

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az obezitás patomechanizmusa során megváltozott
koleszterin- és kalciumháztartás vizsgálata monocitákban**

Padra János Tamás

Témavezető: Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

Tartalomjegyzék

I. BEVEZETÉS	3
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
1. Obezitás	5
2. Leptin	7
3. Koleszterin szintézis; sztatinek szerepe és pleiotropikus hatásai	10
3.1 A koleszterinszintézis regulációjában résztvevő molekulák és gátlószerek	11
3.1.1 MAPK és PD98059	11
3.1.2 SCAP és 25-HC	12
4. Kalcium	12
4.1 A kalcium homeosztázis fenntartása	13
4.2 A kalcium jelátvitelben szerepet játszó molekulák és gátlószerek	13
4.2.1 Membráncsatornák és verapamil	13
4.2.2 G _i protein és pertusszis toxin	14
4.2.3 Foszfatidilinozitol-3-kináz és wortmannin	15
4.2.4 Foszfolipáz C és neomycin	15
4.2.5 Inozitol triszfoszfát	16
4.2.6 Intracelluláris kalcium transzlokáció és thapsigargin	16
4.2.7 Proteinkináz C	17
5. NADPH oxidáz (Nox)	18
III. CÉLKITŰZÉSEK	20
IV. A VIZSGÁLATBA BEVONT SZEMÉLYEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
Vizsgált személyek	22
Laboratóriumi paraméterek meghatározása	22
Monociták izolációja	22
Kísérleti körülmények	24
A membránhoz kötött protein kináz C meghatározása	25
Az endogén koleszterin szintézis mérése	25
Szuperoxid anion képződés	26
Az Ins(1,4,5)P ₃ meghatározása	26
Az intracelluláris [Ca ²⁺] meghatározása	27
Statisztikai analízis	27
V. EREDMÉNYEK	28
1. Leptin hatásának vizsgálata az endogén koleszterinszintézisre	28
1.1 Leptin koncentráció gradiens hatásának vizsgálata	28
1.2 A koleszterin szintézis regulációjának vizsgálata	29
1.3 A PKC szerepe a koleszterin szintézis regulációjában	30
2. Leptin hatásának vizsgálata az intracelluláris Ca ²⁺ viszonyokra és a Nox működésére ..	32
2.1 A K és TS monociták leptin indukált intracelluláris kalcium változásai	32
2.2 A megváltozott kalcium szignálok okának vizsgálata	33
2.3 Az Ins(1,4,5)P ₃ szintjének változása a kalcium jelátvitel gátlása során	35
2.4 A szuperoxid anion képződésben tapasztalt változások	36
2.5 A kalcium jelátvitel gátlásának következményei	37
2.6 A Nox és a kalcium viszonyok kapcsolata	39
VI. MEGBESZÉLÉS	41
1. A koleszterinszintézis regulációjának meghatározó különbségei	41
2. Az intracelluláris kalcium szint és a Nox szabályozása	45
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	49
VIII. SUMMARY	50

IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	51
X. FÜGGELÉK.....	67
Tárgyszavak	67
Keywords	67
Köszönetnyilvánítás	67
XI. RÖVIDÍTÉSEK	68

I.BEVEZETÉS

Jelenlegi ismereteink szerint az elhízás a metabolikus szindróma kialakulásának egyik mérföldköve. Emellett az elhízás egyike a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás legelterjedtebb kockázati tényezőinek, köszönhetően a magas vérnyomással, II-es típusú diabétesz mellitusszal és hiperkoleszterinémiával való szoros összefüggésének (Lenz és mtsai, 2009). Az obezitás általában hosszú idő alatt, sok esetben az évtizedek során fejlődik ki. Ennek ellenére néhány, az elhízásra jellemző, metabolikus abnormalitás már a betegség korai szakaszában kimutatható és jelei láthatók a mérsékelt súlytöbblettel rendelkező betegeken is. Ennek hatására számos tanulmány foglalkozott a túlsúlyos betegek emelkedett kardiovaszkuláris kockázatának vizsgálatával (Calle és mtsai, 1999). Az obezitás központi szerepe a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában részben az adipocita eredetű adipokineknek tulajdonítható, amelyek részt vesznek az elhízással összefüggő metabolikus szindróma kialakulásában (Ai és mtsai, 2011; Cicero és mtsai, 2011). Az adipokinek a citokin szupercsalád tagjai, közöttük a leptin, képesek a mevalonát ciklus működésének intenzitását fokozni, ami emelheti a koleszterin bioszintézisének mértékét (Ruan és mtsai, 2006). Az emelkedett leptin koncentrációnak azonban nem egyedüli következménye a mevalonát ciklus és vele együtt a koleszterinszintézis fokozódása. Párhuzamosan a sejtmembrán összetétele is változik, amely befolyásolja a membráncsatornák működését. Neutrofilekben, szabad koleszterin hatására a kalcium sejtbe áramlásának csökkenését találták (Kannan és mtsai, 2007). Adipocitákban, a sérült ATP- és kalmodulin-dependens H^+/Ca^{2+} antiport hatására az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szintje folyamatosan emelkedett lesz. Ez az állapot a lipogenezis fokozódásának és a lipolízis csökkenésének kedvez (Zemel, 2002; Zemel, 2009). Ezek a folyamatok a zsírszövet jelentős növekedéséhez vezetnek, tükrözve az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szerepét az obezitás patomechanizmusában (Shi és mtsai, 2001). Másfelől a szabadgyök képződés károsítja a membránon keresztüli iontranszportot a Na^+/K^+ -ATPáz, a Na^+/Ca^{2+} csere protein és az ATP-függő H^+/Ca^{2+} antiport proteinek közvetlen károsításával (Kourie, 1998; Stark, 2005). Obezitásban a leptin overexpressziója, a hosszú transzmembrán doménnel rendelkező leptin receptorokon keresztül, stimulálja a NADPH oxidázt és számos sejt szuperoxid termelését fokozza (Fernández-Sánchez és mtsai, 2011; Fortuño és mtsai, 2010; Koh és mtsai, 2008). *In vitro* kísérleteikben Franzoni és mtsai bemutatták, hogy a sztatinoknak saját antioxidáns aktivitásuk van. Ezen kívül feltételezték, hogy a fluvasztatin

hiperkoleszterinémias betegekben gátolhatja a NADPH oxidázt az adiponektin fokozott termelésén keresztül (Franzoni és mtsai, 2003; Carnevale és mtsai, 2010). A NADPH oxidáz gátlása a szuperoxid anion csökkent képződését okozza.

Vizsgálatainkat a kutatócsoportunk által hiperkoleszterinémias betegek monocitáinak felhasználásával elért korábbi kutatási eredményeknek folytatásaként végeztük, Doktori Értekezésem e munkákon alapul. Korábbi kísérleteink a cPKC fontosságát emelik ki a koleszterin bioszintézisét reguláló tényezők közül (Balogh és mtsai, 2007; Seres és mtsai, 2007) és rámutatnak az egészséges és hiperkoleszterinémias egyének véréből szeparált monociták kalcium homeosztázisának különbségeire (Kosztáczky és mtsai, 2007; Seres és mtsai, 2006). Feltételezésünk szerint a leptin azon faktorok egyike, amely túlsúlyos személyek monocitáiban a Ca^{2+} szintjének emelkedéséért felelős. Elméletünk alátámasztásához tanulmányoztuk a leptin hatását humán monocitákon, vizsgáltuk a leptin-indukált bifázikus koleszterin szintézist, valamint a szuperoxid anion képződés és a sejten belüli szabad Ca^{2+} kapcsolatát normál testsúlyú és túlsúlyos egyénekből származó monociták (K és TS monociták) leptin kezelését követően. Továbbá elemeztük mindkét monocita csoportban a Ca^{2+} szignálok eredetét. Végül, hogy tisztázzuk a szuperoxid anion képződésének szerepét a sejten belüli szabad Ca^{2+} egyensúlyának felborulásában, a sejtszuspenzióhoz fluvasztatint adva így gátoltuk a NADPH oxidáz aktivitását.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Obezitás

Az elhízás napjainkban jelentős terhet ró az érintettek egészségére, az egészségügyre és a társadalomra egyaránt. Európában az elhízott lakosok aránya magas, s ez az arány a világ legtöbb országában növekvő tendenciát mutat. Az egészségügyi kiadások jelentős részét fordítják az obezitással összefüggő betegségek kezelésére és kutatására. Az elhízás legjelentősebb kísérőbetegségei a szív- és érrendszeri betegségek (pl. abnormális koleszterin szint, emelkedett vérnyomás, iszkémiás szívbetegség stb.), az endokrinológiai betegségek (pl. cukorbetegség), az emésztőszervi betegségek (zsírmáj, reflux betegség stb.), a légzőszervi betegségek (pl. alvási apnoe) és a különböző tumoros megbetegedések. Az obezitásnak ezeken kívül is számos olyan következménye ismert, melyek nagymértékben rontják a beteg életminőségét (bőrgyógyászati, ortopédiai és egyéb problémák). A járványszerű elhízás tehát olyan jelenség, amelynek megelőzése, gyógyítása és kutatása egyre fontosabb feladatot jelent az egészségügyben dolgozók és kutatók számára.

Annak megállapítására, hogy kit nevezhetünk elhízottnak, és hogy az elhízás melyik stádiumában van, számos módszer létezik. A nagy munkaigényű és költséges módszereket elsősorban a kutatásban alkalmazzák. Ilyen pl. a denzitometria, a has komputertomográfiás (CT) vizsgálata és a mágneses rezonanciás leképezés (MR) (Dang és mtsai, 2010). Az egészségügyi gyakorlatban az obezitás mértékének felmérésére leggyakrabban használt technikák az előbbiekkal összevetve költség-, munkaerő- és időtakarékosabbak. Közöttük említhetjük a hasi elhízás mutatóit: a haskörfogatot, a csípőkörfogatot, és a derék-csípő arányt. Ezek a mérések azért fontosak, mert a hasi elhízás jelentőségét a szív és érrendszeri megbetegedések kialakulásában folyamatosan bővülő kutatási eredmények támasztják alá (Recio-Rodriguez és mtsai, 2012). Az elhízás értékelésére mégis, egyszerűsége miatt, egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a testtömegindex (Body Mass Index, BMI) számolása, amely a kg-ban kifejezett testsúly és a méterben kifejezett magasság négyzetének hányadosa (testsúly [kg]/testmagasság [m]²). Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) definíciója alapján túlsúlyosnak tekinthető az, akinek BMI értéke meghaladja a 25,0 kg/m²-t, és elhízottnak az, akinek BMI-je 30,0 kg/m² fölött van (WHO, 2012).

Az elhízással kapcsolatba hozható egészségügyi problémák megoldásához fontos megismerni kialakulásának tényezőit, mint a beavatkozás lehetséges helyeit. Kialakulása multifaktoriális: részt vesznek benne genetikai, hormonális, viselkedési és környezeti tényezők.

Az elhízás legnyilvánvalóbb oka az energiamérleg felborulása: az étkezéssel bevitt és a felhasznált energia nem megfelelő aránya, amihez a fejlett országokra jellemző civilizációs változások is nagymértékben hozzájárulnak. A gazdaság fejlődésével a népesség könnyebben jut élelmiszerhez, az élelmiszerek kalóriában gazdagabbak, és a magas szénhidrát-tartalmú üdítőitalok fogyasztása nő. Az ülő életmód, az elégtelen fizikai aktivitás még tovább ront a felborult energiaegyensúlyon.

Az obezitás genetikai hátterének vizsgálata során ismertté vált a monogén polimorfizmusok (SNP) szerepe. A genetikai polimorfizmusok jelenléte az obezitással kapcsolatba hozható génekben (FTO, melanocortin-4 receptor, leptin, leptin receptor stb.) és azok mintázata a genomon belül szignifikáns hatású az elhízásra való hajlam szempontjából (Fawcett és Barroso, 2010; Dang és mtsai, 2010).

Az obezitás kórlefolyását elsőként a fehér zsírszövet mennyiségének növekedése jellemzi. A fehér zsírszövet mechanikai védő, hőszabályozó és raktározó szerepe mellett azonban endokrin funkciókat is ellát. Az adipociták által termelt peptidek – adipokinek – közé tartozik pl. a chemerin, az adiponektin és a leptin. A fehér zsírszövet növekedését a termelt citokinek mennyiségének változása is kíséri. Az étvágyat és az anyagcserét a hipotalamuszon hatva szabályozó leptin mennyisége a zsírszövettel arányosan emelkedik. Étvágycsökkentő funkcióját a tartósan emelkedett koncentrációjának hatására kialakuló leptin-rezisztencia következtében nem tudja megfelelően ellátni. A leptin rezisztencia kialakulása mellett megjelenik az inzulin rezisztencia, amely a II-es típusú diabétesz kialakulásának kockázatát növeli. A magas vérnyomás betegség és a koleszterin szint emelkedése tovább emeli a betegekben a szív- és érrendszeri események kockázatát. Az említett obezitást kísérő betegségek együtteseként azután megjelenik a metabolikus szindróma, amely rizikófaktorainak következményeként tovább növeli az obezitás vaszkuláris kockázatát. Az obezitásban a fent említett metabolikus változások és kísérőbetegségek már visszafordíthatatlanokká váltak, ezért célszerű a beavatkozást korábban megkezdeni. A túlsúlyos állapotot kísérő betegségek még nem „rögzültek”, így azok életmód változtatással is gyógyíthatóak. Kíváncsiak voltunk, hogy az eddig a túlsúlyos állapotban megfigyelt betegségekhez milyen intracelluláris elváltozások köthetők, ezért kísérleteinket túlsúlyos, nem pedig elhízott személyeken végeztük.

Az elhízás és kialakulásának első lépcsőjét jelentő túlsúlyos állapot vizsgálatának és a beavatkozásnak szükségessége tehát vitathatatlan. Munkám során az I. számú Belgyógyászati Klinikán a túlsúlyos egyének monocitáiban megfigyelhető koleszterinszintézist, kalcium jelátvitelt és szabadgyökképződést érintő változásokat vizsgáltam. A leptin kezelés hatására bekövetkező intracelluláris jelátvitel különböző lépéseit a hírvivő molekulák hatását vagy azok képződését gátló szerek segítségével tanulmányoztam.

2. Leptin

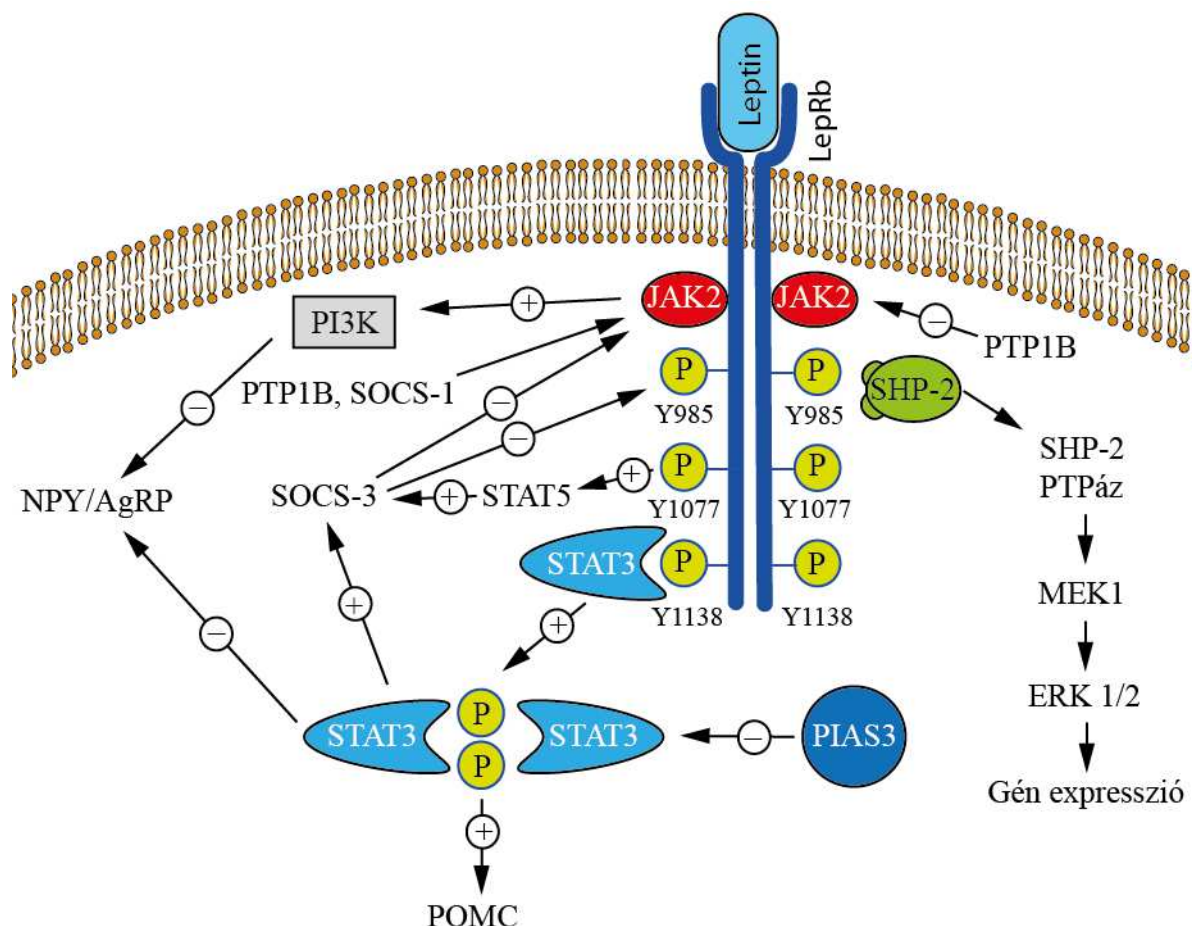
A leptin a legnagyobb arányban a bőr alatti zsírszövet által termelt, 167 aminosav hosszúságú, emberben a 7-es kromoszómán található *ob* gén által kódolt 16 kDa tömegű hormonfehérje. Koncentrációja a vérben egyenes arányban van a fehér zsírszövet tömegével. Szabályozza az étvágyat és a neuroendokrin működést. Jelentőségét a testsúly szabályozásában neve is mutatja: a *leptos* szó, melyből ered, vékonyat jelent.

A leptin a sejtek transzkripciójának, aktivitásának és membránpotenciáljának megváltoztatásáért felelős. Receptorainak „splice” variánsai alapján rövid és hosszú receptorformákról beszélhetünk. Az előbbi több szövetben, míg az utóbbi, amely hosszabb citoplazma domént (LepRb) kódol, főként a központi idegrendszer (KIR) bizonyos pontjain, de az immunsejtekben is expresszálódik. Annak ellenére, hogy a leptin a perifériás szöveteken is hat, a testsúly, az evés, az energiafelhasználás és a glükózanyagcsere regulációjához a KIR működésének befolyásolása önmagában is elegendő.

A LepRb, a leptin bekötődését követő konformációváltozás hatására, a Janus kináz2/ signal transducer and activator of transcription (JAK2/STAT3) útvonalat és a foszfatidilinozitol-3-kinázt (PI3K) stimulálja (Gautron és Elmquist, 2011). A JAK2 a Tyr985, Tyr1077 és Tyr1138 tirozin oldalláncok foszforilációját indukálja. Ezáltal, a Tyr1138-on keresztül foszforilálódik a STAT3 és a Tyr1077-en keresztül a STAT5. A Tyr985 foszforilációjának következménye egy protein tirozin foszfatáz molekula, az SHP2 aktivációja és a LepRb/JAK2 jelátvitel gátlásáért felelős suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) megkötése (Myers és mtsai, 2010). A STAT3-nak melanocortin génexpressziót szabályozó hatása miatt nagy szerepet tulajdonítanak az energia homeosztázisban. A leptin a szimpatikus idegrendszerre az agy *nucleus arcuatusában* található proopiomelanocortin (POMC) termelő neuronokon keresztül, a protein-tirozin foszfatáz SHP2, majd az azt követő ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) aktivációjával hat (Israel és Chua, 2010).

A leptin a neuropeptid Y és az Agouti-related protein (AgRP) orexigén hatását a PI3K és a STAT3 expressziójának fokozásával képes csökkenteni, így befolyásolva az éhséget és az energiabevitelt (1. Ábra).

