

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

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

Cseri Karolina

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



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

# **A GYULLADÁSOS KÖRNYEZET ÉS A PRAVASZTATIN HATÁSA A VÁZIZOM REGENERÁCIÓS KÉPESSÉGÉRE**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Cseri Karolina okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája  
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Csernoch László, Dr. Tózsérné Dr. Benkő Szilvia

Az értekezés bírálói:

Dr. Lontay Beáta, PhD  
Dr. Almássy János, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, MTA doktora  
tagok: Dr. Ivanics Tamás, PhD  
Prof. Dr. Tóth Attila, MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet, Könyvtár  
2022. július 18., délután 14 óra

## **Bevezetés és irodalmi áttekintés**

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

### *Idiopátiás inflammatórikus miopátiák*

Az idiopátiás inflammatórikus miopátiák (IIM) olyan neuromuszkuláris betegségek heterogén csoportjait foglalják magukban, melyeket általánosan myositisként szokás említeni. Ezeket évtizedekig három alcsoportra osztották az izomgyengeség, izomgyulladás és extramuszkuláris tünetek megléte és súlyossági foka alapján. 1975-ben Bohan és Peter munkássága nyomán még csak két csoportot tartottak számon, a polymyositist (PM) és a dermatomyositist (DM), majd 1995-ben Griggs és munkatársai leírták a zárványtestes myositist is (inclusion body myositis, IBM), mint harmadik csoportot. 2003-ban egy nemzetközi konferencián (European Neuromuscular Centre International Workshop – 2003 ENMC-IIM) immunmediált nekrotizáló miopátiával (IMNM) és nem-specifikus miozitiszel bővítették a meglévő kategóriákat. Az elmúlt évtized kutatási eredményei, a myositis-specifikus antitestek (MSA) felfedezése és a kiterjedt klinikai tapasztalatok alapján szükségessé vált egy új klasszifikációs rendszer megalkotása. A diagnózis felállításakor először az EULAR/ACR (European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology) klasszifikációs kritériumokat kell figyelembe venni, majd egy többlépcsős szempontrendszer alapján lehet meghatározni az alcsoportot. A jelenlegi kategorizálás hat alcsoportot különít el: polymyositis (PM)- melynek alcsoportja lett az immunmediált nekrotizáló miopátia (IMNM), zárványtestes myositis (IBM), amiopátiás dermatomyositis (ADM), dermatomyositis (DM), és fiatalkori dermatomyositis (juvenile dermatomyositis, JDM). Amennyiben a páciens tünetei megfelelnek az EULAR/ACR IIM-re felállított kritériumrendszerének, a következő szempont a páciens életkora az első tünetek

megjelenésekor. Amennyiben 18 éves kor alatt jelentkeztek a panaszok, úgy a bőrtünetek megléte esetén juvenilis dermatomyositis, bőrtünetek hiányában juvenilis myositis lehet a diagnózis. 18 éves kor fölött felnőttkori megbetegedésről beszélhetünk, ebben az esetben a következő szempont a bőrtünetek megléte vagy hiánya. Amennyiben bőrtünet nincs, de terápiára nem reagáló ujjhajlítói izom gyengeséget panaszol a páciens vagy az izombiopsziás mintán igazolódott a rimmed vakuóla, akkor a diagnózis zárványtestes myositis, amennyiben sem az ujjhajlítói izom makacs gyengesége nem jellemző, s a szövettani képen sem igazolódott rimmed vakuóla jelenléte, úgy a diagnózis polymyositis. Abban az esetben, ha felnőttkori kezdetnél bőrtünetek is jelentkeznek, eldöntendő kérdés, hogy jellemző-e a felső vagy az alsó végtagok szimmetrikus és progresszív gyengesége, vagy a nyakhajlítói izmok gyengülése a nyakfesztőkhöz képest, vagy az alsó végtagok proximális gyengesége a disztális régiókhoz képest. Amennyiben ezek közül legalább egy tünet jelen van, úgy a diagnózis dermatomyositis, ha nincs, akkor amiopátiás dermatomyositis állhat fenn.

