  $\text{Ca}^{2+}$  extrusio is csökkent, az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint megnő, de ez a szignál nagyságán (AUC-ban kifejezve) nem változtat. A jeltovábbításokat gátló szerek használatánál a wortmanninnal gátolható PI3K szerepe szorul még magyarázatra: Frühbeck (2006) szerint a leptin receptor jeltovábbításában részt vesz egy  $\text{G}_i$  protein - PLC -  $\text{IP}_3$  útvonal, de ez a mi esetünkben, vagy nem játszik szerepet, vagy a G protein PTX-rezisztens. A leptin és tegyük hozzá az Ang II esetében is létezik, egy alternatív út is (Touyz és Berry, 2002). Ez az út azon alapszik, hogy a PI3K által hasított  $\text{Ins}(3,4,5)\text{P}_3$  képes a PLC-t aktiválni, és így, egy kerülő úton de érvényesül a PLC -  $\text{IP}_3$  -  $\text{Ca}^{2+}$  szignál (Wu és mtsai, 2000; Keqiang és Snyder, 2004). Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a kontroll és az obez csoportban a leptinnel stimulált monociták szignalizációja nem csupán a  $\text{Ca}^{2+}$  szignálok eredetét illetően különbözik egymástól, de a calcium görbék késve bekövetkező normalizálódása a CaM-függő Ca-ATPase oxidációs károsodásának a következménye. Ennek bizonyítéka az a megfigyelés, hogy a fluvastatinnal előkezelt sejtekben a calcium görbe teljesen normalizálódik, sőt a



leptinnel kiváltott szignál visszanyeri a thapsigarginnal szembeni érzékenységét is. A fluvastatin rendkívüli hatása a  $\text{Ca}^{2+}$  szignálra nem magyarázható pusztán a NADPH oxidázt gátló tulajdonságával, ugyanis még nem közölt adataink szerint ilyen helyreállító hatással pl. az ugyancsak NADPH oxidáz gátló  $\alpha$ -tocopherol nem rendelkezik. Ezek szerint a fluvastatin, amely hatását a granulocita NADPH oxidase-re a Rac2 small GTPase activálásának felfüggesztésén keresztül fejt ki, nem csak ezen az úton képes hatni a  $\text{Ca}^{2+}$  szignálra (Bokoch és Diebold, 2002; Delbosc és mtsai, 2002).

### **3.7. A 3. fejezet összefoglalása**

*Metabolikus szindrómában szenvedő betegek (obezitás, 2 típusú diabetes mellitus, hiperkoleszterinémia) granulocitáinak membrán rigiditása, a membránhoz kötött PKC aktivitása, a verapamil-szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornán keresztül létrejött  $\text{Ca}^{2+}$  szignálja, valamint a membrán telített zsírsav, lipidhidroperoxid és konjugált dién tartalma szignifikánsan megnőtt. A membránhoz kötött koleszterin mennyisége ezzel szemben csak hiperkoleszterinémiás betegek membránjában volt emelkedett. Az Ang II-vel stimulált granulociták fokozott szuperoxid anion képződése és arahidonsav metabolizmusa mindhárom betegcsoportban, a membránban levő lipid raftok átrendeződésének és a membrán rigiditás fokozódásának a következménye. Circulus vitiosus-ként viszont a fokozottan felszabaduló szabadgyökök a beteg csoportokban károsítják a sejtmembrán állapotát. Obezitásban, a nyugvó monociták magas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  értéke, valamint a leptinnel kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  szignálja az időgörbe alakját tekintve is megváltozik. A kisebb csúcs időben később jelentkezik, és a magas basalis szinthez képest is csak lassan normlizálódik. Az időgörbe alatti területtel (AUC érték) számolva kiértékeljük a thapsigargin és a verapamil szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx részvételét az agonista-indukált  $\text{Ca}^{2+}$  szignálban. Eredményeink szerint az obez monociták esetében a fokozott ROS képződés eredményeként károsultak az  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázist biztosító enzimek: különösen a SERCA-hoz kötött thapsigargin-szenzitív Ca-ATPase és a calmodulin-dependens  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, mely a calcium extruziót biztosítja a sejtől. A HMG CoA reductase gátló fluvastatin preinkubáció az eredeti calcium homeosztázist helyreállította.*

## **4.0. Leptin hatása a humán monociták endogén koleszterin szintézisére**

### **4.1. Irodalmi előzmények**

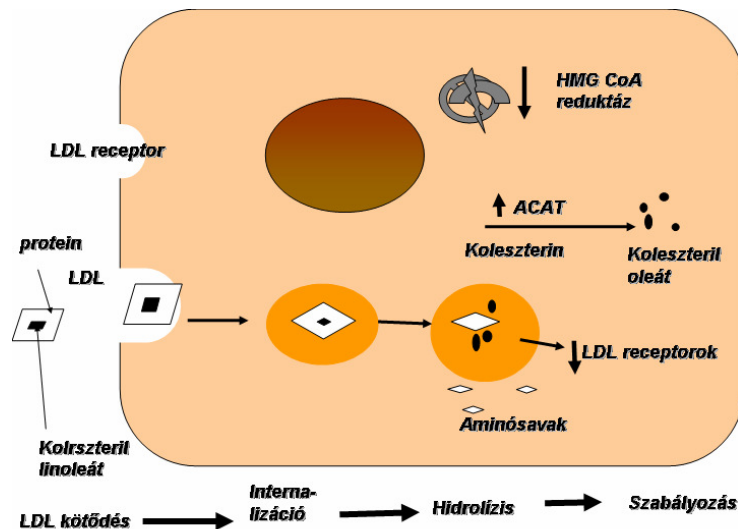
#### **4.1.1 Az LDL receptorok szerepe a hiperkoleszterinémia kialakulásában**

A koleszterin homeosztázis sejtszintű szabályozásának kérdésével elsősorban a Nobel-díjas Goldstein munkacsoport foglalkozott, és első ebben a tárgykörben megjelent dolgozatuk az 1973-as évre tehető (Hazzard és mtsai, 1973; Brown és mtsai, 1973).

Ezekben az években még élenjárónak volt tekinthető, hogy pontosan tisztázni tudták az LDL receptorok specificitását, affinitását, számát a humán fibroblasztok felszínén, továbbá a receptorok génjét is azonosították (Brown és mtsai, 1974). A közvetlen gyakorlati oka ezeknek a vizsgálatoknak, melyek a receptorokról alkotott igen szegényes tudásunk idején történtek, az volt, hogy egy öröklődő, korai halállal járó megbetegedés - a familiáris hypercholesterinaema (FH) - okát keresték. Fredrickson és mtsai (1978) vizsgálatai alapján kiderült, hogy ez a megbetegedés az LDL receptorok teljes hiányával jár és jellemzője a már gyermekkorban megjelenő rendkívüli nagyságú hiperkoleszterinémia, és a súlyos ateroszklerózis. A megbetegedés az étellel összeegyeztethetetlen. A kórkép igen ritka, előfordulása 1 millió ember közül csak 1, és említett formájában csak homozygotákon fordul elő. Jóval gyakoribbak a heterozygota formák, melyekre a korábban (35 - 40 éves korban) jelentkező magas LDL-C szint és infarctus a jellemző. Az LDL receptorok leggyakrabban jelentkező allél mutánsa, amikor a receptor jelen van a sejt felszínén, de nem képes LDL-t kötni ( $R^{b0}$ ), amikor jelen van a receptor, de csak csökkent mennyiségben tud LDL-t kötni ( $R^b$ ), továbbá amikor a receptor képes az LDL megkötésére de nem képes internalizálódni ( $R^{b+,i0}$ ). Meg kell jegyezni, hogy a FH minden formájának tisztázása, továbbá a kimutatásukra szolgáló metodikai leírások a munkacsoport szívós, sok éves munkájának az eredménye (Goldstein and Brown, 1974; Brown és Goldstein, 1974; Brown és Goldstein, 1976). További kutatásaik eredményeként az is kiderült, hogy az LDL receptor főszerepe nem

csak abban van, hogy képes eltávolítani az LDL-t a keringésből, hanem inkább szabályozó szerepet tölt be, nem csupán a májsejtekben, de a perifériás sejtek többségében is (Balasubramaniam és mtsai, 1976; Brown és Goldstein, 1979). Ennek a szabályozó szerepnek a lényege a következő: Az LDL részecske a specifikus receptorokhoz kötődve internalizálódik a receptorral és az u.n. „coated pitt”-el együtt, majd a keletkező endocitózis veszikulumban a lizoszómális enzimek hatására az LDL protein része lebomlik, míg az LDL receptor kiszabadulva a citoszólba, visszajut a membránba. A felszabaduló koleszterin az ACAT hatására észterifikálódik koleszterinoleáttá. A szabályozás lényege abba van, hogy a sejt belsejébe jutó LDL részecske hatására a HMG CoA reductase enzim valamint az új LDL receptorok szintézise csökken, míg a koleszterin észterifikálásáért felelős ACAT enzim szintézise nő. Ennek a szabályozásnak a vázlatát az **1. ábrán** tüntettük fel.

**4/1. ábra. Az LDL receptor működésének és szabályozó szerepének vázlata  
Goldstein és Brown szerint**



(Brown és Goldstein, 1979)

A 70-es évek végén az a kérdés fel sem merült, legfeljebb csak sejtek formájában, hogy az LDL részecske és a receptor kötődése után milyen mechanizmus vezet pl. a HMG CoA reduktáz enzim vagy az LDL receptorok szintézisének csökkentéséhez. Ma már csak történeti érdekességű Brown és Goldstein már idézett (**1 ábra**) 1979-ben íródott dolgozatának az része, amelyben a reguláció kérdését tárgyalják.

### **Model 1**

**Binding → Internalization → Degradation → Regulation**

### **Model 2**

**Binding → Regulation**

↓

**Internalization**

↓

**Degradation**

A két modell úgy értelmezhető, hogy a 2-es variáció esetében a szerzők feltételezték, hogy a reguláció magától a lipoprotein - receptor kötődés bekövetkeztéből jöhet létre.

Több mint 10 év telt el, míg a kérdésre a munkacsoport megtalálta a helyes választ, amennyiben természetesen a „Model 1” szerint történik a szabályozás. Addig azonban legalább olyan nagy érdeklődéssel fordultak a kutatók az atheroszklerózis kialakulásában direkt módon résztvevő foam sejt képződés felé.

#### **4.1.2. A makrofágok (makrofág-szerű sejtek) és a scavenger receptorok szerepe az atheroszklerózis kialakulásában**

A 70-as évek végén már nagy érdeklődéssel fordultak a kutatók a makrofágok és makrofág-szerű sejtek felszínén található u.n. scavenger receptorok felé (Basu és mtsai, 1977; Shechter és mtsai, 1981; Brown és Goldstein, 1983; Chait és mtsai, 1983). Az érfal intimában a nagyszámú makrofág habossejtté alakulva található meg, és belsejükben lipidcseppek halmozódnak fel. Mai tudásunk szerint az atheroszklerotikus plakkok kialakulásában az SR-BI és SR-BII valamint a HDL receptorok ko-lokalizálódnak a

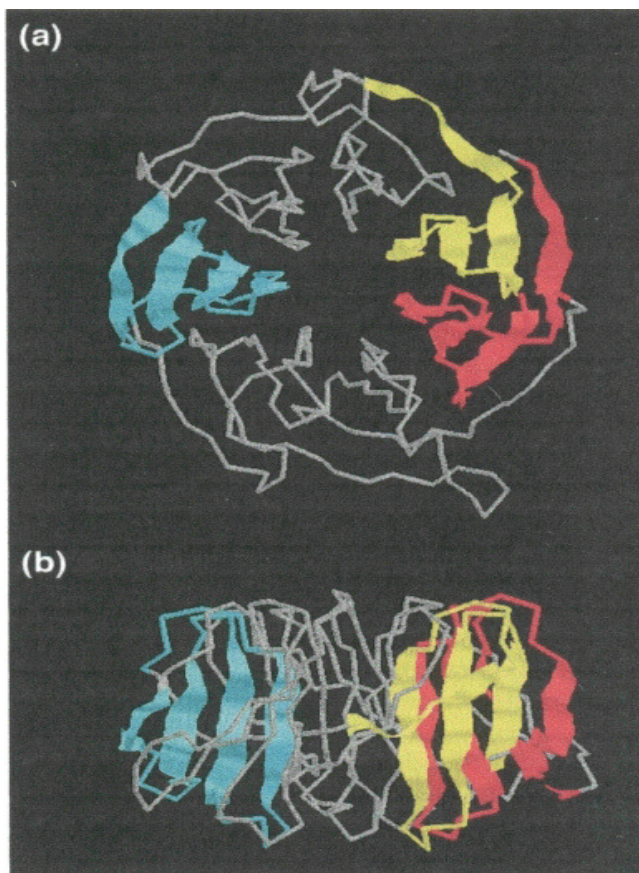
caveolin-al a caveolákban, és fontos tulajdonságuk, hogy nem down-regulálódnak a koleszterinészter felszaporodásakor (de Villiers és Smart, 1999) A makrofágok felszínén expresszálandó scavenger receptorok az LDL-t kationizált formában veszik fel, ami in vivo körülmények között oxidációt, vagy diabetesben a glükozidált formát jelenti. A makrofágok fokozott szabadgyök termelés esetén maguk alakítják át az LDL-t oxLDL-é, mely a lectin like oxidized LDL receptorokon (LOX-1) jut be a makrofágokba. Ez az a ma már ismert mechanizmus, mely a plakk képződés leggyakoribb útja és az ateroszklerózis kialakulásának legveszélyesebb előidézője (Adachi és Tsujimoto, 2006). A módosult LDL hatására - amennyiben egészséges szervezetről van szó - megindul az eszterifikáció, az ABC transzporter proteinek működése, ill a cAMP-függő protein kinase aktiválódása. Az utóbbi hatására beindul a fokozott apoE szekréció, valamint a HDL receptorok expressziója. A szintetizálódó apoE beépül a HDL receptorokhoz kötődő HDL-be, és ezzel a HDL részecske koleszterin felvevő képessége többszörösére nő. Ezeknek a változásoknak a hatására a koleszterin távozik a sejtből. Amennyiben a védekező mechanizmusok nem indulnak be, a koleszterin cseppek formájában a makrofágokban marad és „foam sejt” keletkezik, mely hozzájárul az aterómás plakk képződéshez az érfalban (Basu és mtsai,1977; Bellosta és mtsai, 1995; Adachi és Tsujimoto, 2006). Az eddig leírtakból az világossá válhat, hogy a foam sejt képződés az ateroszklerózis kialakulásának egyik rendkívül fontos pontja. Mukacsoportunk számos publikációja látott napvilágot ezen a területen, de mivel én ezekben a vizsgálatokban nem vettem részt, és disszertációm tárgykörét nem érintik ezek az eredmények, a foam sejt képződés mechanizmusát bővebben nem érinteném ( Kovács és mtsai, 1988; Paragh és mtsai, 1998; Kárpáti és mtsai, 1999)