1. Ábra: A leptin jelátviteli útvonalai a hipotalamuszban (Scarpace és Zhang, 2007))

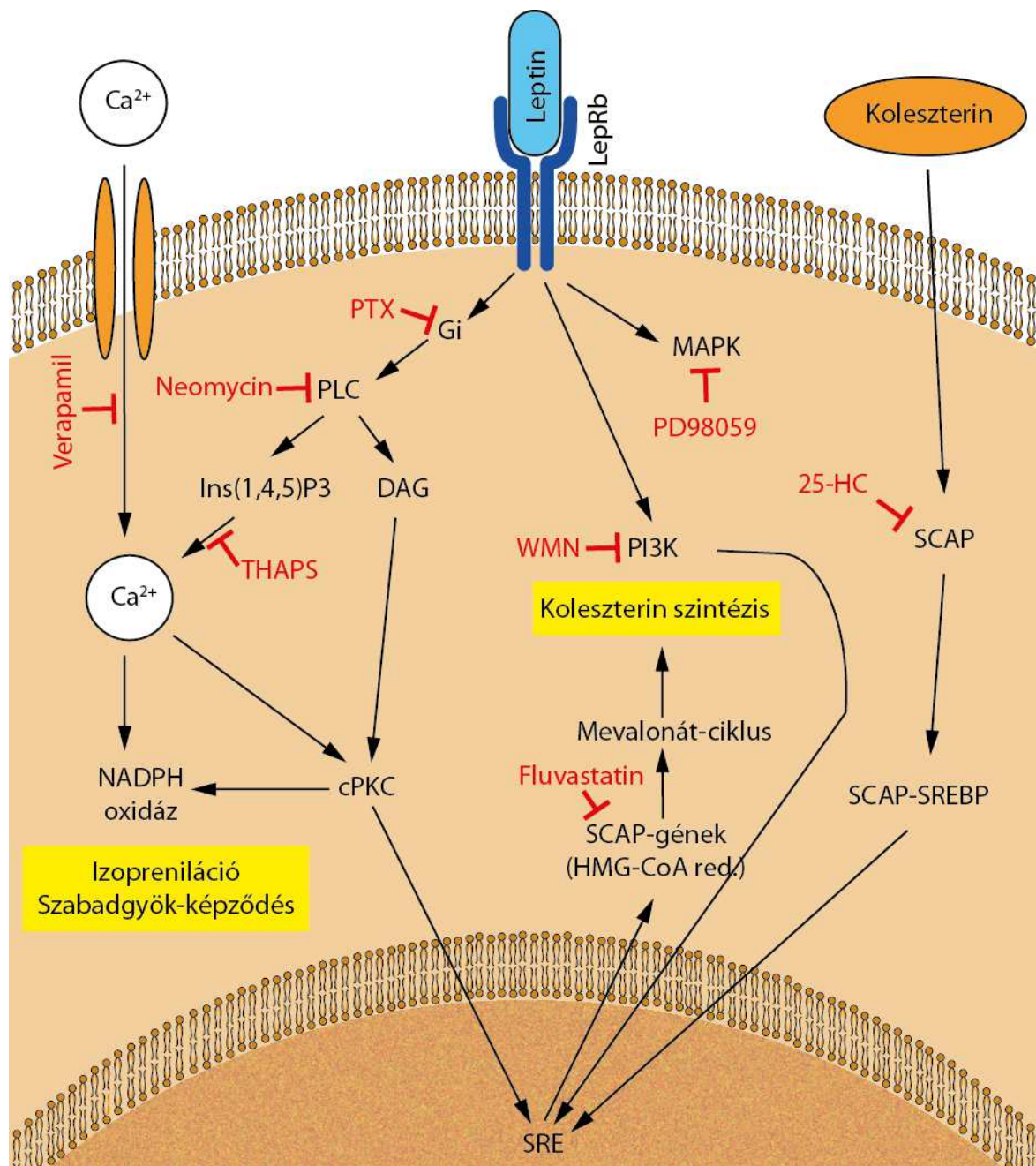


A leptin étvágycsökkentő hatását elsősorban a JAK2-STAT3 útvonalon és a PI3K-n keresztül a POMC szekréciójának fokozásával és a NPY és az AgRP szekréciójának gátlásával fejei ki. Rövidítések: LepRb= hosszú izoformájú leptin receptor; JAK2= Janus kináz; PI3K= foszfatidilinozitol-3-kináz; PTP1B= protein tirozin foszfatáz 1B; SHP-2 PTPáz= SHP-2 protein tirozin foszfatáz; MEK= mitogén-aktivált protein-kináz kináz; ERK 1/2= extracelluláris szignál regulált kináz; STAT= signal transducer and activator of transcription; SOCS-3= suppressor of citokine signaling; NPY= neuropeptid Y; AgRP=Agouti-related protein; PIAS3= protein inhibitor of activated STAT.

Az elhízás állapotára a leptin hosszan tartó, fokozott termelése jellemző, aminek következménye a sejtek leptin érzékenységének csökkenése. A leptin rezisztencia kialakulásában több tényező is szerepet játszik. Az egyik ilyen tényező az inzulin-PI3K útvonal hatása, ami hiperpolarizálja a POMC neuronokat és a sejtek leptin érzékenységét csökkenti (Oswa és Yeo, 2010). Ezen kívül obezításban a leptin rezisztencia mediátorának tekinthető még a SOCS3, a PTP1B, az ER stressz és a gyulladásos folyamatok, amik gátolják a LepRb jelátvitelt (Myers és mtsai, 2010). A leptin rezisztencia kialakulása miatt a nagy

tömegű fehér zsírszövet ellenére anorexigén hatását nem tudja kifejteni, ami az elhízás súlyosbodásának és az azzal kapcsolatos kórképek kialakulásának kedvez.

2. Ábra: A leptin által regulált intracelluláris jelátviteli útvonalak áttekintése



2. Ábra: Leptin-indukált jelátviteli folyamatok áttekintése. Az ábra azokat a jelátviteli lépéseket mutatja be, amelyekre a leptin hatással lehet. Ennek vizsgálatához az egyes lépéseket különböző inhibitorokkal gátoltuk, amiket az ábrán pirossal jelöltem. Rövidítések: LepRb= hosszú izoformájú leptin receptor; G_i= „inhibitor” G protein; PTX= pertusszis toxin; PLC= foszfolipáz C; Ins(1,4,5)P3= inozitol(1,4,5)-triszfoszfát; DAG= diacil-glicerol; THAPS= thapsigargin; cPKC= klasszikus proteinkináz C; SRE= sterol regulatory element; PI3K= foszfatidilinozitol-3-kináz; WMN= wortmannin; MAPK= mitogen activated protein kinase; SCAP= SREBP cleavage activating protein; SREBP= sterol regulatory element binding protein; 25-HC= 25-hidroxikoleszterol; HMG CoA red.= 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Koenzim A.

Az obezitásban fokozottan termelődő leptin nem csak a KIR sejtjeinek működését befolyásolja, hanem a perifériás sejtekre is hatással van. Így, miután a LepRb-hoz kötődött a koleszterinszintézis, a kalcium transzport, és a szabadgyökképződés egymással összefüggő jelátviteli rendszerét indítja el. Az ezekhez a folyamatokhoz köthető jelátviteli lépéseket, amiket kísérleteink során vizsgáltunk a **2. Ábra** mutatja be. A Ca^{2+} -nak, mint másodlagos hírvivőnek a koncentrációját a citoszolban több mechanizmus befolyásolja. Ezek közül az egyik a (verapamil szenzitív) kalcium csatornákon történő beáramlás az extracelluláris térből. Másik nagy jelentőséggel bíró folyamat a kalcium kilépése az endoplazmatikus retikulumból. Ennek kiváltásáért az inozitol(1,4,5)-triszfoszfát (Ins(1,4,5)P3) ER-membránjához kötődése felelős, amely az ER kalcium raktárak gyors kiürülését okozza. Az Ins(1,4,5)P3 képződését foszfatidilinozitol (4,5)-biszfoszfátból (PIP2) a foszfolipáz C (PLC) enzim katalizálja. A szuperoxid anion képződésének sebességére a MAPK (mitogen activated protein kinase) rendszer, a Ca^{2+} és a klasszikus proteinkináz C (cPKC) is hatással van. A koleszterinszintézis leptin általi regulációja a PKC és a PI3K, sterol regulatory element (SRE) génexpressziójára kifejtett hatásának következménye.

3. Koleszterin szintézis; sztatínok szerepe és pleiotropikus hatásai

A koleszterin bioszintézis útvonalának öt fő lépése van, melyek sebességét a hozzájuk tartozó enzimek működése határozza meg. Közülük a legfontosabb, sebesség meghatározó lépést katalizáló, enzim a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reduktáz (HMG-CoA-reduktáz). A széles körben elterjedt és alkalmazott sztatínok ezt a lépést megcélozva gátolják a koleszterin *de novo* szintézisét. Mivel a szérum koleszterin szint 60-70%-ért a máj koleszterinszintézise a felelős, a sztatínok HMG-CoA reduktáz gátló hatása az LDL-koleszterinszint jelentős csökkenését eredményezi (Burns és Rebeck, 2010).

A sztatínoknak koleszterintől független ún. pleiotropikus hatásai is vannak. A mevalonát útvonal számos nem szteroid természetű izoprenoid képzéséért felelős (pl. farnezil-pirofoszfát [FPP] és geranil-geranil-pirofoszfát [GGPP]), melyek a sejten belül létfontosságú fehérjéket izoprenilálnak. Ide tartozó fehérjék a kis GTP-ázok mint pl. a Ras, a Rho és a Rab. A kis GTPázok GDP-vel kapcsolt inaktív és GTP-vel kapcsolt aktív formája ciklikusan változik. Ennek köszönhetően ezek a fehérjék a növekedést, a morfogenezist, a sejtmigrációt, a citokinézist és a molekulák szállítását a molekuláris jelátvitel kapcsolóiként szabályozzák. A Ras és a Rho GTPáz családok kiemelt szerepet kapnak, ugyanis az extracelluláris

stimulusokat képesek több intracelluláris jelátviteli folyamattal összekapcsolni (Wang és mtsai, 2008).

A sztatinok izoprenoid szintézist gátló hatásának tehát az intracelluláris jelátviteli folyamatok befolyásolásán keresztül több pleiotropikus hatása is van. Ide tartoznak az endotheliális funkció javítása, az erekben megjelenő gyulladás csökkentése, a simaizomsejtek proliferációjának gátlása és az immunmodulátor szerep (Wang és mtsai, 2008).

McNamara és mtsai bemutatták, hogy a humán mononukleáris sejtek jól tükrözik a teljes test koleszterinszintézisének változásait (McNamara és mtsai, 1980). Emellett kiemelt szerepet játszanak az atheroszklerózis folyamatában. Ennek szellemében kísérleteink során vizsgáltuk a monociták endogén koleszterinszintézisét és annak regulációját.

3.1 A koleszterinszintézis regulációjában résztvevő molekulák és gátlószereik

3.1.1 MAPK és PD98059

A leptin által kiváltott jelátviteli útvonalak között található a kanonikus MAPK/ERK1/2 útvonal és a nem kanonikus p38 MAP kináz útvonal (Yan és mtsai, 2012). A kanonikus MAPK-kaszád a Ras-ERK-MAPK útvonalon aktiválódik és a sejtmagba jutva a génexpresszió regulációjával számos biológiai folyamatot szabályoz. A legújabb kutatások a MAPK kaszkád szerepét bizonyították az egér preadipociták kalcium-indukált lipid metabolizmusában (Sun és mtsai, 2012) és a makrofágok koleszterin-észter felhalmozásában (Mei és mtsai, 2012), mellyel az atheroszklerózis kezdeti lépéseként habos sejtekké alakulnak. Calleros és mtsai a nukleáris faktor- κ -B (NF κ B) transzkripció aktivitásának intracelluláris koleszterinfüggő változásában a p38 MAPK/MSK1 mediátor szerepét mutatták ki (Calleros és mtsai, 2006). A p38 MAPK útvonal NF κ B aktiváló hatása, köszönhetően részben a mevalonát bioszintézis gátlásának, fluvasztatinnal csökkenthetőnek bizonyult (Gao és mtsai, 2012). A MAPK kaszkád tehát fontos szerepet játszik a koleszterin homeosztázis fenntartásában és a gyulladásos folyamatokban.

A MAPK fehérjéknek, az ERK1-nek és ERK2-nek, aktivációjáért a mitogén-aktivált protein-kináz kináz (MEK) foszforiláló hatása felelős (Robinson és Cobb, 1997). A PD98059 egy flavonoid molekula, amely a MEK-et specifikusan gátolja. Ez a tulajdonsága a

növekedési faktor útvonalak és az ER mediált események közötti kapcsolatok feltárásában nyújt segítséget (Lobenhofer és mtsai, 2000; Watters és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2000). Továbbá széles körben alkalmazzák a MAPK kaszkád tagjai biológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára (Alessi és mtsai, 1995; Dudley és mtsai, 1995; Cook és mtsai, 1997; Pumiglia és mtsai, 1997). Rendkívüli hasznossága oldhatóságából, (MEK-kel szembeni) specificitásából és abból a képességéből fakad, hogy a sejtmembránon keresztül szabadon képes átjutni (Alessi és mtsai, 1995; Dudley és mtsai, 1995).

3.1.2 SCAP és 25-HC

A koleszterinháztartás fenntartása a koleszterinszintézisért és felvételért felelős gének transzkripció szabályozásán keresztül valósul meg. Ennek egyik központi eleme a „sterol regulatory element binding protein” (SREBP) család. Az SREBPk az ER-ben szintetizálódnak és aktivációjukért a SREBP cleavage activating protein (SCAP) a felelős. A SCAP-nak kettős szerepe van: szterol szenzorként működik és az SREBP szállításáért felel. Az SREBP-t a Golgi apparátusba szállítja, ahol az aktiválódik és a magba jutva befolyásolja a koleszterinszintézisben és felvételben szerepet játszó gének transzkripcióját (Sun és mtsai, 2007).

Ha a sejtben a koleszterin mennyisége nő, akkor az a SCAP-SREBP-komplexhez kapcsolódik, a komplex konformációja megváltozik melyet az Insig-1 vagy Insig-2 protein további bekötődése követ. Ebben az esetben a koleszterin feed-back regulátor hatása miatt az SREBP regulátor feladatát nem tudja ellátni (Sun és mtsai, 2007).

A koleszterinszintézis transzkripció szabályozásának gátlása történhet 25-hidroxikoleszterinnel (25-HC), ami a koleszterinnel ellentétben a SCAP-ban nem okoz konformáció változást, de a 25-HC szenzor proteinen keresztül elősegíti a SCAP-Insig protein kapcsolat kialakulását (Adams és mtsai, 2004; Nohturfft és mtsai, 1998).

4. Kalcium

Az emberi szervezetben levő kalcium ~1%-a található meg az intra- és extracelluláris folyadékban oldva. Az ionizált kalcium a legtöbb élettani folyamatban alapvető fontosságú,

ezért koncentrációja szigorú szabályozás alatt áll. Ez az extracelluláris térben 1,16-1,18 mmol/l, a sejten belül pedig hozzávetőlegesen ennek a tízezred része (Fonyó és Ligeti, 2008).

A kalcium, mint másodlagos hírvivő molekula, az intracelluláris folyamatok szabályozásában kiemelt szerepet tölt be.

4.1 A kalcium homeosztázis fenntartása

A monociták a Ca^{2+} -t az ER specifikus raktározó fehérjéihez kötve tárolják, amit szükség esetén a citoplazmába juttatnak. Az ER-ból a Ca^{2+} ionok receptor- Ca^{2+} csatornákon kerteszlül lépnek ki a citoplazmába. A citoplazma Ca^{2+} koncentrációjának ezt követő emelkedése pozitív visszacsatolási folyamatként kiváltja az organelum Ca^{2+} csatornáinak további megnyílását: „ Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulás” jön létre. Az ER-ban fellépő kalciumhiány megszüntetésére a sejt kalciumcsatornáinak megnyitásával és az extracelluláris Ca^{2+} beengedésével törekszik. Ezt a kiegyenlítő folyamatot „raktár által vezérelt kalcium belépés”-nek (SOCE) nevezzük.

A citoplazmából a feleslegben jelen lévő kalcium útja az extracelluláris tér vagy az ER felé vezet. A Ca^{2+} kipumpálásáért a citoplazmából az extracelluláris térbe egy $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter és egy kalmodulin függő Ca^{2+} ATP-áz pumpa felel. Ez utóbbi aktivitását az intracelluláris Ca^{2+} szint egy citoplazmatikus fehérje, a kalmodulin közvetítésével szabályozza. A Ca^{2+} -kalmodulin komplex a Ca^{2+} pumpa citoplazmatikus szabályozó régiójához kapcsolódik, és az enzim működési sebességét növeli, ezáltal kipumpálva a citoplazmában „feleslegben” jelen lévő kalciumot. Ezen kívül a citoplazmába kiáramlott Ca^{2+} -ból a kiürült intracelluláris Ca^{2+} raktárak az organelum membránban lokalizált Ca^{2+} pumpa révén töltődnek fel újra (Fonyó és Ligeti, 2008).

4.2 A kalcium jelátvitelben szerepet játszó molekulák és gátlószerek

4.2.1 Membráncsatornák és verapamil

A verapamil egy fenilalkilamin, melyet a gyógyászatban többek között a hipertónia és a szívritmuszavar kezelésére használnak. A verapamil a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák

inhibitora, melyek közül az „L-típusút” nagyobb hatékonysággal blokkolja, mint a „T-típusút”. Az előbbi esetében az „L” a csatorna hosszan tartó – „long-lasting” – aktivációjára utal, az utóbbinál pedig a „T” a tranziens aktivációt jelenti. A depolarizált ioncsatornákat a nyugvó csatornákhöz képest nagyobb aktivitással blokkolja. Ez a jelenség kifejezettebb az L-típusba tartozó csatornáknál, ahol a depolarizált csatornák gátlása tízszeresen meghaladja a nyugalmi csatornákét. Gátló hatását feltételezhetően a csatorna pórusához feszültségfüggetlenül kötődve, annak elzárásával fejt ki. Így az ioncsatorna membránpotenciál változásaira nem hat és a normál kapuzási folyamatokat nem befolyásolja (Freeze és mtsai, 2006; Bergson és mtsai, 2011).

4.2.2 G_i protein és pertusszis toxin

A G protein kapcsolt receptorok (GPCR) egy 7-transzmembrán szakaszból álló monomer fehérjéből és a hozzá kapcsolódó valamelyik heterotrimer (α -, β - és γ - alegységből álló) G fehérjéből felépülő receptorok. A receptorok G fehérje alegysége a sejtmembrán citoplazma felőli oldalán található. A G proteinek a jelátviteli rendszerek szabályozásában fontos szerepet játszó guanin nukleotid regulátor proteinek, amiket α -alegységeik alapján különböző családokba sorolunk. A G_i/o protein családba tartozó G proteinek az adenilát-cikláz gátlása révén csökkentik a cAMP képződését és annak következményeként a kalcium felszabadulását az endoplazmatikus retikulumból (Mangmool és Kurose, 2011).

A G_i/o proteint és a kalcium jelátvitelre gyakorolt hatását pertusszis toxin (PTX) kezeléssel kíséreltük meg gátolni. A PTX egy ADP-riboszil-transzferáz aktivitással rendelkező molekula, ami a G_i/o fehérjecsalád α alegységének ciszteinjét irreverzibilisen ADP-riboszilálja és az adenilil-cikláz (AC) gátlását akadályozza meg. A PTX kezelés tehát a cAMP képződését hivatott serkenteni. Az Epac (exchange protein directly activated by cAMP) molekulacsalád közvetlen módon köti a cAMP-t, ami calmodulin kinase II (CaMKII)-függő jelátviteli útvonalakat indít be, közöttük a Ca^{2+} felszabadulását az endoplazmatikus retikulumból. Annak bizonyítása, hogy a PTX aktiválja az Epac-mediált CaMKII jelátviteli útvonalat, még további vizsgálatokat igényel (Locht és mtsai, 2011). PTX kezeléssel a G_i/o protein szerepvállalását vizsgáltuk monociták kalcium viszonyainak és koleszterin szintézisének regulációjában.

4.2.3 Foszfadilinozitol-3-kináz és wortmannin

A PI3K-ok regulátor/adapter és katalitikus alegység szoros kapcsolatából álló heterodimer komplexek, melyek foszfadilinozitolok 3-hidroxilcsoportjának foszforilációján keresztül a sejtek számos funkcióját szabályozzák, mint pl. a glükóz- és fehérjeszintézist. A PI3K-hoz kötődő jelátvitelt több hormon és növekedési faktor indukálja így pl. a leptin és az inzulin jelátvitel egyik közös pontját képviseli. Az inzulin receptorának aktivációját az inzulin receptor szubsztrát -1 és -2 (IRS-1 és IRS-2) foszforilációja, majd a PI3K-kal történő gyors asszociációja követi. A kapcsolat következménye a PI3K komplex aktivációja, amely lehetővé teszi a foszfadilinozitolok foszforilációját: fő szubsztrátja a PIP₂, amelyet foszfadilinozitol (3,4,5)-triszfószfáttá (PIP₃) alakít. A leptin receptor aktiváció hatására létrejövő jelátvitel a JAK2/STAT3-on keresztül megy végbe. A PIP₃ másodlagos hírvivőként az intracelluláris folyamatokra olyan szignál molekulák közreműködésével hat, mint pl. az Akt vagy a foszfoinozitid-dependens kináz-1 (PDK-1). Inzulin, leptin és növekedési faktorok hatására nem-receptor tirozin-kinázok, mint a Janus tirozin-kináz család, és adapter fehérjék, mint a GRB-2 (growth factor receptor-bound protein 2) is PI3K jelátvitelt indukálnak. Az aktiválás lehetőségeinek nagy száma és a más jelátviteli útvonalakkal (pl. Ras/MAPK útvonal) való kereszteződéseknek köszönhetően a PI3K sok biológiai folyamat szabályozásában vesz részt.

A PI3K gátlásához az egyik széles körben alkalmazott vegyület egy wortmannin (WMN) nevű gomba eredetű toxin, amely az enzim katalitikus alegységéhez kovalensen kötődik és meggátolja a PIP₂ és az ATP enzimhez kötődését (Donato és mtsai, 2010; Acosta-Martínez, 2011).

4.2.4 Foszfolipáz C és neomycin

A foszfoinozitid specifikus PLC izoenzimek több doménből felépülő 85-150 kDa molekulatömegű fehérjemolekulák, melyek az inozitol foszfolipidek poláris feji részét hasítják le. Sejtfelszíni receptorok irányító hatására a lipid kettősrétegben helyet foglaló PIP₂ hidrolízisével Ins (1,4,5)P₃-t és diacilglicerolt (DAG) képeznek. G-fehérjéken keresztül a PLC- β izoforma aktiválódik, tirozin-kináz receptorok közreműködésével pedig a PLC- γ . A PLC izoenzimek foszforilációjukat követően a membránba vándorolnak, ahol a szubsztrátjuk található és Ins (1,4,5)P₃-t és DAG-ot állítanak elő. Az Ins (1,4,5)P₃ a Ca²⁺ mobilizálásában

részt vevő másodlagos hírvívő molekula a DAG pedig a PKC aktivátora (Rebecchi és Pentyala, 2000).

