

## Az apelin/APJ receptor rendszer szerepe humán endotheliális progenitor sejtekben 2007-2010. szakmai záróbeszámoló, OTKA F67919

---

### Háttér

A mortalitási és morbiditási statisztikák első helyén a szív és érrendszeri betegségek állnak, ezért kialakulásuk molekuláris hátterének megismerése fontos kutatási terület. Kifejlődésükben mechanikai-hemodinamikai tényezők és neuroendokrin faktorok egyaránt szerepet játszanak. A szabályozó rendszer egy új eleme az angiotenzin receptor-szerű 1 (APJ) receptor és endogén ligandja, az apelin, szerepük a szív és érrendszerben ugyanakkor csak részben ismert. Az apelin a szívszövetben és az érfali endotheliumban is kimutatható. Az APJ receptor és az apelin szerepet játszik az érfejlődés szabályozásában, az apelin hypotenzív hatású, az endotheliumban mitogén aktivitású. Ez felveti, hogy az apelin/APJ receptor jelátvitelnek szerepe lehet az angiogenezisben és a sérült endothelium pótlásában. Vizsgálatainktól azt vártuk, hogy sikerül az apelin szív és érrendszerre, az endotheliumra gyakorolt fiziológiás és patológiás hatásairól és szerepéről egy átfogó képet kapnunk egészségesekben és szívelégtelenségben. Az apelin kardiovaszkuláris hatásainak jellemzése és szívbetegségekben való leírása új terápiás támadáspontot jelenthet a szívbetegségekben.

### Eredmények rövid ismertetése:

#### 1. Apelin diabeteses bal kamrai dysfuncióban. Állatkísérletek

Az apelin szerepét egyfelől egy állatkísérletes diabeteses szívbetegség modellben jellemeztük. A bal kamrai dysfunció kísérletes vizsgálatára kontroll és streptozotocinnal-indukált diabeteses patkányokban (n=15 csoportonként) szubkután implantált ozmotikus minipumpák segítségével angiotenzin II infundáltunk 24 órán keresztül. A vizsgálat végén a bal kamrákat és a plazmát szeparáltuk további vizsgálatokra. A modell ellenőrzésére a szív súly/ testsúly arányokat, a biokémiai markerek közül az atrialis natriuretikus peptid (ANP) génexpresszióját határoztuk meg. A hemodinamikai paramétereknek az online telemetriával korábban jellemzett eredményeket használtuk fel. Az apelin és az APJ receptor mRNS szinteket real time kvantitatív PCR technikával határoztuk meg; az ANP szívbeli génexpressziójának vizsgálatához Northern blot analízist használtunk.

- A bal kamrai apelin and APJ mRNS expressziók 50% és 63%-kal alacsonyabbak voltak a streptozotocinnal kezelt állatokban, mint a kontrollokban ( $P < 0.001$ ).
- A bal kamrai APJ mRNS szintek fordított összefüggést mutatnak a bal kamrai tömeggel ( $r = -0.58$ ,  $P < 0.001$ ) és az ANP mRNS szintjeivel ( $r = -0.61$ ,  $P < 0.001$ ).
- Az angiotenzin II infúziók hatására bekövetkezett expresszió-fokozódás a kontroll és diabeteses állatokban nem mutatott különbséget (1. ábra).
- A bal kamrai apelin mRNS szintekben mért változások függetlenek voltak a szérum koleszterin, triglicerid szintektől kontroll és diabeteses állatokban egyaránt.
- Sejtkultúrában tartott patkány kamrai szívizomsejtekben az APJ receptor mRNS szintek hyperglykémia hatására szignifikáns csökkenést mutatnak, ugyanakkor az apelin expressziója változatlan marad. Az in vitro és in vivo eredmények közötti korreláció összességében az endotheliális apelin termelődés mellett a szívizomsejtek szívszöveti átépülésben betöltött szabályozó szerepét valószínűsíti.

