

**A NEUROPEPTIDEK SZEREPE AZ  
ATEROSZKLERÓZIS PATOMECHANIZMUSÁBAN**

**DR. KOSZTÁ CZKY 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**

## 1. BEVEZETÉS

a XXI. században a civilizált világ egyik legnagyobb egészségügyi kihívása 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 LDL-hez kötött szérum koleszterin szint, különösen, ha ehhez alacsony HDL-C szint társul, szinte a kardiovaszkuláris összeomlás előszobáját jelentik. 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 szabadgyökök fokozott termelődésének. Így, az utóbbi 25-30 évben az ateroszklerózis kutatás egyre inkább sejtszintű kutatássá vált, sőt mai tudásunk alapjait a receptorokról valamint a genetikai szabályozásokról is éppen az ateroszklerózissal foglalkozó kutatók tették le. Érthető tehát, hogy témaválasztásomkor ez a kutatási terület keltette fel érdeklődésemet, és amelynek a Debreceni Egyetem I. Belgyógyászati Klinikáján akkor már komoly hagyományai voltak. Alapelvünk volt, hogy a kardiovaszkuláris megbetegedések sejtszintű kutatása területén újabban napvilágot látott elméleti eredményeket felhasználva, betegektől nyert fehérvérsejteken vizsgáljuk meg ex vivo kísérletekben az egyes elméleti eredmények gyakorlati jelentőségét.

### **1.1. Neuropeptidek (angiotensin II, leptin) hatása kontroll és hiperkoleszterinémiában (HC) szenvedő betegek fehérvérsejtjeinek szabadgyök képzésére**

Az általunk választott mindkét neuropeptid szuperoxid anion termelődést kiváltó hatása ismert, és aterogén hatásukat is erre vezetik vissza. Figyelemre méltó, hogy mind az angiotensin II (Ang II), mind a leptin bizonyos receptorai (az AT1 és a LpRb), melyek a monociták, és Ang II esetében a neutrofilek felszínén is expresszálódnak, a proinflammatorikus citokin I. szupercsaládhoz tartoznak, Így, stimuláló hatásukhoz

tartozik, hogy a Gi protein- PLC-Ins(1,4,5)P3 útvonalon kívül, olyan szignalizációs úttal is rendelkeznek, mint a PI3 kináz, MAP kináz, PKC, ERK1/ERK2, és így a sejtmagban szabályozó hatást fejthetnek ki a gén expressziókra. Másrészt több, mint 10 éve ismert, hogy a mevalonát ciklus az Rho szupercsaládba tartozó Rac1/Rac2 kis GTPáz prenilációján keresztül fontos szabályozója a NADPH oxidáz aktiválódásának. Ismert az is, hogy a HMG CoA reduktáz enzimet gátló statinok terápiás hatása atheroszklerózisban, részben a stimulust követő szabadgyök képzés gátlásán alapszik. Számos, még meg nem oldott kérdés vetődött fel az irodalmi ismeretek alapján. A két neuropeptid azonos hatást vált-e ki a kontroll és a HC-ben szenvedő betegek fagocita sejtjeiben? A szignálok útjai változnak-e az egész szervezetben romboló hatású anyagcsere megbetegedésekben? Hogyan reagálnak a két neuropeptidre a metabolikus szindróma különböző entitásában szenvedő betegek fagocita sejtjei? Ha a szuperoxid anion termelődés sztatín-szenzitív és sztatín-rezisztens részből áll, akkor ez az arány hogyan alakul a HC-betegek sejtjeiben?

**1.2.Kapcsolat a metabolikus szindróma különböző önálló entásaiban a neuropeptidok által indukált szabadgyök képződés és a sejtmembrán károsodása között**

