

# A ROSUVASTATIN ÉS AZ ASZPIRIN MORFOLÓGIAI, FUNKCIONÁLIS ÉS IMMUNSZABÁLYOZÓ SZEREPE MIKROGLIA TENYÉSZETEKBEN

Ph.D értekezés tézisei

Kata Diána

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Gulya Károly  
tanszékvezető egyetemi tanár



Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék  
Általános Orvostudományi Kar - Természettudományi és Informatikai Kar  
Szegedi Tudományegyetem

Szeged, 2017

**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK:**

- I. **Kata D**, Földesi I, Feher LZ, Hackler L Jr, Puskas LG, Gulya K (2016) Rosuvastatin enhances anti-inflammatory and inhibits pro-inflammatory functions in cultured microglial cells. **Neuroscience** 314:47-63. (IF: 3.231)
  
- II. **Kata D**, Földesi I, Feher LZ, Hackler L Jr, Puskas LG, Gulya K (2017) A novel pleiotropic effect of aspirin: beneficial regulation of pro-and anti-inflammatory mechanisms in microglial cells. **Brain Research Bulletin** Közlésre elfogadott, DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.05.009 (IF:2.572)

**AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓGÓ POSZTER ELŐADÁSOK:**

- I. **Kata D**, Gulya K (2014) Aspirin regulates the inflammatory responses of activated microglia. **9<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, FENS-0477; C112**
  
- II. **Kata D**, Földesi I, Feher LZ, Hackler L Jr, Puskas LG, Gulya K (2015) A rosuvastatin gyulladásgátló hatása bakteriális lipopoliszacharid által aktivált tiszta mikroglia kultúrában. **MÉT 79. Vándorgyűlése és a MMVBT 2015. évi konferenciája, Szeged, Magyarország, P2.7**

## BEVEZETÉS

### A mikroglia sejtek szerepe a központi idegrendszerben

A mikroglia sejtek a központi idegrendszer elsődleges immunsejtjei, amelyek kiemelkedő jelentőséggel bírnak az idegszövet homeosztázisának fenntartásában. Fontos szerepet töltenek be mind fiziológiás, mind olyan patológiás körülmények között, mint például a traumás sérülések, fertőzések, stroke, ischemia, vagy a neurodegeneratív megbetegedések. A mikroglia sejtek funkcióihoz jellegzetes morfológiai sajátosságok járulnak. Az egészséges idegrendszerben a mikroglia nyúlványos ("ramifikált") morfológiát mutatnak. Ezek a sejtek jellemzően kisméretű sejttesttel rendelkeznek, amelyből kiterjedt nyúlványok ágaznak el. Ezt a megjelenési formát elsődlegesen a sejtek "nyugalmi" állapotával azonosítjuk.

Patológiás események, illetve a normál agyi homeosztázis sérülésének hatására azonban a mikroglia sejtek nyugalmi állapotból "aktív" állapotba transzformálódnak. Ez az aktiváció gyors és erőteljes változásokat idéz elő a sejtek morfológiájában, funkciójukban és génexpressziós mintázatukban egyaránt. Az aktiváció hatására a mikroglia sejtek morfológiai komplexitása lecsökken. Ezen folyamat során a sejtek nyúlványai visszahúzódnak és a mikroglia morfológiája "amoeboid" fenotípust vesz fel. A mikroglia sejtek aktivált állapotához számos jellegzetes funkcionális sajátosság is kapcsolódik. Ezek a formák számos szolubilis faktort termelnek, amelyek elsődlegesen gyulladásszerű és immunszabályozó hatással rendelkeznek, továbbá olyan chemoattraktív faktorokat felszabadítanak fel, amelyek további immunsejteket irányítanak a központi idegrendszer területére. Az aktivált sejtek további jellegzetessége az emelkedett proliferációs aktivitás, a fagocitózis megnövekedése, valamint a különböző fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulák és komplement receptorok fokozott expressziója.

