

Antioxidáns szteroidok szerepe a bakteriális infekciók lefolyásában: szteroid hatásszerkezeti összefüggés az antioxidáns és teljes gyökfogó hatás tekintetében

Doktori értekezés

Dr. Stark Júlia

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Békési Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Kristóf Katalin, Ph.D., részleg vezető szakorvos

Dr. Kovács Gábor, Ph.D., szakmai profilvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Blázovics Anna, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Halász Zita, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Molnár Jeannette, Ph.D., szakorvos

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
I. Bevezetés.....	5
I.1. Reaktív oxigén származékok és az antioxidáns védekező rendszer	6
I.1.1. A reaktív oxigén származékok keletkezése és fiziológias szerepe	6
I.1.2. A reaktív oxigén származékok patológiás szerepe	8
I.1.3. Az antioxidáns védekező rendszer.....	8
I.2. A szteroid hormonok mint antioxidánsok	10
I.3. A tibolon antioxidáns tulajdonságai	17
I.4. A mieloperoxidáz szerepe az antioxidáns védelemben	21
II. Célkitűzések.....	22
III. Módszerek	23
III.1. Vizsgálatok humán neutrofil granulocitákkal.....	23
III.1.1. A tibolon és származékainak hatása a szuperoxid termelésre.....	23
III.1.1.1. Vizsgálati egyének és sejtizolálás.....	23
III.1.1.2. A sejtek kezelése tibolonnal és származékaival	23
III.1.1.3. A sejtek szuperoxid termelésének mérése	24
III.1.1.4. A vizsgált hormonok hatása a xantin – xantin-oxidáz rendszerben	24
III.1.1.5. Statisztikai analízis	25
III.1.2. Az indometacin és egyes szteroid hormonok hatása az intracelluláris baktérium ölésre	25
III.1.2.1. Vizsgálati egyének és sejtizolálás.....	25
III.1.2.2. Az Escherichia coli opszonizációja	25
III.1.2.3. A granulociták kezelése.....	25
III.1.2.4. Az intracelluláris baktériumölés vizsgálata.....	26
III.2. <i>In vivo</i> patkánykísérletek	26
III.2.1. A kortikoszteron és kortizol gyökfogó hatásának vizsgálata	26
III.2.1.1. Kísérleti állatok és kezelések.....	26
III.2.1.2. Teljes gyökfogó kapacitás mérése	27
III.2.1.3. Statisztikai analízis	27
III.2.2. Az indometacin, az ösztradiol és a tesztoszteron hatásának vizsgálata patkány szepszis modellen	28

III.2.2.1. Kísérleti állatok.....	28
III.2.2.2. Kezelések a vizsgálat első fázisában	28
III.2.2.3. Kezelések a vizsgálat második fázisában	28
III.2.2.4. Laboratóriumi és mikrobiológiai vizsgálatok.....	29
III.2.2.5 Statisztikai analízis	30
IV. Eredmények.....	31
IV.1. Humán neutrofil granulocitákkal végzett vizsgálatok eredményei	31
IV.1.1. A tibolon és származékainak hatása a szuperoxid termelésre.....	31
IV.1.1.1. Ex vivo szuperoxid termelés különböző koncentrációjú szteroidokkal történt inkubáció után	31
IV.1.1.2. A vizsgált hormonok hatása a xantin – xantin-oxidáz rendszerben	31
IV.1.2. Az indometacin és egyes szteroid hormonok hatása az intracelluláris baktérium ölésre	34
IV.2. Az <i>in vivo</i> patkánykísérletek eredményei	35
IV.2.1. A kortikoszteron és kortizol gyökfógo hatásának vizsgálata.....	35
IV.2.2. Az indometacin, az ösztradiol és a tesztoszteron hatásának vizsgálata patkány szepszis modellen	35
IV.2.2.1. Eredmények a vizsgálat első fázisában	35
IV.2.2.1.1. Az állatok klinikai követése	35
IV.2.2.1.2. Laboratóriumi és mikrobiológiai eredmények	36
IV.2.2.2. Eredmények a vizsgálat második fázisában	38
IV.2.2.2.1. Az állatok klinikai követése	38
IV.2.2.2.2. Laboratóriumi és mikrobiológiai eredmények	38
V. Megbeszélés.....	43
VII.1. Összefoglalás	58
VII.2. Summary	59
VIII. Irodalomjegyzék	60
IX. Saját publikációk jegyzéke.....	71
X. Köszönetnyilvánítás.....	73

Rövidítések jegyzéke

cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CRP	C-reaktív protein
DHEA	dehidroepiandroszteron
DHEAS	dehidroepiandroszteron-szulfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
E ₂	17 β -ösztadiol, ösztadiol
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid szintáz
ER	ösztrogén receptor
fMLP	formil-metionin-leucin-fenilalanin
fvs	fehérvérsejt
GC	glukokortikoid
GPX	glutation-peroxidáz
GR	glukokortikoid receptor
HDL	high-density lipoprotein – nagy sűrűségű lipoprotein
Hgb	hemoglobin
HSD	hidroxiszteroid-dehidrogenáz
Htk	hematokrit
IFN- γ	interferon- γ
IL	interleukin
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
LDL	low-density lipoprotein – kis sűrűségű lipoprotein
MAPK	mitogén-aktiválta protein kináz
MCP-1	monocita kemoattraktáns fehérje-1
MDA	malondialdehid
MMP	mátrix metalloproteináz

MPO	mieloperoxidáz
mRNS	messenger (hírvivő) RNS
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF- κ B	nukleáris faktor kappa B
NK sejt	natural killer – természetesen ölő sejt
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NOX	NADPH-oxidáz
OPG	osteoprotegerin
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
RLU	relative light unit – relatív luminszcencia
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktive oxygene species – reaktív oxigén származékok
SERM	szelektív ösztrogén-receptor modulátor
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SULT	szulfotranszferáz
tct	vérlemezke
TGF β	transzformáló növekedési faktor β
TIMP	mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitora
TNF α	tumor nekrozis faktor α
Tris-HCl	tris-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid
TSC	total scavenger capacity – teljes gyökfogó kapacitás
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
VSMC	vaszkuláris simaizomsejt
vvt	vörösvértest
XO	xantin-oxidáz

I. Bevezetés

A civilizált társadalmak nagy problémája korunkban a főként a helytelen életmódból következő krónikus betegségek, mint a cukorbetegség, magas vérnyomás, érlemeszesedés, daganatos megbetegedések, neurodegeneratív betegségek növekvő gyakorisága. Ezen kórképek közös patogenetikai tényezője a reaktív oxigén származékok (reactive oxygene species, ROS) fokozott termelődése és elégtelen semlegesítése következtében kialakuló oxidatív stressz. Bár számos antioxidáns hatású gyógyszer és étrendkiegészítő van forgalomban, ezeknek a jótékony hatása az említett kórképekben nem bizonyított [1–3]. Az ösztadiolról és több más, a mellékvesekéregben, herében, petefészekben termelődő szteroid szerkezetű hormonnál kimutatták, hogy szintén antioxidáns tulajdonsággal bírnak [4–6].