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. Az átalakulás lényege, hogy atheroszklerózisban a sejtek membránjának lipid „raft”-jaiban a koleszterin tartalom megnő, és ez a citokin, és citokinszerű receptorok szignalizációját megváltoztathatja. 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. 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 a zsírszövetben jelenlevő immunkompetens sejtek termékei. Újabban felvetődött a calcium anyagcsere és az obezitás szoros kapcsolata. Az 1,25-dihydroxycalcitriol, melynek szintje obezitásban megnő, specifikus receptorain keresztül fokozza a sejtekbe, így az adipocitákba is a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást. A magas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint ugyanakkor szimulálni tudja az agouti gén által regulált agouti protein hatását, azaz jelentősen képes gátolni az adipocitákban a lipolízist és fokozni a zsírsavszintáz (FAS) aktivitását. Ez együttesen a zsírszövet mennyiségi fokozódását idézi elő. Másrészt az is ismeretes, hogy a szabadgyök képződés súlyos károsító hatást fejt ki az ion, de különösen a  $\text{Ca}^{2+}$  transzportra, mivel csaknem az összes sejtmembránban működő enzimet ill. csatornát károsítani tudja. Különösen érzékeny szuperoxid anion hatására a calmodulin, mely alapvető komponense a calmodulin-függő  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz enzimnek. Ez az enzim pedig az egyetlen, amely képes eltávolítani a felesleges  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiséget a nem-vezető membránnal rendelkező sejtekből. Kétségtelen, hogy az oxidációs stressz, a membrán változások és az ion-transzport olyan sokszorosan kapcsolódnak egymáshoz, hogy az egymásrahatások sorrendje csak nehezen tisztázható. Nem találtunk azonban adatot arra, hogy a metabolikus szindróma különböző entitásaiban hogyan alakul a membrán rigiditás, az agonista stimulust követő  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, vagy a szuperoxid anion és leukotrién felszabadulás.

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

Az az irodalomból ismert, és már említett tény, hogy a citokinek által stimulált fagocita sejtekben a szuperoxid anion és leukotrién képződése a HMG CoA reduktáz gátlásával csökkenthető, felhívta a figyelmet arra, hogy a stimuláció hatására a mevalonát ciklus aktivitása is fokozódik. Ez a tény azért is figyelemre méltó, mivel a mevalonát ciklus egyik végterméke éppen a koleszterin. Másrészt, az is ismert, hogy a citokinek hatására HepG2 és mesangialis sejtvonalakban fokozódik a SCAP gén expressziója, és fokozódik a sejtek endoplazmás retikulumában a SCAP szintézise is. A SCAP túlsúly vezet azután ahhoz az állapothoz, hogy a koleszterin molekulák megkötése után a feleslegben maradt SCAP képes még komplexet képezni az SREBP2-vel, és a komplex eljut a Golgi-ba, ahol az SREBP2 aktiválódik. Mindez felvetette azt a lehetőséget, hogy a leptin, amelynek receptora a citokin receptorokkal azonos tulajdonságokkal rendelkezik, képes hatni a monociták endogén koleszterin szintézisére.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

1.) A két, atheroszklerózis patomechanizmusában is résztvevő peptid, az angiotensin II és a leptin jelátviteli útjait kívántuk összehasonlítani kontroll egyének és HC-ben szenvedő betegek fehérvérsejtjeiben, különböző gátlószerek in vitro alkalmazásának a segítségével. Tisztázni kívántuk továbbá a különböző agonisták hatására bekövetkező szuperoxid anion és leukotrién képződés függőségét a mevalonát ciklustól egészséges és beteg egyének fehérvérsejtjeiben.

2.) Meg kívántuk vizsgálni, hogy milyen összefüggés található a metabolikus szindrómában szenvedő betegek sejtjeiben a neuropeptid stimulust követő szabadgyök képződés és a sejtmembrán károsodása között. Tervbe vettük továbbá annak tisztázását, hogy az obezitásban a leptin szerepet játszhat-e az intracelluláris  $Ca^{2+}$  homeostasis zavarának kialakulásában.

3.) Célkitűzésünk volt, annak tisztázása, hogy a leptin képes-e a keringő vérből nyert humán monocitákban hatni a sejtek endogén koleszterin szintézisére, és ha igen, akkor ennek milyen szignalizációs útvonala valószínűsíthető.

## 3. MÓDSZEREK

**3.1. Beteganyag:** A kontroll csoportokban a vért részben egészséges, önként jelentkező egészségügyi dolgozóktól, részben pedig a Vértároló Állomás segítségével önkéntes véradóktól nyertük. A betegeket az I. Belgyógyászati Klinika Anyagcsere Megbetegedések Tanszéke szakrendeléseinek anyagából kértük fel a vérvételre. Külön nehézséget jelentett a metabolikus szindróma különböző entitásainak az összegyűjtése, továbbá azoknak a HC-ben szenvedő betegeknek a kiválasztása, akiknél előzetes vizsgálattal tisztáztuk, hogy a LDL receptor defektussal nem kell számolnunk, de már a nyugvó monociták endogén koleszterin szintézise magasabb a kontroll monocitáknál. A kontroll és HC betegek demográfiai adataihoz szükséges 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 betegről és 3-4 kontroll véradóról. Az interassay coefficient nem haladta meg a 15%-ot. A DEOEC etikai bizottságától az engedélyt kísérleteinkhez megkaptuk.