#### **4.1.3. Az intracelluláris koleszterin bioszintézis szabályozása**

Csak 1993-ban jelent meg az a közlemény, amelyben először érintették újra azt a kérdést, mi is lehet az az intracelluláris szabályozó mechanizmus, amely őrökdi a koleszterin homeosztázis fenntartásán (Briggs és mtsai, 1993; Wang és mtsai, 1993). Ekkor sikerült csak tisztázni, hogy az LDL receptor, valamint a HMG CoA reduktase synthase génjeinek a szabályozásában egy „sterol regulating element” - továbbiakban SRE vesz részt, melynek a génekhez jutását egy fehérje, az SRE binding protein (SREBP) segíti elő. Az is kiderült, hogy ez a fehérje az endoplazmás retikulum membránjában

szintetizálódik, akkor ha az intracelluláris koleszterin szint csökken, és a sejtnek szüksége van koleszterinre. Újabb 3 évnek kellett eltelnie ahhoz, hogy a szenzor fehérjét is kitudják mutatni (Hua és mtsai, 1996). Kiderült, hogy az SREBP1a és 1c isoformok, azonos gén által kódoltak, csak a hasításuk történik különböző helyeken. Ez a két fehérje inkább a zsírsavcsere szabályozásában játszik szerepet, míg a koleszterin homeosztázis szabályozásában az SREBP2 vesz részt. A magban azonban csak az SREBP2 N-terminális 450 aminosavból álló része jut be, amelynek hasítása két részletben (Sp1 és Sp2) történik a Golgiban. Az, hogy az SREBP el tud jutni a Golgiba, az annak az eredménye, hogy egy ugyancsak az ER membránban szintetizálódó fehérje az SREBP cleavage activating protein (SCAP) képes a C-terminális végével megkötni az SREBP C-terminális végét. A SCAP molekula két fontos domain-je a koleszterin-szenzor rész, amellyel érzékelni képes a sejtben levő szabad koleszterin mennyiségét, valamint a C-terminális WD-rész, mely általában a transzportálásban szerepet játszó fehérjék szokott szekvenciáját képviseli (Smith és mtsai, 1999). A SCAP WD domain-jét a **2. ábrán** tüntettük fel. Amennyiben a sejtben sok a koleszterin, a koleszterin a szenzor részhez kötődik, melynek következtében a SCAP olyan konformáció változáson esik át, hogy az Insig proteinek is be tudnak kötödni, így bár a WD C-terminális vége a molekulának megköti az SREBP C-terminális részét, de az Insig proteinek az egész komplexet lehorgonyozzák az ER membránban. Amennyiben a sejtben nincs elegendő koleszterin, a SCAP koleszterint kötő domain-jei üresen maradnak. Az intracelluláris szabályozás folyamatát vázlatosan a **3. ábrán** tüntettük fel. A molekula WD részével megköti az SREBP2 C-terminális végét, az üresen maradt koleszterin érzékelő domain-ek következtében a szükséges konformáció változás nem jön létre, és az Insig fehérje nem képes a SCAP-hoz kapcsolódni. A SCAP ezen konformációja alkalmas arra, hogy a COPII szállító vesiculumhoz kötődve, az SREBP-t a Golgi-ba szállítsa. Az SREBP kétszeres hasítása az Sp1 és Sp2 helyen a Golgi-ban következik be, és innen jut el az N-terminális 450 aminosavat tartalmazó rész a magba, ahol az SRE-t szállítja mindazon génekhez, amelyek a koleszterin szintet a sejtben megemelik: így fokozza többek között a HMG CoA reductáz szintáz, és az LDL receptorok szintézisét is (Weber és mtsai, 2004; Gimpl és mtsai, 2002; McPherson és Gauthier, 2004). Az Insig 1 és 2 proteinek az ER membrán fehérjéi, melyek génjeit az insulin szabályozza, és fontos szerepük van abban,

**4/2 ábra. A SCAP C-terminális WD részének struktúrája**

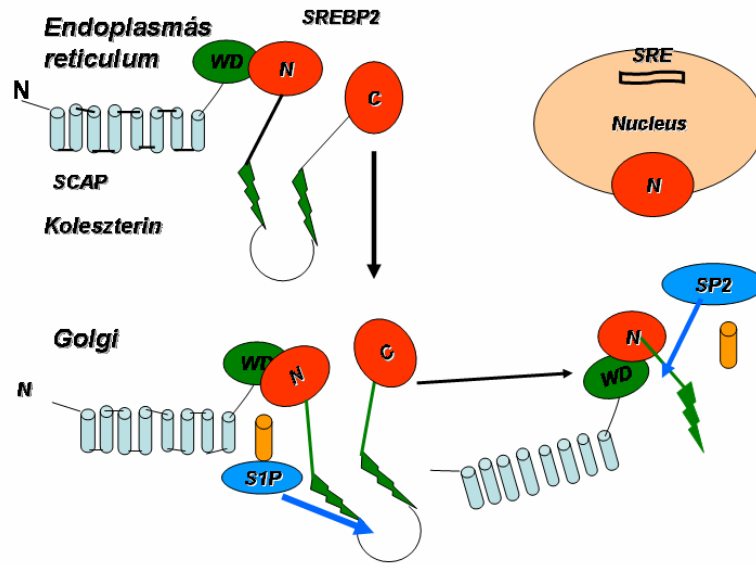


*a.) felülnézetből - Ga-hoz való kötődés után (Smith és mtsai, 1999)*

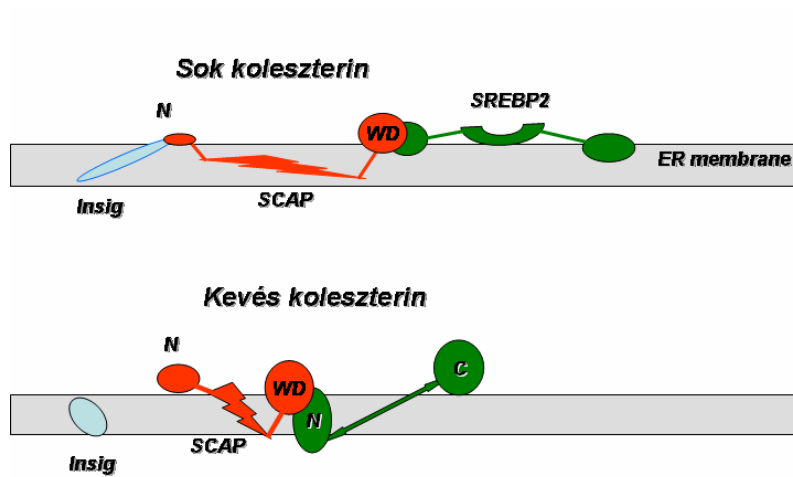
*b.) oldal nézetből*

hogyan a megemelkedett intracelluláris koleszterin szint esetén a SCAP-SREBP2 komplexet az ER membránban tartásuk (4. ábra). A két Insig protein közül a magas koleszterin tartalom down regulálja az Insig 1-t, és ilyenkor csak az Insig2 köti meg nagy affinitással a SCAP-ot, míg a koleszterin csökkenés megindítja az Insig 1 szintézist, mely kisebb affinitással de részt vesz a SCAP-SREBP komplex megkötésében és fixálásában (McPherson és Gauthier, 2004; Loewen és Levine, 2002). Könnyű belátni, hogy a SCAP és a két Insig protein mennyiségének genetikai szabályozása a kulcsa az endogén koleszterin szintézis szabályozásának (Yang és mtsai, 2000).

4/3 ábra. Az SREBP és a SCAP szerepe az endogén koleszterin szintézis szabályozásában.



4/4 ábra. Insig protein szerepe a SCAP-SREBP komplex kialakulásában





#### **4.1.4. Citokinek hatása a SCAP-SREBP szabályozó mechanizmusra**

Az elmondottakból logikusan következik, hogy amennyiben a SCAP génjeiben mutáció következik be, úgy nem tudja szabályozó feladatát betölteni: ennek egyik eredménye az lehet, hogy nem képes érzékelni a koleszterin felszaporodását a sejtben, nem képes az Insig proteinhez kötődve lehorgonyozni, és leállítani a további koleszterin szintézist, ill inkorporációt az LDL receptorokon keresztül. A másik lehetőség, hogy a SCAP valamilyen stimulus hatására túltermelődik, és a felesleges SCAP, miután megkötötte a szükséges koleszterin mennyiséget, képes még SREBP2-t a Golgi-ba szállítani. Ennek eredménye ugyancsak az lesz, hogy a koleszterin túltermelődik a sejtekben. Ruan és mtsai (2001) mutatták ki, hogy TNF- $\alpha$ , valamint IL-1 $\beta$  stimulus hatására humán mesangialis sejtekben a SCAP gének amplifikációja, valamint a SCAP szintézis fokozódása indul meg, melynek eredménye az LDL receptorok expressziójának fokozódása lesz. Tekintettel arra, hogy a magba bejutó SREBP2 N-terminális 450 aminosav nem csupán az LDL receptor, de a HMG CoA reductáz szintézisét is fokozza, joggal tételezhetjük fel, hogy az intracelluláris koleszterin szintet mind a koleszterin import, mind az endogén bioszintézis növeli. Legújabbán Fon Tacer és mtsai (2007) mutatták ki, egerekben, hogy TNF- $\alpha$  adására egerekben a májban fokozódott az Insig gének expressziója, fokozódott a keringésben az LDL-koleszterin mennyisége, továbbá csökkent a koleszterin lebontási termékeinek távozása az epével. A citokinek eddigi káros, az ateroszklerózist fokozó hatásához ez az eddig ismeretlen, endogén koleszterin szintézist fokozó hatás is hozzájárul.

## **4.2. Közvetlen előzmények és célkitűzés**

### **4.2.1. A munkacsoport kísérletei, melyek a jelen munkához elvezettek**

Először 1998-ban közölte a munkacsoport azt a jelenséget, hogy 2 típusú DM-ben a betegektől nyert nyugvó (resting) monociták [ $^{14}\text{C}$ ]acetát inkorporációja a koleszterin frakcióba 26.5%-al nagyobb volt, mint a kontroll csoportokban. Ennek ellenére, az LDL adásával kiváltható negatív “feed back” reakció csökkent mértékben érvényesült: az 50  $\mu\text{g/mL}$  LDL proteinnel történő blokkolás után a kontroll csoportban a [ $^{14}\text{C}$ ]acetát

inkorporáció 54.7%-al csökkent, míg a diabetes-es csoportban ez csak 7.4% volt (Paragh és mtsai, 1998). Lényegében az LDL által kiváltott negatív “feed back” reakció ehhez hasonló csökkenése volt kimutatható végső stádiumban levő hemodializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek monocitáinak vizsgálatakor is: a kontroll monocitákban az LDL által kiváltott [<sup>14</sup>C]acetát inkorporáció csökkenése 49.1%, míg a beteg csoportban csak 24.8% volt (Kárpáti és mtsai, 1999). A legmarkánsabb eredményeket akkor kapták, amikor a hiperkoleszterinémiával társult obez betegek monocitáinak endogén koleszterin szintézisét vizsgálták: ebben az esetben a beteg csoportban a resting monociták [<sup>14</sup>C]acetát inkorporációjának az emelkedése 62.3%-os volt, és a kontroll csoportban észlelt LDL által kiváltott 45.6%-os csökkenéssel szemben a beteg csoportban a csökkenés csak 16.7% volt. Ebben az esetben, a csak HC-ben szenvedő, valamint az obez, de nem hiperkoleszterinémiás betegekben a kontrolloktól eltérés nem volt kimutatható. (Paragh és mtsai, 2003). Ezek a kísérletek arra mutattak, hogy 2 típusú diabetesben, valamint obez HC-s betegek esetében eleve magasabb az endogén koleszterin szintézis, de ami ennél is fontosabb, az LDL-el bevitt koleszterint a sejt nem, vagy csak csökkent mértékben képes észlelni. Ezek szerint ezekben a betegekben, pl. a monocitákban, a 4.1.3 fejezetben tárgyalt regulációs mechanizmus károsodott. A teljesség kedvéért meg kell még említeni, hogy a diabetes-es, valamint a hemodializált betegek monocitáinak 5 napos tenyésztése után nyert makrofágokban az acetilált LDL (acLDL) kötődése és intracelluláris degradációja nem változott, de csökkent az acLDL által kiváltott apoE szekréció, és megnőtt a koleszterin zárványok száma (Kárpáti és mtsai, 1999). Összefoglalva, az előzetes vizsgálatok szerint különböző, az ateroszklerózis szempontjából rizikótényezőnek számító anyagcsere megbetegedésben mind a monocitákban, mind a tenyésztés útján kialakult makrofágokban nem az LDL receptorok számának vagy funkciójának csökkenésével, hanem az intracelluláris regulációs mechanizmusok károsodásával kell számolni. Az is figyelemreméltó, hogy ezek a zavarok rövidebb-hosszabb in vitro tenyésztések után is kimutathatók, tehát nem az extracelluláris milliő függvényei.