### *A koleszterin*

A koleszterin a lipidek közé tartozó, szteránvázas, szerves molekula. Nélkülözhetetlen alkotó eleme az emberi és állati sejtek membránjának. A koleszterin prekuzorként szolgál az epesavak, szteroid hormonok és a D-vitamin bioszintéziséhez. A szervezet minden egyes sejtje képes szintetizálni, gerincesekben legnagyobb mennyiségben a májsejtek termelik. Már száz évvel ezelőtt megfigyelte Virchow a német patológus, hogy a miokardiális infarktuszban elhunyt páciensek artériáinak fala vastag és szabálytalan, illetve sárgás, zsíros anyaggal tömített. Az artériának ezt a patológiás megjelenését aterómának nevezte el. A kutatók kezdetben szkeptikusan álltak a koleszterin és a szívkoszorúér betegségek kapcsolatához, de később egyre több tanulmány látott napvilágot, melyek bizonyították a koleszterin szerepét a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában. Későbbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a koronária betegségekből eredő halálozás főleg az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) koleszterinnek tulajdonítható, mely a totál koleszterin 70%-át teszi ki. Így született meg az az elmélet, mely szerint a megemelkedett totál, pontosabban LDL koleszterinszint okozhat koszorúér megbetegedést. Jelenleg a fejlett országokban és hazánkban is emberek millióinak halálát okozzák az érelmeszesedés talaján kialakult szív-és érrendszeri betegségek, melyek nem csak korai halálozással, hanem hosszú, rokkantságban telt évekkel is sújtják a társadalmat.

## *A sztatinok*

A sztatinok széles körben alkalmazott, nagy hatékonyságú gyógyszerek a hiperkoleszterinémia kezelésében. A koleszterinszint csökkentése mellett enyhítik a gyulladást és az oxidatív stresszt. A sztatinok a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA-) reduktáz kompetitív gátlószerei. A koleszterin szintézis során a HMG-CoA reduktáz katalizálja a HMG-CoA átalakulását mevalonáttá. A sztatinokat a máj metabolizálja, így elsődleges hatásukat a májban fejtik ki. A HMG-CoA reduktáz gátlásával a májban és egyéb szövetekben csökken a koleszterinszintézis, s mivel a koleszterin nagyon fontos alkotó eleme a sejtmembránoknak, a sejtek a plazma lipoproteinjeinek felvételével próbálják a hiányt fedezni, ehhez pedig fokozzák az LDL receptoraik szintézisét. A sztatinok ilyen közvetett módon képesek csökkenteni a plazma koleszterinkoncentrációját, dózistól függően akár 55%-kal is. A sztatin terápia során néhány esetben súlyos mellékhatásokkal lehet számolni, melyek a vázizmokat károsítják. Izomkárosító hatásuk szorosan összefügg magas plazmakoncentrációjukkal. A vázizmot intenzív anyagcsere és magas vérátáramlás jellemzi, így számos anyagot nagy mennyiségben képes megkötni, ennek következtében erősen ki van téve a vérben keringő gyógyszerek hatásainak. A sztatinok által kiváltott izomkárosodások kialakulásuk szerint lehetnek toxikus, nem-autoimmun eredetű miopátiák és sztatin-indukált nekrotizáló autoimmun miopátiák (SINAM). A tünetek súlyossága dóziszfüggő. A sztatin-indukált miotoxicitás tünetei viszonylag széles spektrumon mozognak, az enyhe nem specifikus mialgiáktól kezdve az emelkedett kreatin kináz szintekkel járó myositisen át egészen az életveszélyes rbdomyositisig, melynek végső stádiuma a veseelégtelenség. A toxikus miopátia a sztatin kezelés megvonásával legtöbb esetben megszüntethető. A sztatinokhoz köthető autoimmun betegségek közé tartozik a tipikus polymyositis és dermatomyositis.

## *High mobility group box 1 protein (HMGB1)*

Az érett korú páciensek esetében az izompanaszok megjelenését a koleszterinszint csökkentését célzó sztatin terápia iniciálja. Egyes esetekben a kezelés felfüggesztése sem oldja meg a panaszokat, mivel a tüneteket autoimmun folyamatok állandósítják. A károsodott sejtekből kiszabadult molekulák, mint a HMGB1, a továbbiakban is triggerelik a gyulladást. Így a HMGB1-nek patogén szerepe lehet az izomgyulladás, izomgyengeség, izomfájdalom kialakulásában, olyan autoimmun betegségeknél, mint az idiopátiás inflammatorikus miopátiák, vagy a reumatoid arthritisz. A „High Mobility Group” fehérjék nem-hisztin típusú kromatinfehérjék, melyek minden sejt típusban jelen vannak. Az élő sejtekből aktívan, az elpusztult sejtekből passzívan szabadul föl. Az extracelluláris térben alarmin, azaz figyelmeztető funkciót ellátva képes aktiválni a természetes (veleszületett) immunrendszert.