**3.2. Sejtek izolálása, in vitro körülmények:** A monocitákat és a neutrofileket a szokott módon gradiens centrifugálással izoláltuk, és a monociták további tisztításához a Kumagai f. módszert alkalmaztuk. Minden vizsgálatot steril körülmények között végeztünk, az inkubációk CO<sub>2</sub> termosztátban történtek (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% páratartalom).

**3.3. A jeltovábbítás útjainak tisztázásához alkalmazott gátlószerek:** 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 μM 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 μM thapsigargin (Sigma) 60 percig, az angiotensin II AT1 receptorát gátló 1 μM losartant (Merck) 20 percig, az AT2 receptorát gátló 1 μM PD123319-t (Sigma and Aldrich) 20 percig, a PKC-t gátló 1.0 μM H-7-t (Sigma) 60 percig, a PI3 kinase-t gátló 20 nM wortmannint (Sigma) 30 percig, a MAP kinase-t gátló 50 μM PD98059-t (Sigma) 30 percig, a HMG CoA reductase-t gátló 5 μM fluvastatin (Merck) 60 és 20 μM lovastatin 120 percig, a SCAP-SREBP komplex kialakulását gátló 25 μM 25-hydroxycholesterol-t (Sigma) methyl-β--cyclodextrin komplexben 120 percig. Végül a Ca<sup>2+</sup>-influx gátlására a sejteket Medium V-ben inkubáltuk 60 percig. A Medium V 10 μM verapamil ((Sigma) és 3 mmol/L EGTA-t tartalmazott Ca<sup>2+</sup>- mentes HBSS-ben.

### **3.4. Alkalmazott módszerek**

**3.4.1. Szuperoxid anion:** superoxide dysmutase-zal gátolható ferricytochrom C (Sigma) redukciójának spektrofotometriás mérése

**3.4.2. Arachidonsav kaszkád:** [<sup>14</sup>C]arachidonic acidal feltöltött sejtekből a stimulus utáni radioaktív arachidonsav termékek kiáramlásának mérése

**3.4.3. Leukotrién meghatározás:** reverz HPLC technikával, ultraibolya tartományban történt 280 nm-n (UV-VIS, L-4250 detektorral).

**3.4.4. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>:** Indo1/AM felhasználásával spektrofluorimetriásan (Hitachi, F-4500) lex 405 és lem 485 nm-on, 37° C-n állandó keverés közben történt.

**3.4.5. Ins(1,4,5)P3:** Belső standard segítségével reverse phase ion-pair kromatográfiai módszerrel. A frakcionálást követően a radioaktivitásokat Packard 2200 CA liquid scintillációs számlálóban határoztuk meg.

**3.4.6. Protein kinase C:**  $^{32}\text{P}$  beépülését mértük [ $^{32}\text{P}$ ]ATP-ből histone III-S-be.

**3.4.7. Membrán fluiditás:** A fluoreszcencia polarizációhoz 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatreine (DPH, Sigma) diszperziót használtunk, a sejtek fluoreszcencia polarizációját Hitachi F4500 spektrofluorimeterben, polarizációs feltét segítségével  $37^\circ\text{C}$  hőmérsékleten mértük (az excitációt 355, míg az emissiót 430 nm-en).

**3.4.8. Koleszterin szintézis:** [ $^{14}\text{C}$ ]acetát beépülését határoztuk meg a monociták koleszterin frakciójába.