#### **4.2.2. A jelen munka célkitűzései**

*Az intracelluláris koleszterin homeosztázis zavarainak leggyakoribb oka a SCAP vagy az Insig protein génjeinek mutációja, továbbá, mint ez az idézett*

*irodalomból ismeretes, a SCAP gének expresszójának fokozódása. Az is ismert, hogy a gyulladáscsökkentő citokinek képesek fokozni a SCAP szintézist, így joggal merült fel az a kérdés, hogy a citokin természetű leptin, amely mint azt kimutattuk, képes fokozni a mevalonát ciklus intenzitását, játszhat-e valamilyen szerepet az intracelluláris koleszterin szintézis fokozásában. A továbbiakban azt is tisztázni kívántuk, hogy a HC-ben szenvedő betegek esetében található-e különbség a kontroll és a HC monociták között a leptin által kiváltott mevalonát ciklus fokozásában és a jelátviteli útvonalban.*

### **4.3. Az alkalmazott módszerek**

#### **4.3.1. Beteganyag**

A vizsgálatokat egészséges önkéntes véradók, valamint frissen diagnosztizált HC-ben szenvedő betegek monocitával végeztük. A betegek a kísérlet idején semmilyen gyógyszeres kezelésben nem részesültek. A Zocor (Fluvastatin) terápiát a vérvételek után kezdtük el, és 4 hetes (40 mg/nap) kezelés után a 31 beteg közül utólag 4 beteget kizártunk a kísérletekből, mivel nem jól reagáltak a statin-kezelésre. A megmaradt 27 beteg a Zocor kezelésre jól reagált, amit az is mutatott, hogy a szérumszintű össz.koleszterin  $30.6 \pm 5.1\%$ -al, míg az LDL-C  $39.8 \pm 6.1\%$ -al csökkent. A továbbiakban Goldstein és Brown (1974) módszere szerint kizártuk az LDL receptor számszerű csökkenésének és/vagy diszfunkciójának a lehetőségét. A munkacsoport régebbi munkái alapján (Paragh és mtsai, 2003) további kritérium volt a betegek kiválogatásakor a resting monocitákban mért bazális endogén koleszterin szintézis mértéke ( $> 13.1 \text{ pmol}/60 \text{ perc}/10^7 \text{ monocita}$ ), továbbá a 6 mmol/L izolált LDL-re adott koleszterin szintézis csökkenés, ( $< 45\%$ ).

A. Táblázat

Paraméterek	Kontroll	HC
n =	20	21
Életkor (év)	55.6±6.3	52.8±5.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.8±3.4	23.1±4.1
WHR	0.85±0.1	1.01±0.18
Éhomi vércukor (mmol/L)	5.1±0.68	5.8±1.1
Insulin (mU/L)	22.7±3.4	25.5±5.8
HbA <sub>1c</sub> %	4.9±0.53	5.1±1.1
Koleszterin (mmol/L)	4.5±0.57	9.8±1.05 <sup>a</sup>
Triglycerid (mmol/L)	1.71±0.23	1.94±0.38
HDL-C (mmol/L)	1.45±0.15	1.55±0.17
LDL-C (mmol/L)	3.27±0.43	6.44±1.00 <sup>a</sup>
Koleszterin szintézis resting monocitákba (pmol/10 <sup>7</sup> sejt/60 min)	12.7±1.8	15.4±2.4 <sup>a</sup>
LDL-C-indukálta (6 mmol/L) koleszterin szintézis gátlás %	57.8±8.7	12.6±1.6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> A különbség a kontroll és a HC csoport között szignifikáns ( $P < 0.001$ ). Rövidítések: HC = hyperkoleszterinémia; BMI = body mass index; WHR = waist-to-hip-ratio

Az ily módon szelektált kontroll és beteganyag demográfiai adatait az A Táblázat tartalmazza. A beteganyagra vonatkozó általános leírásokat lásd a **2.3.1. fejezetben**.

A táblázatban feltüntetett vizsgálatokat a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében végezték el. Egy-egy kísérlet elvégzéséhez a vénás vérvétel (10-15 mL) 4-5 napos intervallumokban történt 6-8 HC betegtől és 3-4 kontroll véradótól. Az interassay coefficiens nem haladta meg a 15%-ot. A DEOEC etikai bizottságától az engedélyt a kísérletekhez megkaptuk.

#### **4.3.2 Sejtek izolálása**

A monociták vérből való izolálására vonatkozó leírásokat lásd a **2.3.2 fejezetben**.

#### **4.3.3. In vitro kísérleti körülmények**

A sejteket általában HBSS-ben szuszpendáltuk és a stimulációkhoz a következő agonistákat használtuk fel előzetes kísérletek után: 10 nM angiotensin II (Serva), 50-100 ng/mL leptin (Sigma), A gátlószereket a következő koncentrációkban és ideig alkalmaztuk: a PLC-t gátló 5  $\mu$ M neomycint (Sigma) 60 percig, a Gi proteint gátló 100 ng/mL pertussis toxint (Sigma) 120 percig, az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> transzlokációt gátló 1.0  $\mu$ M thapsigargin (Sigma) 60 percig, a PI3 kinase-t gátló 20 nM wortmannint (Sigma) 30 percig, a MAP kinase-t gátló 50  $\mu$ M PD98059-t (Sigma) 30 percig, a konvencionális

protein kinase C cPKC inhibitor 1.0  $\mu\text{M}$  H-7-t (Sigma) 60 percig, a HMG CoA reductase-t gátló 5  $\mu\text{M}$  fluvastatint (Merck) 60 percig, 60 percig, a SCAP-SREBP komplex kialakulását gátló 25  $\mu\text{M}$  25-hydroxycholesterol-t (Sigma) methyl- $\beta$ -cyclodextrin komplexben 120 percig (Adams és mtsai, . Végül a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx gátlására a sejteket Medium V-ben inkubáltuk 60 percig. A Medium V 10  $\mu\text{M}$  verapamilt ((Sigma) és 3 mmol/L EGTA-t tartalmazott  $\text{Ca}^{2+}$ - mentes HBSS-ben.

#### **4.3.4. Endogén koleszterin bioszintézis meghatározás**

A mérést McNamara és mtsai (1985) módszere szerint végeztük. A HBSS-ben elkészített sejtszuszpenziót ( $10^6$  sejt/mL) 4 órán keresztül inkubáltuk 2.5 nmol/L [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]acetát-al (Amersham, 1.8 GBq/mmol). A stimuláció az angiotensin II és a leptin különböző koncentrációval történt. A különböző gátlószereket a stimuláció előtt a megjelölt időben (30-120 perc) és végső koncentrációkban adtuk a sejtekhez (lásd. 4.3.3. fejezet ) A reakciót 1.0 mol/L KOH -val állítottuk le, majd a mintákat szaponifikáltuk  $70^\circ\text{C}$ -n, 90 percig. Belső standardként [ $1,2\text{-}^3\text{H}$ ]cholesterol (Amersham, 1480 GBq/mmol) használtunk. A nem szaponifiált lipideket hexane-al extraháltuk, majd az extraktumot alumínium oszlopokra helyeztük és a szteroid frakciót aceton/diethyleter 1:1 arányú keverékével eluáltuk. A mintákat  $\text{N}_2$  áramlás alatt szárítottuk, a radioaktivitásokat Packard CA liquid scintillációs számlálóban meghatároztuk és a koleszterin szintézis intenzitását pmol/60 min/ $10^7$  sejtben fejeztük ki.

#### **4.3.4.Ins(1,4,5)P3 meghatározás**

A meghatározást Shayman és BeMeut (1988) által módosított eredetileg Dillon és mtsai (1987) által kidolgozott, valamint Patthy és mtsai (1990) módszerének segítségével „reverse phase ion-pair” chromatográfiával végeztük. A leírást részletesen lásd a **3.3.6. fejezetben**.

#### **4.3.5. Intracelluláris szabad $\text{Ca}^{2+}$ meghatározás**

Az intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$  meghatározásokat Mc Cormach és Cobbold (1990) módszere szerint végeztük. Részletes leírást lásd a **3.3.5 fejezetben**. A különböző gátlószerekkel történő előinkubációk során a leghosszabb inkubációs időhöz igazodva, legalább 120 percig inkubáltuk a sejteket HBSS-ben, majd a **4.3.3. fejezetben** feltüntetett időpontoknak megfelelően adtuk a rendszerhez stimuláció előtt a

gátlószereket. A gátlószerek az Indo1/AM felvételét nem befolyásolták. A stimuláció már a küvettában történt. Egyes esetekben a mérések Medium V-ben történtek: a  $\text{Ca}^{2+}$  mentesen elkészített HBSS puffer 10  $\mu\text{M}$  verapamil (Sigma) és 3 mM EGTA-t tartalmazott.

#### **4.3.7. Membránhoz kötött koleszterin meghatározása**

A sejtek membránhoz kötött koleszterin tartalmát Goh és mtsai (1990) módszere szerint határoztuk meg. A módszert a **3.3.9. fejezetben** ismertettük.

#### **Matematikai kiértékelés**

A paramétereket leíró statisztikával jellemeztük (átlag, szórás, esetszám). Az egyes betegcsoportok kontrollhoz viszonyított különbségét ANOVA teszttel illetve párosítatlan t-teszttel hasonlítottuk össze. A 6 percig tartó  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  meghatározások során a görbe alatti területeket (area under curves (AUC)) szintén ANOVA segítségével hasonlítottuk össze, a részletes összevetésekhez pedig a Newman-Keuls tesztet használtunk kiegészítésként. Az elemzések során  $p \leq 0.05$  valószínűségi szintet tekintettük szignifikánsnak.

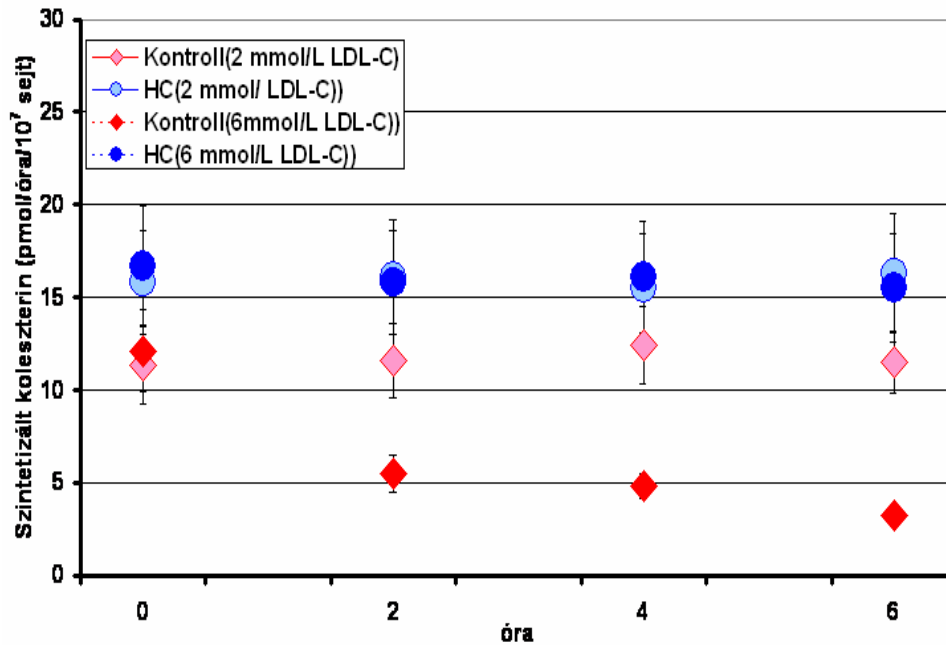
**Saját munka:** A betegek kiválasztásában, a kísérletek megtervezésében és kiértékelésében valamint a laboratóriumi munka egyes fázisaiban vettem részt.

### **4.4. Kísérleti eredmények**

Első kísérletsorozatunkban kontroll, valamint magas endogén koleszterin bioszintézist produkáló betegcsoport monocitáit 6 órán keresztül inkubáltuk 2 és 6 mmol/L LDL tartalmú tápfolyadékban, annak eldöntésére, hogy az inkubáció alatt változik-e a sejtek  $^{14}\text{C}$ acetát inkorporációja a koleszterin frakcióba (**5. ábra**). Eredményeink szerint a 2 mmol/L LDL-t tartalmazó mediumban a HC monocitákban a koleszterin bioszintézis üteme a 6 órás inkubáció alatt végig magasabb volt, mint a kontroll sejtekben. A jelzett acetát beépülés különben sem a kontroll, sem a HC monocitákban nem változott a 6 órás inkubációs periódus alatt. Fontos eredménynek tartjuk, hogy a 6 mmol/L LDL-t tartalmazó médiumban a kontroll monocitákban megfigyelhető volt a negatív feed back jelenség, amennyiben az idő előrehaladtával a  $^{14}\text{C}$ acetát inkorporáció jelentősen csökkent. Ezzel szemben a HC monocitákban, mint ezt a **4.2.1 fejezetben** ismertettük, az LDL adásával kiváltott negatív feed back reakció nem érvényesült. Ezek a sejtek tehát LDL-el felvett koleszterin mennyiség hatására nem

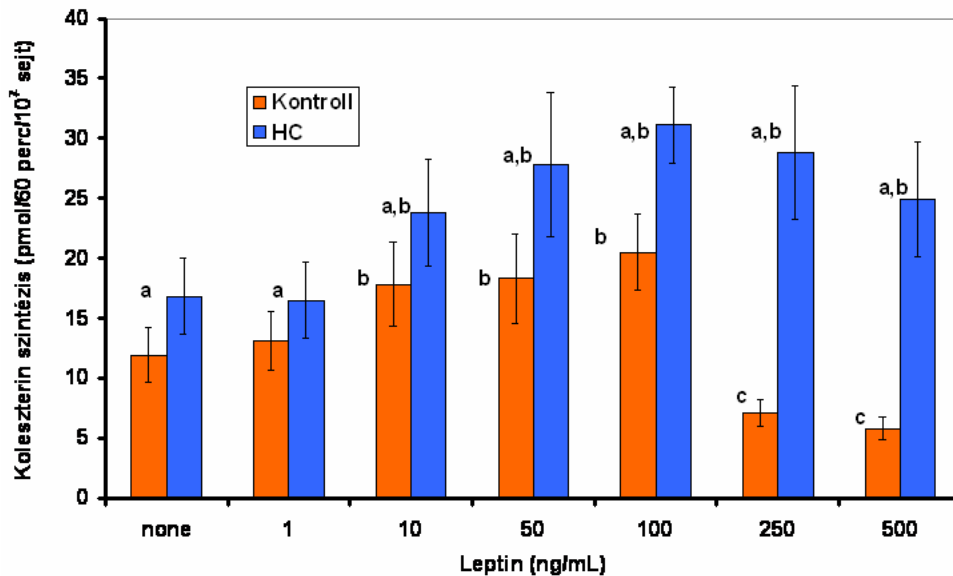
voltak képesek csökkenteni a saját endogén koleszterin szintézisüket. Eredményeink szerint tehát az világossá vált, hogy a koleszterin homeosztázis ezekben a kórosnak