#### 2. Apelin és diabetes. Apelin plazmaszintek szívkatéterezésre került betegekben

Hasonló eredményeket kaptunk diabeteses szívbeteg klinikai vizsgálata során is. A Balatonfüredi Állami Kórházban szívkatéterezésre került szívbetegből (n=86) levett vérből plazmát szeparáltunk, majd elvégeztük az extrakciót. Az apelin szintek meghatározása az apelin-36 ELISA kit-tel történt. Az apelin és számos klinikai és humorális paraméter összefüggését vizsgáltuk. Eredményeink szerint az

apelin expressziója a diabetesben és szívbetegségekben szenvedőkben szignifikáns összefüggést mutat. A mért apelin-36 szintek: normál glükóz toleranciájú betegekben:  $7.6 \pm 2.06$  ng/ml; IGT:  $5.05 \pm 4.45$ ; 2-típusú diabetesben:  $6.68 \pm 2.53$ ; a teljes diabeteses (IGT+DM2T) populációban:  $6.83 \pm 2.79$  ng/ml, amely összességében az apelin csökkent termelődését mutatja diabetesben. Összefüggés volt kimutatható az apelin és olyan klinikai változók, mint a keringő leptin-szintek ( $p < 0.05$ ), HOMA szintek ( $p < 0.001$ ), DKK-1 szintek ( $p < 0.05$ ), usCRP ( $p < 0.05$ ), szisztolés vérnyomás ( $p < 0.05$ ) és különböző csontmarkerek, így pl. a BMD L1-4 szintek ( $p < 0.01$ ) között. Az arteriosclerosis súlyosságával (catheter score) nem volt kimutatható kapcsolat.

### 3. Apelin és mikrocirkuláció. Laser Doppler mérések

A perifériás mikrocirkuláció és az endothel funkció (vaszkuláris reaktivitás, mikrocirkulációs zavar) vizsgálatára a laser Doppler áramlásmérést alkalmaztunk. A műszer validálását követően, az első vizsgálatokat kontrollokon a Semmelweis Egyetem I. Belgyógyászati Klinika Keringés Laboratóriumában végeztük. Az endothelfunkció becslése specifikus stimulusokra adott vazodilatáció meghatározásával történt. A bőrbe juttatott apelin, illetve a kontroll acetilkolin által kiváltott áramlásnövekedést, szisztémás hatás nélkül, noninvaszív módon laser Dopplerrel kombinált iontophoresis metódikávközvetlenül mértük. A Perilont mikrofarmakológiai rendszer segítségével a bal alkaron elhelyezett fűthető, gyógyszeradagoló elektródával apelin-36-ot ill. apelin-13-at iontophoretizáltunk  $10^{-12}$ , és  $10^{-7}$  mol/l ( $6.94 \times 10^{-13}$ , és  $10^{-8}$  g apelin-36, 0.5-ml végtérfogat; 0.1 mA, 30 sec és 0.16 mA, 30 sec) dózisban egészséges kontrollok ( $n=5$ ) alkarjába.

- Kontrollként 1 %-os ACh oldatot vittünk a bőrbe 30 sec alatt, 0.1 mA áramerősséggel, majd 2 perc elteltével 30 sec alatt, 0.16 mA áramerősséggel.
- Rögzítettük a nyugalmi áramlást, majd a hyperaemiás görbét a csúcsáramlás lezajlását követően 2 percig.  $10^{-7}$  mol/l apelin-13 hatására tranzienst, 3-5 perc alatt lecsengő áramlásfokozódást detektáltunk két esetben, míg 3 esetben szignifikáns apelin hatás nem volt detektálható.
- A vizsgálat második felében beválasztott 2 szívelégtelen beteg esetében az apelin egészségesekben perfúzió fokozó hatása nem volt detektálható.