Noha a mikroglia sejtek immunszabályozó szerepe nélkülözhetetlen a központi idegrendszer megfelelő védelme érdekében, az aktivált mikroglia sejtek bizonyos esetekben káros hatással lehetnek az idegrendszerre. A mikroglia által szabályozott gyulladási válaszoknak ugyanis kiemelkedően fontos szerepe van számos neurodegeneratív megbetegedés progressziójában. Az Alzheimer-kór esetében például a béta-amyloid fehérje aktiválja és elősegíti a mikroglia sejtekben számos gyulladáskeltő citokin termelését és felszabadulását (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), amelyek tovább károsítják a neuronokat. Emellett az aktivált mikroglia nagy mennyiségben halmozódik

fel a szenilis plakkok körül, esetleg a plakkok központi részében is. A Parkinson-kór esetében szintén kimutatható az agyban a mikroglia sejtek által indukált túlzott, fokozott immunválasz.

A mikroglia sejtek immunválaszainak gyógyszerkészítményekkel történő szabályozása rendkívül fontos lehet számos neurodegeneratív megbetegedés megelőzésében, vagy lefolyásának szabályozásában.

### **A statinok hatása és szerepe**

A statinok (3-hidroxi-3-metil glutaril koenzim A reductáz gátlók) a magas koleszterinszint kezelésére szolgáló széles körben alkalmazott készítmények. Elsődleges hatásuk a vér LDL (low-density lipoprotein) koleszterin és triglicerid szintjének csökkentése, illetve a HDL (high-density lipoprotein) koleszterin mennyiségének növelése. Működésük alapja, hogy blokkolják a koleszterin szintézis első lépésének enzimét. Ennek eredményeként azonban az elsődleges szerepük mellett jelentős hatásuk van egyéb alapvető sejtes funkciókra is, ugyanis a szintézis első lépésének gátlásával a szintézisútvonalon kialakuló számos nagy jelentőségű intermedier metabolit kialakulása is gátolódik, ezáltal mennyiségük csökken. A különböző intermedier termékekre gyakorolt hatásuknak köszönhetően a statinok jelentősen befolyásolják az izoprenilált G-fehérjék által szabályozott szignalizációs folyamatokat, ezáltal rendkívül széles körben befolyásolják a különféle celluláris funkciókat (pl. sejtproliferáció, migráció, sejtadhézió, gyulladásos válaszok).

A kardiovaszkuláris megbetegedésekben már ismert terápiás hatásuk mellett azonban a statinoknak kedvező hatásuk lehet a központi idegrendszerben is. A statinok igazoltan képesek csökkenteni a neuroinflammációt, valamint gátolják a szenilis plakkok és a gyulladásos válasz kialakulását. A statinok továbbá neuroprotektív hatást fejtenek ki úgy, hogy egyrészt elősegítik a különböző neurotróf faktorok expresszióját (pl. BDNF), másrészt a reaktív oxigén intermedierek (ROS) gátlásával védik a sejteket és szöveteket az oxidatív károsodástól. A napjainkban használt statinok közül jelenleg a rosuvastatin fejt ki a legnagyobb gátló hatást a koleszterin bioszintézisre.

A statinok gyulladásgátló és immunmoduláló hatásuk miatt olyan készítmények lehetnek, amelyeknek jelentős szabályozó hatásuk lehet a mikroglia sejtekre is, így segítségükkel szabályozhatók lehetnek a mikroglia sejtek által vezérelt erős neuroinflammációs reakciók.