Az extracelluláris térbe nagy mennyiségben kijutott HMGB1-nek gyulladáskeltő hatása van. A HMGB1 két, pozitív töltésű DNS kötő alegységből (A és B box) és egy negatív töltésű savas végződésből áll. Két nukleáris lokalizációs szignál szakaszt tartalmaz (NLS1: 28-44 aminosavak; NLS2: 179-185 aminosavak), melyek fontos szerepet töltenek be a fehérje sejtmagba történő transzportjában. A RAGE kötéséért az 50-183 közötti aminosav szakasz felelős. Az extracelluláris citokin aktivitás a B boxban található, és a hasított A box alegység segítségével antagonizálható. A B box 106-os pozícióban található ciszteinje nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a HMGB1 aktiválni tudja a citokin felszabadulást. A fehérje transzkripciót stimuláló hatását a C-terminális savas vég biztosítja. Jelenleg ismert, bizonyított receptorai a toll-szerű receptor-4 (TLR-4) és a RAGE (receptor for advanced glycation end products). Számos receptor rendszert kapcsolatba hoztak a HMGB1-gyel de ezek feltételezhetően nem a valódi receptorai, hanem a HMGB1-gyel komplexbe kerülő molekulákra specifikusak. A HMGB1 és RAGE közötti kapcsolat hatása jelenleg intenzív kutatás tárgyát képezi. A vizsgálatok összességében arra mutatnak, hogy a HMGB1 kötődése RAGE-hez közvetlenül aktiválja az NF- $\kappa$ B útvonalat és az ebből fakadó citokin képződést. A makrofágokon mind a TLR-4 mind pedig a RAGE receptor megtalálható, de ha a TLR-4 funkcionálisan inaktív, vagy nincs jelen, akkor a sejtet a HMGB1 egyik izoformája sem tudja citokintermelésre ösztönözni. Így feltételezhető, hogy a HMGB1-RAGE kapcsolat közvetlenül nem képes citokintermelést indukálni.

## Célkitűzések

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

-Hogyan hat az in vivo gyulladáshoz vezető környezet az izom szatellita sejtjeinek proliferációs és differenciációs képességére?

Egyes IIM-ben szenvedő páciensek a biopsziavételezés idején már kortikoszteroid kezelés alatt álltak, mely további kérdéseket vetett fel:

-Milyen hatása lehet az in vivo metilprednizolon kezelésnek a miogenezisre?

-Hogyan befolyásolja a kortikoszteroid kezelés a miozitiszes izomból indított primer tenyészetek osztódó és fúzionáló képességét?

A klinikumban jól ismert jelenség, hogy egyes pácienseknél a sztatin kezelés autoimmun folyamatokat beindítva krónikus miopátiát okoz. Ez több kérdést is felvetett:

-Sztatin indukálta miopátiás izomban a makrofágok és a miogén sejtek hogyan hatnak egymás proliferációjára?

-A pravasztatin, mint ismert gyulladáscsökkentő anyag, képes-e mérsékelni az izomgyulladást?

- Hogyan hat a pravasztatin a miogén sejtek proliferációs és differenciációs képességére?

Az izomgyulladás in vitro modellezésére C2C12 izomsejtekből és RAW264.7 makrofágokból álló kokultúrákat hoztunk létre, melyeken tanulmányoztuk a sejtek osztódási rátáját és IL-6 termelését, az izomsejtek fúziós kapacitását, valamint a pravasztatin kezelésre történő változásokat. Hipotézisünk az volt, hogy a gyulladáshoz vezető környezet a szatellita sejteket a regenerációs folyamatok beindítására serkenti. Emellett azt is feltételeztük, hogy a gyulladást mérséklő szteroid kezelés rontja az izomregeneráció esélyeit. A pravasztatintól pedig gyulladáscsökkentő hatást vártunk.

## **Anyagok és módszerek**

### Humán eredetű harántcsíkolt izomszöveten végzett kísérletek, vizsgálatok

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

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

#### *Biopsziás minták és műtéti anyagok beszerzése*

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

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

A biopsziás és csípőprotézis műtétek során gyűjtött izomminták szatellita sejtjeit mechanikus és enzimátikus elválasztással szabadítottuk ki. A biopsziás mintát 0,75 mg/ml 2-es típusú kollagenázt valamint tripszint tartalmazó  $Ca^{2+}$ - és  $Mg^{2+}$ - mentes foszfát pufferben emésztettük. A kiszabadult sejteket 5% magzati szarvasmarha és 5% lószérumot (HS) tartalmazó HAM's F12 növesztő médiumban üveg fedőlemezre szélesztettük és 37°C-on 5%  $CO_2$  jelenlétében tenyésztettük. A differenciáció beindításához a tenyésztett sejteket 4 nap után 2% HS-t és 2% FBS-t tartalmazó differenciációs tápfolyadékba helyeztük a következő 7 napra.