### 4. Endothelialis progenitor sejtek mérése és izolálása

A keringő endothelialis progenitor sejteknek (EPS) szerepe lehet a neoangiogenezisben. A csontvelőből a sejtek a keringésbe kerülnek, differenciálódnak, és részt vehetnek a sérült endothelium pótlásában. Az EPS csökkent csontvelői mobilizációja szív és érrendszeri megbetegedésekhez vezethet; a csökkent keringő EPS szám fokozott rizikót jelent koszorúér-betegségben. Feltételeztük, hogy apelin befolyásolja az EPS kifejezettebb mobilizációját, differenciálódását és működését. A krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegek és kontroll személyek beválasztását és mintavételt a Gottsegen Országos Kardiológiai Intézetben és a Semmelweis Egyetem I. Belgyógyászati Klinikán végeztük el ( $n=25$  beteg, ill. 26 egészséges, hasonló életkorú egészséges kontroll). Az EPS szeparációs technika beállítását, a vizsgálni kívánt sejtpopuláció fluoreszcencia aktivált szeparálását, a specifikus sejt felszíni markerek expressziójának, így a KDR (VEGF-receptor), a CD133, valamint az APJ receptor meghatározását, és a szeparált sejtek fagyasztásos tárolását az MTA Enzimológiai Intézetében végeztük el (2. ábra). Jellemeztük a flow cytometriás értékek, a hemodinamikai, valamint részletes klinikai és laboratóriumi paraméterek statisztikai összefüggéseit. A sejtekből RNS-t izoláltunk, majd a cDNS-ből az apelin és APJ receptor PCR reakciót végeztünk.

A keringő KDR/CD133 sejtek száma a szívelégtelen és kontroll csoportokban szignifikánsan nem különbözött, a keringésből szeparált sejtek száma és a klinikai változók között nem volt összefüggés kimutatható. A kvantitatív RT-PCR analízis és flow cytometria alapján megállapítottuk, hogy az APJ receptor igen alacsony mRNS expressziót és sejt felszíni immunogenitást mutat az EPC sejtekben. Az apelin protein expressziója Western blottal ugyanakkor nem volt detektálható. A sejt felszíni APJ

receptor immunogenitás csökkenő tendenciát mutat szívelégtelenségben, azonban nem mutatott szignifikáns összefüggést a szívelégtelenség súlyosságával és becsült prognózisával (NYHA, Seattle score), a betegség etiológiájával, a betegek nemével, a gyógyszerelésükkel és más klinikai laboratóriumi változókkal.

Az EPC sejt kultúrában is tarthatóak. NYHA 3-as stádiumú szívelégtelen betegekből és egészséges kontrollokból sejteket szortoltunk, majd további szaporításukat a SE Kardiológiai Központ laborjában végeztük. A sejteket a szortolást követően EGM-2 médiumban növesztettük. A G-protein kapcsolt receptorok, valamint a továbbiakban tervezett, apelin jelátvitelért részben felelős foszfatidil-inozitol 3 kináz jelátviteli mechanizmusok microarray jellemzése a zárójelentés benyújtásakor még folyamatban van.

### **5. Humán embrionális őssejtből differenciált endotheliális progenitorsejtek (hESC-EC)**

A keringésben alacsony számban előforduló endotheliális progenitorokat (ill. ezekhez hasonló endotheliális sejteket) laboratóriumi körülmények között nagy mennyiségben is elő tudtuk állítani. Az Imperial College Londonnal együttműködésben ehhez differenciálatlan H7 humán embrionális őssejteket Activin és BMP4 citokinekkal kezeltük, majd a differenciált sejt kultúrából CD31 antitesttel megjelölt sejteket sejtszeparálással (FACS) válogattuk ki. A hESC-EC-eket morfológia, acetilált-LDL felvétel, CD31 és von Willebrand faktor markerek, valamint endothel specifikus gének (eNOS, angiopoietin-2, endothelin) expressziójával jellemeztük. Igazoltuk, hogy a felnőtt endothel sejtekhez hasonlóan a hESC-EC kapillárisokat képez Matrigelen (3. ábra).