## **Az aszpirin hatása és szerepe**

Az aszpirin világszerte az egyik legszélesebb körben alkalmazott készítmény. A nemsteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek közé tartozik, és bár elsősorban fájdalomcsillapító, gyulladásgátló valamint lázcsillapító hatásairól ismert, a különféle kardiovaszkuláris megbetegedésekben is széles körben alkalmazzák. Az elsődleges hatása a ciklooxygenáz (COX) enzim aktivitásának gátlása. A ciklooxygenáz kulcsszerepet játszik az arachidonsav prostaglandinokká és egyéb lipid mediátorokká történő átalakításában, amelyeknek jelentős szerepe van számos fiziológiai és patológiai folyamatban, többek között a gyulladásos folyamatokban is. A gyulladásos folyamatok kialakulásakor a prostaglandinok lokális mediátorként kiemelkedő szerepet töltenek be a gyulladásos állapotok kifejlődésében, valamint elősegítik a különböző gyulladások keltő citokinek aktiválódását. Az aszpirin a makrofágokban számos gyulladások keltő citokin mennyiségét csökkenti, többek között például az IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, vagy az IFN- $\gamma$  szintjét. A COX-2 aszpirin általi acetilációja emellett módosult enzimaktivitást eredményez, ami olyan új metabolikus szubsztrátok kialakulását eredményezi, amelyek a lipoxigenázzal interakcióba lépve létrehozza az ún. "aszpirin-triggered" lipoxinokat (ATL). Ezek a lipoxinok olyan gyulladásgátló mediátorok, amelyek megakadályozzák a gyulladások keltő citokinek felszabadulását. Az agyban mind a COX-1, mind a COX-2 enzim konstitutívan expresszálódik. A COX-1 enzimnek fontos szerepe van számos központi idegrendszeri gyulladásos folyamatban, és emelkedett expressziója figyelhető meg számos neuroinflammációs modell esetében. Az Alzheimer-kór esetében a COX-1, a COX-2 és a prostaglandin E2 emelkedett mennyisége figyelhető meg. A COX-1 expresszáló mikroglia sejtek nagy mennyiségben mutathatók ki az amyloid plakkok körül. COX-1 expresszáló mikroglia megfigyelhető a fokális agyi ischaemiát követően kialakuló nekrotikus mag körül is. Ismeretes az is, hogy a COX-1 gátlása csökkenti az oxidatív stresszt és a neuronok pusztulását a globális ischaemiát követően.

Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a ciklooxygenázt expresszáló mikroglia sejtek jelentős szerepet tölthetnek be számos patológiás esemény során, így a COX enzim aszpirin által történő gátlása kedvező lehet a különböző terápiák során.

## CÉLKITŰZÉSEK

A gyulladáshoz vezető folyamatoknak kritikus szerepe van a neurodegeneratív megbetegedések kialakulásában és progressziójában. A mikroglia sejtek aktiválódása jelentős morfológia, funkcionális és génexpressziós változással jár együtt, s ezek mind gyulladáskeltő, mind gyulladásgátló folyamatok aktiválását is eredményezhetik. Noha ezek a folyamatok az idegszövet védelmét biztosítják, a mikroglia sejtek krónikus gyulladási folyamatokat is előidézhetnek, amelyek különféle neuropatológias állapotok kialakulását eredményezhetik. Azok a gyógyszerkészítmények, amelyek szabályozni tudják az erőteljes mikroglia aktivációt, hasznosak lehetnek a különböző neurodegeneratív megbetegedések megelőzésében/és/vagy kezelésében.

Bár a statinokat elsődlegesen a hiperkoleszterinémia kezelésére használják, gyulladásgátló hatásuk is ismert. Noha néhány tanulmány már foglalkozott a statinok központi idegrendszerben kifejtett hatásával, ezek a vizsgálatok kizárólag a lipofil statinokra korlátozódtak (pl. simvastatin, atorvastatin). A koleszterin bioszintézis leghatékonyabb gátlására az eddig ismert statinok közül a rosuvastatin képes, azonban a szer esetleges hatását a központi idegrendszerre eddig még nem vizsgálták, feltehetőleg a hidrofил természete miatt. Beigazolódott azonban, hogy a rosuvastatin specifikus transzporterek segítségével bejut az agy területére, ezért úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a mikroglia sejtekre gyakorolt hatását.

Az aszpirin az egyik legáltalánosabban alkalmazott nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer. Noha széles körű hatása ismert az immunsejtek funkcióira is, a mikroglia sejtekre gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták behatóan, így elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk az aszpirin központi idegrendszeri immunfunkciókra gyakorolt hatását.

Munkánk során a rosuvastatin és az aszpirin pleiotróp hatásait vizsgáltuk 18 napos (E18) patkány embriók előagyából készült primer kultúrából származtatott kontroll és bakteriális lipopoliszachariddal (LPS) kezelt szekunder mikroglia tenyészetekben.