A neomycin egy aminoglikozid antibiotikum, ami az inozitol foszfolipidekkel kötődve képes a PLC-t gátolni. A PIP₂-hoz nagy affinitással kötődik ezért a PLC-t akadályozza az Ins(1,4,5)P₃ és a DAG előállításában (Gabev és mtsai, 1989).

4.2.5 Inozitol triszfoszfát

A PLC hatására képződő Ins(1,4,5)P₃ szabályozó szerepet játszik az intracelluláris kalcium homeosztázis fenntartásában. Receptorai a sejten belüli kalcium raktárak (endoplazmatikus retikulum, kiválasztó vezikulumok) felszínén találhatóak. Az Ins(1,4,5)P₃ kötődése az ER felületén található klaszterekbe rendeződött receptorokhoz az intracelluláris kalcium raktárak gyors kiürülését eredményezi, majd disszociációja a csatornáról a Ca²⁺ szignál terminációját hozza létre. Az intracelluláris Ca²⁺-raktárak ürülése a citoplazma Ca²⁺ koncentrációjának emelkedésével jár, ami a plazmamembrán Ca²⁺ ATPáz-át aktiválja. Az aktivációt követően a Ca²⁺ ATPáz a citoplazmában feleslegben lévő Ca²⁺-t az extracelluláris térbe pumpálja. Ezzel ellentétesen hatva a raktárban fellépő kalcium koncentrációcsökkenést a sejtmembránon keresztül történő Ca²⁺ beáramlás pótolja. Az ER-ben található Stim1 protein érzékeli az ER kalcium raktárának ürülését és a sejtmembránhoz vándorolva a raktár által vezérelt kalcium csatornák pórusát kialakító Orai proteineket aktiválja, ami szükséges a csatorna kinyílásához és a kalcium belépéséhez. Ezt raktárak által vezérelt Ca²⁺ belépésnek nevezzük. Néhány, az utóbbi időben megjelent tanulmány azonban nagyobb jelentőséget tulajdonít a raktár által vezérelt csatornákon keresztül történő Ca²⁺ belépésének az azt követő kalcium jelátviteli folyamatok aktiválásában (Aires és mtsai, 2007; Rüdiger és mtsai, 2012; Leybaert és Sanderson, 2012; Putney, 2011).

4.2.6 Intracelluláris kalcium transzlókáció és thapsigargin

A thapsigargin (TG) egy szeszkviterpén lakton, amelyet az ernyősvirágzatú *Thapsia garganica* növény gyökeréből nyernek. A TG nagyon hatékony és specifikus gátlója az intracelluláris Ca²⁺ ATPázoknak, azokkal egy ún. „dead-end” komplexet, zsákutca komplexet

alkot, lehetetlenné téve a további katalízist. Ennek következménye az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürülése és a citoszolikus Ca^{2+} szint megnövekedése (Akolkar és mtsai, 2012).

A TG felfedezése és alkalmazása a kutatásban jelentősen megkönnyítette a kalciummal kapcsolatba hozható celluláris folyamatok vizsgálatát, így például a Ca^{2+} citoszolba kerülésének módját. Alkalmazásával lehetővé vált a PLC látható hatásának kizárása a Ca^{2+} belépésére a citoszolba. Továbbá az a tény, hogy a TG a kalcium beáramlását ugyanolyan mértékben aktiválta, mint a PLC (az inozitol triszfoszfát emelése nélkül), azt támasztotta alá, hogy az endoplazmatikus retikulum nem az egyedüli forrása a citoszolikus Ca^{2+} -nak: a sejtmembránon keresztüli beáramlás ugyanolyan fontos szerepet játszik.

A TG fontossága a Ca^{2+} raktár által vezérelt belépésének vizsgálata során az egyéb befolyásoló tényezők hatásának minimalizálása (receptorok, G-proteinek, PLC stb.) (Putney, 2007).

4.2.7 Proteinkináz C

A PKC izoenzim családba szerin/treonin kinázok tartoznak. Az enzimes család tagjai a klasszikus (α , βI , βII , γ), az új típusú (ϵ , δ , θ , η) és az atípusos (ζ , λ/ι) izoformák. Az első csoport tagjai mind a kalcium mind a DAG hatására aktiválódnak, az új típusú PKC-k csak a DAG-ra érzékenyek, az atípusosak pedig ezek közül egyikre sem.

A PLC hatására a PIP₂ hidrolizálódik, aminek következménye a DAG képződése és az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése. Az inaktív, citoszolban található klasszikus PKC molekulák ezeknek a másodlagos hírvivőknek a hatására a sejtmembránhoz transzlokálódnak, kihorgonyozódnak és konformációjuk megváltozik. A membrán foszfatidilszerinjéhez kötődő aktív PKC a fehérjék szerin és treonin oldalláncait széles szubsztrátspecifitással foszforilálja (Kheifets és Mochly-Rosen, 2007). A monociták több PKC izoformát is expresszálnak, ezek között van a PKC α , PKC βI , PKC βII , PKC δ , PKC ϵ , és a PKC ζ (Kang és mtsai, 2011).

5. NADPH oxidáz (Nox)

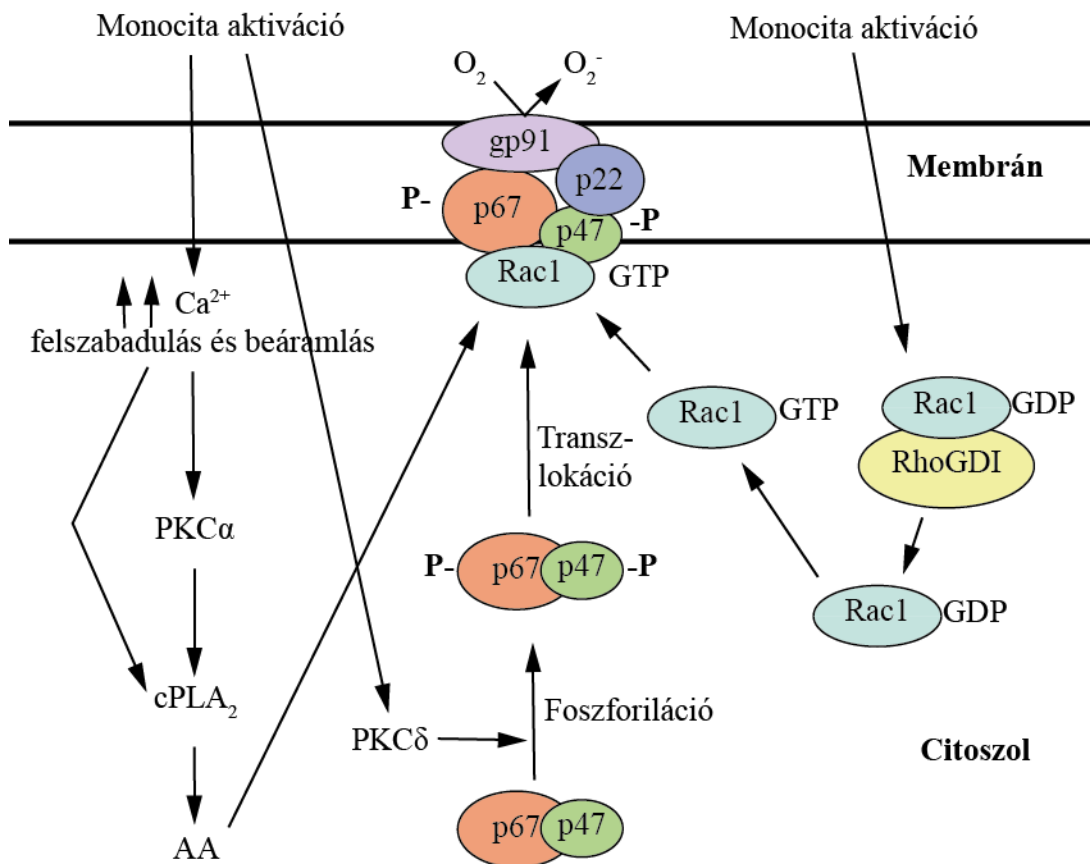
A NADPH oxidázok többkomponensű enzimek, melyek a NADPH-ról származó elektronokat használják szuperoxid anion termeléséhez. A képződő szuperoxid anionból ezt követően különböző enzimek katalizáló hatásának eredményeként számos reaktív oxigén gyök (ROS) jön létre, melyek elsődleges szerepe az immunvédekezésben van (Bokoch és Diebold, 2002.).

Nyugvó monocitákban a Nox rendszer inaktív: komponensei a citoszolban és a membránban elkülönülten helyezkednek el. Aktiváló hatásra a citoszolban található elemek (p67, p47, Rac1) a membránba vándorolnak és összeszerelődnek a membránban található alkotórészekkel (gp91, gp22). A létrejött asszociátum az aktív enzim, ami a szuperoxid anion képződését katalizálja (Cathcart, 2004).

A monociták lipid oxidáló képességére – ami szuperoxid anion-függő esemény – a kalcium sejtbe áramlása és az intracelluláris kalcium mobilizációja nagy hatással van (Li és mtsai, 1993). Az intracelluláris Ca^{2+} szint változása más jelátviteli útvonalakat is nagymértékben befolyásol, pl. a kalciumfüggő PKC és a citoszolikus foszfolipáz A2 (cPLA2) útvonalakat. Az emelkedő intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ által aktivált cPLA arachidonsav (AA) képzésén keresztül képes a monociták és makrofágok Nox aktivitásának regulációjára. Hasonlóképpen a PKC is szerepet kap a Nox aktivációjában: a p47phox és a p67phox foszforilációja az aktiváció meghatározó lépése. A monocitákban expresszált PKC izoformák, melyek működését a kalcium regulálja: PKC α , PKC β I és PKC β II. A cPLA és a PKC-k egymástól nem független módon hatnak a NADPH oxidázra. A cPLA működését a kalciumon kívül a PKC foszforiláló hatása is szabályozza. Cathcart (2004) mutatta be, hogy a cPLA foszforilációjához, aktivációjához és ezek következményeként a Nox szabályozásához a PKC α szükséges (Cathcart, 2004). A Nox szabályozásához továbbá szükség van a PKC δ -ra, amely feltételezhetően mind a p47phox és p67phox foszforilációjáért, azok membránhoz vándorlásáért és a Nox enzim összeszerelődésének kontrolljáért felelős (Cathcart, 2004). A PKC-k a MAPK család tagjait képesek aktiválni (pl. ERK1/2). A MAPK útvonalak szerepe bizonyított a Nox-ból származó ROS indukált jelátviteli útvonalakban. A ROS és a MAPK szoros kapcsolata annak is köszönhető, hogy a MAPK közvetlen módon tudja befolyásolni a Nox ROS-termelését. A ROS szintjének emelkedése egy öngerősítő kaszkádfolyamatot indíthat be, amely magas ROS koncentrációt eredményezhet (Pandey és Fulton, 2011). A fentebb

említettéken kívül a Nox aktiválásában meghatározó szerepet játszik még az Akt és a kalmodulin kináz is (Babior, 2002).

3. Ábra



3. Ábra: A NADPH oxidáz regulációja monocitákban (Cathcart és mtsai (2004) nyomán). Rövidítések: PKC= proteinkináz C; cPLA₂ = citoszolikus foszfolipáz A; AA= arachidonsav.

A kalcium és Nox kapcsolata nem egyoldalú: nem csak az intracelluláris [Ca²⁺] emelkedése hat a Nox aktivitására, hanem ennek fordítottja is igaz: a Nox hatására keletkező ROS aktiválja a rianodin receptorokat (RyRs), melyek az intracelluláris Ca²⁺ mobilizációjának fő aktivátorai közé tartoznak (Souvannakitti és mtsai, 2010). A Nox regulációját monocitákban a **3. Ábra** mutatja be.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk a korábbi kísérletei során granulociták és monociták jelátviteli folyamatait tanulmányozta. Monociták *in vitro* LDL-kezelésével sikerült az endogén koleszterin szintézis PKC aktivációtól függő regulációját bemutatni (Seres és mtsai, 2007). Hiperkoleszterinémiás betegek neutrofiljeinek Angiotenzin-II indukált O_2^- képzésére és a jelátviteli folyamatok elváltozásaira a fluvasztatinnal történő kezelés jótékonyan hatott (Seres és mtsai, 2005). Monociták *in vitro* leptin kezelése emelte azok endogén koleszterol szintézisének mértékét; az emelkedés nagyobb volt hiperkoleszterinémiás (HC) betegek monocitáin. A leptin stimulált monociták koleszterin szintézisét a fluvasztatin és a 25-HC csökkentette (Kosztáczky és mtsai, 2007; Kosztáczky és mtsai, 2006). Hiperkoleszterinémiás betegek neutrofiljeiben a PTX-szenzitív Ins(1,4,5)P3 jelátvitel hibásan működött és a Ca^{2+} szignál lecsökkent. Emellett a betegek sejtjeiben a Ca^{2+} szignálok az extracelluláris médiumból, nem pedig intracelluláris raktárakból származtak, mint ahogy azt a kontroll neutrofilekben láttuk. Továbbá lecsökkent Ca^{2+} szignálok és azok késleltetett visszatérését figyeltük meg idős egyének monocitáiban FMLP (N-formil-metionil-leucil-phenilalanin) és κ -elastin kezelést követően (Fülöp és mtsai, 1987). Ezen kívül azt találtuk, hogy az öregedés megemelte a monociták $^{45}Ca^{2+}$ izotóp felvételét, de a Ca^{2+} kiáramlása a sejtekből lassabb volt, mint kontroll monocitákban (Fülöp és mtsai, 1986; Jacob és mtsai, 1987).

A dolgozat elsődleges célja a túlsúlyos állapotban megváltozott működésű monociták jeltovábbítási rendszerének átfogó megismerése volt. Munkám során, a kutatócsoportunk korábbi eredményeire alapozva, az alábbi vizsgálatok elvégzését tűztem ki célul:

- eddigi kísérleteinktől eltérően a leptin kezelés, és annak hatására bekövetkező jelátviteli folyamatban tapasztalt változásokat túlsúlyos, de egészséges férfiakon is vizsgálni akartuk;
- különböző leptin koncentrációkat használtunk, feltételezve az azokhoz tartozó koleszterinszintézist szabályozó jelátviteli eltéréseket, a leptinhez kapcsolódó szabályozás részletesebb megismeréséhez gátoltuk a SCAP-ot és a MAPK-t;
- feltételeztük a membránhoz kötött PKC (mPKC) szerepét a leptinkezelést követő koleszterinszintézis szabályozásában, ezért a $[^{14}C]$ acetát beépülése mellett annak szintjét is mértük;

- az intracelluláris kalciumnak, mint a leptinhez kötődő jelátvitel kulcsfontosságú hírvivőjének, szintjét és transzlokációját az ER felé tartó kaszkád egyes tagjainak és a membrán kalciumcsatornáinak gátlásával térképeztük fel;
- a NADPH oxidáz aktivitását a O_2^- kalcium pumpák működésére gyakorolt hatása és az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ Nox-ra gyakorolt hatása miatt vizsgáltuk;
- fluvasztatinnal a O_2^- -képződés csökkentését céloztuk meg, amitől a membráncsatornák és a jelátvitel normalizálódását vártuk.

IV. A VIZSGÁLATBA BEVONT SZEMÉLYEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgált személyek

A kísérleteket 16 normál testsúlyú és 18 túlsúlyos, egészséges férfin végeztük. Kizárólag férfiak bevonása lehetővé tette a nemek közötti különbségek kizárását. A normál testsúlyú és túlsúlyos önkéntesek demográfiai adatait az **1. Táblázat** mutatja be.

Laboratóriumi paraméterek meghatározása

A vérmintákat (10–15 ml) a méréseinkhez 4-5 naponta 6-8 túlsúlyos és 3-4 kontroll önkéntes vénájából vettük. Az interassay variációs koefficiens nem haladta meg a 15%-ot. A szérum koleszterin és triglicerid szintek mérését enzimatikus úton, kolorimetriás tesztekkel végeztük (GPO-PAP, Modular P-800 Analyzer, Roche/Hitachi), míg a HDL-koleszterint homogén, enzimatikus, kolorimetriás méréssel határoztuk meg (Roche HDL-C plus 3rd generation). Az LDL-koleszterint homogén, enzimatikus, kolorimetriás módszerrel mértük (Roche LDL-C plus 2nd generation). Az apolipoprotein vizsgálata immuno-turbidimetriás méréssel történt (Roche Tina-Quant APO A (Version 2), Tina-Quant APO B (Version 2), Roche Ltd). A leptin koncentrációját a szérumban kompetitív enzim immunoassay-vel mértük (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA).

Monociták izolációja

A monocitákat vénás vérből izoláltuk Boyum módszere szerint (Boyum, 1968). A mononukleáris sejt szuszpenziókat (90 mm átmérőjű) fetal calf serummal előkezelt Nunc petricsészékbe helyeztük, majd ezt követően Kumagai és mtsai (Kumagai és mtsai, 1979) módszere szerint tovább szeparáltuk. A petricsészéket 5-6 órára 37 C ° termosztátba tettük, hogy a mononukleáris sejtek közül a monociták a 10 % fetal calf szérummal kevert RPMI

1640 odatban letapadjanak. A monocita monolayereket azonnal 37 C°os RPMI 1640-el erőteljesen mostuk, hogy a limfocitákat eltávolítsuk. Ezután egy éjszakán át 4 C°-n inkubáltuk a sejteket. Másnap erőteljes hideg RPMI 1640 oldatban a monocitákat többszöri mosással eltávolítottuk. Végül a kapott sejtszuszpenzió 93-96%-os tisztaságban tartalmazott monocitákat és az élő sejtek aránya 90-95 % volt.

1. Táblázat: A normál testsúlyú kontroll és a túlsúlyos férfiak demográfiai adatai és laboratóriumi paraméterei

Paraméterek	Kontroll	Túlsúlyos
n	16	18
Kor (év)	40,5±5,8	42,2±5,5
BMI (kg/m ²)	22,1±1,5	29,7±4,8*
Derék-csípő arány (WHR)	0,81±0,11	1,32±0,15*
Éhomi vércukor (mmol/l)	5,2±0,5	5,5±1,0
Szisztolés vérnyomás	122,7±15,3	125,5±15,5
Diasztolés vérnyomás	76,4±10,1	80,3±12,5
Éhomi inzulin (mU/l)	20,8±3,6	21,6±4,0
Leptin (ng/ml)	12,6±2,1	39,7±8,6*
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*
HDL-C (mmol/l)	1,55±0,25	1,50±0,25
LDL-C (mmol/l)	3,48±0,65	4,91±0,68*

Az értékek átlag ± SD-ben vannak kifejezve. Rövidítések: BMI= testtömegindex (body mass index); HbA1c= glikozilált Hgb. * A kontroll és a túlsúlyos csoportok közötti különbségek szignifikánsak ($p \leq 0,001$).

Kísérleti körülmények

A monocitákat HBSS-ben szuszpendáltuk fel. A monociták stimulációja az endogén koleszterinszintézis és PKC vizsgálata során 1–500 ng/ml végkoncentrációjú leptin (Sigma) adagolásával történt. A monociták intracelluláris kalcium homeosztázisának és NADPH-oxidáz aktivitásának vizsgálatához 50 ng/ml végkoncentrációjú leptint használtunk. Korábbi tanulmányokat alapul véve különböző inhibitorokat alkalmaztunk az alábbiak szerint:

2.Táblázat: Inhibitorok felhasználása a kísérletek során

Gátlószer	Gátlás helye	Alkalmazott koncentráció	Alkalmazott időtartam (min)
Neomycin	PLC	5 μ M	60
PTX	G _i	100 ng/ml	120
Thapsigargin (1)	SERCA	15 μ M	2
Thapsigargin (2)	SERCA	1 μ M	60
Medium V	Verapamil szenzitív ioncsatornák	10 μ M Verapamil + 3mM EGTA	60
WMN	PI3K	20 nM	30
H-7	cPKC	1 μ M	60
PD98059	MAPK	50 μ M	30
Fluvasztatin	HMG-CoA reduktáz	5 μ M	60
25-HC + Metil- β -ciklodextrin	SCAP	25 μ M	120

2.Táblázat: Inhibitorok alkalmazása monociták jelátviteli útvonalainak vizsgálatához. PLC= foszfolipáz C; PTX= pertusszis toxin; SERCA= szarko- és endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz; EGTA= etilén-glikol-tetraecetsav; WMN= wortmannin; PI3K= foszfatidilinozitol-3-kináz; H-7= protein-kináz gátló szer (1-(5-izokinolinil-szulfonil)-2-metilpiperazin); cPKC= konvencionális protein kináz C; MAPK= p38 mitogén aktivált protein kináz; 25-HC= 25-hidroxi-koleszterin; SCAP= sterol regulatory element binding protein cleavage activating protein.

A különböző monocita csoportokat a leptin kezelést megelőzően 120 percen át HBSS-ben inkubáltuk, mivel ez az időtartam volt a leghosszabb az inhibitorok használatával történő inkubációs idők közül. A különböző gátlószereket a fent említett HBSS inkubáció során a gátláshoz szükséges inkubációs hosszának megfelelően eltérő időpontokban adtuk. A leptint a gátlószert tartalmazó sejtszuspenziókhöz a szükséges előinkubációt követően adtuk hozzá. A

leptinnel történő stimuláció időtartama a vizsgált paraméterek típusától függött: az Ins(1,4,5)P₃ meghatározás 20 másodperc, az intracelluláris [Ca²⁺] mérés 6 perc, és a szuperoxid anion meghatározás 30 perc hosszú stimuláció után következett. Az inkubáció 37 °C-on CO₂ inkubátorban történt (CO₂ 5%, levegő 95%, páratartalom 95%). A kísérleteket a monociták izolációját követő 6 órán belül elvégeztük.