Automatizált fluoreszcens mikroszkópos technikával (Cellomics arrayscan) megfigyeltük, hogy a PI3K/Akt inhibitor LY294002 csökkenti a képzett kapillárisok komplexitását, területét és hosszát *in vitro*. Az LY294002 emellett csökkenti a proliferáló hESC-EC sejtek arányát a kontrollokhöz képest. A sejtek életképességét és az indukálható sejthalál mértékét a PI3K/Akt jelátviteli út modulálása nem módosította. Részben tisztáztuk a jelátvitelben fontos szerepet játszó további összetevők jelentőségét. A PI3K/Akt jelátviteli út többek között befolyásolja FOXO1A és FOXO3A transzkripció faktorok működését, melyek fontos szerepet játszanak a sejtek proliferációjának és metabolismusának szabályozásában, valamint az apelin és más G-protein-függő jelátviteli folyamatokban. Az LY294002 fokozza a FOXO1A nukleáris transzlokációját, és kvantitatív PCR-rel detektálható volt a FOXO1A mRNS megnövekedett szintje is, amely a FOXO1A többszintű aktivációjára utal. A FOXO3A sejten belüli eloszlására az LY294002 nem volt hatással. Eredményeink szerint a PI3K/Akt jelátviteli út fontos szerepet tölt be a hESC-EC proliferációjában és *in vitro* angiogenezisben. Automatizált mikroszkópos rendszert alkalmazva azt is megállapítottuk, hogy az apelin-13 kezelés közvetlenül nem befolyásolja a FOXO transzkripció faktor nukleáris aktiválódását és transzportját embrionális őssejt-eredetű endothelsejteken és 24 órás kezelésnek nincs hatása az őssejt-eredetű endotheliális progenitorok proliferációjára.

Kimutattuk, hogy az apelinnel ellentétben, az azzal homológiát mutató angiotensinogen magas expressziós aktivitást mutat az őssejt-eredetű endotheliális progenitorokban. Az őssejtekből képzett endotheliális progenitor sejteket angiotensin II-vel, angiotensin II konvertáz inhibitor captoprillal, valamint angiotensin receptor antagonistá losartannal kezeltük. Az angiotensin II a sejtek proliferációját, apoptózisát, életképességét nem befolyásolta. A losartan gátolta a sejtek indukálható sejthalálát, apoptózisát, és az *in vitro* angiogenezis kapacitását (Matrigel assay, csökkent angiopoietin 2 mRNS szintek), ami az angiotensin II 1. típusú receptor állandó aktivitására és annak funkcionális szerepére utal ezekben a sejtekben.

Eredményeink emellett az őssejt eredetű endotheliális progenitorok és felnőtt endothelium eltérő receptormintázatát, természetes immunválasz jelátviteli folyamataiban mérhető alacsonyabb válaszképességet (NFκB transzkripció faktor, citokin-termelődést) igazolták. A sejtek a

kardiovaszkuláris és immunbetegségekben fontos jelátviteli ligandokra (pl. lipopoliszacharid és más toll receptor ligandok) kevésbé érzékenyek, mint a felnőtt endothelsejtek; az éretlen válaszreakciónak szerepe lehet későbbi sejterápiás, transzplantációs beavatkozások megtervezésekor, valamint a sejtek in vitro betegsége modellekben való alkalmazásakor.

A vizsgálatok során kontrollként szívűtétek során nyert humán szívűmintákból izolált endothelsejteket kívánjuk felhasználni. A szövetűmintákat enzimátikus úton emésztettük. Szűrésűt és centrifugálást követően, a kinyert sejteket, kapilláris darabokat endotheliális növekedési faktorokkal kiegészített tápfolyadékban tenyészítettük. A tenyészűtési körűlményeket különbözű felszíni matrixok (kollagén, laminin, zselatin, fibronektin) alkalmazásával optimalizáltuk. A felnövekvű primer sejteket anti-CD31 immunomágneseűs szeparációval vagy puromycin kezeléűssel tovább tisztítottuk. A sejtek kapilláris-képzű kapacitását Matrigelen (szolubilis extracelluláris mátrix) vizsgáltuk, acetilált LDL (Dil-Ac-LDL) felvétellel és von Willebrand faktor, CD31 kimutatásával jellemeztük.