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

A humán vázizomsejtek primer sejt kultúráiról a kiszélesztéstől számított 2. naptól kezdve a 11. napig felvételeket készítettünk 24 óránként fáziskontraszt mikroszkóp és a hozzá kapcsolt Canon EOS-300D, digitális tükörreflexes



kamera segítségével. Minden üveglemezről 5 fotó készült az egyes napokon. A fotókon manuálisan jelöltük a miogén sejtmagokat, majd morfolometriai elemzést végeztünk. A proliferáció jellemzéséhez normáltuk a miogén magok számának növekedését a tenyészet 2. napján számolt magszámra. A differenciáció kifejezésére a fúziós indexet adtuk meg, mely a miotubulusokban található magok száma és az összes miogén magszám hányadosaként fejezhető ki.

#### *Immunhisztokémia a HMGB1 kimutatására:*

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

#### *Immunhisztokémia CD45 kimutatására*

Formalinban fixált, parafinba ágyazott humán izomból készült metszeteken mutattuk ki a CD45 pozitív sejtek jelenlétét.

A parafinos metszeteket előbb deparafináltuk, rehidráltuk, majd az endogén peroxidázok hatásának kiküszöbölésére desztillált vízzel készített 0,3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal inkubáltuk 15 percig nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Az antigének feltárása Tris-EDTA oldattal (10 mM Tris bázis, 1 mM EDTA oldat, 0.05 % Tween 20, pH 9.0) történt hagyományos konyhai főzőkuktában (100°C), a forrástól számítva 20 percig. A nem specifikus kötőhelyeket 5% BSA-PBS oldattal blokkoltuk. A szövetmetszeteket 1 órán át inkubáltuk egérben termelt monoklonális, humán CD45 elleni antitesttel, melyet 2,5% BSA-PBS-ben 1:50 arányban hígítottunk. Negatív kontrollhoz primer antitest nélkül készült 2,5% BSA-PBS-ben inkubáltuk a metszeteket. A másodlagos antitest peroxidáz polimerrel konjugált, kecskében termeltetett nyúl elleni antitest. A reakciót VECTOR VIP peroxidáz szubsztrát kit alkalmazásával tettük láthatóvá, a gyártó által javasolt protokoll alapján. A metszeteket metilénkékkel kontrasztosítottuk.

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

A western blot vizsgálathoz az izomszövetekből készült lizátumok teljes proteintartalmát használtuk. Az izomminták egy darabját a műtétet követően azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben majd lízis pufferben (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, and pH 7.5) homogénre dörzsöltük mozsár segítségével. A szövetlizátumokat 40–50 kHz frekvenciás, 5–10 másodpercig tartó szónikus kavitációnak vetettük alá. Az így előkészített mintákat elektroforézishez alkalmazott oldatban hígítottuk (50 % glicerol, 10 % SDS, 310 mM Tris-HCl, pH 6.8; 100 mM DTT, 0.02 % brómfenolkék) és 10 percig főztük. Mintánként 30 µg fehérjét szeparáltunk 7,5%-os SDS-PAGE gélen, majd a proteineket elektroforetikus eljárással nitrocellulóz membránra juttattuk. Transzfer után a membrán nem specifikus kötőhelyeit 5% zsírintes tejpórt tartalmazó foszfát pufferrel blokkoltuk 30 percig, szobahőmérsékleten. Blokkolás után a membránt egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on HMGB1 elleni és aktin elleni elsődleges antitesttel. A membránokat másnap 3x10 percig mostuk PBST oldatban (0.1 % Tween-20 PBS-ben) majd 1 órán keresztül inkubáltuk HRP-vel kapcsolt másodlagos antitestekkel, melyeket 5% zsírintes tejpórt tartalmazó PBS-ben hígítottunk. A lumineszcens jeleket megnövelt kemilumineszcenciás eljárással detektáltuk (ECL) a gyártó által javasolt protokollt követve.

## Egér eredetű immortalizált sejtvonalakon végzett kísérletek

### *Egér eredetű sejtvonalak tenyésztése*

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

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

A kokultúrában élő sejtek proliferációjának vizsgálatához 3 cm átmérőjű petri-csészék széli részére helyeztünk 10<sup>5</sup> darab C2C12 sejtet 200 µl médiumban. Ugyanezen csészék középső részén 5x10<sup>3</sup> darab RAW264.7 sejt tenyésztését indítottuk el 100 µl tápfolyadékban. Miután a sejtek leülepedtek a minimális

térfogatú médiumban, gyengéden átmostuk őket foszfát puffer oldattal (PBS), majd 2 ml médiumban folytattuk a tenyésztésüket. Ily módon a kétféle sejt típus egy ideig direkt sejt-sejt kapcsolat nélkül egyazon tápfolyadékban tenyésztett. A monokultúrák sejtjeit is a fent leírt elrendezésnek megfelelően helyeztünk el a petri-csészékben, hogy az összehasonlításból eredő hibázás lehetőségét minimalizáljuk. A médiumot két naponta frissre cseréltük. A sejteket May-Grünwald és Giemsa oldattal festettük meg. A műanyag petri-csésze alján ülő, letapadt C2C12 sejteket háromszor mostuk PBS oldatban majd 5 perc metanolos fixálást követően 5 percig festettük Giemsa festékkel. Ezt követően mosási lépés nélkül May-Grünwald oldatot adtunk a sejtekhez, melyet közvetlenül felhasználás előtt csapvízben hígítottunk (25x) és 15 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a sejteket csapvízzel óvatosan átmostuk majd hagytuk megszáradni. A sejtekről felvételeket készítettünk, melyeken ImageJ szoftver programmal határoztuk meg a sejtek által lefedett területeket