A membránhoz kötött protein kináz C meghatározása

A módszert a Bell és mtsai (Bell és mtsai, 1986) által leírt Gopalakrishna és mtsai (Gopalakrishna és mtsai, 1986) által módosított módon végeztük. A leptin stimulációt követő 0–45 perc időtartamban a monocita szuszpenziót (10⁵ sejt/ml) 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet jéghideg Hepessel beállított pH-jú HBSS-t tartalmazó EDTA-ban, 0,5 mmol/l EGTA-ban, fenil-metil-szulfonil-fluoridban (Sigma), és leupeptinben (Sigma) vettük fel újra. A sejteket ultrahangos eljárással tártuk fel (Branson Sonifier 450), majd 100000 g-vel centrifugáltuk 4 °C-on 45 percen át (Beckman L5- 65B). A pelletet Chaps-al (Sigma) és 1%-os Nonidet P-40 (Sigma)-el oldottuk fel. A pelletet a fentiek szerint még egyszer homogenizáltuk és centrifugáltuk. A membránfrakciók PKC aktivitásának meghatározásához mértük a ³²P, 100-200 cpm/mg [³²P]-ATP-ből, 100 µg/ml hiszton III-S-be (Sigma) épülését 10 mmol/l MgCl₂, 1,5 mmol/l CaCl₂, 96 µg/ml l-foszfatidil-L-szerin (Sigma), 6,5µg/ml 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (Sigma), 50 µmol/l adenzin 5-trifoszfátNa₂ (ATP, Sigma), és 100–200 cpm/mg [³²P]ATP jelenlétében. A reakciót, 10 perc eltelte után jéghideg triklór-ecetsavval és bovine serum albuminnal (BSA) állítottuk le. Ezután a csapadékot 0,45 µm Millipore HA szűrőn szűrtük át és 5 ×2ml jéghideg triklór-ecetsavval mostuk. A radioaktivitást Packard 2200 CA liquid szcintillációs számlálóval határoztuk meg. A PKC aktivitást a beépült ³²P (pmol/min/mg fehérje) mennyiségével fejeztük ki.

Az endogén koleszterin szintézis mérése

A mérést McNamara és mtsai (McNamara és mtsai, 1985) módszere szerint végeztük el. A monocitákat (10⁶ sejt), melyeket 1 ml 2,5 nmol/l [2-¹⁴C]-acetátot (1,8 GBq/mmol specifikus aktivitás [Isotope Institute of the Hungarian Academy of Sciences]) tartalmazó HBSS-ben szuszpendáltunk fel 1–500 ng/ml leptinnel és a fent említett gátlószerekkel

inkubáltuk. A reakciót a 4h inkubáció végén 0,5ml 1,0 M KOH-dal állítottuk le és a mintákat 70 °C-on 90 percig szaponifikáltuk. Belső standardként [1,2-³H]-koleszterint (1480 GBq/mmol) használtunk. Az el nem szappanosított lipideket hexánnal vontuk ki. Az extraktumokat alumínium-oxid oszlopokra vittük fel és a szteroid frakciót aceton és dietil-éter 1:1 arányú keverékével eluáltuk. Az eluátumok szárítását követően mértük radioaktivitásukat. Az értékeket a szintetizált koleszterin pmol/h/10⁷ monocita mennyiségével fejeztük ki.

Szuperoxid anion képződés

A szuperoxid anion termelés mérése a leptin stimulációt követően 30 percen keresztül, a ferricitokróm C (Sigma) szuperoxid dizmutáz gátlható redukciójával történt (Cohen és Chovaniek, 1978). Minden mérés triplikátumban történt. Az eredményeket a 10⁶ monocita által 30 perc alatt képződött O₂⁻ anion koncentrációjával (O₂⁻ nmol//30 perc/10⁶ monocita) egységben fejeztük ki.

Az Ins(1,4,5)P3 meghatározása

Az Ins(1,4,5)P3 meghatározását Patthy módszere szerint végeztük (Patthy és mtsai, 1990). A HBSS-el készített monocita szuszpenziókat (10⁷ sejt/ml) 4 órán keresztül rázás közben inkubáltuk 37°C-on 100-200 µCi myo-[³H]inositol (Amersham) és 10 nmol/l LiCl jelenlétében CO₂ inkubátorban. A gátlószerek megfelelő koncentrációit a myo-[³H]- inozitol előinkubáció vége előtt 30-120 perccel adtuk a keverékekhez. Alapos mosást követően meghatároztuk a sejtekhez tartozó radioaktivitást. A mintában a beépült myo-[³H]- inozitol a gátlószerek jelenlétében is meghaladta az alkalmazott teljes radioaktivitás ötven százalékát. A gátlószereket – a mosást követően – újra hozzáadtuk a monocitákhoz és a sejteket 50 ng/ml koncentrációjú leptinnel kezeltük. 20 másodperc elteltével a reakciót jéghideg perklórsavval állítottuk le, melyet telített kálium-hidrogén-karbonáttal semlegesítettünk. Az Ins(1,4,5)P3-ot reverz fázisú ion-pár kromatográfia használatával izoláltuk. Belső standardként Ins(1,4,5)P3-ot (Amersham) használtunk. A képződött Ins(1,4,5)P3 mennyiségét az Ins(1,4,5)P3 pmol /mg összfehérje hányadossal fejeztük ki.

Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ meghatározása

Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ meghatározását a korábban leírtak szerint végeztük (Kosztáczky és mtsai, 2007). 5×10^6 monocitát 1 ml térfogatban 20 μ l Indo 1/AM (Calbiochem) hozzáadása után 30 percen át 37°C-on rázattunk. A sejteket ezt követően alaposan mostuk és újra felvettük HBSS-ben. A sejtekhez a gátlószereket a leptin stimulációt megelőzően a korábban meghatározott időben adtuk. Az alkalmazott gátlószerek nem befolyásolták az Indo 1/AM képességét a citoszol szabad Ca^{2+} mennyiségének meghatározásában. A intracelluláris $[Ca^{2+}]$ meghatározása spektrofлуоримéterben (Hitachi, F-4500) 405 és 485 nm-en, 37°C-on, folyamatos kevertetés mellett történt. A méréshez használt sejtuszpenziót, amely 2 ml HBSS-ben 10^6 monocitát tartalmazott, küvettába helyeztük, majd a sejteket 50 ng/ml végkoncentrációjú leptinnel stimuláltuk a 6 perc hosszú mérés nulladik percében. A Ca^{2+} szignálokat a bazális (nyugalmi) intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t a leptin-stimulált intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -ból kivonva kaptuk meg. A görbe alatti területet (area under curve [AUC]) a hat perc időtartamhoz tartozó Ca^{2+} szignálok görbéiből számoltuk.

Statisztikai analízis

A dolgozatban vizsgált paraméterek elemzésére leíró statisztikát alkalmaztunk (esetszám, átlag, szórás). A monociták mPKC szintjeit és intracelluláris kalcium koncentrációit görbe alatti terület (AUC) számolásával adtuk meg amit egyutas ANOVA-val elemeztünk. A csoportok közötti különbségek vizsgálatára a Newman-Keuls kiegészítő tesztet használtuk. Az elemzéseink során a $p \leq 0,05$ valószínűségi szintet tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

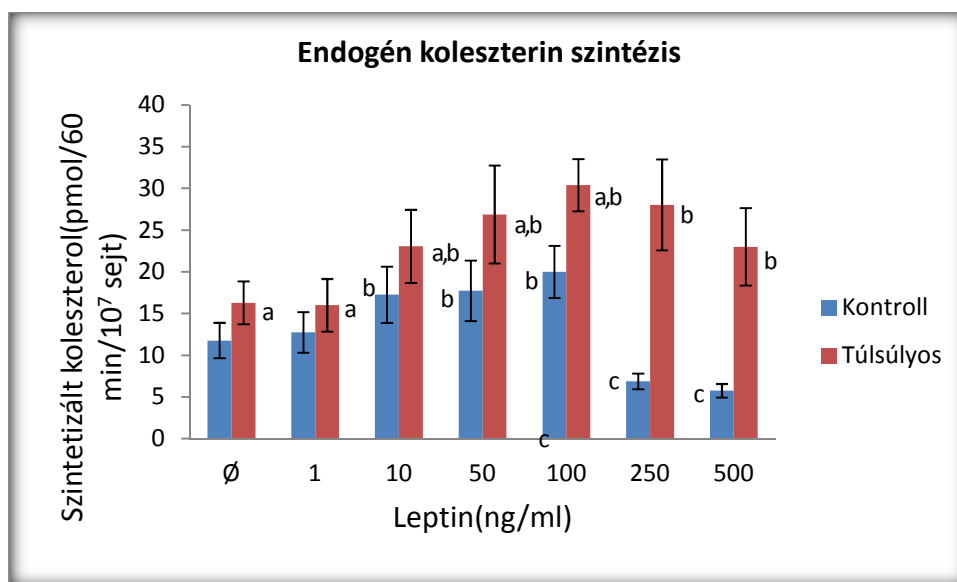
V. EREDMÉNYEK

1. Leptin hatásának vizsgálata az endogén koleszterinszintézisre

1.1 Leptin koncentráció gradiens hatásának vizsgálata

Az első kísérletsorozat során a leptin endogén koleszterin szintézisre gyakorolt hatását kontroll (K) és túlsúlyos egyénekből származó (TS) monocitákon, különböző leptin koncentrációk alkalmazása mellett vizsgáltuk (4. Ábra).

4. Ábra



4. Ábra: Az endogén koleszterin szintézis változásai különböző leptin koncentrációkkal történő kezelést követően K és TS monocitákban. Az értékek átlag±SD-ben vannak kifejezve. (a) A K és TS értékek közötti különbségek szignifikánsak ($p \leq 0,001$); (b) a koleszterol szintézis emelkedése szignifikáns ($p \leq 0,001$); (c) a koleszterol szintézis csökkenése szignifikáns ($p \leq 0,001$).

A TS csoportba tartozó, nyugalmi állapotú monociták koleszterin szintézisének alap szintje magasabb volt, mint a K csoportba tartozó monociták esetén. K sejtekben 10–100 ng/ml leptin stimulálta a koleszterin szintézist, míg magasabb: 250–500 ng/ml leptin koncentráció csökkentette azt. Ezzel szemben, 10–500 ng/ml leptin koncentráció a TS monociták endogén koleszterin szintézisének jelentős növekedéséhez vezetett, amely arra

enged következtetni, hogy TS monocitákban, az endogén koleszterin szintézist limitáló szabályozó mechanizmus sérült.

1.2 A koleszterin szintézis regulációjának vizsgálata

Tanulmányoztuk az 50 és 500 ng/ml leptinnel stimulált endogén koleszterin szintézis downstream regulációját a két monocita csoportban (3. Táblázat).

3. Táblázat: Különböző gátlók hatása a kontroll és túlsúlyos egyénekből szeparált monociták leptin stimulált endogén koleszterinszintézisére

Gátlók	Szintetizált koleszterin mennyisége (pmol/60 perc/10 ⁷ monocita)			
	Kontroll monociták		Túlsúlyos egyének monocitái	
	Lp50	Lp500	Lp50	Lp500
Nincs	16,8±3,2	5,5±1 ^a	28,2±6,3*	28,7±5,5*
Neomycin	13,1±2,5**	5,7±1,1	25,3±5,5	26,9±5,1
Pertussis toxin	15,2±3,1	5,1±0,9	27,8±5,5	27,3±5,8
Thapsigargin	12,6±2,2**	7,1±1,2	26,5±5,1	30,1±6,1
Medium V	15,9±3,4	6,1±1,1	13,5±3,1**	14,7±2,2**
H-7	16,1±3,1	14,7±2,7 ^b	27,9±5,5	26,8±5,1
Wortmannin	10,8±2,1**	9,1±1,5 ^b	12,7±2,5**	11,2±2,1**
PD98059	11,6±2,2**	5,6±1,0	14,8±2,7**	26,2±2,5
Fluvasztatin	10,8±2,0**	6,1±1,1	8,2±1,8**	5,5±1,1**
25-HC	8,6±1,4**	5,5±1,0	7,1±1,2**	5,7±1,3**

Az értékek átlag±SD-ben vannak megadva. Lp50= 50 ng/ml leptin; Lp500= 500 ng/ml leptin.

^a A leptin koleszterinszintézist csökkentő hatása szignifikáns (p≤0,001).

^b A szintézis helyreállása szignifikáns (p≤0,001). Az érték nyugvó K sejtekben 12,8±2,2, TS sejtekben pedig 16,5±3,3 pmol koleszterin/60 perc/10⁷ monocita

* A különbség K és TS sejtek között szignifikáns (p≤0,001).

** A gátlás szignifikáns (p≤0,001).

50 ng/ml leptin koncentráció mindkét monocita típusban növelte a koleszterin szintézist bár a reakció kifejezettebb volt TS sejtekben. A koleszterin szintézis emelkedését a

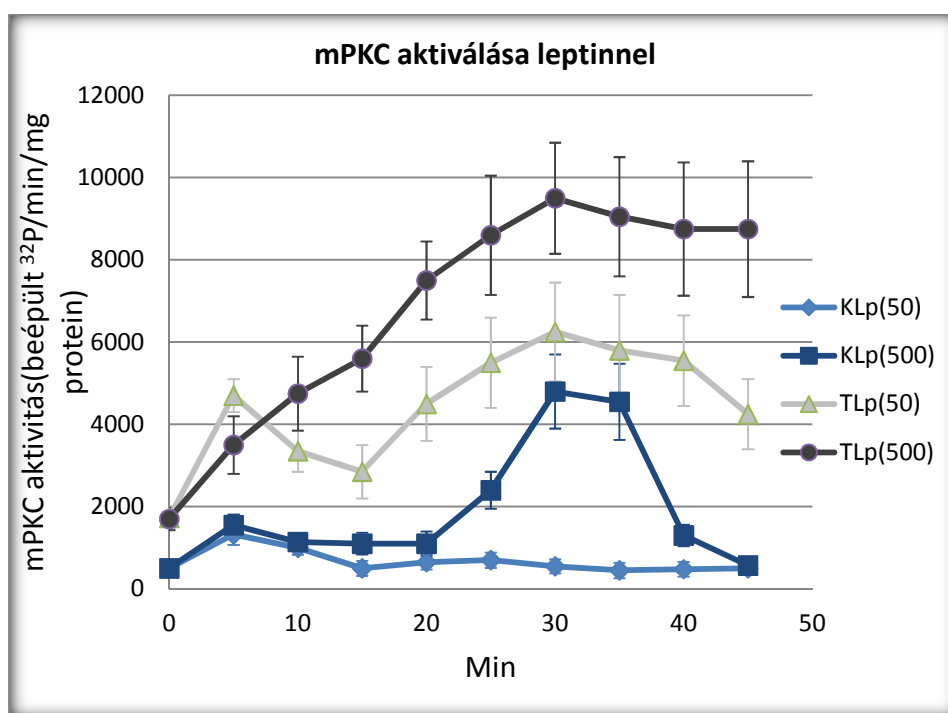
PI3K inhibitor WMN, a MAPK inhibitor PD98059, a HMG-CoA reduktáz inhibitor fluvasztatin és a SCAP inhibitor 25-HC mindkét monocita csoportban gátolta. Kontroll sejtekben a leptin-indukált koleszterin szintézist a PLC inhibitor neomycin és az intracelluláris Ca^{2+} raktárak szupresszora a thapsigargin is csökkentette. Ezzel szemben TS monocitákban a verapamilt tartalmazó Medium V gátolni tudta a leptin-indukált koleszterin szintézist. Ezen kívül mindkét monocita csoportban tanulmányoztuk a jelátviteli útvonalak működését 500 ng/ml leptin hozzáadását követően. Kontroll monocitákban a koleszterin szintézis csökkenését a thapsigargin, a H-7 és a wortmannin előkezelés megszüntette, amely a Ca^{2+} -jelátvitel, a cPKC és a PI3K aktivációjának szerepére utal a leptin-indukált koleszterin szintézis regulációjában. Azonban a TS monocita csoportban a Ca^{2+} beáramlásának gátlása Medium V-vel, wortmanninnal, 25-HC-vel és fluvasztatinnal csökkentette a leptin hatására fokozódott koleszterin szintézist.

1.3 A PKC szerepe a koleszterin szintézis regulációjában

A kontroll és a TS sejteknek a cPKC inhibitor H-7-el szemben tanúsított érzékenysége közötti szignifikáns különbség figyelmünket a PKC izoformák jelentőségére irányította az endogén koleszterin egyensúly regulációjában. Az **5. Ábra** felvilágosítást ad a K és TS monociták leptin kezelést követő aktív – membránhoz kötött – PKC szintjének változásairól. A koleszterin szintézis mérését követően a mPKC szint leptin kezelést követő változásainak vizsgálata segítheti a PKC izoformák koleszterin szintézis regulációjában betöltött lehetséges szerepének tisztázását.

A PKC aktivitást a kontroll és az TS monocitákban az 50 és 500 ng/ml koncentrációjú leptin-stimulációt követően 45 percen át mértük. A kontroll csoportban alacsony leptin koncentrációval történő stimulációt követően 5 perccel egy korai csúcsot, míg 500 ng/ml stimulációt követően 30-35 perccel egy második csúcsot is megfigyeltünk. A leptin-indukált PKC idő görbék a TS monocitákban azt mutatták, hogy a PKC aktivitása nyugvó TS sejtekben a kontroll sejteknél megfigyelt aktivitás hétszerese. Ezen felül 50 ng/ml leptin TS monocitákban két csúccsal rendelkező idő görbét eredményezett, míg 500 ng/ml-es koncentrációnál egyetlen nagy csúcsot láttunk, melynek maximuma 30 percnél volt.

5. Ábra



A pontok az átlag $\pm$ SD értékeket jelölik. Rövidítések: K=kontroll; T=túlsúlyos; Lp(50) = 50 ng/ml leptin; Lp(500) = 500 ng/ml leptin; mPKC= membránhoz kötött protein kináz C.

AUC számolásakor a kontroll csoportban, az 50 és 500 ng/ml leptin-indukció esetén az első csúcsok közel azonos értéknél voltak és a második nagy csúcs kizárólag az 500 ng/ml leptin hozzáadása után jelent meg (4. Táblázat).

A TS csoportokban a leptin-indukált membránhoz kötött PKC aktiváció kifejezettebb volt, mint a kontroll sejtekben és az 500 ng/ml stimulációt követő nagy csúcs magasabb volt, mint az 50 ng/ml-es leptin koncentráció hozzáadása után képződött két csúcs összege. A 4. Táblázat AUC értékei azt mutatják, hogy mindkét kontroll monocita csoportban a membránkötött PKC aktivitás csúcsokat a wortmannin előinkubáció gátolta, amíg az 500 ng/ml leptin kezelést követő második csúcs esetén a PKC aktivitást a wortmannin és a H-7 is csökkentette. TS monocitákban a PKC aktivitás rezisztenciája a H-7-re független az alkalmazott leptin koncentrációtól és a PKC aktivitást csak a PI3K inhibitor wortmannin gátolja. A fenti eredményeket összegezve úgy tűnik, hogy TS monocitákban a H-7 szenzitív cPKC aktiváció hiánya jelentős szerepet játszik a leptin kezelés koleszterin szintézisre ható fokozott stimulációjában.

4.Táblázat: Kontroll és túlsúlyos egyének monocitáiban mért mPKC aktivitás érzékenysége a különböző inhibitorokra

Csoportok	Leptin (ng/ml)		WMN	H-7	mPKC (AUC)x10 ³	
	50	500			1. csúcs	2. csúcs
Kontroll monociták	+	-	-	-	8,67±1,5	0
	+	-	+	-	0,97±0,2 ^a	0
	+	-	-	+	6,81±1,1 ^b	0
	-	+	-	-	10,41±2,1 ^c	75,07±15,3
	-	+	+	-	0,61±1,1 ^a	6,82±1,4 ^a
	-	+	-	+	8,41±1,5	8,04±1,5 ^b
Túlsúlyos egyének monocitái	+	-	-	-	26,02±5,1 ^d	146,52±26,8 ^d
	+	-	+	-	6,96±1,3 ^a	15,62±3,4 ^a
	+	-	-	+	25,78±5,1	140,21±27,6
	-	+	-	-	265,48±53,7 ^e	
	-	+	+	-	33,64±6,5 ^a	
	-	+	-	+	269,18±51,8	

Rövidítések: mPKC = membránhoz kötött proteinkináz C; AUC= 45 perc időgörbe alatti terület; WMN= 10 µM wortmannin; H-7= 10 µM H-7. Az első és második csúcs AUC értékeit a 0-15 és 15-45 percből számoltuk.

^a A gátlás wortmanninnal szignifikáns volt ($p \leq 0,001$).

^b A gátlás H-7-el szignifikáns volt ($p \leq 0,001$).

^c A csúcs szignifikánsan magasabb volt az 50 ng/ml leptinnel indukált csúcsnál ($p \leq 0,001$).

^d Az első és második csúcs szignifikánsan magasabb volt TS monocitákban, mint kontroll monocitákban ($p \leq 0,001$).