A hormon kezelés – a hormonhiányos állapotokban szükséges szupplementáció kivételével – számos, bizonyos esetekben kedvezőtlen anyagcsere hatása miatt nem elfogadható a krónikus betegségek kiegészítő terápiájaként. Azonban a szteroid hormonok antioxidáns tulajdonságának és hatás-szerkezeti összefüggéseinek pontosabb megismerésével olyan molekulák fejlesztése válhat lehetővé, amelyek a káros szteroid hatások nélkül javítják az oxidatív státuszt. Kutatócsoportunk korábbi eredményeire támaszkodva dolgozatomban néhány hormon *in vivo* antioxidáns hatását, valamint egy szintetikus szteroid, a tibolon és metabolitjainak *ex vivo* szuperoxid csökkentő képességét vizsgáltam.

A bakteriális vérmérgezés (szepszis) súlyos formái a korszerű antibiotikus kezelés mellett is magas mortalitással járnak. A súlyos szepsziszhez és szeptikus sokkhoz gyakran társul kortikoszteroid elégtelenség, melynek hátterében elégtelen kortizol termelés, megváltozott kortizol metabolizmus, a kortizol hatásra való szöveti rezisztencia vagy mellékvese endothel működészavar állhat. Az elégtelen intracelluláris kortizol aktivitás eredménye a túlzott gyulladásozó válasz vagy a pro- és antiinflammatorikus mediátorok egyensúlyának megbomlása. Ebben az állapotban a kis dózisú glukokortikoid pótlás jótékony hatású lehet, és olyan betegeknél, akiknél a megfelelő folyadékpótlás és vazopresszor terápia nem elegendő a hemodinamikai stabilitás fenntartásához, ajánlott is [7]. Egyéb szteroid hormonokat ilyen indikációval

nem használ a klinikum, azonban többek között az ösztrogénnek és tesztoszteronnak is ismert bizonyos immunmoduláns hatása. Ezek a hormonok közvetlenül hatnak az immunrendszer több sejtípusára [8], valamint neutrofil granulocitákban fokozzák a mieloperoxidáz aktivitását, aminek fontos szerepe van az antibakteriális védelemben [9]. Dolgozatomban egyes szteroid hormonok, valamint a mieloperoxidáz és inhibitora hatását vizsgáltam neutrofil granulociták *ex vivo* baktériumölő képességére, valamint egy szepszis állatmodellen.

I.1. Reaktív oxigén származékok és az antioxidáns védekező rendszer

I.1.1. A reaktív oxigén származékok keletkezése és fiziológiai szerepe

A mitokondriumban zajló terminális oxidáció során a sejtek által felhasznált oxigén, mint végső elektronfelvevő, vízzé redukálódik. Egy oxigénmolekula négy elektront vesz fel, bizonyos körülmények között azonban csak részleges redukció következik be. Ilyenkor szuperoxid anion (O_2^-), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és hidroxil-gyök ($\cdot OH$) keletkezik, amelyeket reaktív oxigén származékoknak (reactive oxygen species, ROS) nevezünk [10].

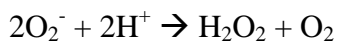
A mikrobiológiai ágensek fagocitózisa során a neutrofil granulocitákban fokozódik a molekuláris oxigén felhasználása és a ROS-ok termelődése, ún. légzési robbanás (respiatory burst) következik be [11]. Ennek első lépéseként molekuláris oxigénből és NADPH-ból a NADPH-oxidáz (NOX) enzim segítségével O_2^- keletkezik [12]:



A NOX több alegységből áll, amelyek a nyugvó sejtben a citoszol és a sejtszervecskék és vezikulumok membránjai között oszlanak meg. A granulocita aktivációjakor az alegységek kötődnek egymáshoz, és kialakul az aktív NOX enzim. A sejtszervecskék fuzionálhatnak a sejtmembránnal, így a termelődő O_2^- kijuthat az extracelluláris térbe vagy bejuthat a fagoszómába, ahol így felhalmozódnak a ROS-ok és megtámadják a kórokozót [12].

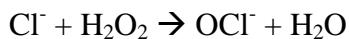
A O_2^- külső elektronhéján párosítatlan elektront hordoz, így igen nagy oxidoredukációs képességgel rendelkezik. Az ilyen tulajdonságú molekulákat, atomokat és ionokat szabad

gyököknek nevezzük [13]. A O_2^- egy további elektron felvételével a szuperoxid-dizmutáz (SOD) által katalizált reakcióban hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakulhat [12]:



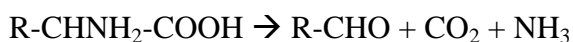
A SOD emlősökben három izoformában van jelen: a citoszolban a konstitutívan expresszált CuZnSOD, a mitokondriumban az indukálható MnSOD, és a plazmamembrán felszínén az extracelluláris SOD (ecSOD) [14].

A H_2O_2 , bár erős oxidáló hatású, nem szabad gyök, féléletideje háromszorosa a szuperoxidénak [15]. A H_2O_2 önmagában gyenge mikrobicid hatással bír, de egy, a mieloperoxidáz (MPO) katalizálta reakcióban kloridionnal erős baktericid hatású hipoklórossavat (HOCl) képez [12]:



A MPO egy hem tartalmú enzim, amely a csontvelőben termelődik a mieloid differenciáció során, és a neutrofil granulociták elsődleges granulumaiban raktározódik [16].

A mikroorganizmusok elpusztítása a sejtfal halogénálásával vagy aminosavainak dekarboxilálásával történik:



A légzési robbanás önmagát korlátozó folyamat, amennyiben az oxigénfelhasználás és O_2^- produkció az aktiváció után 20-30 perccel csökkenni kezd, és 60 perc alatt már csak a kezdeti értékek töredéke. A MPO valószínűleg fontos szerepet játszik ebben a NOX gátlásán keresztül. Több kutatócsoport eredményei szerint MPO deficienciában szenvedő betegek neutrofil granulocitáiban fokozott az oxigén felhasználás és a NOX aktivitása, tehát késik a légzési robbanás terminálása [11, 17, 18]. Mivel az antimikrobiális védelemhez elegendő egy rövid találkozás a mikroorganizmus és a légzési robbanás által termelt toxikus ágens között, a folyamat terminálása nem csökkenti a neutrofil mikrobicid képességét. Ugyanakkor így megelőzhető a környező szövetek ROS-ok általi károsodása [17].

A szabad gyökök folyamatosan termelődnek aerob sejtekben, és intracelluláris jelölő molekulákként szolgálnak mind fiziológiás, mind patológiás folyamatokban. Tranziens termelődésük bizonyos határokon belül elengedhetetlen a szervezet homeosztázisának fenntartása céljából [13].