*Tenyésztési protokoll kokultúrában tartott sejt vonalak IL-6 termelésének megfigyeléséhez*

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

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

$10^5$  darab C2C12 sejtet szélesztettünk 24 lyukú tenyésztő edénybe, lyukanként 2 ml proliferáltató médiumban. A tenyésztés harmadik napján a médiumot 2% lószérumot tartalmazó, differenciációt segítő tápoldatra cseréltük. A hatodik napon, amikor a tenyészet már jelentős mennyiségű miotubulust tartalmazott  $5 \times 10^4$  darab RAW 264.7 makrofágot szélesztettünk a növekvő izomsejtekre. Az így létrehozott kokultúrát 24 órán át kezeltük  $500 \mu\text{M}$  pravasztatinnal szérum mentes DMEM-ben. A tenyésztő médiumot begyűjtés után centrifugáltuk és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a tervezett mérésekig. A megfelelő összehasonlíthatóság érdekében monokultúrákat is indítottunk, melyeket a kokultúrákkal azonos módon kezeltünk. Kontrollnak kezeletlen sejteket használtunk.

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

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

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

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

### *Kísérleti „kóstoltatás” sejt kultúrákon*

A kísérlet során az volt a célunk, hogy a miogén és mieloid sejtek „megkóstolják” egymás szolubilis faktorait, citokinjeit, és egyéb anyagszere termékeit. C2C12 és RAW 264.7 sejteket szélesztettünk 96 lyukú tenyésztő edényekbe. A tenyésztés 5. napján a sejtek felülúszóját begyűjtöttük, 2000 rpm sebességgel 5 percig centrifugáltuk, majd  $0,22 \mu\text{m}$  pórusátmérőjű fecskendőszűrőn átnyomtuk. Az izomsejtekről begyűjtött felülúszó felét kiegészítettük azonos térfogatú friss tápoldattal, s az így hígított médiumot, mely tartalmazta a C2C12 sejtek anyagszere termékeit, a makrofágokra helyeztük. Hasonló módon jártunk el a RAW 264.7 sejtekről levett felülúszókkal is, melyeket a fenti módon hígítva az izomsejtekre helyeztünk. Az így megcserélt, és friss médiummal is kiegészített tápoldatban a monokultúrákat még 24 óráig tenyésztettük  $37^\circ\text{C}$ -on, 5%  $\text{CO}_2$  -ot tartalmazó termosztátban. 24 óra elteltével a felülúszót begyűjtöttük, centrifugáltuk, leszűrtük, majd ELISA vizsgálat alá vetettük. Kontrollként a monokultúrákkal párhuzamosan, azonos feltételek között tenyésztett kokultúrákat használtunk.

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

A sejtenyészetekről származó médium IL-6 koncentrációját a kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kittel mértük a gyártó utasítása alapján. A mérés 3 biológiai párhuzamossal történt

### *Immuncitokémia az IL-6 kimutatására*

A kokultúrában tartott sejteket 3 µg/ml Brefeldin A -val kezeltük 1 órán keresztül, hogy megakadályozzuk a proteinek szállítását az endoplazmatikus retikulum és a Golgi apparátus között. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk PBS-sel majd 4%-os paraformaldehid (PFA; pH 7.4) oldattal fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Az autofluoreszcencia elkerülésére glicinnel történő kioltást alkalmaztunk, melynek során 5 percig 30 mM glicin-PBS oldatban (pH 7.4) inkubáltuk a tenyészetet. A sejtmembránt 0,5% Tritonx-100-PBS oldattal történő 20 perces kezeléssel tettük átjárhatóvá. A nem-specifikus kötőhelyeket egy órán át blokkoltuk, majd a blokkoláshoz használt oldatot kiegészítettük IL-6 elleni antitesttel és ezzel inkubáltuk a tenyészeteket 4°C-on egy éjszakán át, nedves kamrában. A sejteket másnap háromszor mostuk 0,1% Tween-20-PBS oldattal majd a PBS-ben hígított másodlagos antitesttel inkubáltuk egy órán keresztül szobahőmérsékleten, nedves kamrában. A tenyészeteket ezután háromszor mostuk PBS-ben majd 5 µl Mowiol 4-88 oldatot rácseppentve üveglappal lefedtük. A kiértékelés során a festés pozitivitását vizsgáltuk, kvantitatív analízist fluoreszcens jelintenzitás alapján nem végeztünk.