Munkám során az alábbi célkitűzéseim voltak:

1. Meghatározni a rosuvastatin és az aszpirin morfológiai hatásait, beleértve a mikroglia sejtek citoskeletonális és immuncitokémiai tulajdonságait is;
2. Megvizsgálni a rosuvastatin mikroglia sejtek proliferációjára és sejtadhéziójára gyakorolt hatását;

3. Meghatározni, hogy a rosuvastatin és az aszpirin miként befolyásolja a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitását;
4. Meghatározni a rosuvastatin és az aszpirin hatását a mikroglia sejtek citokin felszabadítására, beleértve mind a gyulladáskeltő (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), mind a gyulladásgátló citokineket (IL-10);
5. Megvizsgálni a rosuvastatin és az aszpirin hatását számos gyulladással kapcsolatos gén expressziós mintázatára a tiszta mikroglia sejtekben.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **Sejtkultúra készítése és fenntartása**

A tiszta mikroglia sejtek izolálása 18 napos patkány embriókból készített primer kortikális sejtkultúrából történt. A primer tenyészetet poli-L-lizinnel borított flasksokban (75 cm<sup>2</sup>, 12x10<sup>6</sup> sejt) tenyésztettük 37 °C-on 5%-os CO<sub>2</sub> tartalom mellett. A sejteket 10% FBS-t tartalmazó DMEM médiumban tartottuk fenn. A tenyésztés hetedik napján (DIV7) a tenyészetek rázatásával (100 rpm, 30 perc, 37 °C) elválasztottuk a mikroglia sejteket és létrehoztuk a szekunder mikroglia kultúrákat.

### **Kezelések**

A tiszta mikroglia kultúrákról a tenyésztés negyedik napján (subDIV4) a DMEM médiumot lecseréltük, majd a mikroglia sejteket bakteriális lipopoliszachariddal (LPS; 20 ng/ml), rosuvastatinnal (1 $\mu$ M), aszpirinnal (0,1 mM vagy 1 mM), illetve az LPS + rosuvastatin, vagy az LPS + aszpirin kombinációval kezeltük. A kísérlet típusától függően a kezelések 6, 24 vagy 72 óráig tartottak.

### **Immuncitokémiai vizsgálat**

A kezeléseket követően a sejteket 4%-os formaldehid segítségével fedőlemezekre fixáltuk. A permeabilizációt követően a mintákat egy éjszakán át inkubáltuk elsődleges anti-Iba1 poliklonális antitesttel (1:500) 4 °C-on. Ezután a mintákat másodlagos Alexa Fluor 568 fluorochrom konjugált antitesttel (1:1,000) inkubáltuk, majd a sejtmagokat 0,5  $\mu$ l/ml Hoechst 33258 festékkel jelöltük.

### **Western blot analízis**

A Western blot analízishez SDS-poliakrilamid gélen 5-10 µg mennyiségű fehérjét választottunk el. Az elválasztott fehérjét Hybond-ECL nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd egy éjszakán át inkubáltuk elsődleges anti-Iba1 poliklonális antitesttel (1:1,000), vagy anti-GAPDH monoklonális antitesttel (clone GAPDH-71.1; 1:20,000). A membránokat ezt követően peroxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk (1:2,000 az Iba1 és 1:2,000 a GAPDH esetén).

### **A fagocitózis mértékének meghatározása**

A mikroglia sejtek fagocitáló képességének vizsgálatát a sejtek által felvett fluoreszcens mikrogyöngyök mennyiségének mérésével végeztük. Ehhez a sejt kultúrákat a kezelés vége előtt 1 µl 2.5% -os fluoreszcens mikrogyöngy szuszpenzióval egészítettük ki, majd 60 percig 37 °C-on inkubáltuk.

### **Az IL-1β, IL-10 és a TNF-α mennyiségének meghatározása**

A mikroglia sejtek által termelt gyulladáskeltő és gyulladásgátló citokinek mennyiségét patkányra specifikus ELISA kitékkel vizsgáltuk. A mérésekhez a kezeléseket követően a tenyészet felüliszóját összegyűjtöttük, majd a vizsgálat elvégzéséig -20 °C-on tároltuk. Vizsgálataink során az IL-1β, az IL-10 és a TNF-α mennyiségét határoztuk meg.