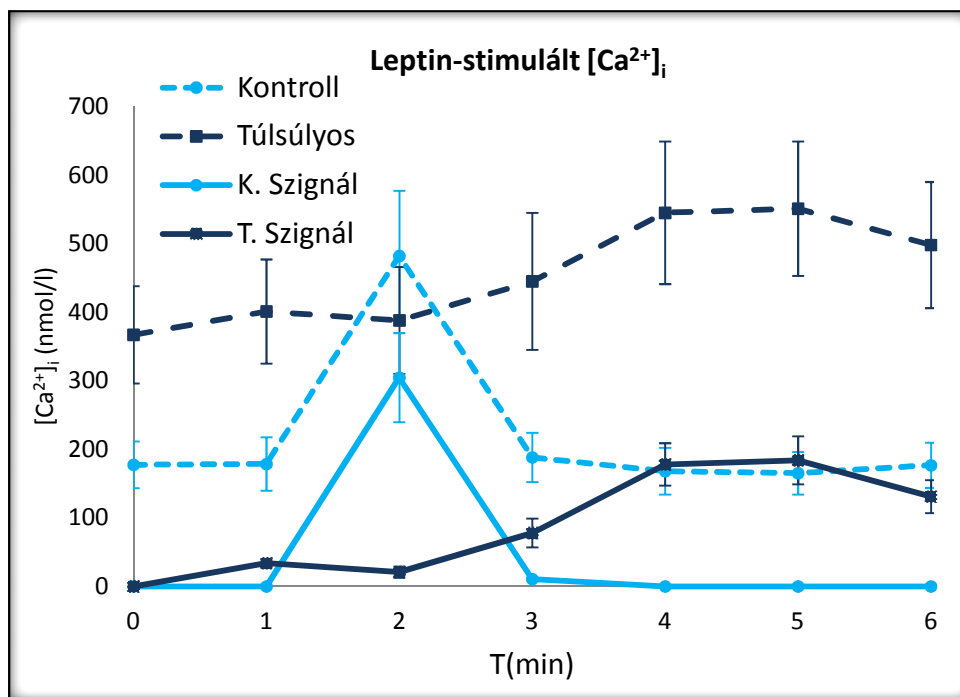
^e Az első és második csúcs összege szignifikánsan alacsonyabb, mint az egyetlen, 500 ng/ml leptinnel stimulált csúcs ($p \leq 0,001$).

2. Leptin hatásának vizsgálata az intracelluláris kalcium viszonyokra és a Nox működésére

2.1 A K és TS monociták leptin indukált intracelluláris kalcium változásai

A következő kísérletsorozatban a túlsúlyos és a normál testsúlyú egyének monocitáinak leptin-indukált intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásait hasonlítottuk össze (6. Ábra).

6. Ábra: Intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ változások a kontroll és túlsúlyos egyénekből származó leptinnel stimulált monocitákban



A kontroll és túlsúlyos monocitákat 50 ng/ml végkoncentrációjú leptinnel kezeltük. Az ábra a leptin-stimulált intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ értékeket és a Ca^{2+} szignálokat (leptin-stimulált és nyugalmi kalcium szintek különbsége) mutatja be kontroll és túlsúlyos egyénekből. Az értékek átlag±SD-ben vannak kifejezve.

TS monocitáknál a nyugalmi intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ szintek a K sejtekhez képest magasabbak voltak, míg a Ca^{2+} - idő görbék csúcsai alacsonyabbak voltak és időben később jelentek meg. A Ca^{2+} szignálok bemutatása az **6. Ábrán** látható. Az **5. Táblázatban** a Ca^{2+} szignálok görbe alatti területben kifejezett értékeit adjuk meg. A TS monociták AUC értékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint a K monociták értékei, aminek oka, az alacsony csúcs ellenére, az alapvonalhoz történő elhúzódó, lassabb visszatérés lehet.

2.2 A megváltozott kalcium szignálok okának vizsgálata

A Ca^{2+} szignálok eredetének felkutatásához a monocitákat pertusszis toxinnal, neomycinnel, thapsigarginnal, wortmanninnal és Medium V-vel inkubáltuk elő.

5. Táblázat: Leptin-indukált Ca^{2+} -szignálok gátlása normál testsúlyú kontroll és túlsúlyos férfiak monocitáiban

Előinkubáció során használt anyag:	Kontroll n=16	Túlsúlyos n=18	Kontroll n=16	Túlsúlyos n=18
	Ca^{2+} szignál AUC értéke		Gátlás mértéke (%)	
Leptin	1497±178	3309±489 ^{**}	-	-
PTX + Leptin	1455±267	3325±628	0	0
Neomycin + Leptin	768±145 [*]	2677±555 [*]	48,7±8.1	19,1±3.2
Thaps + Leptin	590±121 [*]	2285±467 [*]	60,6±11.5	30,9±5.5
WMN + Leptin	688±142 [*]	2773±548 [*]	54,0±10.2	16,2±3.1
Medium V + Leptin	1511±311	894±185 [*]	0	73,0±13.2

Az értékek átlag±SD-ben vannak kifejezve. Rövidítések: AUC= a Ca^{2+} görbe alatti terület értéke; PTX= pertusszis toxin; Thaps= thapsigargin; WMN= wortmannin; Medium V= az előinkubáció Ca^{2+} -mentes 3 mM EGTA-t és 10 μM verapamil tartalmazó médiumban történt. Az értékek a stimulált - nyugvó AUC értékeket jelentik.

^{**} A kontroll és a túlsúlyos egyénekből származó monociták közötti különbség szignifikáns ($p \leq 0,001$),
és ^{*} az inhibitoros kezelés szignifikáns hatást ért el ($p \leq 0,001$).

A kapott adatok szerint a PTX nem volt hatással a leptin-indukált Ca^{2+} szignálokra, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} szintjének változása leptin kezelést követően független a G protein aktivációjától. A neomycin, thapsigargin és WMN K sejtekben nagyobb mértékben gátolta a Ca^{2+} szignálokat, mint a TS monocitákban, mert ez utóbbi csoportban a gátlás százaléka mindössze 19,1; 30,9 és 16,2 volt szemben a K sejtekben számolt 48,7; 60,6 és 54,0 értékekkel. A legkifejezettebb gátló hatása a TS sejtek Medium V-ben történő inkubációnak volt (73,0 %), míg K monocitákban a Ca^{2+} szignálokat az extracelluláris Ca^{2+} hiánya nem befolyásolta (0% gátlás). Ez arra enged következtetni, hogy a verapamil-szenzitív Ca^{2+} csatornák csak a TS sejtekben vesznek részt a leptin-indukált Ca^{2+} szignálok előidézésében. Ezzel ellentétben azt találtuk, hogy a Ca^{2+} transzlokációja thapsigargin szenzitív intracelluláris raktárakból nagyobb K sejtekben, míg szerepe a TS monocitákban kevésbé kifejezett.

2.3 Az Ins(1,4,5)P3 szintjének változása a kalcium jelátvitel gátlása során

A következő kísérletsorozatban a K és TS monocitákban tapasztalt különbségeket tovább vizsgáltuk. A **6. Táblázat** a leptin-indukált Ins(1,4,5)P3 szignálokat és azok válaszát mutatja a különböző jelátviteli útvonalak gátlására.

Az Ins(1,4,5)P3 értéke kontroll sejtekben a leptin kezelést követően 98,6 pmol/mg fehérje volt, amelyet a neomycin és a wortmannin jelentősen gátolt. TS monocitákban a leptin kezelés kisebb Ins(1,4,5)P3 szintemelkedést eredményezett, de a nyugvó TS sejtek alapszintje magasabb volt a kontroll monocitákénál. Az eredmények arra is rámutatnak, hogy a PLC leptin indukált aktivációját egy wortmannin szenzitív útvonal aktivációja okozta, ami nem a PTX szenzitív G_i proteinen keresztül történt.

6. Táblázat: Leptin-indukált Ins(1,4,5)P3 emelkedése normál testsúlyú és túlsúlyos egyénektől származó monocitákban

Előinkubáció során használt anyag:	Kontroll	Túlsúlyos
	Ins(1,4,5)P3 (pmol/mg fehérje)	
Ø	25,7±4,5	36,8±7*
Leptin	98,6±21**	50,4±11**
PTX + Leptin	101,2±22	53,1±11
Neomycin + Leptin	56,8±12***	31,1±6,5***
WMN + Leptin	65,5±13,5***	30,5±6***

Rövidítések: Ins(1,4,5)P3 = inozitol(1,4,5)triszfoszfát; PTX = pertusszis toxin; WMN = wortmannin. Az értékek átlag±SD-ben vannak kifejezve. A meghatározásokat duplikátumban végeztük.

*Az alapérték szignifikánsan magasabb a kontroll értékeknél ($p \leq 0,001$);

**a leptin-indukált emelkedés szignifikáns ($p \leq 0,001$);

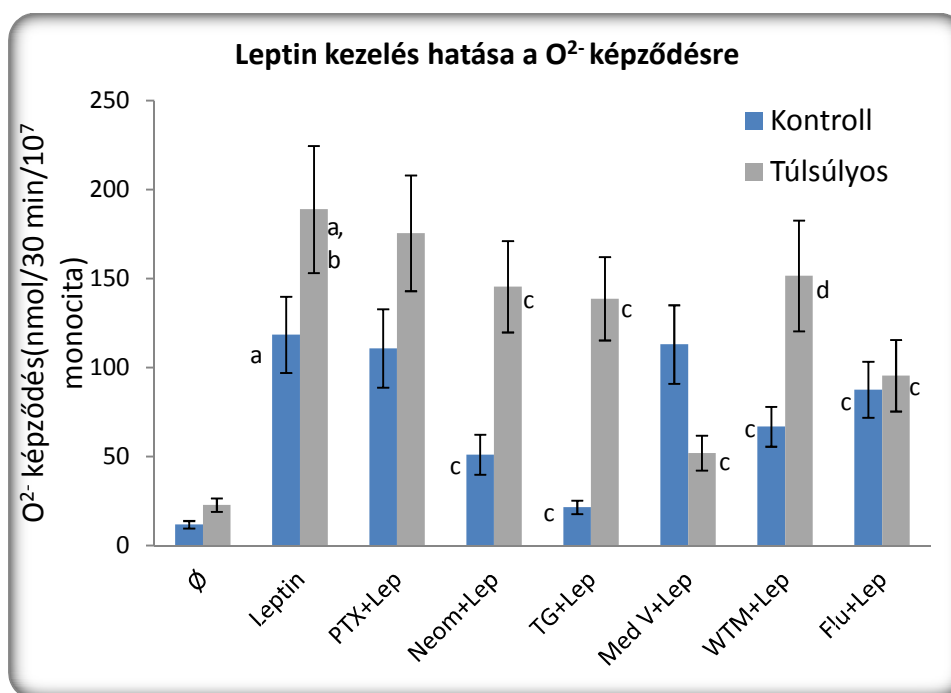
***a gátlás szignifikáns ($p \leq 0,001$).

2.4 A szuperoxid anion képződésben tapasztalt változások

A továbbiakban tisztázni akartuk a szuperoxid anion képződés szerepét a megváltozott Ca^{2+} homeosztázisban. Először meghatároztuk a leptin-indukált szuperoxid anion képződést a két monocita csoportban (7. Ábra).

Eredményeink alapján a leptin intenzívebb szuperoxid anion képződést idézett elő TS monocitákban, mint a kontrollokban, és ez a szuperoxid anion képződés PTX rezisztens volt. A neomycin, thapsigargin és wortmannin szignifikánsan gátolta a NADPH oxidáz aktivációját kontroll monocitákban ($p \leq 0,001$), míg a médium V hatására a szuperoxid anion képződés változatlan maradt. Kiemelendő, hogy a legkifejezettebb gátlást a thapsigargin váltotta ki, jelezve az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} transzlokáció jelentőségét a leptinhez kapcsolódó jelátvitelben.

7. Ábra: Inhibitorok hatása a leptin által kiváltott szuperoxid anion képződésre K és TS monocitákban



Az ábra különböző inhibitorok hatását mutatja be a kontroll és túlsúlyos monocita csoportok leptin-indukált szuperoxid anion termelésére. Az előinkubáció időtartama inhibitoronként változott. PTX=pertusszisz toxin; Neom=neomycin; TG= thapsigargin; WMN= wortmannin; Flu= fluvasztatin. Az értékek átlag±SD-ben vannak kifejezve. ^a A szuperoxid anion képződés mértéke szignifikánsan magasabb a kezeletlen csoportokéhoz képest ($p \leq 0,001$); ^b A kontroll és túlsúlyos csoport közötti különbség szignifikáns ($p \leq 0,001$); A gátlás a leptin-indukált értékekhez képest szignifikáns ($p \leq 0,001$), és ^d ($p \leq 0,05$).

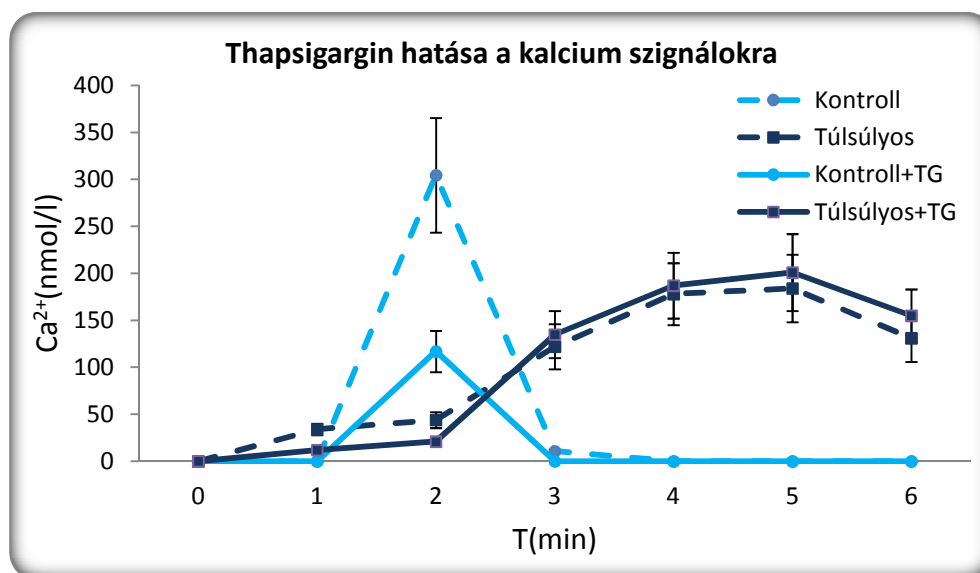
Ezzel szemben a szuperoxid anion képződést TS monocitákban a Médium V gátolta szignifikánsan, a neomycin, thapsigargin és wortmannin pedig csak mérsékelten. Ezen eredmények alapján a Ca^{2+} szignál fontos összetevője a leptin-indukált NADPH oxidáz aktivációjának, és ezek a jelátviteli útvonalak különböznek a kontroll és a túlsúlyos személyekből származó monocitákban. A továbbiakban fluvasztatinnal történő előinkubáció mindkét monocita csoportban a leptin-indukált szuperoxid anion képződés szignifikáns csökkenését eredményezte, ahol a TS csoportban a gátlás erőteljesebb volt.

2.5 A kalcium jelátvitel gátlásának következményei

A **8. Ábra** a Ca^{2+} szignál időgörbéket thapsigargin, wortmannin és a szuperoxid anion gátlásában is részt vevő fluvasztatin jelenlétében ábrázolja.

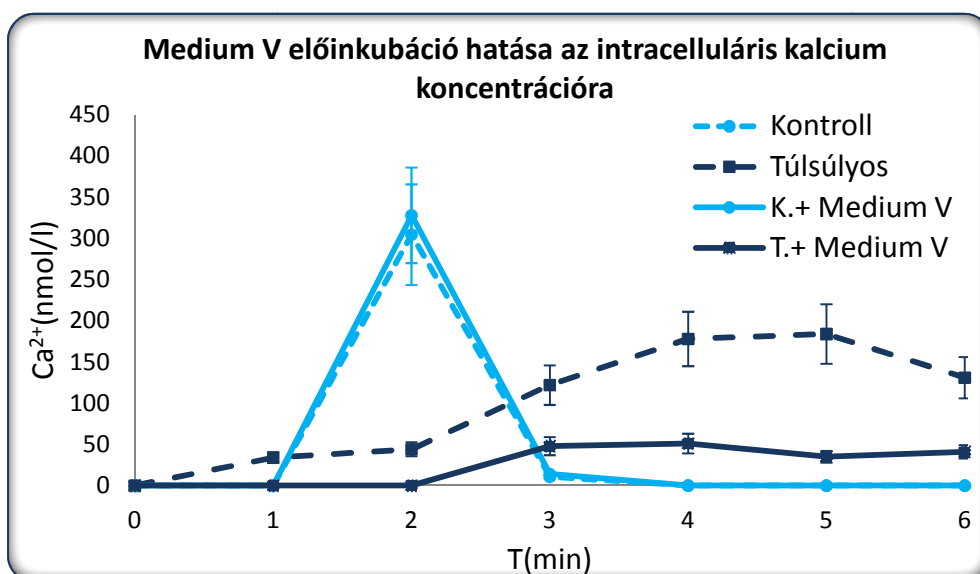
8.Ábra: Különböző inhibitorok hatása a leptin-indukált Ca^{2+} szignálokra kontroll és túlsúlyos férfiakkól származó monocitákban.

8. A Ábra



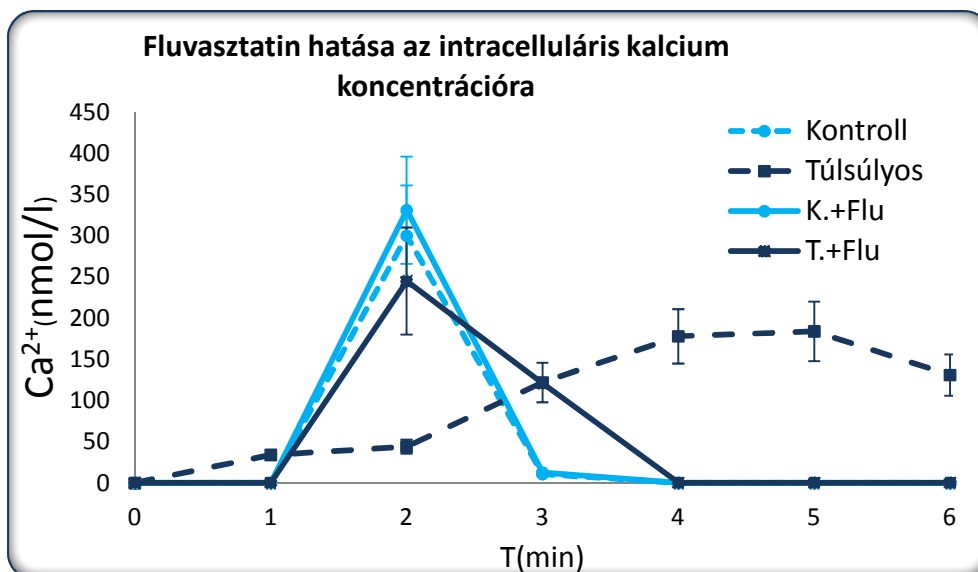
Minden adatpont átlag $\pm$ SD-ben van kifejezve ($n=6$). A Ca^{2+} szignálok AUC-ban vannak feltüntetve. A Ca^{2+} szignálok thapsigargin előinkubációt követően ábrázoltuk. Kontroll monocitákban a thapsigargin gátló hatása szignifikáns volt ($p \leq 0,001$).

8. B Ábra



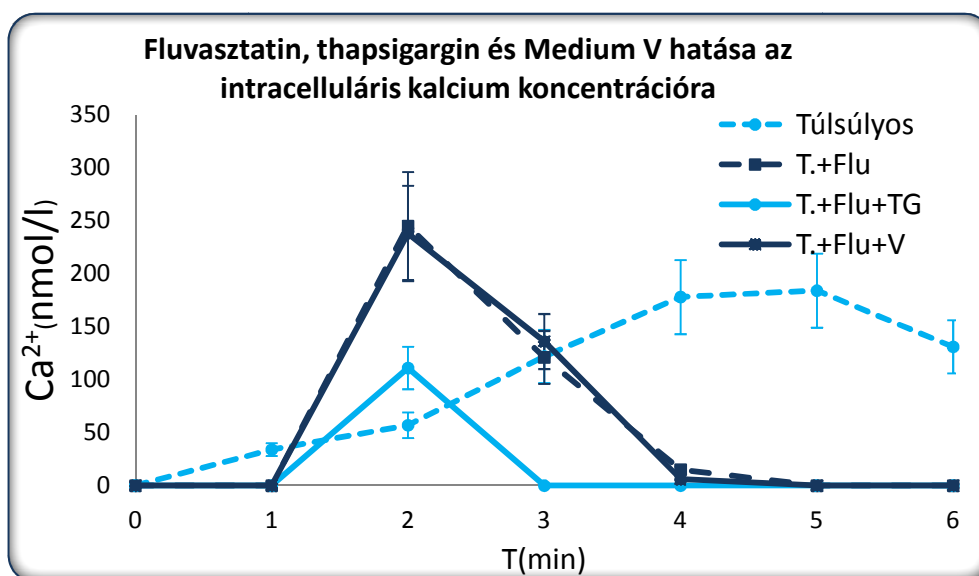
Minden adatpont átlag $\pm$ SD-ben van kifejezve ($n=6$). A Ca^{2+} szignálok AUC-ban vannak feltüntetve. A Ca^{2+} szignálokat Medium V előinkubációt követően ábrázoltuk. Túlsúlyos monocitákban a Medium V gátló hatása szignifikáns volt ($p \leq 0,001$).

8. C Ábra



Minden adatpont átlag $\pm$ SD-ben van kifejezve ($n=6$). A Ca^{2+} szignálok AUC-ban vannak feltüntetve. Túlsúlyos monocitákban a fluvasztatin gátló hatása szignifikáns volt ($p \leq 0,001$).