### *MTT teszt a sejtek életképességének meghatározására*

A tenyésztés hetedik napján meghatároztuk a kontroll és a pravasztatinnal kezelt C2C12 sejtek életképességét MTT-teszt segítségével. Az MTT teszt egy kolorimetriás vizsgálat, mely alkalmas a sejtek metabolikus aktivitásának értékelésére, valamint az életképes sejtek számának meghatározására. A metabolikusan aktív sejtek képesek endocitózissal fölvenni a tetrazólium-bromid molekulákat (3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H tetrazólium bromid) melyeket a mitokondriális dehidrogenázok liláskék színű formazán kristályokká alakítanak. A sejteket 30 percig inkubáltuk 0,01% MTT reagenssel 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban. Az inkubációs idő leteltével az MTT reagenst is tartalmazó médiumot eltávolítottuk, a sejteket pedig 100 µl DMSO-ban lizáltuk. A szolubilizált sejteket egy tiszta ELISA-mikrolemezre, melyen lemértük a kékes oldat optikai denzitását 550 nm hullámhosszon. A pravasztatinnal kezelt sejtekből származó abszorbanciát a kezeletlen sejtek abszorbanciájának százalékában fejeztük ki.

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

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

## **Eredmények**

### Humán harántcsíktolt izomszöveten végzett vizsgálatok eredményei

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

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

értékek azt jelzik, hogy a szatellita sejtekben, mioblasztokban és miotubulusokban lévő miogén sejtmagok száma kisebb mértékben emelkedik a kezeletlen IIM páciensek biopsziás mintáiból indított primer tenyészetekben, mint a coxarthrosisos páciensek műtéti anyagából indított sejt kultúráiban. Az IIM-ben szenvedő páciensek standard, kortikoszteroidokkal történő kezelése hatással volt az izmaikból indított primer tenyészetek proliferációs ütemére is, ugyanis növekedési rátájuk a coxarthrosisos páciensek mintáiból indított tenyészetekhez közelített. A tenyészeteket 11 napig tartottuk fenn és vizsgáltuk. A fáziskontraszt mikroszkóp alatt készült felvételek alapján a tenyésztés 6. napján, a proliferáció előrehaladott, de a differenciáció még korai stádiumában, a sejtek morfológiája nem változott. Ebben a stádiumban a coxarthrosisos és IIM tenyészetek miotubulusai 2-10 sejtmagot tartalmaztak, de kisebb a sejtszám és a sejtmagszám is. A tenyésztés 10. napjára a különbség még inkább szembetűnő. A proliferációs rátával szemben a prekursor sejtek fúziós kapacitása nem károsodott az IIM-ben szenvedő páciensektől származó primer tenyészetekben. A fúziós index adataira illesztett 3 paraméteres szigmoid görbék ( $y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ ) nem különböztek egymástól szignifikánsan ( $p=0,285$ ). A kezeletlen IIM páciensek mintáiból indított tenyészetek esetén a fúziós indexre illesztett görbék enyhe jobbra tolódást mutattak (coxarthrosisos minták tenyészetei:  $x_0 = 2.745 \pm 0.25$  nap; kezeletlen IIM tenyészetei:  $x_0 = 3.404 \pm 0.086$  nap), mely arra utal, hogy kissé később kezdődött a sejtek fúziója. A kortikoszteroidokkal történő kezelés azonban balra tolta el a fúziós index görbét ( $x_0 = 1.831 \pm 0.29$  nap), s az eltolódás hasonló mértékű volt, mint a kezeletlen myositises görbe eltolódása a coxarthrosisoshoz képest.

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

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

Az izom keresztmetszetének egységnyi területén a HMGB1 pozitív miogén magok száma szignifikánsan kisebb volt ( $p < 0,05$ ) mind a kezeletlen ( $402.5 \pm 60.2 \text{ mm}^2$ ) mind a kezelt IIM ( $360.1 \pm 77.5 \text{ mm}^2$ ) csoportban a coxarthrosisos kontroll csoporthoz képest ( $882.74 \pm 155.1 \text{ mm}^2$ ). Az izomregeneráció jeleinek azonosítása érdekében megvizsgáltuk az izomrostok centrálisan elhelyezkedő sejtmagjainak arányát. A centrális helyzetű sejtmagokat az izom minták keresztmetszeti felszínén számoltuk. A 11 minta 4 coxarthrosisos betegből, 4 IIM-ben szenvedő, de kortikoszteroiddal nem kezelt betegből és 3 IIM-ben szenvedő és metilprednizolon terápia alatt álló páciensből származott. Az izmok keresztmetszeti képén hat látótérben számoltuk meg a centrális sejtmagokat, átlagoltuk, s az arányt az összes miogén magszámhoz viszonyítva adtuk meg. Azt találtuk, hogy a coxarthrosisos mintákban az összes miogén sejtmag  $4,53 \pm 1,35\%$ -a centrális helyzetű, s ehhez képest a kortikoszteroid terápiaiban nem részesülő IIM páciensek mintáiban jelentősen kevesebb a centrális magok száma ( $p = 0,039$ ), az összes miogén magnak csak  $1,37 \pm 0,51\%$ -a. A kortikoszteroid terápiaiban részesült páciensek mintáiban ez az arány  $2,32 \pm 0,62\%$  volt, mely egyik csoport eredményeitől sem tér el szignifikánsan.