I.1.2. A reaktív oxigén származékok patológiás szerepe

Ha a neutrofil granulocita fagoszómája még nem fűződött le teljesen a plazmamembránról, amikor az elsődleges granulum összeolvad vele, akkor ennek a tartalma (MPO, proteázok, defenzinek) részben az extracelluláris térbe jut, ahol a ROS-produkció folytatódhat [12]. Ha a ROS-ok termelődése meghaladja az antioxidáns védekező rendszer kapacitását, ún. oxidatív stressz alakul ki. Ekkor a szabad gyökök az oxidáció által molekuláris károsodást okoznak a lipideken, fehérjéken és nukleinsavakon. Az indukált biológiai hatások változatos fenotípusos válaszokat váltanak ki: génextpresszió aktiválása, sejthalál, sejtproliferáció vagy annak gátlása. Az oxidatív károsodás fiziológiás körülmények között is észlelhető, és szerepet játszik az öregedésben. A ROS-produkció tartós fokozódása és a redox-egyensúly egyidejű zavara szöveti károsodáshoz és krónikus gyulladásos állapothoz, ezáltal számos megbetegedéshez vezet. Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy többek között a diabetes mellitus, daganatképződés, ateroszklerózis, iszkémia-reperfúziós károsodás, neurodegeneratív betegségek patogenezisében az oxidatív stressznek fontos szerepe van [13].

I.1.3. Az antioxidáns védekező rendszer

A makromolekulákat összetett antioxidáns hálózat védi a ROS-ok káros hatásaitól. Ennek a rendszernek alkotói a sejtek által termelt antioxidáns enzimek, tiol csoporttal rendelkező peptidek [pl. glutation (GSH), tioredoxin család] és a táplálkozási antioxidánsok (pl. C-, E vitamin, szelén, karotinoidok). Az enzimek, mint a SOD, kataláz, glutation-peroxidáz (GPX) reakciók sorozatával alakítják a ROS-okat stabilabb molekulákká, mint a víz és molekuláris oxigén. A kis molekulású antioxidánsok (pl. GSH, NADPH, tioredoxin, E- és C vitamin, szelén) másodlagos antioxidáns enzimekkel

együtt redox köröket alkotnak, amelyek az elsődleges enzimek működéséhez szükséges kofaktorokat termelik. A kis molekulású antioxidánsok emellett közvetlen gyökfogóként is funkcionálnak. A sérült makromolekulák helyrehozatalában különböző javító (repair) rendszereknek van szerepük.

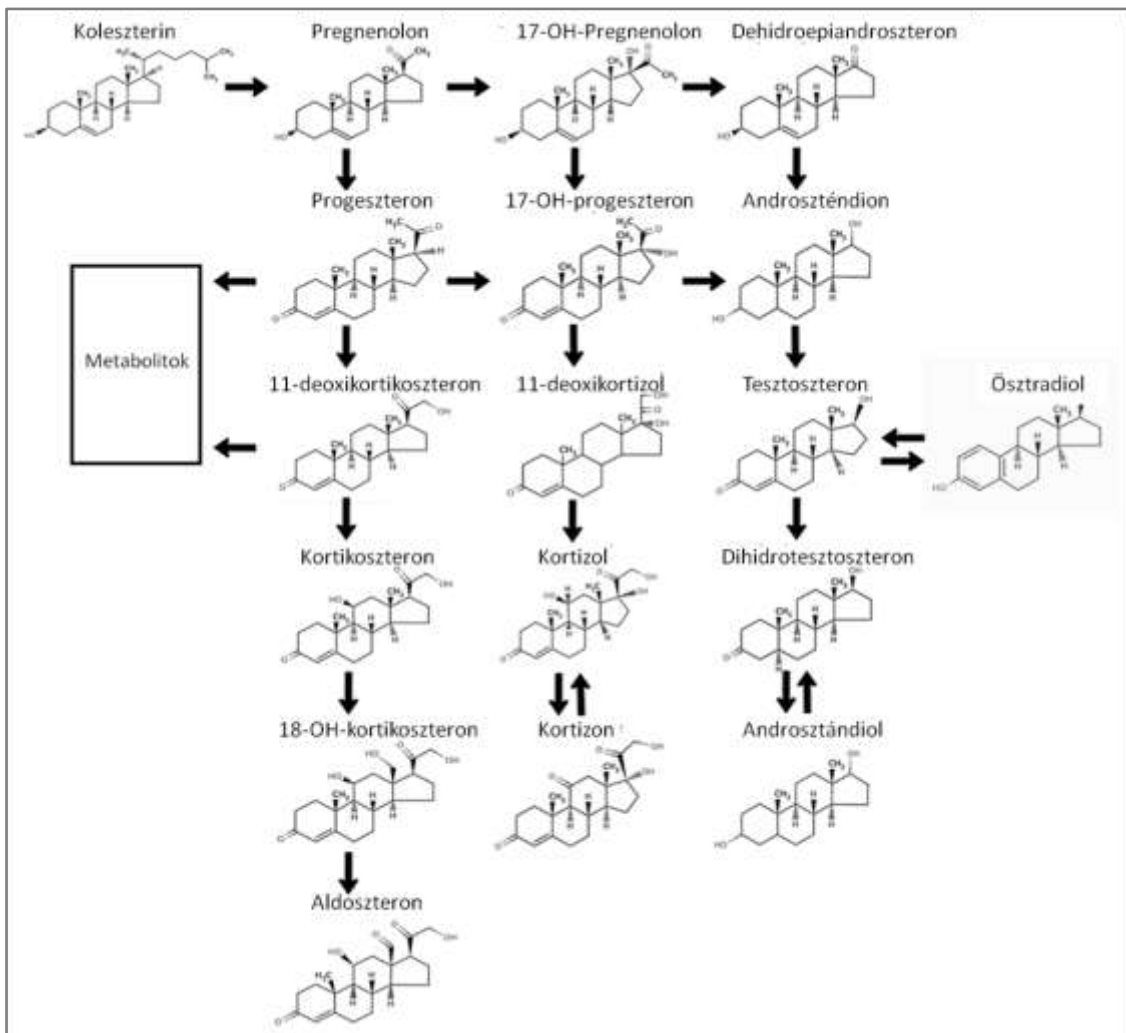
Az antioxidánsok között sok az átfedés és együttműködés, és a különböző rendszerek együttesen tartják fenn az intracelluláris redox egyensúlyt és csökkentik a ROS-ok általi molekuláris károsodást [13].

1. táblázat Antioxidánsok osztályozása [19]

Enzimatisz antioxidánsok		
Elsődleges enzimek: <i>szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz</i>		
Másodlagos enzimek: <i>glutacion-reduktáz, glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz</i>		
Nem enzimatisz antioxidánsok		
Ásványok: <i>cink, szelén</i>		
Karotinoidok: <i>β-karotin, likopin, lutein, zeaxantin</i>		
Kis molekulású antioxidánsok: <i>tioredoxin, glutacion, húgysav</i>		
Vitaminok: <i>A-, C-, E-, K-vitamin</i>		
Szerves kén származékok: <i>allium, allil-szulfid, indolok</i>		
Antioxidáns kofaktor: <i>koenzim-Q₁₀</i>		
Polifenolok	Flavonoidok	Flavonolok: <i>kvercetin, kaempferol</i>
		Flavanolok: <i>katechin, epigallokatechin-3-o-gallát</i>
		Flavanonok: <i>heszperidin</i>
		Flavonok: <i>krizin</i>
		Izoflavanoidok: <i>genistein</i>
		Antocianidinek: <i>cianidin, pelargonidin</i>
	Fenolsavak	Hidroxi-fahéjsavak: <i>ferulasav, p-kumársav</i>
		Hidroxi-benzoésavak: <i>gallát, ellagsav</i>

I.2. A szteroid hormonok mint antioxidánsok

A szteroid hormonok a mellékvesekéregben (glukokortikoidok, mineralokortikoidok, androgének), petefészekben (ösztrogének, progeszteron) és herében (androgének) termelődnek, fiziológias szerepük számos anyagcsere folyamat szabályozása (glukokortikoidok), a só-víz háztartás egyensúlyának fenntartása (mineralokortikoidok) és a nemi funkciók szabályozása (androgének, ösztrogének, progeszteron) (1. ábra). A szteroid szerkezetű hormonok egy része antioxidáns tulajdonsággal rendelkezik. Ennek a területnek széles a szakirodalma, és sok ponton egymásnak ellentmondó eredményekről számolnak be.