## **8. Egyéb, a pályázathoz kapcsolódó tevékenységek**

„Őssejteket a kardiális kutatásban és terápiaiban”. Tudományos szimpózium és PhD kurzus. 2009. november 25.-27. A Semmelweis Egyetem Kardiológiai Központjában első alkalommal rendeztünk Magyarországon olyan tudományos szimpóziumot és PhD kurzust, amelynek fókuszában a kardiális őssejtkutatás állt. A meghívott neves hazai és nemzetközi előadók részletesen jellemezték a különbözű őssejttípusok, így az embrionális, mesenchymális, csontvelű-eredetű és szöveti őssejtek in vitro és in vivo tulajdonságait. Külön szekció foglalkozott a gyakorlati alkalmazási lehetőségekkel, így a génalapú kardiovaszkuláris diagnosztikával és terápiaival, a különbözű modern laboratóriumi és képalkotó technikákkal, és a szövetépítés modern lehetőségeivel. A klinikai szekcióban az őssejtek kardiovaszkuláris alkalmazásáról, így többek között a magyarországi első őssejtalapú terápiaűs beavatkozásokról, az európai jogi szabályozásról és etikai megfontolásokról egyaránt szó esett. A nagysikerű szimpózium utolsó napján laboratóriumi gyakorlati bemutatókra került sor.

## **9. További kutatási tervek**

A munka folytatásaként tervezzük az apelin-kapcsolt és egyéb kardiovaszkuláris microRNS-ek expressziójának vizsgálatát, és azok szerepének leírását endotheliális progenitor modellekben. Emellett az itt jellemzett G-protein függű mechanizmusokat in vivo transzplantált endotheliális progenitor sejtekben is tovább kívánjuk vizsgálni.

## **Közlemények**

### **A kutatási témához kapcsolódó eredményeink eddigi bemutatása (konferenciák, absztraktok)**

1. European Society of Cardiology. 2007.09.02. Bécs, Ausztria, előadás. Földes G, Ruzicska É, Ilves M, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin in diabetic and hyperlipidemic cardiac dysfunction. *Eur Heart J* 2007; 28:7
2. International Society of Heart Research 2007., Bologna, Olaszország, poszter. Földes G, Ruzicska É, Ilves M, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin in diabetic and hyperlipidemic cardiac dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: S141
3. Magyar Sportorvos Társaság 2008. évi Kongresszusa 2008 április. Tóth M, Komka Z, Szokodi I, Sárman B, Seres L, Skoumal R, Ruskoaho H, Földes G. Apelin, az APJ árvareceptor endogén ligandja a szívélgtelen betegek szívében és plazmájában. *Sportorvosi Szemle* 2008; 47
4. Reed D, Földes G, Mioulane M, Ali NN, Schneider MD, Harding SE, Mitchell JA. Identification of NFkB pathways in human embryonic stem cell-derived endothelial cells: comparison with human umbilical vein endothelial cells. *BHF Foundation Centre of Excellence*. 18.06.2010

5. Földes G, Lendvai Z, Mioulane M, Ali NN, Schneider MD, Mitchell JA, Harding SE. PI3K/Akt/FOXO signalling pathway regulates angiogenic and proliferative potential of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *BHF Foundation Centre of Excellence*. 18.06.2010
6. MKT balatonfüredi kongresszusa. Lendvai Z, Harding SE, Merkely B, Schneider MD, Ali NN, Földes G. A PI3K/Akt jelátviteli rendszer modulálja a humán embrionális őssejt eredetű endothel sejtek proliferációját és érzékelő aktivitását. *Cardiologia Hungarica* 2010
7. International Society of Stem Cell Research 2010 San Francisco. Lendvai Z, Harding SE, Merkely B, Schneider MD, Ali NN, Földes G. PI3K/Akt signalling pathway regulates angiogenic and proliferative potential of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. ISSCR 2010
8. ESC-HFA Nizza 2009. Lendvai Z, Földes G, Mioulane M, Merkely B, Schneider MD, Harding SE, Ali NN. The role of PI3K/Akt and calcineurin signalling pathways in the proliferation activity of human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Eur J Heart Failure Suppl* 2009; 8(2)
9. Földes G. New trends in cardiovascular stem cell therapy. Semmelweis Symposium 2008;12