#### **4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS**

**4.1. Neuropeptidek által kiváltott szabadgyök képződés szabályozása:** A leptin humán monocitákban, míg az Ang II humán granulocitákban és monocitákban a neuropeptidek koncentrációjától függő módon képes fokozni a szuperoxid anion termelését, az arahidonsav termékek kiáramlását és a leukotrién C4 és B4 szintézisét. A neuropeptidekkel stimulált HC sejtekben a szabadgyök képződés szignifikánsan nagyobb. Ez egyértelműen a statin-szenzitív szabadgyök képződés fokozódásának eredménye. A fluvastatin kezelésben részesült betegekben a neutrofilek stimulusra adott reakciója normalizálódott. A HC sejtek fokozott szabadgyök képződésének oka, hogy a Rac1/Rac2 mevalonát cikluson keresztül történő isoprenilációja sokkal jelentősebb szerepet játszik a HC leukocitákban, mint a kontrollokban. Erre vezethető vissza a statin-terápia sikeres alkalmazása is. A jelátvitel útja a HC sejtekben megváltozik, mégpedig az Ang II és a leptin esetében azonos módon. A HC sejtek szignalizációjában a verapamil-szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -influx, az PI3 kináz aktiválódásán keresztül érvényesülő kerülőút vonal, valamint a Rac1/Rac2 aktiválódás játszik fontos szerepet a NADPH oxidáz és az arachidonsav kaskád robbanásáért felelős foszfolipáz  $\text{A}_2$  aktiválódásában. Összefoglalva: a HC sejtekben nem működik sem az AT1, sem a LpRb receptorról érkező stimulus esetében az u.n. “kanonikus”  $\text{Gi}$  protein  $\rightarrow$  phospholipase C  $\rightarrow$  Ins(1,4,5)P3  $\rightarrow$   $\text{Ca}^{2+}$  transzlokáció szignál út, helyette a verapamil-szenzitív csatornákon

át következik be a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál. További szignalizációs útvonalat jelent a PI3 kinase által hasított Ins(3,4,5)P3, mely a phospholipase C egy isoformját képes aktiválni, de ennek a down-stream regulációnak a szerepe a HC sejtekben nem jelentős.

**4.2. Metabolikus szindrómában szenvedő betegek stimulált leukocitáiban keletkező raktív oxigén species-ek (ROS) membrán károsító hatása:** 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 termelése és arachidonsav 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 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 bazális szinthez képest is csak lassan normalizálódik. Az időgörbe alatti területtel (AUC érték) számolva kiértékelhettük a thapsigargin és a verapamil szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  szignálok mennyiségét az agonisták által indukált intracelluláris folyamatokban. Eredményeink szerint az obez monociták esetében a fokozott ROS képződés eredményeként károsultak a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázist biztosító enzimek: különösen a SERCA-hoz kapcsolt thapsigargin-szenzitív Ca-ATPase és a calmodulin-dependens  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, mely a calcium effluxot biztosítja a sejtől. A HMG CoA reduktáz-t gátló fluvastatin preinkubáció az eredeti calcium homeosztázist helyreállította, részben antioxidáns hatása révén.

**4.3. A leptin stimulus hatása kontroll és HC-ben szenvedő betegek monocitáinak endogén koleszterin szintézisére:** Eredményeink szerint 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  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, a PI3 kinase, a MAP kinase és a HC sejtekben a konvencionális PKC vesznek részt. Ezek a szignál utak, hasonlóan a citokinekhez, a magban a SCAP gén amplifikációjához vezethetnek. A kontroll monocitákban a koleszterin szintézis szuppressziója egyértelműen a H-7-szenzitív konvencionális PKC aktiválódásának eredménye, mely megerősíti azt a régebbi eredményünket, hogy H-7-el az LDL adásával kiváltható és az endogén koleszterin szintézisét gátló negatív „feed back” reakció is felfüggeszthető. A HC monocitákban a további koleszterin szintézis fokozódása ezzel szemben csak a PI3 kinase-t gátló wortmannin-al függeszthető fel, mely irodalmi adatok alapján arra utal, hogy ebben a folyamatban a PI3 kinase  $\rightarrow$  Ins(3,4,5)P3  $\rightarrow$  PKC $\xi$   $\rightarrow$  NF $\kappa$ B szignalizációs útvonal vesz részt.

## **5. Összefoglalás**

**5.1.**A metabolikus szindrómában szenvedő betegek neuropeptidekkel stimulált fagocita sejtjeinek a kontroll sejtekhez viszonyítva fokozott a szuperoxid anion termelésük. 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.

**5.2.**A proinflammatorikus 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.

**5.3** 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 hiperkoleszterinémias betegek membránjában volt emelkedett.

**5.4.** 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 bazális szinthez képest is csak lassan normlizálódik. A 6 percig mért időgörbe alatti területtel „areas under curves” (AUC érték) számolva azonban kimutattuk, hogy a leptin által kiváltott  $Ca^{2+}$  szignál az obez betegek sejtjeiben, az időben elhúzódó  $Ca^{2+}$  szignál miatt szignifikánsan nagyobb, mint a kontroll sejtekben.