**4/5 ábra. A [<sup>14</sup>C]acetát beépülés alakulása kontroll és HC monocitába 2 és 6 mmol/L LDL jelenlétében a 6 órás inkubáció alatt**



tekinthető HC monocitákban alapvetően nem függ az extracelluláris millió koleszterin tartalmától, mivel feltehetően a genetikai szabályozás károsult. A **2.4 fejezetben** tárgyalt kísérleti eredmények alapján az világos volt, hogy a leptin bizonyos koncentráció tartományban képes a mevalonát ciklus intenzitását fokozni, hiszen a leptin által indukált statin-szenzitív szuperoxid produkció éppen a mevalonát ciklus aktivitásának fokozásán alapszik. A **6. ábrán** az emelkedő koncentrációban alkalmazott leptin hatását így, az endogén koleszterin bioszintézis alakulására vizsgáltuk meg. Eredményeink szerint a leptin 10-100 ng/mL koncentrációkban szignifikánsan fokozta a koleszterin szintézist a kontroll sejtekben, míg > 250 ng/mL koncentrációkban a nyugalmi bazális értékhez képest csökkentette azt. Egészen másként hatott azonban a

leptin a HC monocitákra, mivel azokban 10-1000 ng/mL koncentrációban csak fokozni volt képes a koleszterin szintézisét, azaz a leptin koleszterin szintézist csökkentő hatása a **4/6 ábra. Különböző leptin koncentrációk hatása kontroll és HC monociták endogén koleszterin szintézisére**



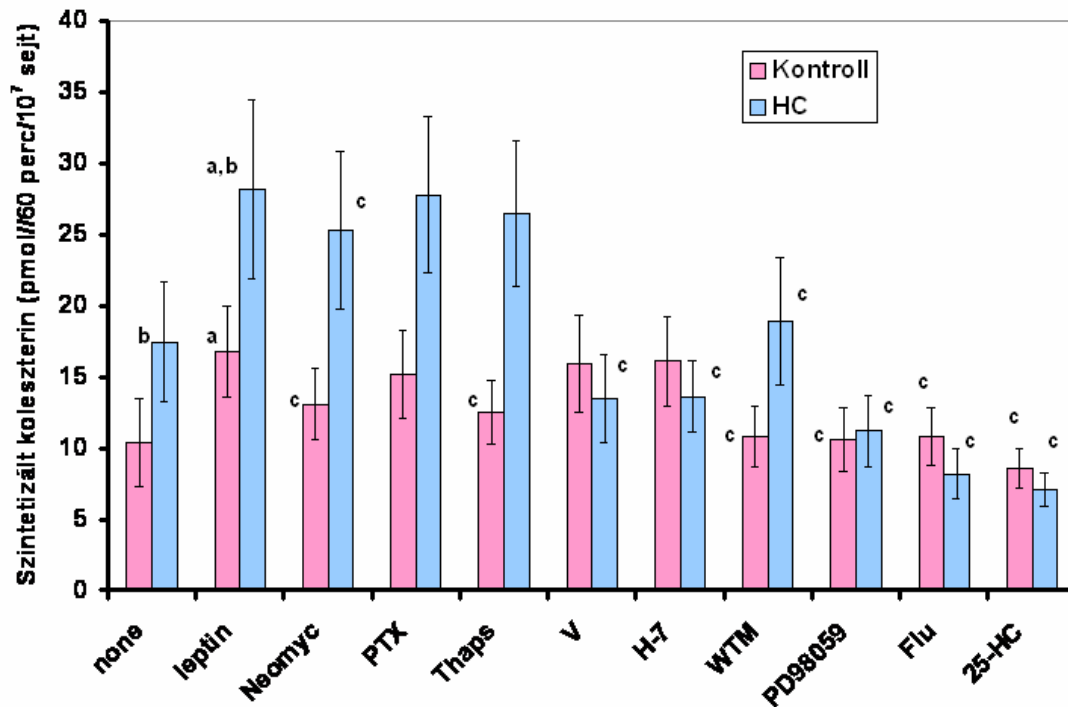
<sup>a</sup> A kontroll és a HC csoport között a különbség szignifikáns ( $P < 0.001$ ); <sup>b</sup> A leptin okozta emelkedés szignifikáns ( $P < 0.001$ ); <sup>c</sup> A leptin okozta szupresszió szignifikáns ( $P < 0.001$ ).

HC monocitákban egyáltalán nem érvényesült. Ki kell emelnünk azt, hogy mind a nyugvó sejtekben, mind az összes alkalmazott koncentráció esetében a HC sejtekben magasabb volt az endogén koleszterin szintézis, mint a kontroll monocitákban. A továbbiakban a **2.4. fejezet 8. ábráján** feltüntetett és a szuperoxid stimulációt ábrázoló kísérleti modellhez hasonlóan megvizsgáltuk, hogy a leptin 100 ng/mL koncentrációjának hatása a koleszterin szintézis fokozódására milyen szignalizációs utakon történhet. Ezekben a kísérletekben is különböző, az intracelluláris szignalizációt elfogadottan gátló szerek jelenlétében történt a leptin stimuláció (**7. ábra**). Így, a sejteket a stimuláció előtt a PLC-t gátló neomycinnel, a Gi proteint gátló PTX-el, az intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktárakat kiürítő thapsigarginnal, a  $Ca^{2+}$  csatornákat gátló verapamillal (Medium V =  $Ca^{2+}$  mentes médium + 3 mM EGTA + verapamil) kezeltük, a továbbiakban alkalmaztuk még a



konvencionális PKC gátló H-7-et, a PI3K-t gátló wortmannint, a MAPK-t gátló PD98059-t, a HMG CoA reduktáz-t gátló fluvastatin és a SCAP-ot gátló 25-HC-t.

**4/7 ábra. Különböző gátlószerek hatása a 100 ng/mL leptin által létrehozott koleszterin szintézis fokozódására**



*Rövidítések: HC=hyperkoleszterinémia, Neomyc=neomycin, PTX=pertussis toxin, Thaps=thapsigargin, V=verapamil, WTM=wortmannin, Flu=fluvastatin, 25-HC 25-hydroxycholesterol.*

<sup>a</sup> A növekedés szignifikáns volt a nyugvó sejtekhez képest ( $P<0.001$ );

<sup>b</sup> A kontroll és a HC csoport közti különbség szignifikáns volt ( $P<0.001$ ); <sup>c</sup> A gátlás szignifikáns volt ( $P<0.001$ ).

Eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze: 1. Arra az eredményre alapozva, hogy a kontroll sejtekben a leptin által kiváltott stimulációt a neomycin, a thapsigargin, a wortmannin, a PD98059, a fluvastatin és a 25-HC gátolta, arra kell következtetnünk, hogy a jeltovábbításban a PLC és a következményes intracelluláris raktárakból származó  $Ca^{2+}$  szignál, a PI3K és MAPK vesz részt, továbbá a koleszterin szintéziséért felelő kulcsenzim, a HMG CoA reduktáz, valamint a SCAP játszik fontos szerepet. A HC

monocitákban a jeltovábbítás útja annyiban tér el a kontroll sejtekben észleltektől, hogy H-7-szenzitív PKC, valamint a verapamil-érzékeny csatornákon beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  vesz részt

**1 Táblázat. A 100 ng/mL leptin által léterhozott Ins(1,4,5)P3 szignál alakulása kontroll és HC monocitákban**

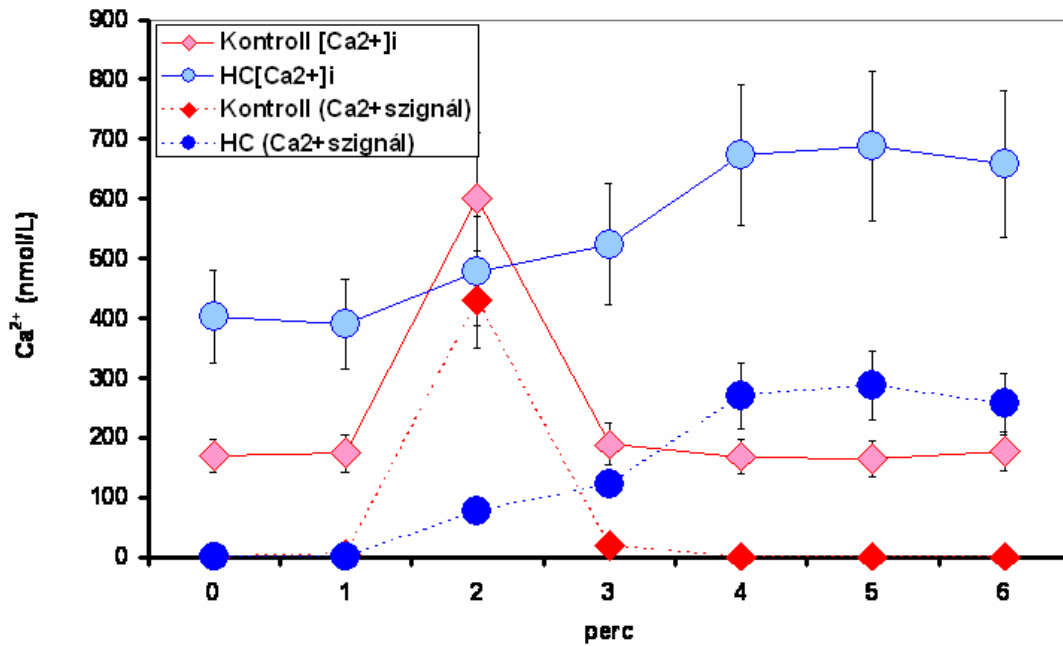
Inkubáció	Kontroll		HC	
	n = 20		n = 21	
	Ins(1,4,5)P3 (pmol/mg protein)			
	Átlag±SD	P	Átlag±SD	P
Leptin	58.3±12.5		65.7±11.3	
Neomycin+leptin	15.5±3.2	<0.001	17.8±3.8	<0.001
PTX+leptin	61.1±11.3		64.8±13.1	
WMN+leptin	11.6±2.3	<0.001	10.5±2.1	<0.001
PD98059+leptin	54.8±11.6		63.7±11.8	

*Rövidítések: PTX= pertussis toxin; WTM= wortmannin. A basalis Ins(1,4,5)P3 szint a monocitákban 21.8±3.7, ill. 38.4±6.5 pmol/mg protein volt.*

a jeltovábbításban, míg a thapsigargin teljesen hatástalan volt. A kontroll és HC sejtek között a leptin- szignalizációból adódó leglényegesebb különbség abban foglalható össze, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál eredete a kontroll monocitákban az PLC → Ins(1,4,5)P3 →  $\text{Ca}^{2+}$  út vonal, míg a HC sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$  influx → PKC transzlokáció. A 100 ng/mL leptin által kiváltott Ins(1,4,5)P3 szignál alakulását az **1. Táblázatban** tüntettük fel. Elsősorban meg kell jegyeznünk, hogy a HC sejtekben a nyugvó, bazális érték magasabb volt, mint a kontroll sejtekben, ezért a HC sejtekben a leptin által stimulált Ins(1,4,5)P3 emelkedés csak 71.1% volt, míg a kontrollokban 167.4%. A gátlást mindkét csoportban a PLC gátló neomycin és a PI3K gátló wortmannin fejtette ki, míg a PTX hatástalannak bizonyult. Ebből arra következtettünk, hogy az Ins(1,4,5)P3 szignál mind a kontroll, mind a HC csoportban létrejön, de egy PTX-rezisztens alternatív úton keresztül. Ezek után érdeklődésünk a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál alakulása felé fordult. A **3.4.2. fejezetben** tárgyalt, és ott, az obezitásban észlet és a **8. ábrán** feltüntetett leptin által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  szignálok tanulságait alapul véve, a kísérleteket a HC monocitákkal is elvégeztük. Eredményeinket

a **8. ábrán** tüntettük fel. Az ábrán jól látható, hogy leptin stimulus után a  $[Ca^{2+}]_i$  a kontroll sejtekben egy határozott csúcsot mutat a stimuláció 2-ik percében, majd gyorsan

**4/8 ábra. A leptin (100 ng/mL) által kiváltott  $[Ca^{2+}]_i$  szintek és  $Ca^{2+}$  szignálok alakulása kontroll és HC monocitákban**



normalizálódik. Ezzel szemben a HC monocitákban a magas nyugalmi érték a stimulus hatására csak lassan emelkedik, és a csúcsát csak a 4-ik percben éri el, és az induló értékre való visszatérés még a 6-ik percben sem következik be. Amennyiben a  $Ca^{2+}$  szignálokot tüntettük fel oly módon, hogy az induló értékeket kivontuk a leptin által stimulált értékekből, és a 6 perces mérési görbék alatti területeket számítottuk ki (areas under curves), és az értékeket AUC-ban adtuk meg, kiderült, hogy a leptin által indukált  $Ca^{2+}$  szignál a HC monocitákban nagyobb, mint a kontroll sejtekben. A **2. Táblázat** adatai számszerűen is jól mutatják, hogy a  $Ca^{2+}$  szignál AUC-ban kifejezve milyen gátlószerekkel és milyen mértékben gátlható. A kontroll sejtekben a legnagyobb gátlásokat a neomycin, a thapsigargin és a wortmannin eredményezték, de kisfokú gátlást ( $P < 0.05$ ) a Medium V is képes volt kifejteni. Ezzel szemben a HC monocitákban a  $Ca^{2+}$  szignál igazán jelentős gátlójának csak a Medium V mutatkozott, de kisebb gátlást a

wortmannin, a neomycin és a thapsigargin is kifejtett. Ez arra mutat -megegyezően az előbbi kísérletekkel - hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál létrejöttében a kontroll sejtekben is számolnunk

**4/2 Táblázat. A leptin által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  szignálok (AUC-ban kifejezve) és azok változása különböző gátlószerek jelenlétében kontroll és HC monocitákban**

Inkubációk	$\text{Ca}^{2+}$ szignál AUC-ban*	
	Kontroll	HC
	n = 20	n = 21
Leptin	1351±328	4562±863 <sup>a</sup>
Neomyc + leptin	767±15 <sup>b</sup>	4018±78.5 <sup>c</sup>
PTX + leptin	1289±258	4399±901
Thaps + leptin	512±78 <sup>b</sup>	4012±75.5 <sup>c</sup>
Medium V + leptin	1217±201 <sup>d</sup>	891±161 <sup>b</sup>
WMN + leptin	811±163 <sup>b</sup>	4008±722 <sup>a,b</sup>