### **Sejtadhézió és proliferáció meghatározása**

A mikroglia sejtek sejtadhéziós és proliferációs képességeinek rosvastatin hatására történő változását ACEA Real-Time Cell Analysis (RTCA) és 16-lyukú E-Plate rendszerekkel vizsgáltuk. A módszer valós időben méri a sejtek által kialakított elektromos ellenállást, amelyet sejt index formájában fejez ki. A sejteket az E-Platebe töltöttük, majd behelyeztük az RTCA készülékbe, ahol az xCELLigence real-time cell analysis rendszer segítségével 60 órán keresztül rögzítettük folyamatosan a sejt index értékeket. A túlélő/proliferáló mikroglia sejtek mennyiségének meghatározásához a sejteket összegyűjtöttük és Bürker kamra segítségével megszámoltuk.

### **RNS izoláció**

A sejteket PBS-sel mostuk, majd lízis pufferben (RA1) inkubáltuk. Ezt követően a sejteket összegyűjtöttük, majd 70%-os RNáz mentes vizet tartalmazó etanollal egészítettük ki. A keveréket oszlopra vittük és 80%-os dietilpirokarbonáttal kezelt vizet tartalmazó etanollal,



ezt követően W2 mosó pufferrel mostuk. A teljes RNS tartalmat RNáz mentes vízbe eluáltuk. A mintákhoz 1 µl RNáz inhibitorot adtunk.

### **RNS expresszió**

A reverz transzkripciót 3 µg totál RNS-ből 30 µl-ben a High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) felhasználásával végeztük el a gyártó által ajánlott protokoll alapján. A cDNS-t 80 µl nukleáz-mentes vízben oldottuk. Az expresszióhoz az alábbi rendszereket használtuk: Bravo automatic liquid handling rendszer, LightCycler 1536 System, és a LightCycler Nano Instrument. A 116 gyulladási folyamatokhoz kapcsolódó gén expresszióját, és a 6 kontroll gént a Universal Probe Library esszé segítségével génspecifikus primerekkel mértük. A génexpressziót a GraphPad Prism 6 program segítségével analizáltuk.

### **Képanalízis és statisztikai értékelés**

A mikroglia kultúra tisztaságának meghatározását az Iba1 immunpozitív sejtekhez tartozó Hoechst 33258 jelölt sejtmagok megszámlálásával végeztük. Minden sejt kultúra esetén 50-100 véletlenszerűen választott látómezőben végeztük el a számolást. A kerület (µm), terület (µm<sup>2</sup>), és transzformációs index (TI) meghatározásához az Iba1 immunpozitív sejteket az ImageJ, valamint az Adobe Photoshop CS5.1 szoftverekkel bináris replikátumokká (szilvettekké) alakítottuk küszöbölés (thresholding) segítségével. Az így kapott kerület és terület értékekből a  $TI = \frac{\text{kerület}^2}{4\pi \cdot \text{terület}}$  képlet segítségével transzformációs indexet számoltunk.

Minden statisztikai méréshez az R 3.1.0 for Windows programot használtuk. Az eredményeket két szempontos varianciaanalízissel (two-way ANOVA) vizsgáltuk, a páronkénti összehasonlításhoz Bonferroni korrekciót használtunk. Az eredményeket átlag ± SD értékekkel ábráztuk;  $p < 0.05$  értékben határoztuk meg a szignifikanciát.