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

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

Egér eredetű sejtvonalakon végzett kísérletek eredményei

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

A kokultúrában történő tenyésztés nem volt hatással a RAW 264.7 makrofágok és a C2C12 izomsejtek proliferációjára. A kétféle sejttípus egymásra hatását vizsgálva, a sejteket mono-és kokultúrában tenyésztettük és figyeltük, hogyan



hatnak egymás proliferációs képességére. Egy nappal a szélesztést követően a sejtek által elfoglalt terület a C2C12 izomsejtek esetében, monokultúrában  $2,3 \pm 0,9\%$ , kokultúrában  $3,1 \pm 1,2\%$  ( $p > 0,05$ ), RAW makrofágok esetében monokultúrában  $8,0 \pm 1,9\%$ , kokultúrában  $5,8 \pm 2,0\%$  ( $p > 0,05$ ). A kétféle sejtípus növekedési üteme közötti különbség a tenyésztés harmadik napjára vált kifejezetté, amikor a C2C12 sejtek által borított felület monokultúrában  $10,1 \pm 3,4\%$ , kokultúrában  $12,1 \pm 5,4\%$  ( $p > 0,05$ ) volt, RAW 264.7 makrofágok esetében pedig monokultúrában  $34,6 \pm 6,6\%$ , és kokultúrában  $31,6 \pm 3,6\%$  ( $p > 0,05$ ) volt. A RAW 264.7 sejtek proliferációja a harmadik naptól kezdve szignifikánsan gyorsabbnak mutatkozott a C2C12 sejtekénél monokultúrában ( $p < 0,0001$ ) és kokultúrában is ( $p < 0,0001$ ). A kokultúrában történő tenyésztésnek azonban sem a mioblastok sem a makrofágok osztódási rátájára nem volt hatása.

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

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

A kokultúrában lévő sejtekben immunfestéssel tettük láthatóvá az IL-6 citokint. Azt találtuk, hogy az IL-6 termelés jelen van a proliferáló miogén sejtekben és monocita/makrofágokban továbbá megfigyelhető a miogenezis differenciációs stádiumában fejlődő miotubulusokban is. A sejtenyésztés médiumában monitoroztuk a sejtekből felszabadult IL-6 koncentrációját. A tenyésztés 1-3 napján mely a miogenezis proliferációs stádiuma, alacsony IL-6 koncentrációkat mértünk a tenyésztetek felülúszójában és nem találtunk szignifikáns különbséget a kokultúrák és a monokultúrák között. A tenyésztés ötödik napjától kezdve az IL-6 koncentrációja a kokultúrák esetében fokozatosan emelkedett, de a monokultúráknál változatlanul alacsony maradt. A hetedik és kilencedik napon az IL-6 koncentráció tovább emelkedett, s a monokultúrák IL-6 termeléséhez képest szignifikánsan magasabb lett. Annak ellenére, hogy a C2C12 és a RAW 264.7 sejtek is szabadítottak fel mérhető mennyiségű IL-6-ot, monokultúrákban a 9 napos tenyésztés alatt végig alacsony volt a citokin koncentrációja.

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

A pravasztatin fokozta a kokultúrák IL-6 termelését. A sztatinok ismert gyulladáscsökkentő hatása miatt feltételeztük, hogy a vízdoldékony pravasztatin csökkenti a kokultúrák IL-6 termelését. A feltételezés alátámasztásához  $500 \mu\text{M}$  pravasztatinnal kezeltünk 6 napos mono-és kokultúrákat, 24 órán keresztül. Az elvárásainkkal ellentétben azt találtuk, hogy a pravasztatin szignifikánsan emelte a sejtek IL-6 termelését mind C2C12 monokultúrában (kontroll:  $2,3 \pm 0,2 \text{ pg/ml}$ ; pravasztatin kezelt:  $18,0 \pm 1,5 \text{ pg/ml}$ ;  $p < 0,001$ ) mind kokultúrában (kontroll:  $129,3 \pm 5,8 \text{ pg/ml}$ ; pravasztatin kezelt:  $945,8 \pm 50,2 \text{ pg/ml}$ ;  $p < 0,001$ ). A RAW

264.7 makrofágok monokultúrája esetében pravasztatin kezelés hatására nem találtunk jelentős változást a sejtek IL-6 felszabadításában (kontrol:  $2,5 \pm 0,1$  pg/ml; pravasztatin kezelt:  $1,8 \pm 0,1$  pg/ml;  $p > 0,05$ ).