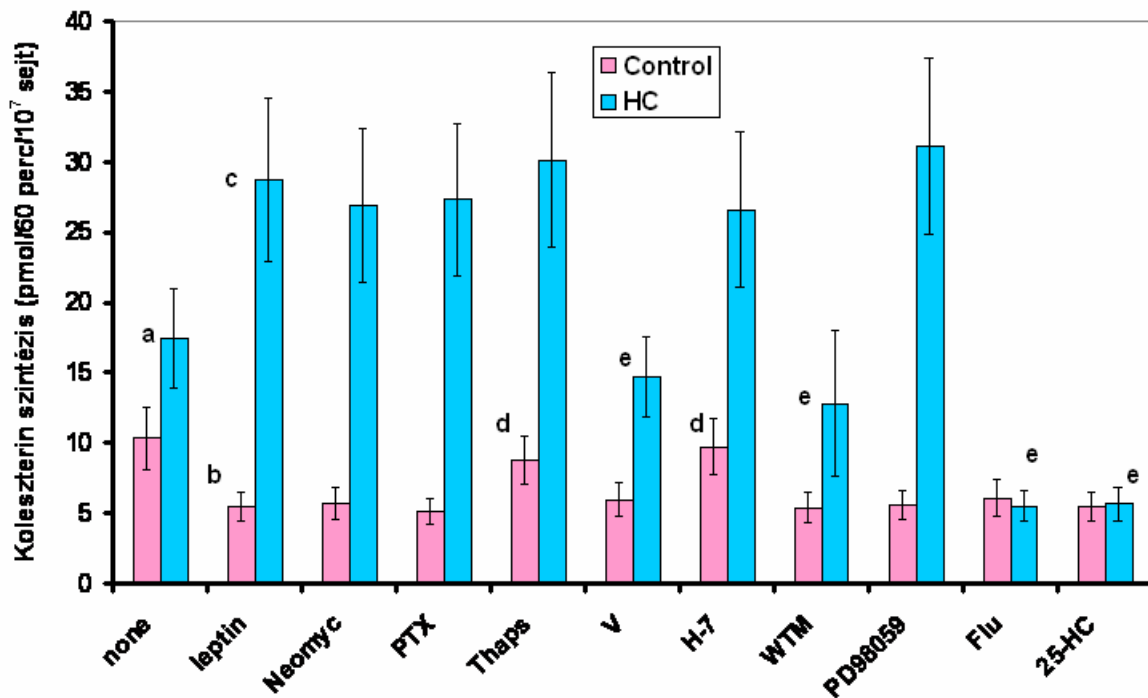
*Rövidítések. HC= hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek; PTX= pertussis toxin; WTM = wortmannin; Medium V = $\text{Ca}^{2+}$ -mentes medium +Verapamil; Thaps = thapsigargin; A sejtek 100 ng/mL leptinnel lettek stimulálva; \*Az értékeket, mint a 6 perces időgörbe alatti területet számoltuk (AUC. <sup>a</sup>A kontroll és a HC monociták közti értékek szignifikánsan különböznek egymástól ( $P<0.001$ ); <sup>b</sup>A gátlások szignifikánsak ( $P<0.001$ ), <sup>c</sup> ( $P<0.01$ ), <sup>d</sup> ( $P<0.05$ ).*

kell a  $\text{Ca}^{2+}$  influx-al, míg a HC sejtekben a nagymértékű  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás mellett az endogén  $\text{Ca}^{2+}$  transzlokáció is részt vesz a folyamatban.

Összefoglalva a kis (100 ng/mL) leptin koncentráció hatását a koleszterin szintézis fokozódására, eredményeink alapján úgy véljük, a stimuláció a citokin-stimulusokhoz hasonlóan elvezet a HMG CoA reduktáz szintézisét szabályozó gének amplifikációjához, amelynek eddig ismert egyetlen útja az Insig- SCAP-SREBP2 komplex által létrehozott promóción keresztül vezet. A SCAP „overproduction” szerepére utal, hogy a leptin hatását 25-HC-val is gátolni tudtuk. Ez az út a kontroll és a HC monocitákban azonosnak tűnik. Más kérdés, hogy a leptin intracelluláris

szignalizációja milyen utakon keresztül éri el a SCAP-SREBP2 működését szabályozó géneket. Ezekben a folyamatokban részt vesz a PLC, az Ins(1,4,5)P3 és  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, továbbá a PI3K és a MAPK. Eredményeink szerint a különbség, azaz a nagyobb reakció a HC monocitákban abból adódik, hogy a jeltovábbításban a nagyobb, és az extracelluláris térből származó  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, továbbá a konvencionális PKC aktiválódás is részt vesz.

**4/9 ábra. Különböző gátlószerek hatása az 500 ng/mL leptin által létrehozott koleszterin szintézis változásokra kontroll és HC monocitákban**

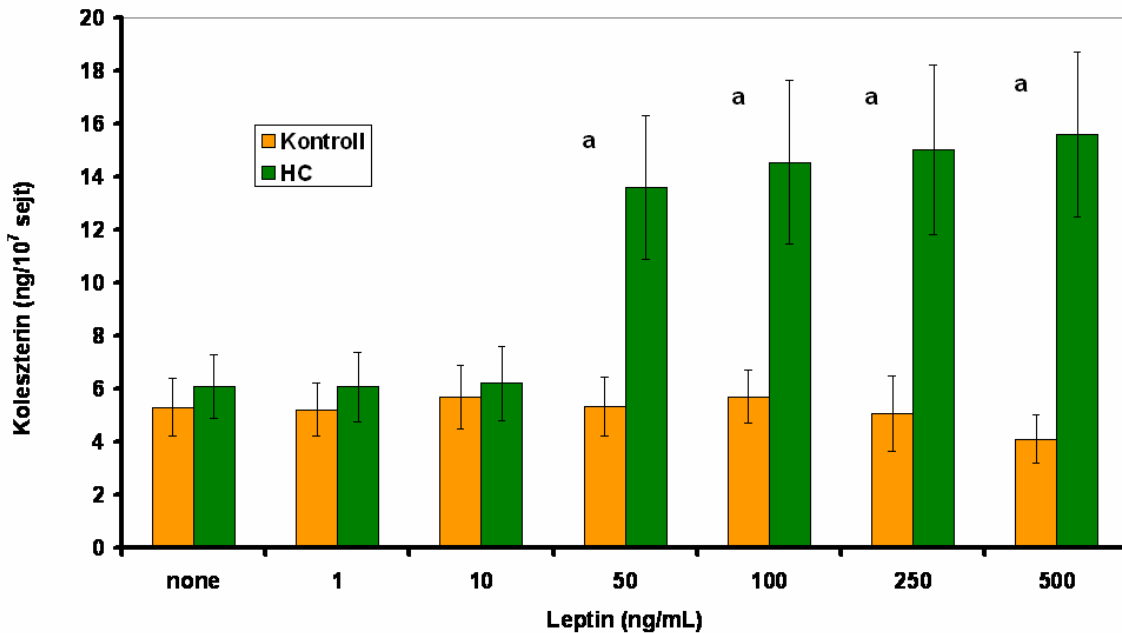


*Rövidítések: lásd a 7. ábrán. <sup>a</sup> A nyugvó sejtekben a koleszterin szintézis szignifikánsan nagyobb, mint a kontrollokban ( $P < 0.001$ ); <sup>b</sup> a nem-kezelt sejtekhez képest a csökkenés szignifikáns ( $P < 0.001$ ); <sup>c</sup> a nem-kezelt sejtekhez képest az emelkedés szignifikáns ( $P < 0.001$ ); <sup>d</sup> a csökkenés gátlása szignifikáns ( $P < 0.001$ ); <sup>e</sup> az emelkedés gátlása szignifikáns ( $P < 0.001$ ).*

A következő lépésben az 500 ng/mL leptin által létrehozott koleszterin szintézis változáshoz vezető szignalizációs útakat kíséreltük meghatározni kontroll és HC monocitákban (9. ábra). Ebben az esetben is megállapítható, hogy a nyugvó HC

monocitákban az endogén koleszterin szintézis magasabb mint a kontroll sejtekben. A továbbiakban az is kitűnik, hogy a kontrollokban a nagy leptin koncentráció hatására a szintézis csökkenése 50.7%, és ezt a csökkenést thapsigargin, H-7 és wortmannin előkezeléssel tudtuk részlegesen kivédeni. A HC sejtekben ezzel szemben az 500 ng/mL leptin hatására 64.8%-os emelkedést találtunk, melyet, a mevalonát ciklusra ható fluvastatinon és 25-HC-n kívül a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx-ot gátló Medium V-vel, valamint a PI3K-t gátló wortmanninnal tudtuk kivédeni. Érdekes tényként szögezhetjük le tehát, hogy az 500 ng/mL leptinnel stimulált kontroll és HC monocitákban nem csak a jeltovábbítás útja, de a stimuláció eredménye is merőben különbözik a kétféle sejten.

**4/10 ábra. Kontroll és HC monociták sejthez-kötött koleszterin tartalma különböző leptin koncentrációkkal történő stimuláció után 4 órával**



<sup>a</sup> a sejthez kötött koleszterin tartalom a nem kezelt állapothoz képest szignifikánsan megemelkedett ( $P < 0.001$ )

A kontroll sejtekben a leptin által kiváltott koleszterin szintézist érintő szuppresszióban a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, a H-7 szenzitív PKC játszik szerepet, míg a HC monocitákban a  $\text{Ca}^{2+}$  influx és a PI3 kinase útján a koleszterin szintézis további fokozódása jön létre.

Végül igen érdekes eredményt kaptunk, amikor megvizsgáltuk a különböző koncentrációjú leptinnel 4 órán keresztül szérum mentes médiumban kezelt kontroll és HC monociták koleszterin tartalmát (**10. ábra**). A sejthez kötött koleszterin tartalom ugyanis csak az 50-500 ng/mL leptinnel stimulált HC monocitákban emelkedett meg szignifikánsan. Kísérleteink alapján tehát azt kimondhatjuk, hogy az egészséges kontroll véradoktól nyert monocitákban leptin-stimuláció hatására bár megnőtt az endogén koleszterin szintézise, de feltehetően megnőtt a felesleges koleszterin leadása, a reverz koleszterin transzport is. Ez a folyamat azonban a HC-ben szenvedő betegek sejteiben nem következik be.

#### **4.5. Kísérleti eredmények megbeszélése**

Eredményeink értékeléséhez feltétlenül figyelembe kell venni, amit már a módszertani részben (**4.3.1**) is leírtunk, hogy kísérleteink során olyan betegek monocitáival dolgoztunk, akiknél előzetes teszteléssel ki tudtuk mutatni a sejtekben a fokozott endogén koleszterin szintézist, továbbá a reaktivitás csökkenését LDL hozzáadása után. Ez a jelenség az általunk vizsgált betegcsoport 78.7%-ában volt kimutatható, míg az általunk kiválasztott kontroll csoportban egyetlen esetet sem találtunk. Másként fogalmazva azt mondhatjuk, hogy a hiperkoleszterinémiák egy csoportjára jellemző, hogy az intracelluláris koleszterin szintézise megnő, és a koleszterin bevitelt követő negatív „feed back” reakció nem, vagy csak csökkenten működik. Tekintettel arra, hogy az in vitro kísérletekhez szükséges procedúrák során a HC monociták tulajdonságai nem változnak, fel kell tételeznünk, hogy a sejtek kóros, a kontroll monocitákétól eltérő tulajdonsággal rendelkeznek. Eredményeink szerint ezek a sejtek a kontroll sejtektől eltérően reagálnak a kis és nagy koncentrációjú leptin stimulációra, amiben biztosan szerepet játszanak a sejtmembránt érintő változások. A fokozott membrán rigiditás, a membránban levő verapamil-szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák

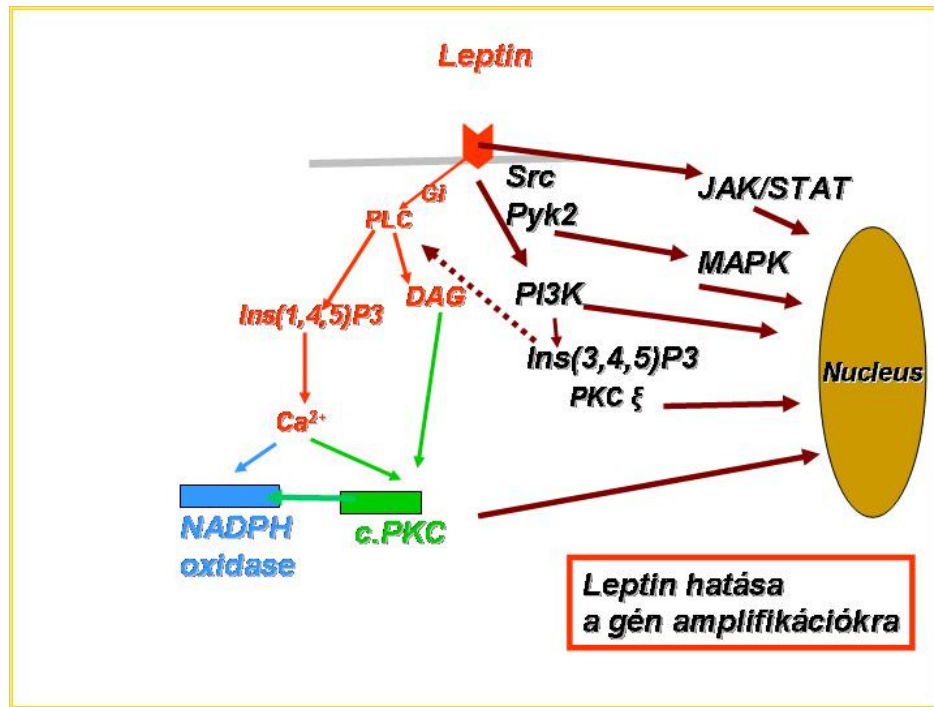
viselkedése, a membránhoz kötött koleszterin mennyiségének megnövekedése és a már nyugalmi állapotban megemelkedett convencionalis PKC aktivitás jellemzi ugyanis a HC-ben szenvedő betegek leukocitáit. Jelen vizsgálataink alapján csak feltételezhetjük, hogy ezekben az általunk kiválogatott betegekben olyan tulajdonságai kódoltak genetikailag a monocitáknak, melyeknek eredménye lett a leptinre adott eltérő reakció.