## **EREDMÉNYEK**

### **A rosuvastatin és az aszpirin morfológiai hatásai**

A rosuvastatin és az aszpirin által kiváltott morfológiai változásokat a kontroll és LPS-aktivált mikroglia sejtekre Iba1 immuncitokémiai vizsgálattal dokumentáltuk. Az egyes sejtek morfológiai változásait a bináris sziluettek kvantitatív morfometriai elemzésével vizsgáltuk. A kontroll tenyészetek sejtjeinek túlnyomó többsége enyhe amőboid morfológiát mutatott, bizonyos esetekben rövid pszeudopodium jellegű nyúlványokkal, többnyire  $TI < 3$  értékekkel. Az LPS aktiváció hatására a sejtek területe, kerülete, valamint transzformációs indexe (TI) lecsökkent (48%, 65%, valamint 78%-al) a kontroll értékekhez viszonyítva. A rosuvastatin a sejteken mikrotüske jellegű képződmények kialakulását indukálta. Ezek a vékony citoplazma-kitüremkedések szignifikánsan emelték a sejtek kerület és TI értékeit. A rosuvastatinnal kezelt csoportok átlagos TI értékei ennek következtében közel tízszeresére emelkedtek a kontroll értékekhez viszonyítva. Az LPS aktivált sejtek rosuvastatin kezelés hatására szignifikánsan növekedtek, a sejtek ramifikáltabb morfológiát vettek fel, a statinnal nem kezelt, LPS-aktivált sejtek értékeinél jelentősen nagyobb kerület és transzformációs index értékkel ( $TI > 7$ ). Ez az eredmény azt mutatta, hogy a rosuvastatin gátolta az LPS aktiváció hatására bekövetkező morfológiai változásokat. Az LPS-aktivált és rosuvastatinnal kezelt sejtek méretnövekedésével párhuzamosan ezeknél a sejteknél szignifikánsan magasabb Iba1 immunoreaktivitást is tapasztaltunk.

Az LPS aktivált sejtek aszpirin kezelését követően szintén szignifikánsan nagyobb és ramifikáltabb morfológiájú sejteket találtunk a kezelést nem kapott, csak aktivált sejtekhez viszonyítva. Az aszpirin kezelések önmagukban is növelték a TI értékeket a kontroll sejtekhez képest (kis dózis:  $5.73 \pm 2.70$ ; nagy dózis:  $7.36 \pm 3.48$ ), ami ramifikált morfológiát indukált vastagabb nyúlványok, valamint mikrotüskék megjelenésének kíséretében.

### **A rosuvastatin proliferációt és sejtadhéziót gátló hatása**

A rosuvastatin szignifikánsan gátolta a sejtproliferációt mind a kontroll, mind pedig az aktivált mikroglia sejtekben (előbbinél 47.8%, utóbbinál 68.9%-ban). A rosuvastatin a sejtadhéziót is gátolta ezekben a csoportokban.

### **A rosuvastatin és az aszpirin csökkenti a fagocitózis mértékét az aktivált mikroglia sejtekben**

A mikroglia sejtek egyik jól ismert jellegzetessége a fagocitotikus aktivitás. A tiszta mikroglia sejtek kontroll körülmények között alacsony fagocitotikus aktivitást mutattak. A kontroll sejtek a rosuvastatin kísérlet során átlagosan  $2.62 \pm 1.7$  mikrogyöngyöt kebeleztek be, míg az aszpirin kísérletsorozat esetében  $3.63 \pm 1.6$  gyöngyöt. Az LPS általi aktiváció jelentősen növelte a sejtek fagocitózisát. Az aktivált sejtek átlagosan  $25.39 \pm 11.4$  gyöngyöt fagocitáltak. Önmagában sem a rosuvastatin, sem pedig az aszpirin nem hatott jelentősen a fagocitózisra, a bekebelezett gyöngyök száma mindkét esetben alacsony maradt. Az aktivált sejtek esetében azonban mind a rosuvastatin, mind pedig az aszpirin kezelés jelentősen csökkentette a fagocitózis mértékét. A rosuvastatin rendkívül jelentősen, közel 80%-kal csökkentette a fagocitózist, míg az aszpirin (0.1 mM és 1 mM) dóziszfüggő módon 30%-kal ( $9.20 \pm 4.25$ ), illetve 70%-kal ( $3.86 \pm 1.85$ ) csökkentette a fagocitált gyöngyök számát az LPS-aktivált sejtekhez viszonyítva.