8. D Ábra



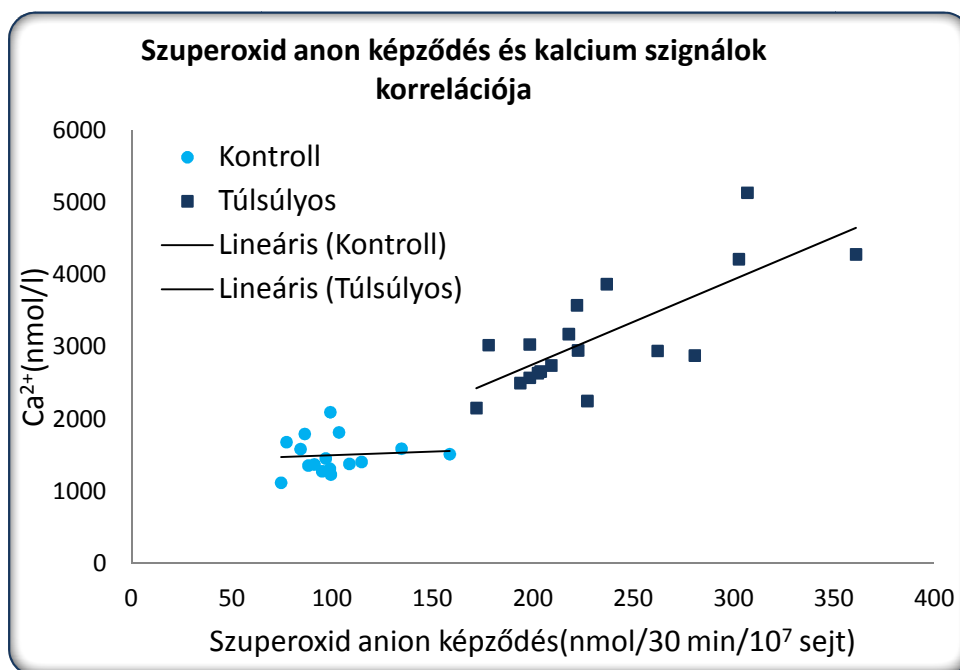
Fluvasztatin, fluvasztatin+thapsigargin és fluvasztatin+ Medium V előinkubáció hatása a Ca^{2+} szignálokra. Minden adatpont átlag $\pm$ SD-ben van kifejezve (n=6). A Ca^{2+} szignálok AUC-ban vannak feltüntetve. A gátlás fluvasztatinnal és fluvasztatin+thapsigarginnal szignifikáns volt ($p \leq 0,001$).

Thapsigargin a Ca^{2+} szignálokot csak K sejtekben gátolta (8. A és 8. B Ábra), míg a Médium V csak a TS monocitákra volt hatással (8. B Ábra). A fluvasztatin kezelés hatástalan volt kontroll sejtekben; TS sejtekben helyreállította a sérült intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ egyensúlyt, tehát meggátolta a citoszolikus szabad Ca^{2+} csökkenését (8. C Ábra). TS monociták fluvasztatinnal történt előkezelésekor vizsgáltuk a thapsigargin és a Médium V hatását (8. D Ábra). Ebben az esetben a leptin indukált intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ csúcs magasságát csak a thapsigargin csökkentette. (A gátlás mértéke 68,7 % volt). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HMG CoA reduktáz inhibitor fluvasztatin képes volt helyreállítani TS monocitákban a intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ homeosztázist.

2.6 A Nox és a kalcium viszonyok kapcsolata

Végül vizsgáltuk a leptin által indukált szuperoxid anion képződés és Ca^{2+} szignálok közötti összefüggéseket. TS monocitákban pozitív korrelációt figyeltünk meg a leptin által indukált szuperoxid anion képződés és Ca^{2+} szignálok között (9. Ábra).

9. Ábra: A szuperoxid anion képződés és a kalcium szignálok kapcsolata K és TS monocitákban.



A túlsúlyos monociták (■) leptin-indukált szuperoxid anion képződése és Ca²⁺ szignáljai (AUC) között szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg: ($r= 0,7765$) ($p\leq 0,001$). Kontroll sejtekben (o) nem volt szignifikáns korreláció ($r= 0,0771$, n.s.).

Ezt az összefüggést kontroll sejtekben nem találtuk meg. Ez alapján feltételezhető, hogy a szuperoxid anion képződésnek TS monociták esetében szerepe van a károsodott intracelluláris [Ca²⁺] viszonyok kialakításában.

VI. MEGBESZÉLÉS

Az obezitás kialakulása során kulcsszerepet játszó leptin hatását vizsgáltuk túlsúlyos és normál testsúlyú egészséges férfiak véréből izolált monocitákon. A leptinnek éhség- és energiabevitel szabályozó szerepe mellett az intracelluláris folyamatok regulációjában is kiemelt szerepe van. Korábbi tanulmányainkban bizonyítottuk, hogy 2-es típusú diabétesz mellituszban és hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek neutrofiljeiben a FMLP és angiotenzin II indukált jelátvitel eltér az egészséges kontrollokéitól (Fóris és mtsai, 1998; Paragh és mtsai, 1999; Paragh és mtsai, 2002).

1. A koleszterinszintézis regulációjának meghatározó különbségei

Jelen kísérleteink során a leptin eltérő módon befolyásolta a kontroll és a túlsúlyos férfiakból származó monociták koleszterinszintézisét, kalcium viszonyait és a NADPH oxidáz aktivitást. A monocitákat különböző koncentrációjú leptinnel kezeltük és kontroll monocitákban a leptin koleszterin szintézisre gyakorolt bifázikus hatását láttuk. Ez a jelenség TS monocitákban hiányzott: a leptin koncentráció emelésével a koleszterin szintézis folyamatosan emelkedett (**4. Ábra**). A kapott eredmények alapján a monocita csoportok közötti feltételezett jelátvitelbeli különbségeket 50 és 500 ng/ml leptin stimulációt követően vizsgáltuk. Ebben a folyamatban különböző eredetű Ca^{2+} jel, PI3K, MAPK és HMG-CoA reduktáz játszanak szerepet. A leptinhez kötődő jelátvitel során az inozitol foszfolipidek számos celluláris folyamat, pl. membrán transzport és apoptózis, regulátorai.

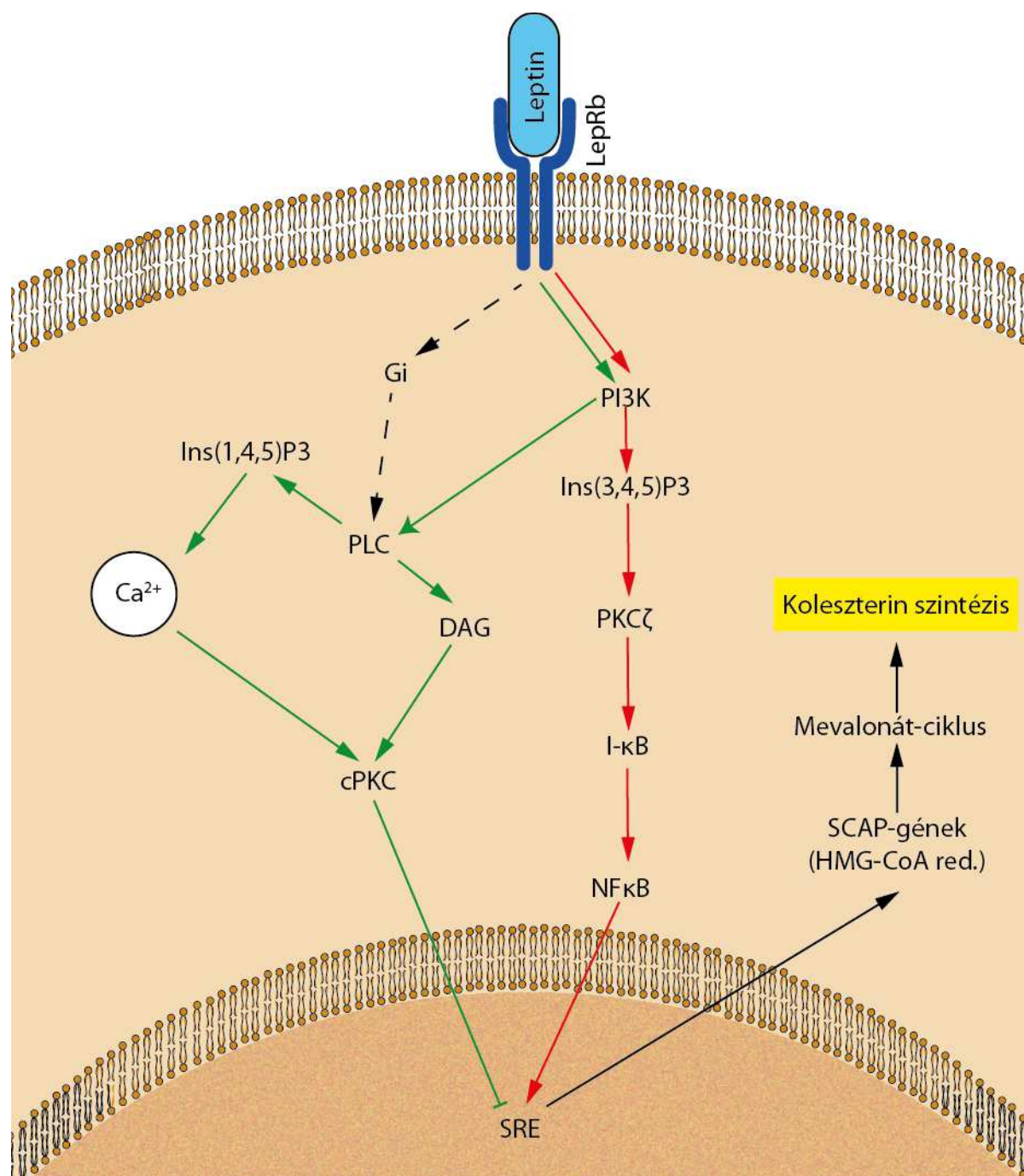
A leptinhez kötődő jelátviteli folyamat monocitákban összeolvadhat más citokin útvonalakkal (Balla, 2001; Greenberg és Obin, 2006) és a leptin -jelátvitel összetarthat egy közös citokin célgén felé a nukleuszba. Az obezitás során a zsírszövetben emelkedett számban jelen lévő makrofágok felelősek a citokin termelés nagy részéért. Juge-Aubry és Meier kimutatta, hogy leptin hatására a monociták interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) szekréciója fokozódik, ami obezitásban hozzájárulhat a leptin rezisztencia kialakulásához (Juge-Aubry és Meier, 2002; Juge-Aubry és mtsai, 2004). Az IL-1Ra az interleukin 1 citokin család tagja, ami az IL-1 α és IL-1 β funkcióját gátolja. A leptin a humán monociták citokin termelésének, így pl. a tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, és IL-12 termelésének modulálásában is részt vesz (Procaccini és mtsai, 2012). Obezitásban a humán zsírszövet egy

enyhe fokú, folyamatos gyulladásos állapotot hoz létre (Fain, 2010), ennek hatására az SREBP és a SCAP expressziója fokozódik és ennek következtében a koleszterinszintézis mértéke is emelkedik (Ruan és mtsai, 2006; Ma és mtsai, 2008). Kísérleteink során, monocitákat leptin mellett 25-hidroxikoleszterinnel és fluvasztatinnal kezelve, a koleszterin szintézis gátlását figyeltük meg. A 25-HC gátló hatása arra engedett következtetni, hogy a monocitákban a leptin indukálta metabolikus változások kialakulásában a SREBP–SCAP rendszer is szerepet kaphat. A 25-HC a SCAP-ra nem közvetlen módon kapcsolódik, hanem hatását feltételezhetően egy szenzor proteinen keresztül fejtí ki. A koleszterinnel ellentétben a 25-HC a SCAP-ban nem okoz konformáció változást, de a 25-HC szenzor proteinen keresztül elősegíti a SCAP-Insig protein kapcsolat kialakulását (Babior, 2002; Souvannakitti és mtsai, 2010).

Kutatócsoportunk korábbi kísérleteiben a hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek nyugvó és leptinnel kezelt monocitáinak eltérő koleszterin homeosztázisát találta (Paragh és mtsai, 2003). Jelenlegi vizsgálatainkban a koleszterin szintézis regulációjának a K és TS monocitákban tapasztalt eltérő mivolta két kérdést vetett fel: K monocitákban mi az oka a magas (500 ng/ml) leptin koncentrációval történő kezelést követő koleszterinszintézis csökkenésének és ez miért nem tapasztalható TS monociták esetén is? Ahogyan az a **3. Táblázat** adataiból látható, az 500 ng/ml leptin által előidézett koleszterin szintézis csökkenés mérséklődött az intracelluláris forrásból származó Ca^{2+} szignálok H-7-el történő gátlásakor és a wortmannin előkezelést követően. A H-7 használata során tehát világossá vált a Ca^{2+} -függő cPKC jelentős szerepe a koleszterinszintézis mértékének csökkentésében a magas leptin koncentrációval történt stimuláció esetén. Emellett a SOCS3 képes a hosszú izoformájú leptin receptor aktivitását csökkenteni: a SOCS3 molekulák dokkolási helye a Tyr985, melyen keresztül a Tyr1138-mediált STAT3 aktiváció antagonistájaként működnek (Bjorbak és mtsai, 2000). Ezért a SOCS3-at, mint a leptin rezisztencia kialakulásának egy meghatározó szereplőjét írták le (Howard és Flier, 2006; Séron és mtsai, 2006). Korábban igazolták, hogy a SOCS3 expressziója idős/obez egerek *nucleus arcuatusában* fokozott (You és mtsai, 2010), de egészséges emberek leptin jelátvitelében betöltött szerepe még további vizsgálódás tárgya. Makrofágok PIM2 antigén kezelését követő emelkedett SOCS3 és ERK1/2 expressziójában mind a PKC, mind a PI3K jelátvitel szerepét bizonyították (Narayana és mtsai, 2009). A PKC és a SOCS család működése tehát egymástól nem független (Hwang és mtsai, 2007a; Hwang és mtsai, 2007b), ami tovább erősíti a PKC feltételezett szerepét a leptin rezisztens koleszterinszintézisben. Kutatócsoportunk korábbi kísérletei során monocitákban megfigyelte a már korábban leírt leptinhez köthető jelátviteli útvonalat, amelynek egyik eleme a diacil-

glicerol által előidézett PKC-aktiváció (Kosztáczky és mtsai, 2007). A **3. Táblázat** adatai azt mutatják, hogy az 50 ng/ml leptinnel történt stimuláció a kontroll és a TS monocita csoportban is emelkedett koleszterin szintézishez vezetett. Ez az emelkedett koleszterin szintézis rendkívül érzékeny volt a wortmannin előkezelésre, ami arra utal, hogy a PI3K aktivációjának és a termelődött Ins(3,4,5)P3-nak szerepe van a koleszterin szintézis fokozódásában alacsony leptin dózis alkalmazását követően. Az Ins(3,4,5)P3 továbbá emeli a PKC ζ autofoszforylációjának aktivációját és ezáltal az NF κ B expresszióját (Diaz-Meco és mtsai, 1994). A **4. Táblázatban** feltüntetett, leptin hatására kialakuló mPKC görbe alatti terület értékek alapján elmondhatjuk, hogy kontroll monocitákban a wortmannin szenzitív PKC aktivitás mindkét leptin koncentráció alkalmazása után megjelent. Az **5. Ábrán** kontroll sejteknél megfigyelhető második csúcs H-7 szenzitívnek bizonyult, a TS monocitáknál azonban a wortmannin gátlás hatásossága mellett a PKC szintézis H-7 rezisztens volt (**4. Táblázat**). A koleszterin szintézis a PKC szinttel összhangban, párhuzamosan változott: a wortmannin K és TS monocitákban is gátolta a koleszterinszintézist, míg a H-7-re csak a K monociták voltak érzékenyek (**3. Táblázat**). A WMN kezelés eredményeképpen mindkét monocita csoportban megfigyelhető gátló hatás a PI3K szerepére utal a PKC aktivációjában. Azonban az OW monociták rezisztenciája a H-7-el szemben arra enged következtetni, hogy a koleszterinszintézis negatív visszacsatolásának hiánya nem a klasszikus, hanem egy atípusos PKC szabályozása alatt állhat. A PKC aktivitás és a koleszterinszintézis aktivitása közötti hidat eredményeink alapján a PKC ζ képezi, amely az inhibitor- κ B (I- κ B) foszforylációján keresztül aktiválja az NF κ B-t, amely a magba jutva transzkripciós aktivátorként működik (Diaz-Meco és mtsai, 1994). Az NF κ B és a koleszterinszintézis szoros kapcsolatát az NF κ B sztatinnal és a koleszterinszintézis fokozódásával szemben tanúsított érzékenysége támasztja alá (Inoue és mtsai, 2002; Mandosi és mtsai, 2010). A PKC mellett a kontroll és a TS monociták koleszterin szintézis szabályozásának megfigyelt különbségeihez a PI3K különböző regulációja, a megváltozott membránösszetétel és membrán rigiditás és a TS monociták membrán raftjainak koleszterin akkumulációja is hozzájárulhat (Calleros és mtsai, 2006; Seres és mtsai, 2006). A koleszterinszintézis leptin kezelést követő megváltozott regulációjának okait a **10. Ábra** szemlélteti.

10. Ábra: A koleszterinszintézis regulációjának eltérő jeltovábbítása K és TS monocitákban



Az ábra a K és TS monociták koleszterin regulációjának eltérő, általunk feltételezett jelátviteli útvonalakat mutatja be. A zöld és piros nyilakkal jelölt útvonalak az eredményeink szerint a K és TS monocitákban meghatározóbb útvonalakat jelölik. A szaggatott nyilakkal jelölt G_i protein szerepét a koleszterin szintézisében nem tudtuk bizonyítani. Magas leptin koncentrációval történő kezelés esetén K monocitákban a klasszikus PKC koleszterin szintézist csökkentő hatására következtethatunk, míg a TS monocitákban a koleszterin szintézis negatív visszacsatolásának hiányáért a PKC ζ tehető felelőssé. Rövidítések: LepRb= hosszú izoformájú leptin receptor; G_i = „inhibitor” G protein; PLC= foszfolipáz C; Ins(1,4,5)P3= inozitol(1,4,5)-triszfoszfát; DAG= diacil-glicerol; cPKC= klasszikus proteinkináz C; SRE= „sterol regulatory element”; PI3K= foszfatidilinozitol-3-kináz.

2. Az intracelluláris kalcium szint és a Nox szabályozása

Kísérleteinkben a TS monociták kalciumháztartásában is változásokat tapasztaltunk. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szignifikánsan magasabb volt nyugvó TS monocitákban és a leptin stimulációt követő Ca^{2+} szignálok csúcsai kisebbek voltak, mint a kontroll monociták Ca^{2+} tranziensei. Emellett az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ visszatérése az alapszintre késleltetett volt, amelyet a Ca^{2+} lassabb kipumpálása okozott a citoplazmából. Mindezek a túlsúlyos egyének monocitáinak jelentősen megváltozott Ca^{2+} homeosztázisára utalnak. Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy TS monocitákban a leptin – más citokinek mellett – részt vesz az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelésében, ezen sejtek erős szabadgyök képző képessége miatt. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ homeosztázis megváltozását az intracelluláris készletekből történő Ca^{2+} transzlokáció sérülésével és a Ca^{2+} citoszolból történő lassabb kipumpálással jellemezhetjük.

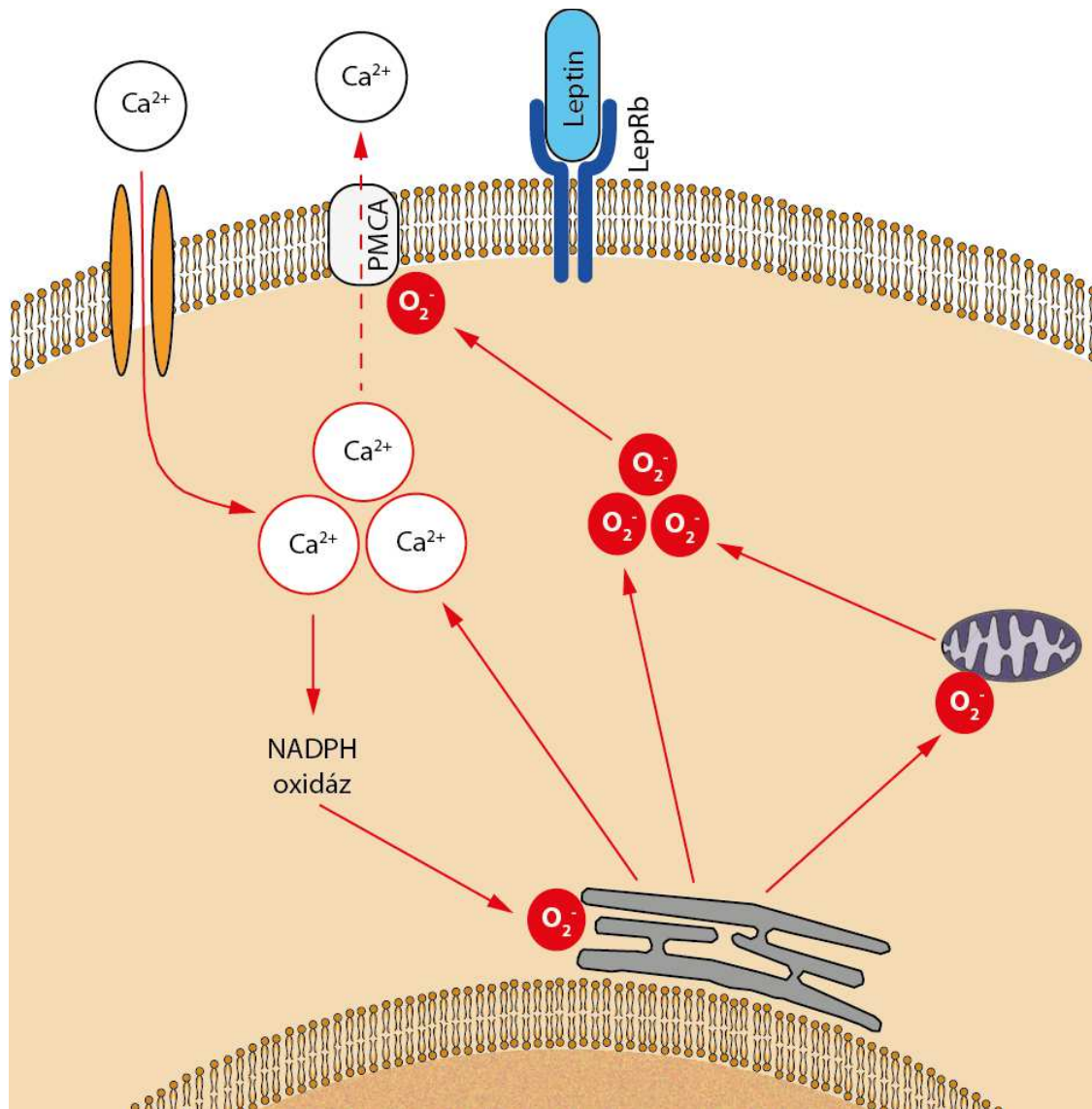
A jelenség hátterében több dolog állhat: 1. A „kanonikus” „receptor - $Ins(1,4,5)P_3$ - intracelluláris Ca^{2+} készletek - Ca^{2+} szignál” jelátviteli útvonal sérülése. 2. A kalcium szignálok eredetének a Ca^{2+} verapamil-érzékeny Ca^{2+} csatornákon keresztül történő beáramlása felé eltolódása. 3. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ késleltetett visszatérése a nyugalmi szintre, ahogyan azt a leptin stimulációt követő Ca^{2+} idő-görbéken láthatjuk.