A 10-100 ng/mL leptin hatására bekövetkező fokozott koleszterin szintézis kontroll és HC sejtekben egyaránt magyarázható azokkal az adatokkal mely szerint a proinflammatorikus citokinek hatására megnő az LDL receptorok expressziója, és ez a SCAP „overproduction” eredménye (Ruan és mtsai, 2001; Liu és mtsai, 2003). Direkt vizsgálatok hiányában még annyit tehetünk ehhez, hogy a 25-HC által létrejött gátlás Adams és mtsai (2004) eredményei szerint a SCAP-Insig kötődését idézi elő, oly módon, hogy a gátlószer egy putatív szenzor proteinhez kötődik, mely azután második lépésben elősegíti a SCAP kötődését az Insig proteinhez. Jelen tudásunk alapján tehát nem zárható ki az sem, hogy az Insig proteinek aránya, esetleg mennyisége és/vagy kötőképessége változik meg a HC sejtekben (Loewen és Levine, 2002). Eredményeink alapján azok a jelutóváltási utak, amelyek a nucleusban kiválthatják a SCAP és/vagy Insig proteinek génjeinek megváltozott expresszióját, leptin stimuláció után mind a kontroll, mind a HC monocitákban jelen lehetnek (Sweeney, 2002; Frühbeck, 2006). A leptin stimuláció lehetséges szignalizációs útjait a nucleusig a **11. ábrán** tüntettük fel. A kis leptin koncentrációk által kiváltott fokozott koleszterin szintézisben akár kontroll, akár HC monocitákról van szó, részt vesz a  $Ca^{2+}$  szingál, a PI3K, a MAPK, és a HC sejtek esetében a convencionalis, H-7-el gátolható PKC. Az alapvető eltérés a két sejtfeleség között a  $Ca^{2+}$  szignál endogén vagy exogén eredetében van. A kontroll monociták esetében tehát a cPKC szerepe a HMG CoA reduktáz szabályozásában egyértelmű: csak a nagy leptin koncentrációk szuppresszálo hatása gátolható H-7-el. A  $Ca^{2+}$  szingál feltehetően a PKC aktiválódás előfeltétele, míg a munkacsoport régebbi munkáiban ki tudta mutatni, hogy kontroll monocitákban H-7-el az LDL által indukált negatív feed back reakció is kivédhető (Seres és mtsai, 2007). A PKC activálódás hatására fokozódik a NADPH oxidáz aktiválódás, mivel a PKC fokozza a gp91<sup>phox</sup> expresszióját - ennek eredménye a szuperoxid anion felszabadulás (Mazzi és mtsai,



2004), míg HepG2 sejtekben és fibroblasztokban az oxidációs folyamatok gátolják a HMG CoA reduktáz génjeinek expresszióját (De Felice és mtsai, 2004).

**4/11 ábra. A leptin stimulációt követő jeltovábbítási utak potenciális szerepe a gén amplifikációban**



Nehezebben értelmezhető a PKC isoformok szerepe a HC monocitákban. A kis leptin koncentrációkkal való stimulus után ugyanis a H-7 szenzitív PKC a **7. ábra** adatai szerint egyértelműen a koleszterin szintézis fokozódásában vesz részt. Az elemzésből azonban nem maradhat ki az az eredmény, melyet a **9. ábra** tartalmaz: a HC monociták esetében ugyanis úgy tűnik, hogy a nagy leptin koncentrációk hatására a HMG CoA reduktáz enzim gátlása nem következik be, és ennek a fokozott koleszterin szintézisnek a gátlását csak a Ca<sup>2+</sup> influxot gátló Medium V-vel, valamint a PI3K-t gátló wortmanninnal tudtuk elérni. A leptin kezelés hatására az aktivált PI3K Ins(3,4,5)P3-t hasít, mely a PKCξ-t, ezt az atipikus PKC izoformot megkötve, azt aktiválni képes (Balla, 2006; Hirai és Chida, 2003; Leever és mtsai, 1999; Maroni és mtsai, 2005). Elképzelhető tehát, hogy a még csak kevésbé ismert PKCξ a convencionális PKC-vel ellentétesen, a HC sejtekben részt vesz a HMG CoA reduktáz aktiválásában. Ennek mechanizmusát nem vizsgáltuk, de

joggal merül fel a PKC $\xi$ -nak az a hatása, hogy az NF $\kappa$ B inhibitorának megkötésével aktiválni képes azt (Folgueira és mtsai, 1996; Diaz-Meco és mtsai, 1994). Az NF $\kappa$ B szerepe az ateroszklerózis kialakulásában, a gyulladásoos sejtelváltozásokban és az apoptózisban közismert (de Nigris és mtsai, 2002).

Fontosnak, és további kutatásra érdemesnek tartjuk azt az eredményünket, hogy a HC monociták esetében a sejthez kötött szabad koleszterin tartalom is jelentősen megnő, ami arra utal, hogy ezekben a sejtekben a reverz koleszterin transzport is sérült, és a sejtek képtelenek a felesleges koleszterin leadására. A HC monociták esetében tehát az intracelluláris koleszterin homeosztázis teljes csődjéről van szó.

Végül meg kell említenünk, hogy a „kis” és „nagy” leptin koncentrációk egyaránt szupravitalisnak tekinthetők, de azt azért ki szeretnénk emelni, hogy a zsírsejtekből lokálisan felszabaduló, és hatásukat helyben kifejtő leptin mennyiségét nem ismerjük - és az Ang II-höz hasonlóan ezeknek a lokális milliőknek a hatásával mindenkor számolni kell

#### **4.6. A 4. fejezet összefoglalása**

*Kimutattuk, hogy a leptin 10-100 ng/mL koncentrációban in vitro körülmények között fokozza mind a kontroll, mind a HC monocitákban az endogén koleszterin szintézist, ezzel szemben > 250 ng/mL koncentrációkban a kontroll sejtekben csökkenti, míg a HC sejtekben tovább fokozza azt. A sejthez kötött koleszterin mennyisége azonban csak a HC sejtekben fokozódik a leptin kezelés után. A koleszterin szintézis fokozódásában a kisebb leptin koncentrációk esetében a Ca<sup>2+</sup> szignál, a PI3K, a MAPK és a HC sejtekben a cPKC vesznek részt. Ezek a szignál utak a magban feltehetően a SCAP gén amplifikációjához vezethetnek. A kontroll monocitákban a koleszterin szintézis szuppressziója egyértelműen a H-7-szenzitív cPKC aktiválódásának eredménye, míg a HC monocitákban a további koleszterin szintézis fokozódásában lehetséges, hogy a wortmannin-érzékeny PI3K → PKC $\xi$  → NF $\kappa$ B szignalizációs útvonal vesz részt.*

## 5. Összefoglalás

Az ateroszklerózis kialakulásában is fontos és káros szerepet játszó két neuropeptid, az angiotensin II és a leptin stimuláció hatását vizsgáltuk hiperkoleszterinémiában (HC), obezitásban, 2 típusú diabetes mellitusban szenvedő betegek granulocitáiban és monocitáiban.

Eredményeink szerint:

1. A metabolikus szindrómában szenvedő betegek neuropeptidekkel stimulált fagocita sejtjeinek a kontroll sejtekhez viszonyítva fokozott a szuperoxid anion termelődésük. Ez a fokozódás a mevalonát ciklusnak a stimulust követő intenzitás-növekedésével magyarázható, melyben az izopreniláció és Rac1/Rac2 aktiválódás vesznek részt. A fokozott szabadgyök képződés a beteg csoportok sejtjeiben *in vitro* és *in vivo* statinokkal gátolható.
2. A proinflammatórikus citokin családba tartozó angiotensin II és leptin szignalizációja a granulocitákban és monocitákban nem tér el lényegesen egymástól, de a metabolikus szindrómában, és különösen a HC-ben szenvedő betegek sejtjeiben lényeges változást találtunk. A betegek sejtjeiben a stimulust követő gyors szuperoxid és leukotrién képződés a verapamil-szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák megnyílásának az eredménye, míg a kontroll csoportban az intracelluláris raktárakból áramlik ki a  $\text{Ca}^{2+}$  a citoszólba.
3. A metabolikus szindrómában szenvedő betegek sejtjeiben nem csak a sejtmembrán  $\text{Ca}^{2+}$  csatornáinak a működése változik, de nagyobb a nyugvó (resting) sejtekben a membrán rigiditás, a membránhoz kötött proteinkinase C aktivitás, valamint a membrán telített zsírsav, lipidhidroperoxid és konjugált dién tartalma. A membránhoz kötött koleszterin mennyisége ezzel szemben csak hiperkoleszterinémiás betegek membránjában volt emelkedett.

4. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a membránban észlelt változások egy része a fokozott szabadgyök képződés eredménye, míg „circulus vitiosus”-ként, a membránban észlelt változások hozzájárulnak a kóros szignalizációt követő fokozott szabadgyök képződéshez. Obezitásban a nyugvó monociták és granulociták magas  $[Ca^{2+}]_i$  értéke, valamint a leptinnel kiváltott  $Ca^{2+}$  szignálja az időgörbe alakját tekintve is megváltozik. A kisebb csúcs időben később jelentkezik, és a magas basalis szinthez képest is csak lassan normalizálódik. A 6 percig mért időgörbe alatti területtel „areas under curves” (AUC érték) számolva azonban kimutattuk, hogy leptin által kiváltott  $Ca^{2+}$  szignál az obez betegek sejtjeiben, az időben elhúzódó  $Ca^{2+}$  szignál miatt szignifikánsan nagyobb, mint a kontroll sejtjeiben.
5. A betegek sejtjeiben a leptin stimuláció hatására bekövetkező fokozott szabadgyök képződés, eredményeink szerint okozója lehet a kóros  $Ca^{2+}$  szignál-görbéknek, és az emelkedett  $[Ca^{2+}]_i$ -nak. Ennek oka a Calmodulin-függő  $Ca^{2+}$ -ATPase erős szabadgyök érzékenység, mely a nem-vezető membránnal rendelkező sejtjeiben az egyetlen útja a felesleges  $Ca^{2+}$  eltávolításának a sejtéből. Fontos következménye az obezitás terápiájában ennek a jelenségnek a statin iránti érzékenység, mivel az adipocitákban a magas  $[Ca^{2+}]_i$  jelentősen fokozza a zsírsejtek méretét, és így a zsírszövet mennyiségét. Fluvastatinnal in vitro körülmények között részben vissza tudtuk állítani a kontrollokra jellemző  $Ca^{2+}$  homeosztázist.
6. Az első 2 pontban ismertetett eredmények alapján - melyek szerint a HC-ben szenvedő betegekben - a neuropeptidekkel stimulált granulociták és monociták fokozott szabadgyök képződése a statin-érzékeny mevalonát ciklus intenzitásának következménye, azt a kérdést kellett megoldanunk, hogy mi ennek a fokozott biokémiai kaszkádnak a jelentősége az ateroszklerózis patomechanizmusában. Megerősítette kérdésfelvetésünket az az eredményünk is, hogy neuropeptidek által kiváltott szabadgyök képződésben olyan szignalizációs utakat mutattunk ki (PI3 kinase, MAP kinase, proteinkinase C), melyek köztudottan a nucleusban is kifejtik

hatásukat. Ezek után az előzmények után megvizsgáltuk a [<sup>14</sup>C]acetát inkorporációs módszert alkalmazva a neuropeptid-stimulust követő endogén koleszterin bioszintézist kontroll és HC-ben szenvedő betegek monocitáiban. Régebbi vizsgálataink alapján a betegek közül csak azoknak a sejteit alkalmaztuk kísérleteinkben, akiknél a monociták endogén koleszterin szintézise magasabb volt 13.1 pmol/60 perc/10<sup>7</sup> sejt-nél, továbbá a 6 mmol/L LDL adására bekövetkező negatív feed back reakció kisebb volt 45%-nál.

7. Kimutattuk, hogy a leptin 10-100 ng/mL koncentrációban in vitro körülmények között fokozza mind a kontroll, mind a HC monocitákban az endogén koleszterin szintézist, ezzel szemben > 250 ng/mL koncentrációkban a kontroll sejtekben csökkenti, míg a HC sejtekben tovább fokozza a szintézist. A membránhoz kötött koleszterin mennyisége azonban csak a HC sejtekben fokozódik a leptin kezelés után. A koleszterin szintézis fokozódásában a kisebb leptin koncentrációk esetében a Ca<sup>2+</sup> szignál, a PI3 kinase, a MAP kinase és a HC sejtekben a convenciónális proteinkinase C vesznek részt. Ezek a szignál utak a magban feltehetően a SCAP gén amplifikációjához, majd a SCAP-SREBP2 úton keresztül fokozott HMG CoA reductase szintézishez vezethetnek. A kontroll monocitákban a koleszterin szintézis szuppressziója egyértelműen a H-7-szenzitív convenciónális proteinkinase C aktiválódásának eredménye.
8. Végső összefoglalásként tehát a metabolikus szindrómában, de különösen a HC-ben szenvedő betegek granulocitáiban és monocitáiban a citokinekhez közelálló neuropeptidek a szabadgyök képződés eredményeként olyan membrán elváltozásokhoz, valamint megzavart Ca<sup>2+</sup> homeosztázishoz vezetnek, melyek “circulus vitiosus”-ként tovább fokozzák a mevalonát cikluson keresztül bekövetkező NADPH oxidáz és lipoxigenáz aktiválódást. Az a tény, hogy ez a folyamat statin-érzékeny egyben felveti a statinok új alkalmazási lehetőségét is.