### **Cikkek, könyvfejezetek**

1. Sheikh Abdul Kadir SH, Ali NN, Mioulane M, Brito-Martins M, Abu-Hayyeh S, Földes G, Moshkov AV, Williamson C, Harding SE, Gorelik J. Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model to study fetal arrhythmia related to maternal disease. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(9B):3730-41. IF: 5.114; cit: 1
2. Földes G, Harding SE, Ali NN. Cardiomyocytes from embryonic stem cells: towards human therapy. *Expert Opin Biol Therapy*. 2008;8(10):1473-1483. IF: 3.475; cit: 0
3. Földes G, Liu A, Badiger B, Paul-Clark M, Moreno L, Lendvai Z, Wright JS, Ali NN, Harding SE, Mitchell JA. Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. *PLoS One*. 2010; 5(5):e10501. IF: 0; cit: 0
4. Földes G, von Haehling S, Jankowska EA, Anker SD. Targeting the Toll-system in cardiovascular sciences. *Recent Patents on Inflammation and Allergy*. 2007;1(1):57-67. IF: 0 ; cit: 0
5. Földes G, von Haehling S, Okonko DO, Jankowska EA, Poole-Wilson PA, Anker SD. Fluvastatin reduces high peripheral blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in patients with heart failure. *Int J Cardiol*.2008;124(1):80-5. IF: 2.234; cit: 1

### **Egyéb, internetes és sajtómegjelenések**

1. Földes G. Apelin. *Wikipedia*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Apelin>.
2. Daily Mirror: <http://blogs.mirror.co.uk/science/2010/02/amazing-images-taken-from-deep.html>
3. BHF: [http://www.bhf.org.uk/research\\_health\\_professionals/reflections\\_of\\_research.aspx](http://www.bhf.org.uk/research_health_professionals/reflections_of_research.aspx)
4. The Guardian: <http://www.guardian.co.uk/science/gallery/2010/jan/19/british-heart-foundation-photography-competition>
5. The Times Higher Education Supplement. [www.timeshighereducation.co.uk/](http://www.timeshighereducation.co.uk/)

### **Előkészületben**

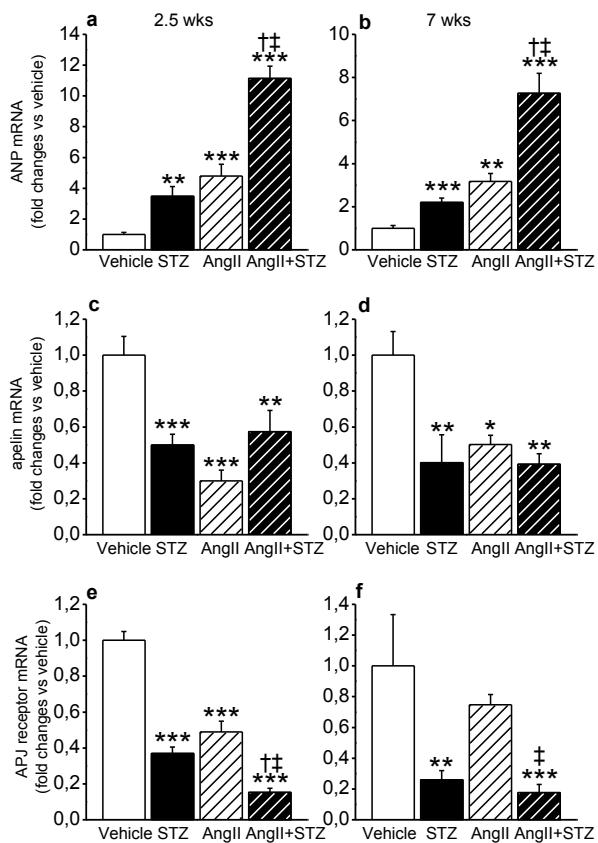
1. Földes G, Skoumal R, Ruzicska E, Ilves M, Szokodi I, Tóth M, Ruskoaho H. Down-regulation of apelin-APJ system in diabetic cardiac dysfunction in rats. Elküldve; absztrakt csatolva.
2. Lendvai Zs, Karázi É, Nardai G, Járai Z, Földes G. Decreased expression of APJ receptor in endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. Előkészületben.
3. Földes G, Harding SE. Stem cell therapy to treat heart failure. in *Comprehensive Biotechnology*, ed.2. Vol 5 (157). *Elsevier*. 2011 (nyomdai előkészületben).