1. ábra A szteroid hormonok bioszintézise

A szteroid hormonok a szervezet antioxidáns védekező rendszeréhez több szinten kapcsolódhatnak (2. táblázat). Csökkenthetik a ROS-ok termelődését, semlegesíthetik a felesleges ROS-okat, fokozhatják a celluláris antioxidáns molekulák, pl. a tioredoxin aktivitását. A tioredoxin az egyik legáltalánosabb antioxidáns molekula, számos folyamatban részt vesz a humán sejtben. Közvetlenül hatástalanítja a ROS-okat, más antioxidáns enzimeknek elektrondonorként szolgál, transzkripciós faktorokat aktivál. Részt vesz a protein javításban, feltekeredésben, stabilitásban, az apoptózis és sejtproliferáció szabályozásában [20]. Az androgének fokozzák a tioredoxin gén expresszióját [21, 22]. A 17 β -ösztradiol (E₂) feltehetőleg az ER α receptoron keresztül, a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) aktiválásával, a cGMP jelátviteli úton fokozza a tioredoxin expresszióját [23].

2. táblázat A szteroid hormonok antioxidáns hatásának lehetséges mechanizmusai. A 3. oszlopban felsorolt példákra a szövegben részletesebben kitérünk.

ROS termelődés csökkentése	NOX/xantin-oxidáz aktivitás ↓	E ₂ , progeszteron
ROS semlegesítése	antioxidáns enzimek aktivitása ↑	SOD: E ₂ , progeszteron, tesztoszteron kataláz: progeszteron, kortikoszteron, tesztoszteron GPX: E ₂
	eNOS aktivitása ↑ → NO termelődés ↑	E ₂
	antioxidáns molekulák aktivitása ↑	tioredoxin: E ₂ , androgének GSH: progeszteron
	„A” gyűrűn fenolos hidroxil csoport	E ₂ , 17 α -ösztradiol

A szteroid bioszintézis közttermékeinek és végtermékeinek nagy része [pl. E₂, progeszteron, tesztoszteron, 18-hidroxi-deoxikortikoszteron, kortikoszteron, kortizol, dehidroepiandroszteron (DHEA) és szulfátja (DHEAS)] csökkenti a humán neutrofil granulociták O₂⁻ termelését, míg másokra ez nem jellemző (pl. aldoszteron, kortexolon) [5, 6]. Emellett a kortizol és szintetikus glukokortikoidok, mint a dexametazon és prednizolon mononukleáris sejtekben és aorta simaizomsejtekben is csökkentik a O₂⁻ felszabadulást [24, 25].

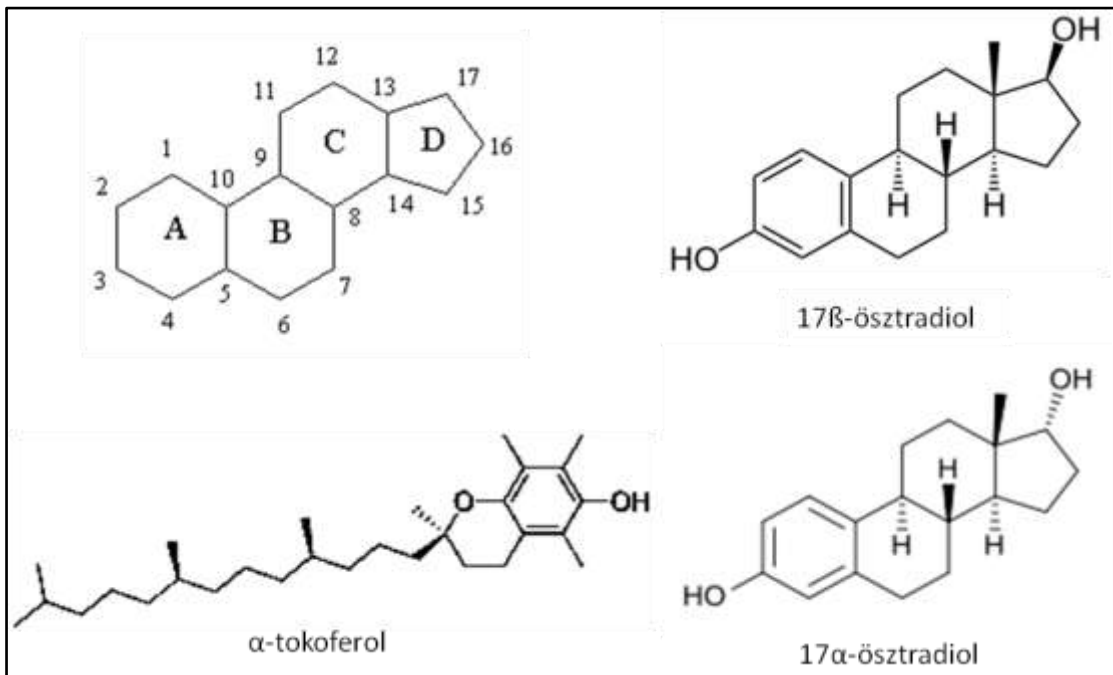
Mivel a ROS legfőbb forrása a NOX, ennek gátlásával javul az antioxidáns státusz. Endothelsejtekben az E₂ fiziológiás koncentrációban csökkenti a NOX gp91phox alegységének expresszióját és a NOX enzim aktivitását [26]. Humán neutrofil granulocitákban ezzel szemben a progeszteron 10⁻⁸ M koncentrációban csökkenti a NOX génexpresszióját [27]. Az ösztrogénhiányos állapotokban, mint a posztmenopauzában a NOX p22phox és p67phox alegységének expressziója fokozott az ér simaizomsejtjeiben. Míg az ösztrogén pótlásával ez megelőzhető, progeszteron kezelés hatására ugyanezen alegységek expressziója és a NOX aktivitása is nő, ami ROS-ok termelődéséhez vezet [28]. Az ösztrogénekhez hasonlóan a glukokortikoidok (dexametazon, kortizol, prednizolon, 10⁻⁷ M) is csökkentik a simaizomsejtek O₂⁻ termelését. A dexametazon downregulálja a p22phox alegység expresszióját a glukokortikoid receptor antagonistá RU486 által feloldható módon, így a génexpressziós hatás feltehetőleg a glukokortikoid receptoron keresztül valósul meg [24]. Ezzel szemben a kortikoszteron egér peritonealis macrophagokban 10⁻⁴-10⁻¹⁰ M koncentrációban gyorsan csökkenti a O₂⁻ termelést RU486 által nem visszafordítható módon, tehát nem a szokásos genomikai úton, hanem egy specifikus membránreceptoron és jelátviteli kaszkádon keresztül. Ezt támasztja alá az is, hogy BSA-hoz kötött, membrán impermeábilis kortikoszteronnal is elérhető volt ez a hatás [29].