## 6. Irodalomjegyzék

- 1.) **Adachi H**, Tsujimoto M. Endothelial scavenger receptors. (2006) *Progr Lipid Res* 45: 379-404.
- 2.) **Adams CM**, Reitz JK, DeBrabander JM, Feramisco JD, Li L, Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. (2004) *J Biol Chem* 279: 52772-52780
- 3.) **Ahima RS**. Adipose tissue as an endocrine organ. (2006) *Obesity* 5: 242S-249S.
- 4.) **Ali H**, Christensen SB, Foreman JC, Pearce FL, Piotrowski W, Thastrup O. The ability of thapsigargin and thapsigargin to activate cells involved in the inflammatory response. (1985) *Br J Pharmacol* 85: 705-712.
- 5.) **Arora S**, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - A review. (2006) *Neuropeptides* 40: 375-401.
- 6.) **Ayuyan AG**, Cohen FS. Lipid peroxides promote large rafts: effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. (2006) *Biophys J* 91: 2172-2183.
- 7.) **Baffy G**, Varga Z, Foris G, Leovey A. Disturbed intracellular calcium-related processes of hepatocytes and neutrophils in human alcoholic liver disease. (1990) *Clin Biochem* 23:241-245.
- 8.) **Balasubramaniam S**, Goldstein JL, Faust JR, Brown MS. Evidence for regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol synthesis in nonhepatic tissues of rat. (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2564-2568.
- 9.) **Balla J**, Jacob HS, Eaton JW, Beicher JD, Verceletti GM. Hemin: A possible mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. (1991) *Atherosclerosis Thromb* 11: 1700-1711.
- 10.) **Balla T**. Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. (2006) *J Endocrinol* 188: 135-153.
- 11.) **Banfi B**, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N, Krause KH. A  $Ca^{2+}$ -activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes. (2001) *J Biol Chem* 276: 37594-37601.

- 12.) Basu SK**, Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS. metabolism of cationized lipoproteins by human fibroblasts. Biochemical and morphologic correlations. (1977) *J Cell Biol* 74: 119-135.
- 13.) Bell RM**, Hannun Y, Loomish C. Mixed micell assay of protein kinase C. (1986) *Methods Enzymol* 124: 353-359.
- 14.) Bellosta B**, Mahley RW, Sanan DA, Murata J, Newland JM, Taylor JM, Pitas RE. macrophage specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. (1995) *J Clin Invest* 96: 2170-2179.
- 15.) Berg AH**, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. (2005) *Circ Res* 96: 939-949.
- 16.) Berridge MJ**, Irvine RF. Inositol phosphate, a novel messenger in cellular signal transduction. (1984) *Nature* 312: 315-321.
- 17.) Bligh EG**, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. (1959) *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- 18.) Bokoch GM**, Diebold BA. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. (2002) *Blood* 100: 2692-2696.
- 19.) Bonneaut C**, Rémy C, Tissot M, Athias A, Roch-Arveiller M, Giroud JP. effects of human low density lipoprotein on superoxide production by Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine activated polymorphonuclear leukocytes. (1997) *Eur J Chem Clin Biochem* 35: 73-80.
- 20.) Boraschi D**, Censini S, Bartalini M, Tagliabue A. Regulation of arachidonic acid metabolism in macrophages by immune and non-immune interferons. (1985) *J Immunol* 135:502-505.
- 21.) Boyum A**. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (1968) *J Clin Lab Invest Suppl* 98: 77-108.
- 22.) Briggs MR**, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. (1993) *J Biol Chem* 268: 14490-14496.
- 23.) Brown MS** and Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins by cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. (1974) *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 788-792.
- 24.) Brown MS**, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. Study of human mutants has disclosed how cells regulate a substance that is both vital and lethal. (1976) *Science* 191: 150-154.

- 25.) Brown MS, Goldstein JL.** Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system. (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3330-3337.
- 26.) Brown MS, Goldstein JL.** Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol depositions in atherosclerosis. (1983) *Annu Rev Biochem* 52: 223-261.
- 27.) Brown MS, Dana SE, Goldstein JL.** Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. (1973) *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2162-2166.
- 28.) Brown MS, Dana SE, Goldstein JL.** Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subjects and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. (1974) *J Biol Chem* 249: 789-796.
- 29.) Carafoli E.** Calcium - a universal carrier of biological signals. (2005) *FEBS J* 272: 1073-1089.
- 30.) Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD.** Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Panel III criteria for the metabolic syndrome. (2004) *Diabetes* 53: 2087-2094.
- 31.) Cathcart, M.K.** (2003) Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocyte/macrophages: Contributions to atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 24: 23-28.
- 32.) Chait A.** The role of lipoprotein receptors in lipid transport and in the pathogenesis of the hyperlipoproteinemia. (1983) *Spec Top endocrinol Metab* 5: 1-53.
- 33.) Chenery RJ, McLean AE.** The effects of fatty acids and antioxidants in the culture medium on membrane composition and properties of the microsomal enzymes and aryl hydrocarbon hydroxylase and cytochrom C reductase of cultured liver cells. (1979) *Biochem Biophys Acta* 572: 9-18.
- 34.) Cohen HJ, Chovaniek ME.** Superoxide generation by digitonin stimulated guinea pig granulocytes. (1978) *J Clin Invest* 61: 1088-1096.
- 35.) De Felice B, Santillo M, Seru R, Damiano S, Matrone G, Mondola P.** Modulation of 3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA reductase gene expression by CuZn superoxide dismutase in human fibroblasts and HepG2 cells. (2004) *Gene Expr* 12: 29-38.
- 36.) De Nigris F, Lerman LO, Napoli C.** New insight in the transcriptional activity and coregulator molecules in the arterial wall. (2002) *Int J Cardiol* 86:153-168.
- 37.) de Villiers WJS, Smart EJ.** Macrophage scavenger receptors and foam cell formation, (1999) *J Leukocyte Biol* 66: 740-746.



- 38.) Delbosc S, Morena M, Djouad F, Ledoucen C, Sescamps B, Cristol JP.** Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitors, are able to reduce superoxide anion production by NADPH oxidase in THP-1 derived monocytes. (2002) *J Cardiovasc Pharmacol* 40: 611-617.
- 39.) Dezső B, Fóris G.** Effect of angiotensin II on the Fc receptor activity of rat macrophages. (1981) *Immunology* 42: 277-283.
- 40.) Dezső B, Jacobsen J, Poulsen K.** Evidence for presence of angiotensins in normal, unstimulated alveolar macrophages and monocytes. (1989) *J Hypertens* 7:5-11.
- 41.) Dezső B, Nielsen AH, Poulsen K.** Identification of renin in resident alveolar macrophages and monocytes: HPLC and immunohistochemical study. (1988) *J Cell Sci* 91: 155-159.
- 42.) Diaz MT, Dominiquez I, Sanz L, Dent P, Lozano J, Municio MM, Berra E, Hay RT, Sturgill TW, Moscat J.**  $\xi$ PKC induces phosphorylation and inactivation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . (1994) *EMBO J* 13: 2842-2848.
- 43.) Dillon SB, Murray JJ, Varghese MW, Snyderman R.** Regulation of inositol phosphate metabolism in chemoattractant-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. (1987) *J Biol Chem* 262: 11546-11552.
- 44.) Fain J, Berridge MJ.** Relationship between 5-hydroxytryptamine activation of phosphatidylinositol hydrolysis and calcium-ion entry in *Calliphora* salivary gland. (1978) *Biochem Soc Trans* 6: 1038-1039.
- 45.) Fain J, Berridge MJ.** Relationship between hormonal activation of phosphatidylinositol hydrolysis, fluid secretion and calcium flux in the blowfly salivary gland. (1979) *Biochem J* 178: 45-58.
- 46.) Fantuzzi G.** Leptin: Nourishment for the immune system. (2006) *Eur J Immunol* 36: 3101-3104.
- 47.) Fleming I, Kohlstedt K, Busse R.** The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. (2006) *Curr Opin Nephrol Hypertension* 15:8-13.
- 48.) Folgueira L, McElhinny JA, Bren GD, MacMorran WS, Diaz-Meci MT, Moscat J, Paya CV.** Protein kinase C $\xi$  mediates NF- $\kappa$ B activation in human immunodeficiency virus-infected monocytes. (1996) *J Virol* 70: 223-231.
- 49.) Fon Tacer K, Kuzman D, Seliskar M, Pompon D, Rozman D.** FNF-( $\alpha$ ) interferes with lipid homeostasis and activates acute and pro-atherogenic processes. (2007) *Physiol Genomic* 12: Epub ahead of print.
- 50.) Fóris G, Dezső B, Medgyesi GA, Füst G.** Effect of angiotensin II on macrophage functions. (1983) *Immunology* 48:529-535.

- 51.) Fóris G,** Gyimesi E, Komáromi I. The mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity stimulation by somatostatin in rat peritoneal macrophages.(1985) Cell Immunol 90: 217-225.
- 52.) Fóris G,** Medgyesi GA, Gyimesi E, Hauck M. met-enkephalin induced alterations of macrophage functions. (1984) Mol Immunol 21: 747-750.
- 53.) Fóris G,** Medgyesi GA, Hauck M. Bidirectional effect of met-enkephalin on macrophage effector functions. (1986) Mol Cell Biochem 69: 127-137.
- 54.) Fóris G,** Paragh G, Dezso B, Keresztes T, Balogh Z, Szabo J. Altered postreceptor signal transduction of formyl-Met-Leu-Phe receptors in polymorphonuclear leukocytes of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. (1998) Clin Immunol Immunopathol 86: 95-101.
- 55.) Frühbeck G.** Intracellular signalling pathways activated by leptin. ( 2006) Biochem J 393: 7-20.
- 56.) Fukuhara A,** Matsuda M, Nishizawa M. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. (2005) Science 307: 426-430.
- 57.) Fülöp T Jr, Jacob MP, Varga Z, Foris G, Leovey A, Robert L.** Effect of elastin peptides on human monocytes:  $Ca^{2+}$  mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. (1986) Biochem Biophys Res Commun 141: 92-98.
- 58.) Fülöp T Jr.,** Hauck M, Worum I, Foris G, Leovey A. Alterations of the FMLP-induced  $Ca^{2+}$  efflux from human monocytes with aging. (1987) Immunol Lett 14: 283-286.
- 59.) Fülöp T Jr.,** Larbi A, Douzich N, Levesque I, Varin A, Herbein G. Cytokine receptor signalling and aging. (2006) Mech Ageing Dev 526-537.
- 60.) Fülöp T Jr.,** Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guerard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. (2004) Aging Cell Blackwell Publishing Ltd. pp217-226.
- 61.) Fülöp T Jr.,** Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. (2006) Pathol Biol 54: 375-386.
- 62.) Fülöp T Jr.,** Varga Z, Csongor J, Foris G, Leovey A. Age related impairment in phosphatidylinositol breakdown of polymorphonuclear granulocytes. (1989) FEBS Lett 245: 249-252.

- 63.) Fülöp T Jr.,** Varga Z, Nagy JT, Foris G. Studies on opsonized zymosan, FMLP, carbachol, PMA and A23187 stimulated respiratory burst of human PMNLs. (1988) *Biochem Int* 17: 419-426.
- 64.) Geffroy S,** De Voss P, Staels B, Duban B, Auwerx J, de Martinville B. Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. (1995) *Genomics* 28:603-604.
- 65.) Gimpl G,** Burger K, Fahrenholz F. A closer look at the cholesterol sensor. (2002) *Trends in Biochem Sci* 27: 596-599.
- 66.) Goetzl EJ,** Klickenstein LB, Watt KW, Wintroub BU. The preferential human mononuclear leukocyte chemotactic activity of the substituent tetrapeptides of angiotensin II. (1980) *Biochem Biophys Res Commun* 97: 1097-1102.
- 67.) Goh EH,** Krauth DK, Colles SM. Analysis of cholesterol and demosterol in cultured cells without solvent extraction. (1990) *Lipids* 25: 738-745.
- 68.) Goldstein JL,** Brown MS. Binding and degradation of low density lipoprotein by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. (1974) *J Biol Chem* 249: 5153-5162.
- 69.) Gopalakrishna R,** Barsky SH, Thomas TP, Andershon WB. Factors influencing chelator stable detergent extractable phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. (1986) *J Biol Chem* 261: 16438-16445.
- 70.) Granfeldt D,** Samuelsson M, Karisson A. Capacitative  $Ca^{2+}$  influx and activation of the neutrophil respiratory burst. Different regulation of plasma membrane- and granule-localized NADPH-oxidase. (2002) *J Leukoc Biol* 71: 611-617.
- 71.) Griendling KK,** Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulate NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. (1994) *Circ Res* 74: 1141-1148.
- 72.) Guerini D,** Coletto L, Carafoli E. Exporting calcium from cells. (2005) *Cell Calcium* 38: 281-289.
- 73.) Guzik TJ,** Mangalat D, Korb R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function ? (2006) *J Physiol Pharmacol* 57: 505-528.
- 74.) Harangi M,** Remenyik EE, Seres I, Varga Z, Katona E, Paragh G. Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. (2002) *Mutat Res* 513:17-25.

- 75.) Hazzard WR**, Goldstein JL, Schrott MG, Motulsky AG, Bierman EL. Hyperlipidemia in coronary heart disease. 3. Evaluation of lipoprotein phenotypes of 156 genetically defined survivors of myocardial infarction. (1973) *J Clin Invest* 52: 1569-1577.
- 76.) Higashiura K**, Ura N, Ohata J, Togashi N, Takagi S, Saitoh S, Murakami H, Takagawa Y, Dhimamoto K. Correlation of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male population. (2004) *Clin Endocrinol* 61: 753-759.
- 77.) Hirai T**, Chida K. Protein kinase C $\xi$  (PKC $\xi$ ): Activation mechanisms and cellular functions. (2003) *J Biochem* 133: 1-7.
- 78.) Hua X**, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage protein. (1996) *Cell* 87: 415-426.
- 79.) Hunyadi L**, Catt J. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. (2006) *Mol Endocrinol* 20: 953-970.
- 80.) Huwyler J**, Gut J. Single-step organic extraction of leukotrienes and related compounds and their simultaneous analysis by high-performance liquid chromatography. (1990) *Anal Biochem* 188: 374-382.
- 81.) Iaccio A**, Collinet C, Gesualdi NM, Ammendola R. Protein kinase C- $\alpha$  and - $\delta$  are required for NADPH oxidase activation in WKYMVm-stimulated IMR90 human fibroblasts. (2007) *Arch Biochem Biophys* 459: 288-294.
- 82.) Jacob MP**, Fülöp T Jr., Foris G, Robert L. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 995-999.
- 83.) Jin SW**, Zhang L, Lian QQ, Wu P, Zhou XY, Xiong W, Ye DY. Close functional coupling between Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and reactive oxygen species production in murine macrophages. (2006) *Mediators Inflamm* 2006: 1-8.
- 84.) Jubiz W**, Nolan G, Kaltenborn KC. An improved technique for extraction, identification and quantification of leukotrienes. (1985) *J Liq Chromatog* 8:1519.
- 85.) Kannan KB**, Barlos D, Hauser CJ. Free cholesterol alters lipid raft structure and function regulating neutrophil Ca<sup>2+</sup> entry and respiratory burst: correlations with calcium channel raft trafficking. (2007) *J Immunol* 178: 5253-5261.
- 86.) Karpati I**, Paragh G, Kovacs E, Balogh Z, Szabolcs M, Szabó J, Kakuk G, Fóris G. Disturbed LDL and scavenger receptor functions in monocytes from chronic haemodialysed patients (1999) *Nephrol Dial Transplant* 14: 2664-2668.