### **A rosuvastatin és az aszpirin gátolja a gyulladáskeltő és serkenti a gyulladásgátló citokinek felszabadulását**

Az aktivált mikroglia számos gyulladáskeltő és gyulladásgátló citokint termel. Az IL-1 $\beta$  alapszintje a kontroll mikroglia sejtekben  $15.00 \pm 5.6$  pg/ml volt. A rosuvastatin önmagában nem változtatta meg az alap IL-1 $\beta$  értéket. Az LPS aktiválás a várakozásainknak megfelelően szignifikánsan emelte a felszabadult IL-1 $\beta$  mennyiségét a mikroglia sejtekből. Az aktivált sejtek rosuvastatinnal történő kezelésének hatására a felszabadult IL-1 $\beta$  mennyisége jelentősen, 45%-kal csökkent. Ehhez hasonló erőteljes hatást okozott a rosuvastatin a TNF- $\alpha$  felszabadulásban is. Az aktivált mikroglia sejtekből felszabaduló TNF- $\alpha$  mennyiségét a 6 órás, valamint a 24 órás kezelést követően is nagyjából 40%-kal csökkentette. A rosuvastatin a gyulladásgátló IL-10 mennyiségét befolyásolta a legdrámaibb módon. Az LPS-aktivált mikroglia sejtekben az IL-10 fehérje felszabadulásának mértékét 750%-kal növelte a kontroll szinthez viszonyítva.

Az aszpirin hatásának vizsgálatakor a kontroll sejtekben mind a gyulladáskeltő IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$ , mind a gyulladásgátló IL-10 esetében a rosuvastatinnál tapasztalt alap értékeket kaptuk. Az aktivált sejtek kezelése 1 mM aszpirinnel szignifikánsan, közel 50%-kal gátolta az IL-1 $\beta$  szintet, míg a 0.1 mM aszpirin kezelés nagyjából 16.5 %-kal csökkentette az értéket. A TNF- $\alpha$  szintjének szabályozása kapcsán hasonló hatást tapasztaltunk. Az aszpirin

mind a 6 órás, mind a 24 órás kezelés során szignifikánsan gátolta a TNF- $\alpha$  felszabadulást: az 1 mM aszpirin kezelés 25%-kal, valamint 50%-kal, míg a 0.1 mM aszpirin dózis a 6 órás kezelés során 16%-kal. Az aszpirin emellett hatott az IL-10 mennyiségére is. Az LPS aktiváció már önmagában jelentősen növelte az IL-10 mennyiségét (536%), és az aktivált sejtek aszpirinnel történő kezelése még további jelentős (több, mint tízszeres) IL-10 produkciót eredményezett.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy mind a rosuvastatin, mind pedig az aszpirin erőteljes gyulladásgátló hatást mutat, amely a gyulladáskeltő citokinek jelentős gátlásában, valamint a gyulladásgátló citokinek mennyiségének növelésében mutatkozik meg az aktivált mikroglia sejtekben.

### **A rosuvastatin és aszpirin hatása a gyulladási folyamatokhoz kapcsolható gének expressziójára**

A rosuvastatin és az aszpirin mikroglia sejtekre gyakorolt jelentős morfológiai és funkcionális hatásának megismerését követően megvizsgáltuk e két szer hatását 116 gyulladással kapcsolatos gén expressziójára a kontroll és LPS-aktivált mikroglia sejtekben.

A rosuvastatin kezelés számos gén expressziójának növelését, illetve csökkenését idézte elő a kontroll és az aktivált mikroglia sejtekben. Az LPS aktiváció számos kemokin ligand és citokin expresszióját növelte meg, így például a *Cxcl1*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Ccl19*, *Ccl24*, valamint az *Il11*, vagy az *Il23r* génekét. A rosuvastatin kezelés a kontroll sejtekben kevesebb, de rendkívül jelentős gének expressziójára hatott, mint például az idegrendszerben főként gyulladásgátló tulajdonságairól számon tartott *Ccl5*, valamint az *Mbl2*, amely rendkívül jelentős faktora a veleszületett immunitás kialakulásának. A rosuvastatin emellett gátolta a gyulladáskeltő hatású *Ccr1* gént. Bizonyos, LPS által indukált gének expressziója lecsökkent a rosuvastatin hatására, ilyen volt például a *Ccl24*, amelynek esetében 73,5%-os csökkenést tapasztaltunk a génexpresszióban, vagy a *Ccr1*, ahol 49,5%-os csökkenést detektáltunk.