A glukokortikoidok a p22phox downregulálásán kívül egyéb úton is csökkentik a ROS termelést, pl. érfal simaizomsejtekben gátolják a foszfolipáz A₂-t, ami néhány sejttypusban elengedhetetlen a O₂⁻ termeléshez [24].

A glukokortikoidokkal ellentétben egyes vizsgálatok szerint a tesztoszteron és norgesztrel (10⁻⁷ M) nem gátolja a O₂⁻ produkciót humán aorta simaizomsejtekben [24]. Ezzel szemben neutrofil granulocitákban a tesztoszteron csökkenti a O₂⁻ termelést [5].

Egyes szteroid vegyületek néhány szerkezetbeli jellegzetessége alkalmas a többlet ROS semlegesítésére. Az E₂, az ismert antioxidáns α -tokoferolhoz (E-vitamin) hasonlóan fenolos vegyület. Hatá szerkezeti vizsgálatok szerint a szteroid molekula A gyűrűjének C-3 pozíciójában levő fenolos hidroxil csoportja felelős a gyökfogó tulajdonságért, mert ezt a hidrogén atomot leadva semlegesíti a ROS-okat (2. ábra). Az E₂ gyökfogó hatása receptortól független módon valósul meg, mivel (1) ösztrogén receptort nem hordozó

sejteken is kimutatták, (2) a hatáshoz a fiziológiásnál nagyobb koncentrációra van szükség, (3) az ösztrogén receptorokhoz nem kötődő 17α -ösztradiol is rendelkezik gyökfogyó tulajdonsággal (4) és az RNS szintézist gátló aktinomicin D nem blokkolja az E_2 védő hatását. Ezzel szemben a fenolos A gyűrűvel nem rendelkező szteroid hormonok, mint a tesztoszteron, dihidrotesztoszteron, progeszteron, kortikoszteron, prednizolon és aldoszteron nem védik a sejteket az oxidatív károsodástól [30–32].



2. ábra A szteroid alapváz, a 17β -ösztradiol, 17α -ösztradiol és az α -tokoferol szerkezeti képlete

A ROS-ok semlegesítésének másik módja a nitrogén-monoxid (NO) serkentése. Az NO számos anti-atherogén hatása mellett a T-sejt proliferáció gátlásával csökkenti a lokális gyulladásos reakciókat és véd a bakteriális invázió ellen [33]. Az NO szuperoxiddal peroxinitritet képez, ami semlegesíti a többlet ROS-ot, ugyanakkor maga is igen reaktív oxidáló és nitráló hatású szabad gyök. Az ösztrogének a plazmamembránon található ER β -n keresztül fokozzák az NO termelődését az endothelialis NOS (eNOS), indukálható NOS (iNOS) és a neuronális NOS (nNOS) aktiválásával mind idegsejteken, mind nem neuronális sejteken. Emellett az eNOS expresszió E_2 általi upregulációját is leírták [4]. A tesztoszteron hatása az NO termelésre nem egyértelmű. Makrofágokban fiziológiás koncentrációban androgén receptoron hatva csökkenti az iNOS gén mRNS-

ét és az iNOS fehérje szinteket, és így az NO felszabadulást. Ez hozzájárulhat a férfiaknál ismert magasabb trombózis rizikóhoz [33]. A dexametazon szintén gátolja az iNOS gén expresszióját [33].

A ROS eliminációjában részt vevő enzimek aktivitását és génexpresszióját is befolyásolják egyes szteroid hormonok. Az E₂ patkány vaszkuláris simaizomsejtekben 10⁻⁶ M koncentrációban növeli a MnSOD és ecSOD mRNS expresszióját és aktivitását receptor mediált úton [34]. Neutrofil granulocitákban viszont E₂ kezelés (10⁻⁸ M) után az ecSOD és CuZnSOD expresszió nem változik, míg a MnSOD expresszió nő [27]. A progeszteron ugyanakkor vaszkuláris simaizomsejteken fiziológiás koncentrációban (10⁻⁶ M) a progeszteron receptoron keresztül downregulálja a MnSOD és ecSOD mRNS expresszióját és enzim aktivitását [28]. A CuZnSOD, a GPX és a kataláz expressziója nem változott sem E₂, sem progeszteron kezelés hatására [28, 34]. Érendothel sejtekben az E₂ fiziológiás koncentrációban (10⁻⁹-10⁻⁷ M) nem befolyásolja a MnSOD expresszióját sem [26]. Hippocampalis sejtekben nagy dózisú (10⁻⁵ M), 24 órás progeszteron kezelés hatására nő a kataláz aktivitás [35].

A progeszteron csökkentheti az oxidatív stresszt a membránstabilizáló hatásán keresztül is. Patkányokban iszkémia/reperfúzió esetén a progeszteron kezelés neuroprotektív hatású, emeli a GSH szintet és csökkenti a lipidperoxidációt [36]. Alacsony dózisban, krónikusan adva a progeszteron fokozza a SOD aktivitást és a GSH szintet patkányok gyomor nyálkahártyájában, magasabb dózisban ugyanakkor ezek a paraméterek csökkennek. Mivel a magasabb dózisú kezelés hatását mifepristonnal, egy progeszteron receptor blokkolóval ki lehet védeni, a hatás valószínűleg progeszteron receptorokon keresztül valósul meg, míg alacsony dózisú kezelés során a progeszteron koncentráció feltehetőleg nem éri el a receptorális pro-oxidáns hatáshoz szükséges értéket [37].

In vivo vizsgálatok szerint a plazma GPX aktivitás eumenorrhoeás nőknél magasabb, mint amenorrhoeásoknál, és ösztrogén kezelés hatására az eumenorrhoeásokéhoz hasonló szintre fokozódik [38]. Az idősebb nőtény patkányoknál több szervben észlelt alacsonyabb CuZnSOD aktivitás kombinált ösztrogén-progeszteron pótlás után jobban emelkedik, mint csupán ösztrogén pótlásra [39]. Fiatal nőtény patkányokban a

májsejtek mitokondriumában magasabb a GPX és MnSOD génexpresszió és enzimaktivitás, valamint kisebb a H₂O₂ produkció, mint azonos életkorú hímekekben [40]. A tesztoszteron szerepe az antioxidáns védelemben vitatott. Egerek májában és prosztatájában tesztoszteron kezelés hatására csökken az antioxidáns enzimek (SOD, kataláz, GSH-reduktáz, GSH S-transzferáz) aktivitása, és ennek megfelelően fokozott a lipidperoxidáció ezekben a szervekben [41]. Ezzel szemben neutrofil granulocitákban a tesztoszteron kezelés fiziológiás koncentrációban (10⁻⁸ M) csökkenti a O₂⁻ produkciót és fokozza a GSH-reduktáz aktivitást, míg a GPX, kataláz, teljes SOD és MnSOD aktivitás nem változik [5, 42]. Ennek ellentmond, hogy a MnSOD expressziója nő tesztoszteron kezelés hatására neutrofilekben [27]. Patkányok kisagyi szemcsesejtjeiben tesztoszteron hatására (10⁻⁶ M) nő a kataláz aktivitás, javul a sejtek ellenállóképessége az oxidatív stresszel szemben. Az androgén receptor antagonistá flutamid adására a védő hatás elmarad, ami androgén receptor által mediált mechanizmusra utal [43]. Az androgén prekursor DHEA és DHEAS *in vivo* patkány modellen antioxidáns hatásának bizonyult [44].