**87.) Kennedy GC.** The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. (1953) Proc Royal Soc (London) Ser. B 140: 578-591.

**88.) Keqiang Y,** Snyder SH. PIKE GTPase: a novel mediator of phosphoinositide signaling. (2004) J Cell Sci 117: 155-161.

**89.) Kern PA,** Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. (2001) Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E745-E751.

**90.) Kourie JI.** Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. (1998) Am J Physiol 275: C1-24.

**91.) Kovacs EM,** Paragh G, Varga Z, Fóris G, Ieövey A. Human model for studying in vitro the regulating function of specific and scavenger LDL receptors. (1988) Acta med Hung 45: 135-144.

**92.) Kreutz M,** Andreesen R, Krause SW, Szabó A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and Vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. (1993) Blood 82: 1300-1307.

**93.) Kumagai K,** Itoh K, Hinuma S, Tada M. Pretreatment of plastic Petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. (1979) J Immunol Methods 29: 17-25.

**94.) Kylin E.** Studien über das Hypertonie-Hyperglykemie-Hyperurikemie syndrom. (1923) Zentralblatt für Innere Medizin. 44:105-127.

**95.) Lau DC,** Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Varma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. (2005) Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H2031-H2041.

**96.) Le Quan-Sang KH,** Levenson J, Simon A, Meyer P, Devynck MA. Platelet cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration and plasma cholesterol in untreated hypertensives. (1987) J Hypertens %: S251-S254.

**97.) Leever SJ,** Vanhaasbrock B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. (1999) Cur Opin Biol 11: 219-225.

**98.) Liu J,** Zhang F, Li C, Lin M, Briggs MR. Synergistic activation of human LDL receptor expression by SCAP ligand and Oncostatin M. (2003) Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 90-96.

**99.) Loewen CJR,** Levine TP. Cholesterol homeostasis: Not until the SCAP Lady Insigs.(2002)Current Biology 12: R779-R781.

- 100.) Lu SP**, Feng MHL, Huang HL, Huang YC, Tsou WI, Lai MZ. Reactive oxygen species promote raft formation in T lymphocytes. (2007) *Free Radical Biol Med* 42: 936-944.
- 101.) Lytton J**, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of Ca pumps. (1991) *J Biol Chem* 266: 17067-17071.
- 102.) Ma DW**, Seo J, Switzer KC, Fan YY, McMurray DN, Lupton JR, Chapkin RS. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. (2004) *J Nutr Biochem* 15: 700-706.
- 103.) Maroni P**, Bendinell P, Picolet R. Intracellular signal transduction pathways induced by leptin in C2C12 cells. (2005) *Cell Biol Int* 20: 542-550.
- 104.) Mathieu P**, Pibarot P, Despres JP. Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis. (2006) *Vasc Health Risk Manag* 2: 285-302.
- 105.) Mazzi P**, Donini M, Margotto D, Wientjes F, Dusi S. IFN- $\gamma$  induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1. (2004) *J Immunol* 172:4941-4947.
- 106.) McCormach J**, Cobbold PH. *Cellular Calcium: a Practical Approach*. 1991. Oxford University Press, Oxford. pp. 39-41.
- 107.) McPherson R**, Gauthier A. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. (2004) *Biochem Cell Biol* 82: 201-211.
- 108.) Mohácsi A**, Kozlovszky B, Kiss I, Seres I, Fülöp T. Neutrophils obtained from obliterative atherosclerotic patients exhibit enhanced resting respiratory burst and increased degranulation in response to various stimuli. (1996) *Biochem Biophys Acta* 1316: 210-216.
- 109.) Morduchowicz GA**, Sheikh-hamad D, Dwyer BE, Stern N, Jo OD, Yanagawa N. Angiotensin II directly increases rabbit renal brush-border membrane sodium transport: presence of local signal transduction system. (1991) *J Membr Biol* 122:43-53.
- 110.) Paragh G**, Balogh Z, Kovacs E, Szabolcs M, Szabo J, Csapo K, Foris G. Disturbed regulation of cholesterol synthesis in monocytes of obese patients with hypercholesterolemia. (2003) *Metabolism Clin Exp* 52:1-6.
- 111.) Paragh G**, Kovacs E, Seres I, Keresztes T, Balogh Z, Szabo J, Teichmann F, Foris G. Altered signal pathway in granulocytes from patients with hypercholesterolemia. (1999) *J Lipid Res* 40:1728-1733.

- 112.) Paragh G**, Kovacs EM, Szabolcs M, Szabo J, Balogh Z, Kovács P, Foris G. Specific and scavenger low-density lipoprotein receptors involved in the disturbed lipid metabolism of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus are independent of obesity. (1998) *Metabolism* 47: 1070-1074.
- 113.) Paragh G**, Szabo J, Kovacs E, Keresztes T, Karpati I, Balogh Z, Pall D, Foris G. Altered signal pathway in angiotensin II-stimulated neutrophils of patients with hypercholesterolemia. (2002) *Cell Signal* 14: 787-792.
- 114.) Patthy M**, Balla T, Aranyi O. High performance reversed-phase ion pair chromatographic study. (1990) *J Chromatogr* 253: 201-216.
- 115.) Reaven GM**. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. (1988) *Diabetes* 37: 1595-1607.
- 116.) Ren I**. Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. (2004) *J Endocrinol* 181: 1-10.
- 117.) Ronti T**, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. (2006) *Clin Endocrinol* 64: 355-365.
- 118.) Ruan XZ**, Varghese Z, Powis SH, Moorhead JF. Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: A new pathway for foam cell formation. ((2001) *idney Int* 60: 1716-1725.
- 119.) Sacksteder CA**, Whittier JE, Xiong Y, Li J, Galeva NA, Jacoby ME, Purvine SO, Williams TD, Rechsteiner MC, Bigelow DJ, Squier TC. Tertiary structural rearrangements upon oxidation of Methionin 145 in calmodulin promotes targeted proteosomal degradation. (2006) *Biophys J* 91: 1480-1493.
- 120.) Saladin S**, De Vos P, Guerre-Millo. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. (1995) *Nature* 377:527-529.
- 121.) Schmidt-Ott KM**, Kagiya S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. (2000) *Regulatory Peptides* 93:65-77.
- 122.) Seres I**, Fóris G, Kovacs E, Páll D, Varga Z, Balogh Z, Paragh G. Crosstalk of sterol-dependent and non-sterol dependent signaling in human monocytes after in vitro addition of LDL. (2007) *Cell Biochem Funct* 25:55-62.
- 123.) Shayman JA**, BeMeut DM. The separation of myoinositol phosphates by ion-pair chromatography. (1988) *Biochem Biophys Res Commun* 151: 114-122.

- 124.) Shechter I**, Fogelman AM, Haberland ME, Seager J, Hokom M, Edwards PA. The metabolism of native and malondialdehyde-altered low density lipoproteins by human monocyte-macrophages. (1981) *J Lipid Res* 22: 63-71.
- 125.) Shi H**, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB. 1,25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. (2001) *FASEB J* 15: 2751-2752.
- 126.) Shinitzky M**, Yuli L. Membrane fluidity and cellular functions. In: *Physiology of Membrane Fluidity*. Ed. by Shinitzky M. CPC Press, Boca Raton (1984) Vol:1, pp.1-52.
- 127.) Stark G**. Functional consequences of oxidative membrane damage. (2005) *J Membr Biol* 205:1-16.
- 128.) Steckeling UM**, Kaschina E, Unger Th. The AT<sub>2</sub> receptor - A matter of love and hate. (2005) *peptides* 26: 1401-1409.
- 129.) Sun X**, Zemel MB. Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in Ap<sup>2</sup>-Agouti transgenic mice. (2004) *J Nutr* 134: 3054-3060.
- 130.) Sweeney G**. Leptin signalling. (2002) *Cell Signal* 14: 655-663.
- 131.) Sweet CS**. Issues surrounding a local cardiac renin system and the beneficial actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors in ischemic myocardium. (1990) *Am J Cardiol* 65: 111-131.
- 132.) Takeya R**, Sumimoto H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. (2003) *Mol Cell* 16: 271-277.
- 133.) Taskinen MR**. Type 2 diabetes as a lipid disorder. (2005) *Curr Mol Med* 5: 297-308.
- 134.) Tatemoto K**, Hosoya M, Habata Y. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 251: 471-476.
- 135.) Tauber AI**. Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. (1987) *Blood* 69: 711-720.
- 136.) Thasturp O**. Role of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> signalling, as studied with the selective microsomal Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor, thapsigargin. (1990) *Agents Actions* 29: 8-15.
- 137.) Tilg H** and Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. (2006) *Nat Rev Immunol* 6: 772-783.



**138.) Toba H**, Shimizu T, Miki S, Inoue R, Yoshimura A, Tsukamoto R, Sawai N, Kobara M, Nakata T. Calcium channel blockers reduce angiotensin II-induced superoxide generation and inhibit lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor -1 expression in endothelial cells.(2006) *Hypertens Res* 29: 105-116.

**139.) Tonnesen MG**, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as Cathepsin G. (1982) *J Clin Invest* 69: 25-30.

**140.) Touyz RM**, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. (2002) *Braz J med Biol Res* 35:1001-1015.

**141.) Treiman M**, Caspersen C, Christensen SB. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. (1998) *TIPS* 19: 131-135.

**142.) Varga Z**, Czompa A, Kakuk G, Antus S. Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonoligands. (2001) *Phytother Res* 15: 608-612.

**143.) Varga Z**, Paragh G, Karpati I, Seres I, Buris L, Kakuk G. Granulocyte function and lipid peroxidation in untreated patients with hyperlipoproteinemia. (1997) *Orv Hetilap* 138: 2301-2304.

**144.) Wahl LM**, Katona IM, Wilder RL, Winter CC, Haraoui B, Scher I. Isolation of human mononuclear cell subsets by counterflow centrifugal elutriation (CCE). I. Characterization of B-lymphocyte-, and monocyte-enriched fractions by flow cytometric analysis.(1984) *Cell Immunol* 85: 373-383.

**145.) Wang X**, Briggs MR, Hau X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. (1993) *J Biol Chem* 268: 14497-14504.

**146.) Weber LW**, Boll M, Stampf A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. (2004) *World J Gastroenterol* 10: 3081-3087.

**147.) World Health Organization** . Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and its complications. 1999. (Report of a WHO consultation).

**148.) Wu D**, Huang CK, Jiang H. Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. (2000) *J Cell Sci* 113: 2935-2940.

- 149.) Yang T**, Goldstein JL, Brown MS. Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP SREBP exit from endoplasmic reticulum. (2000) *Cell* 102:315-323.
- 150.) Yilmaz G**, Aksulu HE, Demirel E, Ercan ZS, Zengil H, Turker RK. Modulation by endothelium of the vascular effects of angiotensin II. (1987) *Agents Actions* 21:184-190.
- 151.) Zemel MB**, Shi H, Greer B, DiRienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. (2000) *FASEB J* 14: 1132-1138.
- 152.) Zhang Y**, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. (1994) *Nature (London)* 372: 425-432.
- 153.) Zhao X**, Kevin AC, Cathcart MK. Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. (2003) *J Biol Chem* 278: 40788-40792.
- 154.) Ziccardi P**, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano G. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. (2002) *Circulation* 105: 804-809.

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

1. Seres I, Fóris G, Páll D, **Kosztáczky B**, Paragh G Jr, Varga Z, Paragh G. Angiotensin II-induced oxidative burst is fluvastatin sensitive in neutrophils of patients with hypercholesterolemia. (2005) *Metabolism* **54**: 1147-1154
2. . **Kosztáczky B**, Fóris G, Seres I, Balogh Z, Fülöp P, Koncsos P, Paragh G. Neuropeptides induced a pronounced and statin-sensitive dysregulation of mevalonate cycle in human monocytes of patients with hypercholesterolemia. (2006) *Neuropeptides* **40**: 309-316.
3. Seres I, Fóris G, Varga Z, **Kosztáczky B**, Kassai A, Balogh Z, Fülöp P, Paragh G. The association between angiotensin II-induced free radical generation and membrane fluidity in neutrophils of patients with metabolic syndrome. (2006) *J Membr Biol* **214**: 91-98.
4. **Kosztáczky B**, Fóris G, Paragh G Jr, Seres I, zsíros E, Koncsos P, Balogh Z, Paragh G. Leptin stimulates endogenous cholesterol synthesis in human

- monocytes: New role of an old player in atherosclerotic plaque formation. (2007) Int J Biochem Cell Biol **39**: 1637-1645.
5. Balogh Z, Fóris G, **Kosztáczky B**, Paragh G Jr, Seres I, Zsíros E, Kónya G, Paragh G. The concentration dependent biphasic effect of leptin on endogenous cholesterol synthesis in human monocytes. (2007) Peptides **28**:2081-2083.

## Köszönetnyilvánítás

*Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőimnek, Dr. Paragh György egyetemi tanár, professzor úrnak, az I. Belgyógyászati Klinika igazgatójának és Dr. Fóris Gabriella tudományos tanácsadó, professzornőnek, akiknek a témaválasztást és a munkámban való gondos segítséget köszönhetem.*

*Köszöm továbbá Dr. Seres Ildikó és Dr. Varga Zsuzsa tanárnőknek a sokrétű laboratóriumi segítséget, amelyet munkám során nyújtottak. Köszönöm Karányi Zsolt matematikusnak, hogy segítséget nyújtott az eredmények kiértékelésekor, és köszönöm Dr. Keresztes Tamásnak a leukotrién meghatározások elvégzését.*

*Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm Dr. Nagy Bélánénak az egészen rendkívüli asszisztensi munkát.*