Amikor a Ca^{2+} szignálok (leptin-indukált emelkedés és a intracelluláris $[Ca^{2+}]$ nyugalmi szintjének különbsége) idő-görbéit vizsgáltuk a teljes Ca^{2+} szignálok görbe alatti területének jelentős emelkedését találtuk TS monocitákban a K monocitákhoz képest (3309 ± 489 szemben a 1497 ± 178 -al). Az AUC leptin által kiváltott emelkedését TS monocitákban a Ca^{2+} szignálok lassabb normalizálódása okozta. A monociták mindkét csoportjában a thapsigargin gátló hatása a WMN-szenzitív PI_3 kináz hosszú típusú leptin receptorok szignalizációjában való részvételének tudható be (Frühbeck, 2006; Balla, 2006). A PI_3 kináz képes a foszfatidilinozitol diacil-glicerolra és $Ins(3,4,5)P_3$ -ra hasítani, amely aktiválja az $Ins(1,4,5)P_3$ képzését indukáló PLC enzimet (Visnjic és Banfic, 2007). Ennek következtében, a thapsigargin lecsökkent gátló hatása TS monocitákban (**5. Táblázat**) arra utal, hogy ezekben a sejtekben a leptin-indukált Ca^{2+} szignált a Ca^{2+} extracelluláris térből történő beáramlása okozza, ellenben az irodalomban arra is található bizonyíték, hogy a PTX-rezisztens $Ins(1,4,5)P_3$ is részt vesz a szignálban (Wu és mtsai, 2000; Gerasimenko és Gerasimenko, 2004). A **7. Ábra** azt mutatja be, hogy a thapsigargin K és TS sejtekben is gátolta a szuperoxid anion képződést, ami szerint a Ca^{2+} szignál indukált NADPH oxidáz

aktiváció részben az intracellulárisan mobilizált szabad Ca^{2+} -tól függ. Az Ins(1,4,5)P3 leptin hatására bekövetkező emelkedés WMN előinkubáció hatására történő szignifikáns csökkenése **(6. Táblázat)** alátámasztja feltevésünket, miszerint a PI3 kináz a PLC szabályozásával szerepet játszik a leptin indukált Ca^{2+} szignál kialakulásában. Monocitákban az Ins(1,4,5)P3 előidézte raktárürítés következménye a Ca^{2+} extracelluláris térből történő belépése, amely segíti a készlet pótlását. Az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedése pedig szükséges a NADPH oxidáz, a O_2^- termelésért felelős enzim, aktivációjához (Schepers és mtsai, 2009). Az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis és a szabadgyökképződés közötti kapcsolat K és TS monocitákban további vizsgálatot igényel. Korábban közöltük, hogy az angiotenzin II és a leptin a kontrollokéhoz képest emelte a szuperoxid anion és leukotrién képződést hiperkoleszterinémiás betegek neutrofiljeiben és a szabadgyökképződést mind az *in vivo* és az *in vitro* statin kezelés is részlegesen gátolta (Seres és mtsai, 2005; Kosztáczky és mtsai, 2006). A plazmamembránban található kalcium/kalmodulin dependens ATPáz az egyetlen rendszer nem-ingerelhető sejtekben a kalcium kipumpálására. Így, az intracelluláris kalcium koncentráció szabályozásában ez a legmeghatározóbb enzimatis Ca^{2+} pumpa (Cartwright és mtsai, 2009; Bobe és mtsai, 2004). A kalmodulin – 145-ös metioninjának specifikus oxidációja miatt - érzékeny a szabadgyökökre, melyek hatására a 20S proteoszómában a molekula több lépcsőben lebomlik (Sacksteder és mtsai, 2006). Ebben a tanulmányban, TS monocitákban a leptin-generált szuperoxid anion képződésének szignifikáns emelkedését találtuk. TS monociták esetében a szuperoxid anion képződésének csökkenése Medium V és fluvasztatin előkezelés hatására nem pusztán megváltozott jelátvitelre, hanem egyfelől a szuperoxid anion képződés mevalonát ciklus függésére, másfelől a sztatinok endogén antioxidáns aktivitására utal. A sztatinok a HMG CoA reduktáznak, a mevalonát ciklus kulcsenzimének, inhibitorai (Fritz, 2009). Továbbá a sztatinoknak pleiotropikus hatásuk is van, így nem csak a koleszterin szintézist gátolják, hanem a Rho szupercsalád tagjait is, melyek a sejt proliferációért, tumorképződésért és a Rac1 kis GTPáz aktivációjáért felelnek (Zhou és Liao, 2010; Diebold és Bokoch, 2005). Ez utóbbi szerepet játszik a monociták NADPH oxidáz aktivitásának regulációjában, tehát a fluvasztatin képes, *in vivo* és *in vitro*, az AngII és a leptin stimulált szuperoxid anion képzést részben csökkenteni (Seres és mtsai, 2005; Kosztáczky és mtsai, 2006). A mevalonát ciklus-függő (fluvasztatinnal gátolható) része a leptin-indukált szuperoxid anion képződésnek kifejezettebb TS, mint K monocitákban. Ez a felfedezés azt a feltevést támasztja alá, hogy az endogén antioxidáns aktivitás nem az egyedüli jellemzője a sztatinoknak a ROS képződés gátlásában. A fluvasztatin képes TS sejtekben megszüntetni az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ késleltetett alapszintre kerülését, feltehetően a

fokozott szuperoxid anion képződés gátlásával, mellyel jelentősen csökkenti a Ca^{2+} szignált. A fluvasztatin kezelés eredményeképpen a sejtekben a Ca^{2+} szignál a thapsigargin érzékeny készletből származott, a Ca^{2+} beáramlása a Ca^{2+} csatornákon keresztül megállt, és a szabad Ca^{2+} eltűnése a citoszolból helyreállt (8. Ábra). Ezen kívül TS monocitákban szignifikáns, erős pozitív korrelációt találtunk a leptin-indukált szuperoxid anion képződés és a Ca^{2+} szignálok AUC értékei között. A TS monociták Ca^{2+} szintjének és ROS képzésének változásait a 11. Ábra szemlélteti.

11. Ábra: TS monociták emelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nak és O_2^- termelésének kapcsolata



Az ábra a TS monociták esetében a leptin hatására bekövetkező $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés és NADPH oxidáz aktivitás fokozódásának szignifikáns pozitív korrelációjának lehetséges magyarázatával szolgál. A sejtbe lépő kalcium a NADPH oxidáz aktivitását fokozza. A fokozottan termelődő O_2^- az ER kalcium ürítését fokozza. Az ER lumenének csökkenő kalcium koncentrációja fokozza a szabadgyökképződést, amelynek pozitív visszacsatolásaként a mitokondrium is fokozott mértékben termel O_2^- -t. A szabadgyökök károsítják a plazmamembrán Ca^{2+} ATP-ázát (PMCA), ami a kalciumot nem tudja megfelelő sebességgel a sejtplazmából eltávolítani. A TS monocitákban ez lehet az oka a citoszol emelkedett Ca^{2+} és O_2^- koncentrációjának.

Eredményeink összegzéseként azt a következtetést vonjuk le, hogy TS monocitákban egy H-7-el szemben érzéketlen, de wortmanninra érzékeny PKC aktivitás van jelen, ami valószínűleg egy atípusos Ca^{2+} szignál független PKC aktiválásának köszönhető, és ami felelőssé tehető a leptin-mediált koleszterin szintézis fokozásában. TS monocitákban a Ca^{2+} szignálok emelkedését részben a leptin indukált szuperoxid anion képződés membrántranszport károsító hatásának következményeként a Ca^{2+} sérült effluxa okozza.

A Ca^{2+} homeosztázis felborulása kulcsszerepet játszik számos betegség, pl. obesitás, inzulin rezisztencia, hipertenzió és atheroszklerózis kialakulásában. A testsúly szabályozásában szerepet játszó géntermék, az agouti protein befolyásolja a Ca^{2+} belépést és az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ szintek emelkedésével gátolja a lipolízist és elősegíti a lipogenezist humán és egér adipocitákban. Mivel emberben az agouti proteint a zsírszövet is termeli, ezért hasonlóképpen fejthet ki parakrin hatásokat az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -ra így stimulálva a *de novo* lipogenezist és elősegítve az obesitás kialakulását. Eszerint a Ca^{2+} szignalizáció terápiás beavatkozási pontot jelenthet az obesításban (Zemel, 2009). A sztatinok, köszönhetően azon képességüknek, hogy a szabadgyökképződés gátlásán keresztül csökkentik az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ szintjét és csökkentik a koleszterinszintézist, fontos szerepet játszanak az obesitással kapcsolatos betegségek, pl. inzulin rezisztencia, hiperkoleszterinémia és atheroszklerózis kezelésében.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az obezitás fontos szerepet játszik számos betegség kialakulásában, melyek között az atheroszklerózis és a tumoros megbetegedések is helyet kapnak. A leptin egy zsírszövet eredetű hormon, melynek szintje túlsúly esetén emelkedett. A leptin monocitákban a gyulladáshoz vezető folyamatok és a koleszterin bioszintézis regulációért felelős.

Kísérleteinkben célul tűztük ki a leptin koncentrációfüggő hatásának vizsgálatát túlsúlyos férfiak monocitáiban (TS) és az alacsony és magas leptin koncentrációhoz tartozó koleszterinszintézist reguláló jelátviteli rendszerek feltérképezését. Vizsgáltuk ezen kívül a K és TS monociták Ca^{2+} szignáljait, NADPH oxidáz aktivációját, és a közöttük feltételezett összefüggéseket. A leptin által kiváltott kalcium és koleszterin jelátvitel vizsgálata során a monocitákat leptinnel és különböző gátlószerekkel kezeltük elő.

Eredményeink szerint a K monociták koleszterinszintézisét a leptin koncentrációfüggő bifázikus módon befolyásolta, míg TS monocitáknál a koleszterinszintézis magas leptin koncentráció hatására nem csökkent. 50 ng/ml leptin kezelés a Ca^{2+} szignált, a PI3K-t, a MAPK-t és a HMG CoA reduktázt stimulálta. K monocitákban az 500 ng/ml leptin kezelést követő koleszterinszintézis csökkenés a Ca^{2+} jeltől, a PI3K aktivációtól és a H-7 szenzitív cPKC-től függött. TS monocitákban a koleszterinszintézis szabályozásában egyedül a PI3K játszott szerepet. A TS monociták nyugalmi intracelluláris kalcium szintje magasabb volt, mint a K sejtekben. A leptin indukált kalciumváltozáshoz egy a K monocitákéhoz képest alacsonyabb csúcs és a nyugalmi szinthez történő csökkent visszatérés tartozott. TS monocitákban a Ca^{2+} szintek lassabb csökkenése miatt a Ca^{2+} szignálok a K csoporthoz képest magasabbak voltak. Az intracelluláris jelátvitel különböző gátlószereit használva azt találtuk, hogy K sejtekben a Ca^{2+} szignálok intracelluláris forrásból származtak, míg TS monocitákba a kalcium az extracelluláris térből áramlott be. A leptin-indukált szuperoxid anion képződés TS monocitákban szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a Ca^{2+} szignálokkal. Fluvasztatin a TS monociták intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ homeosztázisát teljesen helyreállította, amely pleiotropikus hatásának, a szabadgyökképződést gátló hatásának köszönhető. A sztatinek ezért nem csak koleszterinszintézist gátló hatásuk miatt, hanem antioxidáns hatásuknak köszönhetően is hasznosnak bizonyulhatnak az obezitás kezelésében.

Eredményeink a TS monociták sérült H-7 szenzitív cPKC aktivációját, PI3K mediált PKC aktivációját és a sérült kalciumcsatornák következtében emelkedett Ca^{2+} szintjeit mutatják be leptin kezelést követően. A Ca^{2+} eltérésekre a fluvasztatin kedvezően hatott.

VIII. SUMMARY

Obesity takes major part in the development of numerous diseases including atherosclerosis and cancer. Leptin is an adipose tissue derived hormone, the level of which is increased in overweight. Leptin takes part in local inflammations and in the regulation of cholesterol biosynthesis in human monocytes.

In our studies we aimed at defining the concentration dependence of the effect of leptin in monocytes of overweight men (OW), and the downstream signaling of high and low leptin concentrations targeting the regulation of cholesterol synthesis. Additionally, Ca^{2+} signals, Nox activation, and their hypothesized correlation in control and OW monocytes were investigated in our experiments. To reveal the signaling mechanisms in connection with calcium and cholesterol triggered by leptin we stimulated monocytes with leptin in the presence or absence of different inhibitors.

Our results demonstrate that the biphasic effect of control monocytes depends on concentration, while OW monocytes only presented elevated cholesterol synthesis. The stimulation with 50 ng/mL leptin induced Ca^{2+} signal, activation of PI3K, MAPK and HMG CoA reductase. The suppression of cholesterol synthesis in the control monocytes stimulated with 500 ng/mL leptin was shown to be dependent on the Ca^{2+} signal, PI3K activation and the H-7 sensitive cPKC, whereas the cholesterol synthesis in OW monocytes was only increased by PI3K. Our results demonstrate that the OW monocytes had higher basal intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ level than the control cells. On the other hand, in the OW monocytes the leptin-induced peak of the Ca^{2+} signal was lower with a delayed return to the basal level. Despite the lower Ca^{2+} peaks OW monocytes presented higher Ca^{2+} signals than control monocytes due to the delayed return to the baseline values. The Ca^{2+} signals in control monocytes originated from intracellular pools, while they were originated mostly by Ca^{2+} -influx from medium in the OW cells. Leptin induced superoxide anion generation showed significant positive correlation with Ca^{2+} signals in OW monocytes. The treatment with fluvastatin completely restored the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ homeostasis in OW monocytes. The beneficial effect of statins on elevated intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ level might be the consequence of their pleiotropic effects (e.g. inhibiting free radical generation). Statins therefore might be useful for the treatment of obesity not only due to their ability to decrease cholesterol synthesis, but their anti-oxidative effect.

Our results demonstrate that damage of H-7 sensitive cPKC activation, PI3K mediated PKC activation and elevated Ca^{2+} levels characterize the leptin-signaling in OW monocytes. Fluvastatin affected abnormal Ca^{2+} levels beneficially.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- Acosta-Martínez, M., 2011. PI3K: an attractive candidate for the central integration of metabolism and reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2:110.
- Adams, C. M., Reitz, J., De Brabander, J. K., Feramisco, J. D., Li, L., Brown, M. S., and Goldstein J. L., 2004. Cholesterol and 25-Hydroxycholesterol Inhibit Activation of SREBPs by Different Mechanisms, Both Involving SCAP and Insigs*. *J Biol Chem*. 279(50):52772-80.
- Ai, M., Otokozawa, S., Asztalos, B.F., White, C.C., Cupples, L.A., Nakajima, K., Lamon-Fava, S., Wilson, P.W., Matsuzawa, Y., Schaefer, E.J., 2011. Adiponectin: an independent risk factor for coronary heart disease in men in the Framingham offspring Study. *Atherosclerosis*. 217(2):543-8.
- Aires, V., Hichami, A., Filomenko, R., Plé, A., Rébé, C., Bettaieb, A. and Khan, N. A., 2007. Docosahexaenoic Acid Induces Increases in $[Ca^{2+}]_i$ via Inositol 1,4,5-Triphosphate Production and Activates Protein Kinase $C\gamma$ and $-\delta$ via Phosphatidylserine Binding Site: Implication in Apoptosis in U937 Cells, *Mol Pharmacol* 72:1545–1556.
- Akolkar, G., Pande, J., Samson, S.E., Grover, A.K., 2012. Thapsigargin decreases the $Na(+)$ - $Ca(2+)$ exchanger mediated $Ca(2+)$ entry in pig coronary artery smooth muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1818(3):730-7.
- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T. and Saltiel, A.R., 1995. PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489–27494.
- Babior, B. M., 2002. The Leukocyte NADPH Oxidase. *IMAJ*. 4:1023-1024
- Balla, T., 2001. Pharmacology of phosphoinositides, regulators of multiple cellular functions. *Curr. Pharm. Des.* 7, 475–507.

Balla, T., 2006. Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling, J. Endocrinol. 188, 135-153.

Balogh, Z., Fóris, G., Kosztaczky, B., Paragh Jr., G., Seres, I., Zsiros, E., et al., 2007. The concentration dependent biphasic effect of leptin on endogenous cholesterol synthesis in human monocytes. Peptides 28, 2081–2083.

Bell, R.M., Hannun, Y., Loomish, C., 1986. Mixed micell assay of protein kinase C. Methods Enzymol. 124, 353–359.

Bergson, P., Lipkind, G., Lee, S. P., Duban, M. and Hanck, D. A., 2011. Verapamil Block of T-Type Calcium Channels, Mol Pharmacol 79:411–419.

Bjorbak, C., Lavery, H.J., Bates, S.H., Olson, R.K., Davis, S.M., Flier, J.S., Myers, M.G. Jr., 2000. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. J Biol Chem.275(51):40649-57.

Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Andereden, J.P., Clausen, J.D., Dode, L., Kovács, T., Enouf, J., 2004..Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 3 gene. J. Biol. Chem. 279, 24997-24306.

Bokoch, G. M. and Diebold, B. A., 2002. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. Blood.100(8):2692-6.

Boyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 97, S77–S108.

Burns, M. and Rebeck, G. W., 2010. Intracellular cholesterol homeostasis and amyloid precursor protein processing. Biochim Biophys Acta, 1801(8): 853–859.

Calle, E.E., Thun, M.J., Petrelli, J.M., Rodriguez, C., Heath Jr., C.W., 1999. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. N. Engl. J. Med. 341, 1097-105.

Calleros, L., Lasa, M., Toro, M.J., Chiloeches, A., 2006. Low cell cholesterol levels increase NFkappaB activity through a p38 MAPK-dependent mechanism. *Cell Signal*. 2006 Dec;18(12):2292-301.

Carnevale, R., Pignatelli, P., Di Santo, S., Bartimoccia, S., Sanguigni, V., Napoleone, L., Tanzilli, G., Basili, S., Violi, F., 2010. Atorvastatin inhibits oxidative stress via adiponectin-mediated NADPH oxidase down-regulation in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 213, 225–234.

Cartwright, E.J., Oceandy, D., Neyses, L., 2009. Physiological implications of the interaction between the plasma membrane calcium pump and nNOS. *Pflugers Arch*. 457,665-71.

Cathcart, M. K., 2004. Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/Macrophages: Contributions to Atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ;24:23-28.

Cicero, A.F., Magni, P., Moré, M., Ruscica, M., Dozio, E., Steffani, L., Borghi, C., Strollo, F., 2011. Adipokines and sexual hormones associated with the components of the metabolic syndrome in pharmacologically untreated subjects: data from the brisighella heart study. *Int J Endocrinol*. 2011:724816.

Cohen, H.J., Chovaniek, M.E., 1978. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. *J. Clin. Invest*. 61, 1088-1096.

Cook, S.J., Beltman, J., Cadwallader, K.A., McMahon, M. and McCormick, F., 1997. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca²⁺-dependent signal pathways in Rat-1 cells. *J Biol Chem* 272:13309–13319.

Dai, S., Hall, D. D. and Hell J. W., 2009. Supramolecular Assemblies and Localized Regulation of Voltage-Gated Ion Channels, *Physiol Rev* 89: 411–452.

Dang M. Nguyen and Hashem B. El-Serag: The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010; 39(1): 1–7.

Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M.N., Berra, E., Hay, R.T., Sturgill, T.W., Moscat, J., 1994. ξ PKC induces phosphorylation and inactivation of I κ B- α in vitro. *EMBO J.* 13, 2842–2848.

Diebold, B.A., Bokoch, G.M., 2005. Rho GTPases and the control of the oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 291, 91-111.

Donato, J., Jr., Frazão, R. and Elias C. F., 2010. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 54(7):591-602. Review.

Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J. and Saltiel, A.R., 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7686–7689.

Fain, J.N., 2010. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm.* 2010:513948.

Fawcett, K. A. and Barroso, I., 2010. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet.* 26(6):266-74.

Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sánchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., Morales-González, J.A., 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.*;12, 3117-32.

Fonyó, A., Ligeti, E., 2008. Az orvosi élettan tankönyve. *Medicina Könyvkiadó Zrt.* 22, 341-353.

Fortuño, A., Bidegain, J., Baltanás, A., Moreno, M.U., Montero L., Landecho, M.F., Beloqui, O., Díez, J., Zalba, G., 2010. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. *Hypertens.* 28,1944-50.

Fóris, G., Paragh, G., Dezső, B., Keresztes, T., Balogh, Z., Szabó, J., 1998. Altered postreceptor signal transduction of formyl-Met-Leu-Phe receptors in polymorphonuclear leukocytes of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86, 95-101.