**5.5.** 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, amely a nem-vezető membránnal rendelkező sejtekben az egyetlen útja a felesleges  $Ca^{2+}$  eltávolításának a sejtből. 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.

**5.6.** 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 nucleusból is kifejtik hatásukat. Ezek után az előzmények után megvizsgáltuk a  $[^{14}C]$ 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 sejtjeit 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.

**5.7.** 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 konvencionális 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 konvencionális PKC aktiválódásának az eredménye.

**5.8.** Végző 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. ÚJ EREDMÉNYEK**

**6.1.** Először mutattuk ki, hogy a citokin-szerű receptorokkal rendelkező Ang II és leptin HC-ben szenvedő betegek monocitáiban és/vagy granulocitáiban fokozza a ROS képződést, és ez a fokozódás a Rac1/Rac2 fokozott isoprenilációjának a következménye.

**6.2.** Először mutattuk ki, hogy az Ang II és a leptin szignalizációs útja a HC-ben szenvedő betegek fagocita sejtjeiben megváltozik: a kanonikus útvonal nem működik, és a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál a verapamil-szenzitív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon át bekövetkező  $\text{Ca}^{2+}$ -influx eredménye.

**6.3.** Sikerült tisztázni, hogy a metabolikus szindróma egyes elkülönült entitásaiban a fokozott ROS képződés összefüggésben áll a membrán rigiditással, de nem függ a membránhoz kötött koleszterin mennyiségétől. A membrán károsodások súlyossága az egyes entitásokban a következő: obezitás < 2 típusú diabetes mellitus < hiperkoleszterinémia.

**6.4.** Monocita-modell kísérletekben először mutattuk ki, hogy obezitásban a leptin résztvehet az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  megemelkedésében, és a leptin által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  szignál időgörbéje alatti terület (AUC) kórosan megnőtt, az időgörbe alakja megváltozott. Új, és fontos adatnak tartjuk, hogy fluvastatinnal in vitro a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál időgörbéjének a korrekcióját tudtuk elérni obezitásban.

**6.5.** Először írtuk le, hogy a leptin koncentráció függően bifázisos hatást fejt ki a humán monociták endogén koleszterin szintézisére: 10-100 ng/mL koncentrációban fokozza, míg > 250 ng/mL gátolja a mevalonát ciklus aktivitását. HC monocitákban a leptin 10-500 ng/mL koncentrációban csak koleszterin szintézis fokozódást volt képes kiváltani, és ezekben sejtekben a koleszterin reverz transzportja sem működött.

## 7. KÖZLEMÉNYEK

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. (IF:2.497)
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. (IF: 2.789)

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. (IF: 2.112)
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. (IF:4.804)
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. (IF:2.701)

**Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:**

1. Arokoski JP, Hyttinen MM, Lapvetelainen T, Takács P, **Kosztáczky B**, Módis L, Kovanen V, Helminen H. Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training detected by quantitative polarised light microscopy. (1996) *Ann Rheum Dis* **55**: 253-264. (IF:5.767)
2. Balogh Z, Fülöp P, Seres I, Harangi M, Katona E, Kovács P, **Kosztáczky B**, Paragh G. Effects of simvastatin on serum paraoxonase activity. (2001) *Clin Drug Invest* **21**: 505-510. (IF: 0.559)
3. Paragh G, Fóris G, Paragh G Jr, Seres I, Karányi Z, Fülöp P, Balogh Z, **Kosztáczky B**, Teichmann F, Kertai P. Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastases in rats. (2005) *Cancer Lett* **222**: 17-22. (IF: 3.277)

**Az értekezés témájához kapcsolódó idézhető absztraktok:**

1. I Seres, G Paragh, **B Kosztáczky**, T Kalmár, H.Z. Mirdamadi, A. Kassai, G. Fóris: Disturbed Ca<sup>2+</sup> transport in neutrophils of obese patients. *Atherosclerosis Supplements* 2006. 7 (3): 229-229. (IF:5.875)

2. G. Fóris, I. Seres, **B. Kosztáczky**, P. Fülöp, Z. Balogh, G. Paragh: Angiotensin II caused a statin-sensitive dysregulation of mevalonate cycle in human monocytes. *Atherosclerosis Supplements* 2006. 7 (3): 571-572. (IF:5.875)
3. **B. Kosztáczky**, G. Fóris, I. Seres, A. Kassai, T. Kalmár, G. Paragh: Mevalonate cycle of human monocytes is disturbed by leptin in vitro. *Atherosclerosis Supplements* 2006. 7 (3): 577-577. (IF:5.875)
4. Fóris, G, Seres, I, **Kosztáczky, B.**, Balogh, Z, Varga, E., Paragh, Gy: Concentration-dependent effect of angiotensin II on the endogenous cholesterol synthesis in human monocytes. *Atherosclerosis Supplements* 2007; 8 (1):29-30. (IF:5.875)