**A pályázati anyag egyes kísérletei a következő nemzetközi munkacsoportokkal együttműködésben készültek:**

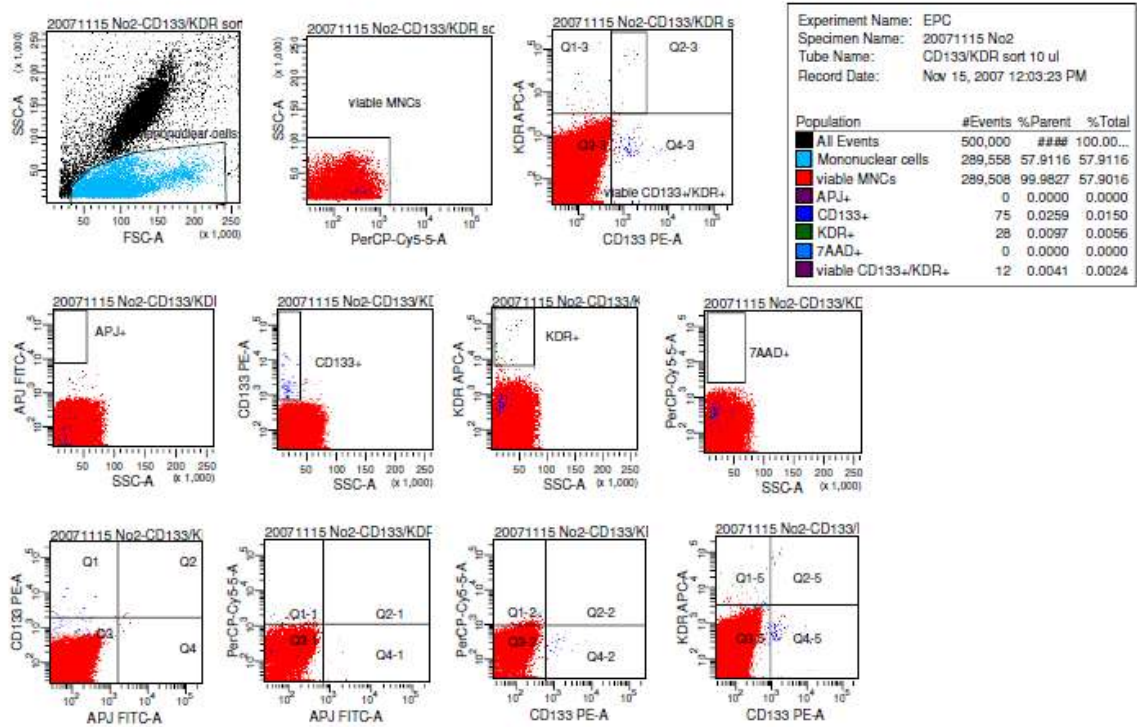
1. Prof. Sian E. Harding, National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, Nagy-Britannia
2. Prof. Heikki Ruskoaho, Gyógyszertani Intézet, University of Oulu, Oulu, Finnország
3. Prof. Thomas Thum, University of Hannover, Hannover, Németország

Ismét megköszönöm az OTKA-nak a munkánkhoz nyújtott fontos támogatást.  
Tisztelettel,

Dr. Földes Gábor  
Semmelweis Egyetem  
2010. július 27.