Az aszpirin kezelés szintén számos gén növelését, illetve csökkenését befolyásolta. Az LPS aktiválás ebben az esetben is több jelentős kemokin ligand és citokin expresszióját növelte meg, mint például a *Cxcl1*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, valamint *Il1 $\beta$* , *Il6* vagy a nitrogén-oxid szintáz (*Nos2*). A kontroll sejtekben számos gén kifejeződésének csökkenését figyeltük meg aszpirin hatására, ilyenek voltak például az *Il1rn*, vagy a gyulladáskeltő *Il6*

és *Ccr1*. Számos LPS által upregulált gén expressziója is csökkent az aszpirin kezelés hatására, ilyen például az *IL1- $\alpha$* , a gyulladáskeltő *Ccr1*, vagy a *Nos2*.

## KONKLÚZIÓ

Kísérleteink során egy komplex morfológiai, funkcionális és génextpressziós vizsgálatot végeztünk annak érdekében, hogy meghatározzuk a rosuvastatin és az aszpirin hatását embrionális eredetű tiszta mikroglia sejtekre kontroll és LPS által aktivált körülmények között. Eredményeink rávilágítottak, hogy mindkét szer erős válaszokat indukál a mikroglia sejtekben in vitro körülmények között: gátolják a káros gyulladáskeltő szignálokat, ugyanakkor szignifikánsan elősegítik a hasznos gyulladásgátló folyamatok kialakulását az LPS aktivációt követően. Széleskörű előnyös hatásaik között szerepel az erőteljes fagocitózis gátlás, valamint a gyulladáskeltő citokinek mennyiségének csökkentése. Ezzel párhuzamosan elősegítik a gyulladásgátló citokinek termelődését, valamint előnyösen hatnak számos gyulladással kapcsolatos gén expressziójára. A rosuvastatin kapcsán kismértékű anti-mitotikus hatást is megfigyelhettünk.

Miután az aktivált mikroglia sejtek károsíthatják az idegszövetet, illetve krónikus gyulladási folyamatokat okozhatnak azáltal, hogy nagy mennyiségben termelnek káros citokineket, megnőhet a fagocitotikus aktivitásuk, ezen gyulladáskeltő események hatékony gátlása megfelelő készítményekkel rendkívül fontos lehet a gyulladási és neurodegenerációs folyamatok terápiájában. Eredményeink tükrében mind a rosuvastatin, mind pedig az aszpirin alkalmas jelölt lehet a neuroinflammációs és neurodegeneratív megbetegedések preventív terápiájában, valamint kezelésében.

Az eredmények összegzése:

1. A kvantitatív morfológiai adatok ( $TI > 6$ ) alapján mind a rosuvastatin, mind az aszpirin a ramifikált morfológiát segíti elő, és mindkét szer gátolja az LPS aktiváció hatására kialakuló morfológiai változásokat ( $TI < 2$ );
2. A rosuvastatin 40-60%-kal gátolja a sejtproliferációt és csökkenti a mikroglia sejtek adhézióját;
3. Mind a rosuvastatin, mind az aszpirin jelentősen csökkenti az LPS aktiváció által kialakított erőteljes fagocitotikus aktivitást, de nem hatnak a sejtek alap (fiziológias) fagocitotikus működésére;

4. Mindkét szer erős gyulladásgátló hatással bír azáltal, hogy gátolják a gyulladáskeltő citokinek (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) felszabadulását, és stimulálják a gyulladásgátló citokinek (IL-10) mennyiségének növekedését az aktivált mikroglia sejtekben;
5. A génexpressziós mintázat vizsgálata kimutatta, hogy a tiszta mikroglia tenyészetekben mind a rosuvastatin, mind az aszpirin széleskörű hatással van számos, gyulladással kapcsolatba hozható génre. A vizsgált 116 génből a rosuvastatin kezelés során 47 gén esetében figyelhattunk meg szignifikánsan megváltozott expressziót, míg az aszpirin kezelést követően 30 ilyen gént találtunk. A két szer számos gyulladáskeltő gén expresszióját (pl. *Ccr1*, *Ccl24*, *IL-6*, *Nos2*) gátolja, mialatt több gyulladásgátló hatású gén expresszióját növelik (pl. *Cxcl1*, *Ccl5*, *IL-10*).