Franzoni, F., Quinones-Galvan, A., Regoli, F., Ferrannini, E., Galetta, F., 2003. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *International Journal of Cardiology.* 90, 317–321.

Freeze, B.S., McNulty, M. M. and Hanck D. A., 2006. State-Dependent Verapamil Block of the Cloned Human $\text{Ca}_v3.1$ T-Type Ca^{2+} Channel, *Mol Pharmacol* 70:718–726.

Fritz, G., 2009. Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy, *Curr. Cancer Drug Targets.*9:626-38.

Frühbeck, G., 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin, *Biochem. J.* 393, 7-20.

Fülöp, T., Jacob, M.P., Varga, Z., Foris, G., Leövey, A., 1986. Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca^{2+} mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 141, 92-98.

Fülöp Jr., T., Hauck, M., Worum, I., Foris, G., Leovey, A., 1987. Alterations of the FMLP-induced Ca^{2+} efflux from human monocytes with aging. *Immunol. Lett.* 14, 283-286.

Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T., McLaughlin, S., 1989. Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). *Biochim Biophys Acta.* 979(1):105-12.

Gao, P., Wu, X., Shui, H., Jia, R., 2012. Fluvastatin inhibits angiotensin II-induced nuclear factor kappa B activation in renal tubular epithelial cells through the p38 MAPK pathway. *Mol Biol Rep.* 39(4):4719-25.

Gautron, L. and Elmquist, J.K., 2011. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance, *J Clin Invest.* 121(6):2087–2093.

Gerasimenko, O., Gerasimenko, J., 2004. New aspects of nuclear calcium signaling. *J. Cell. Sci.* 117, 3087-3094.

Gopalakrishna, R., Barsky, S.H., Thomas, T.P., Andersson, W.B., 1986. Factors influencing chelator stable detergent extractable phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 261, 16438–16445.

Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 461S–465S.

Howard, J.K., Flier, S.F., 2006. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 365–371.

Hwang, M.N., Ha, T.H., Park, J., Shim, J., Lee, H., Kim, Y.N., Lee, E.S., Yoon, S., 2007a. Increased SOCS6 stability with PMA requires its N-terminal region and the Erk pathway via PKC delta activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 184–189.

Hwang, M.N., Kim, K.S., Choi, Y.W., Jou, I., Yoon, S., 2007b. PMA activates Stat3 in the Jak/Stat pathway and induces SOCS5 in rat brain astrocytes. *Mol. Cell* 23, 94–99.

Inoue, I., Itoh, F., Aoyagi, S., Tazawa, S., Kusama, H., Akahane, M., Mastunaga, T., Hayashi, K., Awata, T., Komoda, T., Katayama, S., 2002. Fibrate and statin synergistically increase the transcriptional activities of PPARalpha/RXRalpha and decrease the transactivation of NFkappaB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 131–139.

Israel, D. and Chua, S. Jr., 2010. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility, *Trends Endocrinol Metab.* 21(1): 10.

Jacob, M.P., Fülöp, T., Foris, G., Robert, L., 1987. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 995-999.

Juge-Aubry, C.E., Meier, C.A., 2002. Immunomodulatory actions of leptin. *Mol Cell Endocrinol.* 194(1-2):1-7.

Juge-Aubry, C.E., Somm, E., Chicheportiche, R., Burger, D., Pernin, A., Cuénod-Pittet, B., Quinodoz, P., Giusti, V., Dayer, J.M., Meier, C.A., 2004. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6):2652-8.

Kang, S., Kwon, H., Wen, H., Song, Y., Frueh, D., Ahn, H., Yoo, S. H., Wagner, G. and Park, S., 2011. Global dynamic conformational changes in the suppressor domain of IP3 receptor by stepwise binding of the two lobes of calmodulin, *FASEB J.* 25(3):840-50.

Kannan, K.B., Barlos, D., Hauser, C.J., 2007. *J Immunol.* Free cholesterol alters lipid raft structure and function regulating neutrophil Ca^{2+} entry and respiratory burst: correlations with calcium channel raft trafficking. 178(8):5253-61.

Kheifets, V. and Mochly-Rosen, D., 2007. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function, *Pharmacol Res.* 55(6): 467–476.

Koh, K.K., Park, S.M., Quon, M.J., 2008. Leptin and Cardiovascular Disease : Response to Therapeutic Interventions. *Circulation.* 117, 3238-3249.

Kosztáczky, B., Fóris, G., Seres, I., Balogh, Z., Fülöp, P., 2006. Neuropeptides induces a pronounced and statin-sensitive dysregulation of mevalonate cycle in human monocytes of patients with hypercholesterolemia. *Neuropeptides* 40, 309-316.

Kosztáczky, B., Fóris, G., Paragh Jr., G., Seres, I., Zsiros, E., Koncsos, P., Balogh, Z.,

Paragh, G., 2007. Leptin stimulates endogenous cholesterol synthesis in human monocytes: new role of an old player in atherosclerotic plaque formation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1637–1645.

Kourie, J.L., 1998. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275, C1-24.

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

Lenz, M., Richter, T., Mühlhauser, I., 2009. The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review. *Dtsch Arztebl Int.* 106(40):641-8.

Leybaert, L., Sanderson, M.J., 2012. Intercellular Ca^{2+} waves: mechanisms and function. *Physiol Rev.* 92(3):1359-92.

Li, Q, Tallant, A, Cathcart, MK., 1993. Dual Ca^{2+} requirement for optimal lipid peroxidation of low density lipoprotein by activated human monocytes. *J Clin Invest.* 91:1499–1506.

Lobenhofer, E.K., Huper, G., Iglehart, J.D., Marks, J.R., 2000. Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. *Cell Growth Differ* 11:99-110.

Locht, C., Coutte, L., Mielcarek, N., 2011. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J.* 278(23):4668-82.

Ma, K. L., Ruan, X. Z., Powis, S. H., Chen, Y., Moorhead, J. F., and Varghese, Z., 2008. Inflammatory Stress Exacerbates Lipid Accumulation in Hepatic Cells and Fatty Livers of Apolipoprotein E Knockout Mice. *HEPATOLOGY*;48:770-781.

Mandosi, E., Fallarino, M., Gatti, A., Carnovale, A., Rossetti, M., Lococo, E., Buchetti, B., Filetti, S., Lenti, L., Morano, S., 2010. Atorvastatin downregulates monocyte CD36 expression, nuclear NFkappaB and TNFalpha levels in type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb.* 17(6):539-45.

Mangmool, S. and Kurose H, 2011. G_{i/o} Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins*, 3, 884-899.

McNamara, D. J., Davidson, N. O. and Fernandez, S., 1980. In vitro cholesterol synthesis in freshly isolated mononuclear cells of human blood: effect of in vivo administration of clofibrate and/ or cholestyramine, *J Lipid Res.* 21(1):65-71.

McNamara, D. J., Boch, C.A., Botha, A., Mendelsohn, D., 1985. Sterol synthesis in vitro in freshly isolated blood mononuclear leukocytes from familial hypercholesterolemic patients treated with probucol. *Biochem. Biophys. Acta* 833, 412–419.

Mei, S., Gu, H., Ward, A., Yang, X., Guo, H., He, K., Liu, Z., Cao, W., 2012. p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) promotes cholesterol ester accumulation in macrophages through inhibition of macroautophagy. *J Biol Chem.* 287(15):11761-8.

Munzberg, H., 2010. Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Forum Nutr.* 63:123-32.

Myers, M.G. Jr., Leibel, R.L., Seeley, R.J. and Schwartz, M.W., 2010. Obesity and Leptin Resistance: Distinguishing Cause from Effect, *Trends Endocrinol Metab.* 21(11): 643–651.

Narayana, Y., Bansal, K., Sinha, A.Y., Kapoor, N., Puzo, G., Gilleron, M., Balaji, K.N., 2009. SOCS3 expression induced by PIM2 requires PKC and PI3K signaling. *Mol Immunol.* 46(15):2947-54.

Nohturfft, A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1998. Topology of SREBP cleavageactivating protein, a polytopic membrane protein with sterol-sensing domain. *J. Biol. Chem.* 273, 17243–17250.

Oswa, A. and Yeo, G., 2010. Leptin and the Control of Body Weight: A Review of Its Diverse Central Targets, Signaling Mechanisms, and Role in the Pathogenesis of Obesity, *Obesity* 18 2, 221–229.

Pandey, D. and Fulton, D. J. R., 2011. Molecular regulation of NADPH oxidase 5 via the MAPK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300:H1336-H1344.

Paragh, G., Kovacs, E., Seres, I., Keresztes, T., Balogh, Z., Szabó, J., Teichmann, F., Fóris, G., 1999. Altered signal pathway in granulocytes from patients with hypercholesterolemia. *J. Lipid. Res.* 40, 1728-1733.

Paragh, G., Szabó, J., Kovacs, E., Keresztes, T., Karpati, I., Balogh, Z., Páll, D., Fóris, G., 2002. Altered signal pathway in angiotensin II-stimulated neutrophils of patients with hypercholesterolemia. *Cell. Signal.* 14, 787-792.

Paragh, G., Balogh, Z., Kovacs, E., Szabolcs, M., Szabó, J., Csapo, K., Foris, G., 2003. Disturbed regulation of cholesterol synthesis in monocytes of obese patients with hypercholesterolemia. *Metabolism* 52, 1–6.

Patthy, M., Balla, T., Arányi, P., 1990. High performance reversed-phase ion pair chromatographic study. *J. Chromatography.* 523, 201-216.

Procaccini, C., Jirillo, E., Matarese, G., 2012. Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med.* 33(1):35-45.

Pumiglia, J.M. and Decker, S.J., 1997. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogenactivated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:448–452.

Putney, J.W. Jr., 2007. Recent Breakthroughs in the Molecular Mechanism of Capacitative Calcium Entry (With Thoughts on How We Got Here). *Cell Calcium.* 42(2):103-10.

Putney, J.W., 2011. The Physiological Function of Store-operated Calcium Entry. *Neurochem Res.* 36(7): 1157–1165.

Rebecchi, M. J. and PENTYALA, S.N., 2000. Structure, Function, and Control of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C *Physiological Reviews*, Vol. 80, No. 4.

Recio-Rodriguez, J.I., Gomez-Marcos, M. A., Patino-Alonso, M.C., Agudo-Conde, C., Rodriguez-Sanchez, E., Garcia-Ortiz, L., 2012. Abdominal obesity vs general obesity for identifying arterial stiffness, subclinical atherosclerosis and wave reflection in healthy, diabetics and hypertensive. *BMC Cardiovasc Disord.* 12:3.

Robinson, M.J., Cobb, M.H., 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186.

Ruan, X.Z., Moorhead, J.F., Tao, J.L., Ma, K., Wheeler, D.C., Powis, S.H., et al., 2006. Mechanism of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1150–1155.

Rüdiger, S., Jung, P., Shuai, J., 2012. Termination of Ca^{2+} Release for Clustered IP_3R Channels, *PLoS Comput Biol.* 8(5):e1002485.

Sacksteder, C.A., Whittier, J.E., Xiong, Y., Li, J., Galeva, N.A., Jacoby, M.E., Purvine, S.O., Williams, T.D., Rechsteiner, M.C., Bigelow, D.J., Squier, T.C., 2006. Tertiary structural rearrangements upon oxidation of Methionin 145 in calmodulin promotes targeted proteosomal degradation. *Biophys. J.* 91, 1480-1493.

Scarpace, P.J., Zhang, Y., 2007. Elevated leptin: consequence or cause of obesity? *Front Biosci.*12:3531-44.

Schepers, E., Glorieux, G., Dhondt, A., Leybaert, L., Vanholder, R., 2009. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 1429–1435.

Seres, I., Foris, G., Pall, D., Kosztaczky, B., Paragh Jr., G., Varga, Z., Paragh, G., 2005. Angiotensin II-induced oxidative burst is fluvastatin sensitive in neutrophils of patients with hypercholesterolemia. *Metabolism.* 54, 1147-1154.

Seres, I., Foris, G., Varga, Z., Kosztaczky, B., Kassai, A., Balogh, Z., Paragh, G., 2006. The association between angiotensin II-induced free radical generation and membrane fluidity in neutrophils of patients with metabolic syndrome. *J. Membr. Biol.* 214, 91–98.

Seres, I., Foris, G., Kovacs, E., Pall, D., Varga, Z., Balogh, Z., Paragh, G., 2007. Crosstalk of sterol-dependent and non-sterol-dependent signaling in human monocytes after in vitro addition of LDL. *Cell Biochem. Funct.* 25, 55–62.

Séron, K., Corset, L., Vasseur, F., Boutin, P., Gomez-Ambrozi, J., Salvador, J., Frübeck, G., Froguel, P., 2006. Distinct impaired regulation of SOCS3 and long and short isoforms of the leptin receptor in visceral and subcutaneous fat of lean and obese woman. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1232–1238.

Shi, H., Dirienzo, D., Zemel, M.B., 2001. Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. *FASEB J.* 15, 291-293.

Souvannakitti, D., Nanduri, J., Yuan, G., Kumar, G.K., Fox, A. P. and Prabhakar N. R., 2010. NADPH Oxidase-Dependent Regulation of T-Type Ca^{2+} Channels and Ryanodine Receptors Mediate the Augmented Exocytosis of Catecholamines from Intermittent Hypoxia-Treated Neonatal Rat Chromaffin Cells. *The Journal of Neuroscience*, 30(32):10763–10772.

Stark, G., 2005. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J. Membr. Biol.* 205, 1-6.

Sun, L.P., Seemann, J., Goldstein, J. L. and Brown, M. S., 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(16): 6519–6526.

Sun, C., Wang, L., Yan, J., Liu, S., 2012. Calcium ameliorates obesity induced by high-fat diet and its potential correlation with p38 MAPK pathway. *Mol Biol Rep.* 39(2):1755-63.

Visnjic, D., Banfic, H., 2007. Nuclear phospholipid signaling: phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase, *Pflugers Arch.* 455:19-30.

Wang, F., Duan, R., Chirgwin, J., Safe, S.H., 2000. Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by growth factors. *J Mol Endocrinol* 24:193-202.

Wang, C.Y., Liu, P.Y. and Liao J. K., 2008. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med.* 14(1): 37–44.

Watters, J.J., Chun, T-Y., Kim, Y-N., Bertics, P.J., Gorski, J., 2000. Estrogen modulation of prolactin gene expression requires an intact mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured rat pituitary cells. *Mol Endocrinol* 14:1872-1881.

World Health Organization, 2012. Obesity and Overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> .

Wu, D., Huang, C.K., Jiang, H., 2000. Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. *J. Cell. Sci.* 113, 2935-2940.

Yan, K., Deng, X., Zhai, X., Zhou, M., Jia, X., Luo, L., Niu, M., Zhu, H., Qiang, H., Zhou, Y., 2012. p38 mitogen-activated protein kinase and liver X receptor- α mediate the leptin effect on sterol regulatory element binding protein-1c expression in hepatic stellate cells. *Mol Med.* 18(1):10-8.

You, J., Yu, Y., Jiang, L., Li, W., Yu, X., Gonzalez, L., Yang, G., Ke, Z., Li, W., Li, C. and Liu, Y., 2010. Signaling through Tyr985 of Leptin Receptor as an Age/Diet-Dependent Switch in the Regulation of Energy Balance. *Mol Cell Biol.* 30(7): 1650–1659.

Zemel, M.B., 2002. Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 146S-151S.

Zemel, M.B., 2009. Proposed role of calcium and dairy food components in weight management and metabolic health. *Phys Sportsmed.* 37(2):29-39.

Zhou, Q., Liao, J.K., 2010. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ. J.* 74:818-26.

Iktatószám: DEENKÉTK/259/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Padra János Tamás

Neptun kód: TNBUFO

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Padra, J.T.**, Seres, I., Fóris, G., jr. Paragh, G., Kónya, G., Paragh, G.: Leptin triggers Ca(2+) imbalance in monocytes of overweight subjects.
Neuropeptides. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2012.07.002>
IF:1.553 (2011)
2. Balogh, Z., Fóris, G., Kónya, G., jr. Paragh, G., Köbling, T., **Padra, J.T.**, Sarang, Z., Paragh, G.: Obesity abrogates the concentration-dependent effect of leptin on endogenous cholesterol synthesis in human monocytes.
Immunobiology. 216 (3), 431-435, 2011.
IF:3.205



További Közlemények

3. Sztanek, F., Seres, I., Harangi, M., Lőcsey, L., **Padra, J.T.**, jr. Paragh, G., Asztalos, L., Paragh, G.:
Decreased human paraoxonase-1 (PON1) lactonase activity in hemodialyzed and renal
transplanted patients. A novel cardiovascular biomarker in end-stage renal disease.
Nephrol. Dial. Transplant. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr753>
IF:3.396 (2011)
4. Fekete, E., **Padra, J.T.**, Szentirmai, A., Karaffa, L.: Lactose and D-galactose catabolism in the
filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 55 (2), 119-124, 2008.

Összesített impakt faktor: 8.154

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4.758

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok
bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports
Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.08.21



X. FÜGGELÉK

Tárgyszavak

Leptin, Obezitás, Kalcium, Ca^{2+} jel, Koleszterol szintézis, Intracelluláris jelátvitel, Monocita, Fluvasztatin

Keywords

Leptin, Obesity, Calcium, Ca^{2+} Signal, Cholesterol synthesis, Intracellular signaling, Monocyte, Fluvastatin

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Paragh György Professor Úrnak témavezetői munkájáért, szellemi iránymutatásáért és kutató munkám feltételeinek biztosításáért. Külön köszönöm, hogy lehetővé tette részvételemet egy kínai tanulmányúton és a göteborgi konferencián, amellyel szakmai fejlődésemet tovább segítette. Köszönöm Dr. Seres Ildikó Tudományos Főmunkatárs munkáját, akihez az I. Belgyógyászati Klinikán eltöltött évek során bármikor fordulhattam segítségért, és akivel a közös munka nem csak hasznosan, hanem kellemesen is telt. Hálával tartozom Dr. Balogh Zoltánnak a koleszterinszintézis vizsgálata kapcsán nyújtott segítségéért. Köszönet illeti továbbá Fóris Gabriella Professor Asszonyt és Kertai Pál Professor Urat a közösen elért eredményekért, hasznos szakmai tanácsaikért és segítőkészségükért. Köszönöm az I. sz Belgyógyászati Klinika minden olyan dolgozójának segítségét, akik munkámat könnyebbé tették.

Külön köszönetet érdemel feleségem, aki rengeteg segítséggel és támogatással tette könnyebbé és szebbé „Ph.D.-s” éveimet. Köszönettel tartozom szüleimnek, hogy biztos hátteret teremtettek számomra a tanulmányaim elvégzéséhez és hogy mindig mindenben támogattak.

Vizsgálatainkat az OTKA (K63025), a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

XI. RÖVIDÍTÉSEK

AA	arachidonsav
AC	adenilil-cikláz
AgRP	agouti-related protein
Akt	protein kináz B
AngII	angiotenzin-II
ANOVA	varianciaanalízis, one-way analysis of variance
ApoA	apolipoprotein A
ApoB	apolipoprotein B
AUC	görbe alatti terület
BSA	Bovine Serum Albumin
BMI	Body Mass Index
CaMKII	kalmodulin kináz II
cPKC	konvencionális proteinkináz C
mPKC	membránhoz kötött proteinkináz C
cPLA	citoszolikus foszfolipáz A
DAG	diacil-glicerol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilénglikol-tetraecetsav
ER	endoplazmatikus retikulum
ERK 1/2	extracelluláris szignál regulált kináz
Flu	fluvasztatin
FMLP	N-formil-metionil-leucil-phenilalanin
FOXO1	forkhead box O1
FPP	farnezil-pirofoszfát
FTO	fat mass and obesity-associated protein
GGPP	geranil-geranil-pirofoszfát
GPCR	G _{i/o} protein kapcsolt receptor
GRB-2	growth factor receptor-bound protein 2
HBSS	Hank's Balanced Salt solution
25-HC	25-hidroxikoleszterin
HMG-CoA	3-hidroxil-3-metil-glutaril-Koenzim A
HVA	high voltage activated (calcium channel)

IL-6	interleukin 6
IL-12	interleukin 12
Ins(1,4,5)P3	inozitol (1,4,5)- triszfoszfát
Insig-1	insulin-induced gene 1
Insig-2	insulin-induced gene 2
IRS-1	inzulin receptor szubsztrát 1
IRS-2	inzulin receptor szubsztrát 2
JAK/STAT	Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription útvonal
K	normál testsúlyú férfiakból izolált „kontroll” monociták
KIR	központi idegrendszer
LDL	low density lipoprotein
LEP-Rb	hosszú izoformájú leptin receptor
Lp	leptin
LVA	low voltage activated (calcium channels)
MAP	mitogen activated protein
MEK	mitogén-aktivált protein-kináz kináz
MS	metabolikus szindróma
MSK1	mitogen- and stress activated protein kinase1
Neom	neomycin
NFκB	nuclear factor-kappa-B
Nox	NADPH oxidáz
NPY	neuropeptid Y
PDK-1	foszfoinozitol-dependens kináz-1
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PIAS3	protein inhibitor of activated STAT
PIP2	foszfatidilinozitol (4,5)-biszfoszfát
PIP3	foszfatidilinozitol (3,4,5)-triszfoszfát
PKC	proteinkináz C
PLC	foszfolipáz C
POMC	proopiomelanocortin
PTH	parathormon
PTP1B	protein tirozin foszfatáz 1B
PTX	pertusszisz toxin
ROS	reactive oxygen species

RyRs	rianodin receptorok
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SEM	standard error of the mean
SNP	single nucleotide polymorphism
SOC	store-operated calcium
SOCS3	suppressor of cytokine signaling3
SREBP	sterol regulatory element binding protein
TG	thapsigargin
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TS	túlsúlyos férfiakból izolált monociták
WHO	World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet
WHR	derék-csípő arány
WMN	wortmannin