#### **Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó absztrakt**

1. G. Paragh, G. Foris, G. Paragh, Jr., I. Serest, Z. Karanyi, P. Fulop, Z. Balogh, **B. Kosztáczky**, P. Kertai: Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastases in rats. *Atherosclerosis Supplements*, 2005, 6 (1): 118-118. (5.875)

#### **Előadások, poszterek hazai és nemzetközi kongresszusokon:**

1. Andrea Kassai, Ildikó Seres, **Béla Kosztáczky**, Gabriella Fóris, György Paragh: The possible connection between angiotensin II-induced free radical generation and membrane fluidity in neutrophils of patients with metabolic syndrome Semmelweis Symposium, Inflammatory mechanisms in atherosclerosis - A critical appraisal. 3-4 November 2005, Budapest, Hungary
2. G. Fóris, **B. Kosztáczky**, Gy. Paragh: Angiotensin-II-induced failure of mevalonate cycle in human monocytes Semmelweis Symposium, Inflammatory mechanisms in atherosclerosis - A critical appraisal. 3-4 November 2005, Budapest, Hungary
3. Paragh G, Fóris G, Paragh Gy Jr, Seres I, Karányi Zs, Fülöp P, Balogh Z, **Kosztáczky B**, Teichmann F, Kertai P: Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastases rats. Semmelweis Symposium, Inflammatory mechanisms in atherosclerosis - A critical appraisal. 3-4 November 2005, Budapest, Hungary
4. G. Paragh, G. Foris, G. Paragh, Jr., I. Serest, Z. Karanyi, P. Fulop, Z. Balogh, **B. Kosztáczky**, P. Kertai: Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastases in rats. 75<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress, Prague, Czech Republic, 2005

5. Fóris G., **Kosztáczky Béla**, Balogh Z., Seres I., Paragh Gy.: Új szempontok az angiotensin II atherogén szerepének megítélésében. MAT Soproni Kongresszus 2006. október
6. **Kosztáczky B.**, Fóris G., Balogh Z., Seres I., Paragh Gy.: Neuropeptidekre jellemző szabadgyök képzés mechanizmusa egészséges control (C) véréradók és hypercholesterinemiában (HC) szenvedő betegek monocytáiban. MAT Soproni Kongresszus 2006. október
7. Seres I., Paragh Gy., **Kosztáczky B.**, Hossein Zamir Mirdamadi, Kassai A., Fóris G.: A CA2+ transzport zavara elhízott betegek neutrofiljeiben. MAT Soproni Kongresszus 2006. október
8. I Seres, G Paragh, **B Kosztáczky**, T Kalmár, H.Z. Mirdamadi, A. Kassai, G. Fóris: Disturbed Ca<sup>2+</sup> transport in neutrophils of obese patients. Poster XIV International Symposium on Atherosclerosis Rome, Italy, 2006. június 18-22.
9. G. Fóris, I. Seres, **B. Kosztáczky**, P. Fülöp, Z. Balogh, G. Paragh: Angiotensin II caused a statin-sensitive dysregulation of mevalonate cycle in human monocytes. Poster XIV International Symposium on Atherosclerosis Rome, Italy, 2006. június 18-22.
10. **B. Kosztáczky**, G. Fóris, I. Seres, A. Kassai, T. Kalmár, G. Paragh: Mevalonate cycle of human monocytes is disturbed by leptin in vitro. Poster XIV International Symposium on Atherosclerosis Rome, Italy, 2006. június 18-22.
11. Fóris, G, Seres, I, **Kosztáczky, B.**, Balogh, Z, Varga, E., Paragh, Gy: Concentration-dependent effect of angiotensin II on the endogenous cholesterol synthesis in human monocytes. Poster 76th Annual European Atherosclerosis Society Congress 2007. jún.10-13, Helsinki, Finnország

#### **Tudományos mutatók:**

**In extenso megjelent tudományos közlemények összesített impakt faktora: 24.503**

**Idézhető absztraktok összesített impakt faktora: 29.375**

**Független citációk száma: 13**