A glukokortikoidok antioxidáns tulajdonságait viszonylag kevesen vizsgálták a szakirodalomban. A legfőbb glukokortikoid hormon emberben a kortizol, ami immunszuppresszáns hatású, és glukokortikoid receptorokon keresztül részt vesz a szénhidrát, fehérje és zsírsav anyagcsere szabályozásában. A kortikoszteron az aldoszteron szintézis köztiterméke, emberben plazmakoncentrációja 10-20-szor alacsonyabb a kortizolénál és nincs ismert specifikus szerepe. Rágcsálókban ez a fő stresszhormon [45]. A dexametazon a kortizolnál 25-ször erősebb szintetikus glukokortikoid, elhanyagolható mineralokortikoid hatással. Az orvoslásban immunszuppresszánsként és gyulladáscsökkentőként alkalmazzák. A kortizolhoz hasonlóan glukokortikoid receptorokon hat.

A glukokortikoidok különböző szövetekben változatosan befolyásolják az antioxidáns enzimek aktivitását. A dexametazon 10⁻⁷ M koncentrációban érfal simaizomsejtekben nem befolyásolja a SOD aktivitását [24]. Patkány tüdőben, vesében, lépben és vázizomban dexametazon kezelés után fokozódik, míg a szívben, nyirokcsomóban és csecsemőmirigyben csökken a kataláz aktivitás [35].

Ex vivo dexametazon kezelés (5,1x10⁻³ M) patkány makrofágokban csökkenti a MnSOD és GPX aktivitást, míg patkányok *in vivo* (5 mg/ttkg) kezelésekor a csökkent MnSOD

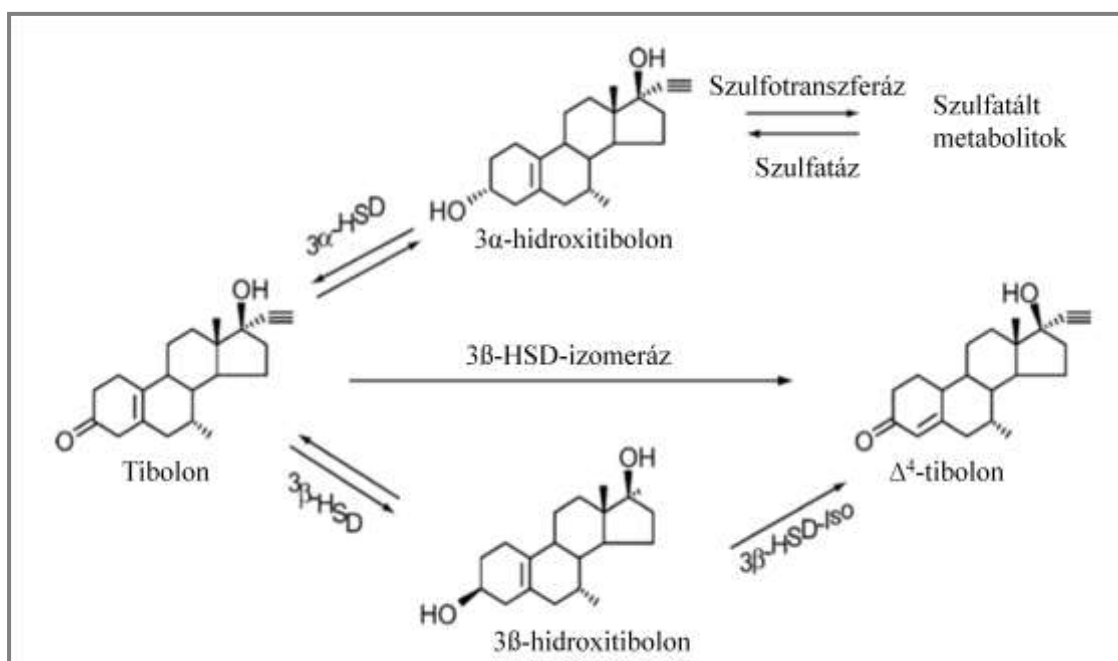
aktivitás mellett a macrophagok GPX és kataláz aktivitása nő [46]. Hippocampalis neuronokban hosszú távú (24h) dexametazon kezelés 10^{-5} M dózisban fokozza a kataláz aktivitást. Alacsonyabb dózisú (10^{-7} M) kortikoszteron és 6-metilprednizolon csak rövid távú (1-3h) hatást fejt ki a kataláz aktivitásra. Ezzel szemben a GSH termelődés elsősorban hosszú idejű dexametazon kezelésre emelkedett, de a kortikoszteron a GSH szintet nem befolyásolja [35]. Gliasejtekben a dexametazon és kortikoszteron (10^{-7} M) csak hosszú távú kezelés után fokozzák a kataláz aktivitást, míg a GSH szint rövid távon is változik [35]. Kisagyi szemcsesejtekben nagy dózisú dexametazon csökkenti a kataláz aktivitást [43]. Tehát a glukokortikoidok a központi idegrendszerben a szteroidtól, dózistól és a kezelés időtartamától függően változatosan szabályozzák a kataláz aktivitást és GSH szintet.

Bár a kortizolt leginkább a stressz fő biomarkereként és pro-oxidánsként említi az irodalom, felmerült az is, hogy részt vesz a SOD aktivitásának szabályozásában. Rhesus majmokban megfigyelték, hogy a CuZnSOD aktivitása a vörösvértetekben a kortizollal és DHEAS-tal jól korreláló napi ingadozást mutat. A legmagasabb SOD aktivitást 10 órakor, a legalacsonyabbat 22 órakor mérték. Ahogy a kortikoszteroidok hatására reggel a szervezet felébred, és fokozódik a légzés, az intenzívebb oxigénfelhasználás által a ROS-ok szintje is nő. Lehetséges, hogy ez váltja ki a SOD expressziójának fokozódását. Öregedő állatokban a SOD aktivitás ritmusa ellapul, hasonlóan a kortizol és DHEAS ritmusához. Embereknél is ismert a SOD napi ingadozása, és patkányok néhány szövetében a SOD génexpressziójának cirkadián ritmusát is leírták [47].