*A pravasztatin csökkentette az izomsejtek proliferációs képességét*

A C2C12 sejtek intenzív IL-6 termelése mögött a pravasztatin kezelésre megszorodott sejtszámot feltételeztük. Megvizsgáltuk a 24 órás monokultúrák proliferációját pravasztatin kezelés mellett. 24 óra elteltével a pravasztatinnal kezelt mioblasztok száma jelentősen csökkent ( $p < 0,01$ ). Ezzel szemben a 24 órás kezelés nem okozott változást makrofágok számában ( $p > 0,05$ ). Ebből arra következtettünk, hogy a kokultúra megnövekedett IL-6 termelését pravasztatin kezelést követően feltételezhetően nem a megnövekedett sejtszám eredményezte. A pravasztatin jelentősen rontotta a C2C12 izomsejtek proliferációs képességét.

*A pravasztatin csökkentette az izomsejtek differenciációs kapacitását*

A pravasztatin kiemelkedően negatív hatást gyakorolt a C2C12 sejtek proliferációjára, ezért megvizsgáltuk hatását a sejtek differenciációjára is. A fúziós index (FI) kifejezi a miotubulusokban lévő sejtmagok arányát a tenyészet összes sejtmagjához viszonyítva. Differenciálódó C2C12 sejteket 9 napon át kezeltünk pravasztatinnal, s a tenyésztés 7. és 9. napján szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) kevesebb miotubulust találtunk a tenyészetekben a kezeletlen kontrollhoz képest. A kontroll tenyészetek esetében a fúziós index az 5. naptól kezdve fokozatosan nőtt, de a pravasztatinnal kezelt tenyészetek esetében nem változott. A kezelt sejtek életképessége azonban a kontroll sejtekéhez volt hasonló ( $p > 0,3$ ). A pravasztatin rontotta a C2C12 sejtek differenciációs képességét.

## Összefoglalás

A hiperkoleszterinémia kezelésében elsőként választandó gyógyszerek a sztatinok. Alkalmazásuk során ritkán előfordulhat súlyos, izomkárosító mellékhatás.

Munkánk során humán izombiopsziás mintákon és műtéti anyagokon, valamint primer izomsejt tenyészeteken végzett kísérleteinkben tanulmányoztuk a gyulladásos környezet hatását az szatellita sejtek életképességére. Az izomgyulladást C2C12 izomsejtekből és RAW264.7 makrofágokból álló kokultúrákon modelleztük in vitro.

A szteroiddal nem kezelt páciensektől származó izmokban a regenerálódó rostok száma kevesebb, valamint az izmokból indított primer tenyészetekben a sejtek lassabban osztódtak a kontrollhoz képest. A páciensek előzetes kortikoszteroid kezelése mérsékelte a vázizmok gyulladásos beszűrődését.

A HMGB1-et a szteroid kezeléstől és betegségtől függetlenül az izmok és az infiltrátum sejtmagjaiban találtuk. A szteroid kezelés ellenére is kevesebb HMGB1-et tartalmaztak a myositises páciensek mintái. A kortikoszteroid kezelés nem befolyásolta sem az izmok összes HMGB1 tartalmát, sem a HMGB1 pozitív sejtmagok vagy a regenerálódó rostok számát.

A kokultúrában tenyésztett sejtek nem voltak hatással egymás proliferációs képességére, azonban az együttélés fokozta a kokultúra IL-6 termelését. Az izomsejtek IL-6 termelése a differenciáció stádiumában makrofágok nélkül is emelkedett, de nem érte el a vele egy stádiumban élő kokultúra citokintermelését. A pravasztatin kezelés tovább fokozta az izomsejtkultúra és a kokultúra IL-6 termelését is és rontotta az izomsejtek osztódási és fúziós képességét. A makrofágok IL-6 termelésére vagy osztódására nem volt hatással. Eredményeink arra utalnak, hogy a pravasztatin egyes esetekben fokozhatja az izomgyulladást, s a folyamatban a HMGB1-nek is lehet szerepe.



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

Jelölt: Cseri Karolina

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10055321

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

### További közlemények

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





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

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

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

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

Debrecen, 2022.01.05.