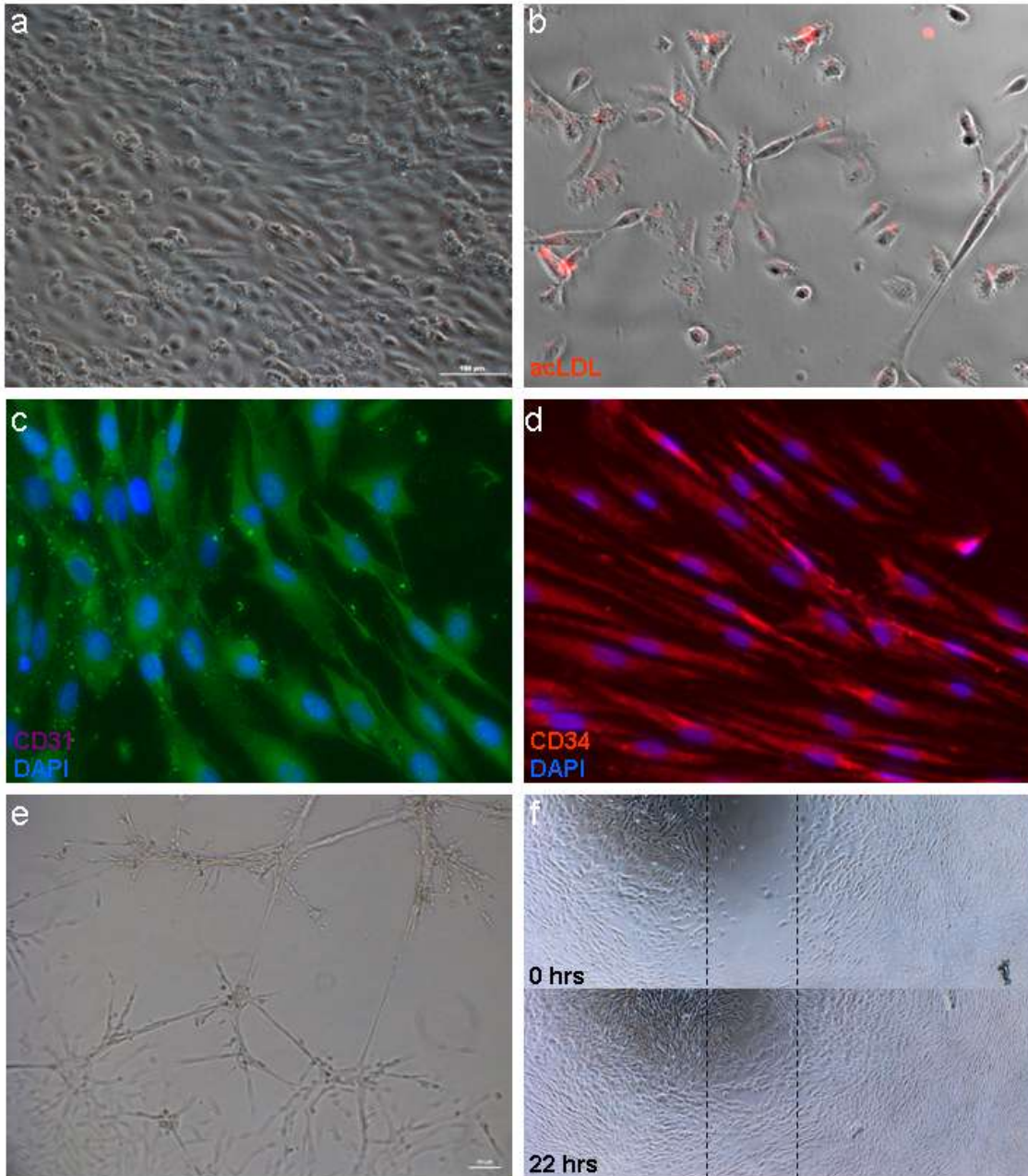


**1. ábra:** Csökkent bal kamrai apelin-APJ expresszió diabeteses nyomásterhelésben. Atrialis natriuretikus peptid, apelin és APJ receptor bal kamrai mRNS szintek kontroll (*vehicle*), streptozotocin-kezelt (*STZ*) diabeteses és angiotensin II-vel (*AngII*) infundált patkányokban. Kontroll csoport génextpresszió=1, átlag±sem.



2. ábra: Endotheliális progenitorsejtek szívélgtelen betegek keringésében. Reprezentatív FACS eredmények: CD133<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, APJ receptor jelölt EPC szubpopulációk.





**3. ábra.** Humán embrionális őssejtből differenciált endotheliális progenitorsejtek. A sejtek az acetilált LDL-t felveszik (b), a CD31 és CD34 sejtfelszíni markereket expresszálják (c, d), extracelluláris mátrix felszínén kapilláris-szerű struktúrákat képeznek (e), fibronektinen az ún. *sebgyógyulási* assayben (f) motilitásuk szintén megfigyelhető.