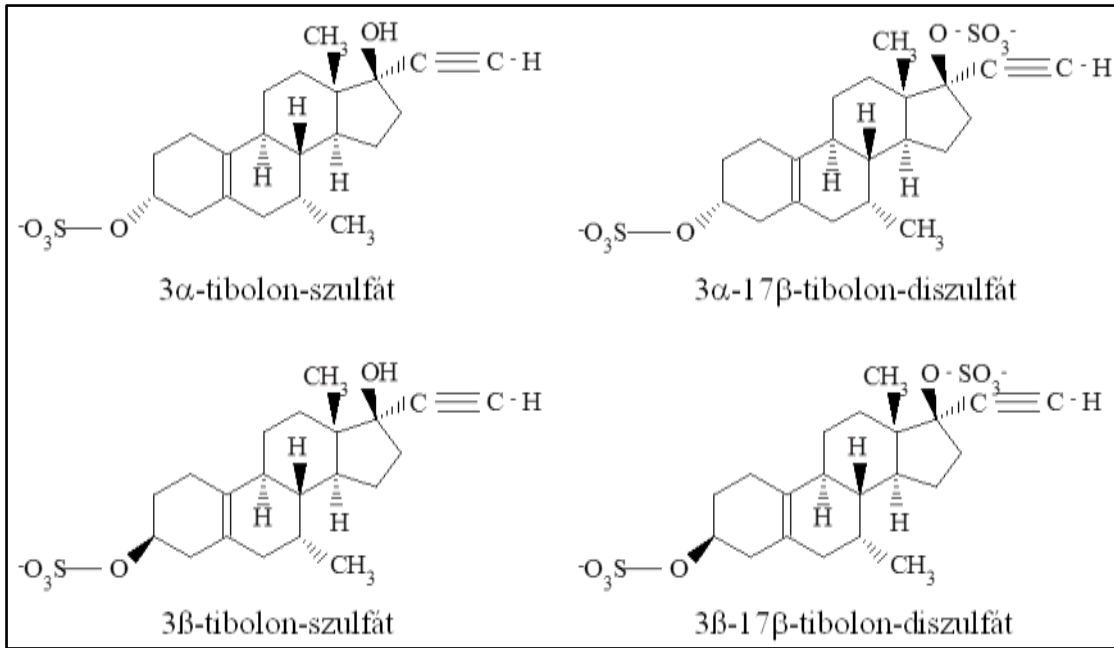
Ezzel ellentétben hiperkortizolizmus esetén Cushing-szindrómás betegekben a plazma kortizol szint negatívan korrelál a vörösvértest CuZnSOD aktivitásával. A betegekben az alacsony SOD aktivitás és magas malondialdehid (MDA) szint oxidatív stressz jelenlétére utal, ami egybevág azzal az ismert jelenséggel, hogy Cushing-szindrómában nő az érlemeszesedés rizikója – feltehetőleg az oxidatív stressznek köszönhetően [48].

I.3. A tibolon antioxidáns tulajdonságai

A tibolon a norethynodrel 17-metil származéka, 1988 óta használják a változókor tüneteinek kezelésére és a menopauzális csontvesztés megelőzésére. A molekula szerkezetét és hatásmechanizmusát tekintve eltér mind az ösztrogénektől, mind a szelektív ösztrogén-receptor modulátoroktól (SERM). A szteroid alapvázról hiányzik az ösztrogénekre jellemző fenolos hidroxilcsoport, ezért közvetlenül nem kötődik az ösztrogén receptorokhoz. Orális alkalmazását követően azonban gyorsan metabolizálódik három vegyületté: 3 α -hidroxitibolonná, 3 β -hidroxitibolonná és Δ^4 -tibolonná. A 3-as helyzetű hidroxilcsoportot tartalmazó származékok a máj és bél 3 α - és 3 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (HSD) segítségével keletkeznek, és receptor mediált ösztrogén hatással bírnak. A Δ^4 -tibolon közvetlenül a tibolonból vagy a 3 β -hidroxitibolonból keletkezik a 3 β -HSD-izomeráz katalizálta reakcióban (3. ábra), és progeszteron- és androgén-receptorokat aktivál. Egyik metabolit sem kötődik glukokortikoid-receptorokhoz [49]. Az említett tibolon származékok kb. 80%-a inaktív mono- vagy diszulfatált formában van jelen a keringésben. Ezekből folyamatosan képződhetnek az aktív 3-hidroxi metabolitok a szulfatáz enzim segítségével [50] (4. ábra).



3. ábra A tibolon metabolizmusa. HSD: hidroxiszteroid-dehidrogenáz ([49] alapján).



4. ábra A tibolon szulfatált metabolitjainak szerkezeti képlete

A metabolitok ösztrogén receptor aktiváció útján hatnak a csontra, agyra, hüvelyre és a keringési rendszerre. Bár a csontszövet sejtjei ösztrogén, progeszteron és androgén receptorokat is tartalmaznak, a tibolon csontvédő hatása feltehetőleg kizárólag ösztrogén receptorokon keresztül valósul meg [51]. A tibolon pozitív hatásait az agyra és hüvelyre valószínűleg szintén a hidroxil metabolitok révén éri el, bár ezt *in vivo* kísérletekkel még nem támasztották alá.

A tibolon antiatheroszklerotikus hatású közvetlenül az érfalban. A két hidroxil metabolit ösztrogén receptor mediált úton csökkenti az érfalban az endothelsejtek VCAM-I és E-szelektin sejtadhéziós molekulák expresszióját [52], és a MAPK regulációja által gátolja a simaizom sejt proliferációt [53]. Simoncini és mtsai szerint a tibolon, a 3α-hidroxitibolon és a 3β-hidroxitibolon humán köldökzsinór véna endothel sejtekben stimulálja az eNOS-t és az NO felszabadulást. Ez a hatás ösztrogén receptorokon, egyrészt gyors, nongenomikus úton, másrészt az eNOS génexpresszió serkentése révén valósul meg. A 3α-tibolon-szulfát és 3α-17β-tibolon-diszulfát kisebb mértékben stimulálja az NO-szintézist, a Δ⁴-tibolonnak nincs ilyen hatása [53]. Posztmenopauzális nők tibolon kezelése a hagyományos ösztrogén-progeszteron tartalmú hormonpótláshoz képest hasonló mértékben csökkenti a plazma endothelin koncentrációt ([54], idézi:

[55]). A tibolon plazmalipidekre való hatása kettős: mind a HDL-koleszterin, mind a lipoprotein(a) és a trigliceridek szintjét csökkenti [56], de a HDL részecskék koleszterin eltávolító kapacitása nem romlik. Idős ovariektomizált patkányokban tibolon kezelés hatására az LDL és HDL szint emelkedett, a triglicerid koncentráció csökkent az áloperált kezeletlen és ovariektomizált, ösztradiol-valeráttal kezelt csoportokhoz képest [57]. Ovariektomizált, koleszterindús tápon tartott nyulaknál a tibolon kezelés dóziszfüggő módon akadályozza az érlemeszesedés kialakulását [58], és humán vizsgálatokban is csökkenti az arteria carotis meszesedésének mértékét. Összességében a tibolon kezelés nem növeli a szív-érrendszeri betegségek rizikóját [53].

A tibolon és származékai a receptorális hatások mellett az ösztradiol metabolizmusában részt vevő enzimek aktivitását is szabályozzák. Ez a hatás szintén szövet-szelektív módon valósul meg: egyes szöveteket stimulálnak, másokat nem. Ezért az ösztrogénektől és SERM-től megkülönböztetve ún. szelektív szöveti ösztrogén aktivitás regulátorként (STEAR: Selective Tissue Estrogenic Activity Regulator) klasszifikáljuk [59].

A csonttal és kardiovaszkuláris rendszerrel ellentétben az endometriumban és az emlőben nem kívánatos az ösztrogén hatás. Úgy tűnik, ezekben a szövetekben a tibolonnak az ösztrogénnel ellentétes hatása van. Az emlőben a tibolon és a Δ^4 -tibolon serkenti az ösztradiolt ösztronná konvertáló II. típusú 17β -HSD-t, valamint az ösztront ösztron-szulfáttá alakító szulfotranszferázt [60, 61], idézi [49]) A másik oldalról a tibolon a szulfatált metabolitokat aktiváló szulfatáz gátlásával is ezt a hatást éri el. Az endometriumban a szulfatáz kisebb mértékben gátlódik, mint az emlőben. Ugyanakkor a csontban a tibolon nem gátolja a szulfatázt, ami valószínűleg az adott sejttípusok fiziológiás különbségeinek (pl. pH, fehérje kölcsönhatások) és a tibolon intracelluláris megoszlásának köszönhető [50]. Az endometriumban a Δ^4 -tibolon progesztagén aktivitása is gátolja az ösztrogén által kiváltott sejtproliferációt. Az emlőben a progesztagén hatás kevésbé kifejezett. Tehát a tibolon az emlőben és az endometriumban enzimreguláció révén kevésbé aktív vagy inaktív ösztrogének képződésének irányában hat, emellett az endometriumban jelentős a progesztagén aktivitás [49].

A tibolon szerepe az oxidatív és antioxidáns folyamatokban még nem tisztázott. Humán emlőráksejtekben a tibolon és két metabolitja, a 3β -hidroxitibolon és a Δ^4 -tibolon magas koncentrációban (10^{-6} M) fokozza a kataláz aktivitását és gátolja a sejtnövekedést [62]. Humán köldökzsinór véna endothel sejtekben a tibolon, a hidroxil metabolitok, és gyengébben a 3α -tibolon-szulfát és 3α - 17β -tibolon-diszulfát serkenti az NO felszabadulást [53], és tibolonnal kezelt posztmenopauzálás nők plazma NO szintje magasabb a placebo csoporténál [55]. DeAguitar és mtsai patkányok agyában vizsgálták a tibolon antioxidáns kapacitását. Ovariektomizált, 12 hetes tibolon kezelésben részesült patkányok agykérgében alacsonyabb az antioxidáns kapacitás, mint az áloperált kontroll csoportban, viszont magasabb, mint az ösztadiol-valeráttal kezelt csoportban. Idős ovariektomizált állatok hippocampusában a tibolon csökkenti az antioxidáns kapacitást az ovariektomizált, kezeletlen kontrollhoz képest. Összességében a tibolon kezelés egyik irányban sem befolyásolta jelentősen az oxidatív állapotot [57]. Egy másik kutatócsoport szerint ózonszennyezésnek kitett hím patkányokban a tibolon megelőzte a lipidek és fehérjék oxidatív károsodását a központi idegrendszerben. 60 napos tibolon kezelés (1 mg/ttkg) hatására az ózon által kiváltott MDA szint emelkedés és SOD aktivitás csökkenés mérséklődött a hippocampusban [63]. Egy humán klinikai vizsgálatban tibolon kezelésben részesülő posztmenopauzálás nőknél mérték az oxidatív stressz és antioxidáns válasz markereit. Posztmenopauzában a plazma aszkorbinsav, α -tokoferol, tiolok és vörösvértest GSH szint szignifikánsan csökkent, a plazma MDA szint emelkedett a premenopauzálás nőkhöz képest. 6 havi tibolon kezelést követően az α -tokoferol szint szignifikánsan emelkedett, a lipidperoxidáció csökkent a kezeletlen csoporthoz viszonyítva [64]. Kimutatták, hogy a 2-hidroxiösztrogon, egy ösztrogén bomlástermék *in vitro* gyorsan reagál a tokoferoxil gyökkel, és helyreállítja a szubsztituált tokoferolt. Az ösztrogének és hormonpótló gyógyszerek valószínűleg részben a tokoferol regenerációja révén fejtik ki antioxidáns hatásukat [65]. Érdekes módon nőstény patkányok májában, *ex vivo* vizsgálva a tibolon inkább pro-oxidánsként viselkedett, fokozta a lipidperoxidációt, csökkentette a GSH szintet, míg a GPX, kataláz és SOD aktivitás nem változott. Májsejtekből izolált mitokondriumokban a tibolon gátolta a NADH oxidációt és az elektron transzportot, csökkentette a GSH szintet. Ezen adatok szerint a tibolon kezelés fokozza a zsírmáj és a steatohepatitis rizikóját, különösen posztmenopauzában, amikor a lipid anyagcsere kedvezőtlenül változik. A

vizsgálatban a humán terápiás vérszintél (10^{-6} M) magasabb koncentrációban ($2,5-10 \times 10^{-5}$ M) adagolták a tibalont. Mivel azonban az orálisan bevitt tibolon portális koncentrációja magasabb, mint a periférián mért terápiás vérszint, számolni kell a potenciális májkárosító hatással [66].

I.4. A mieloperoxidáz szerepe az antioxidáns védelemben

Annak ellenére, hogy a MPO szabad gyököket termelő reakciót katalizál, részt vesz a neutrofilek O_2^- produkciójának terminálásában is [9, 17]. Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint a MPO-zal és az általa katalizált reakció végtermékével, a NaClO-dal kezelt humán neutrofil granulocitákban csökken a O_2^- termelés, valószínűleg a NOX negatív feedback-szerű gátlása miatt [9].

Néhány szteroid hormon szerepet játszik a MPO aktivitásának szabályozásában. Posztmenopauzás nőknél és idősebb férfiaknál alacsonyabb a plazma MPO koncentráció és a neutrofilek intracelluláris MPO aktivitása, mint fiataloknál. Emellett nőknél hormonpótló kezelés hatására a MPO felszabadulás és az intracelluláris MPO aktivitás fokozódik [18]. *Ex vivo* körülmények között az E_2 , tesztoszteron, kortizol és progeszteron 2 órás inkubáció után, 10^{-7} koncentrációban csökkenti a O_2^- felszabadulást. A non-szteroid gyulladásgátló indometacin erős MPO inhibitor, közvetlenül gátolja a MPO klorináló aktivitását. A szteroiddal és indometacinnal kezelt sejtek O_2^- termelése jelentősen emelkedett a csak szteroiddal kezelt sejtekéhez képest. Tehát feltételezhető, hogy az említett szteroid hormonok antioxidáns hatása legalábbis részben a MPO aktivitás fokozásán keresztül valósul meg, illetve az indometacin kezelés jótékony hatással lehet a neutrofilek baktericid aktivitására [9].

II. Célkitűzések

A szteroid szerkezetű hormonok pontosabb hatásának megismerése érdekében dolgozatomban a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. A posztmenopauzás hormonpótlásra használt szintetikus szteroid, a tibolon és metabolitjai hogyan befolyásolják aktivált humán neutrofil granulociták szuperoxid termelését *ex vivo*?
2. Az izolált granulocitákon antioxidáns hatást mutató kortizol és kortikoszteron ezen tulajdonsága *in vivo* körülmények között is megmutatkozik?

A mieloperoxidázzal és ennek aktivitására ható szteroid hormonokkal és indometacinnal végzett korábbi kutatások folytatásaként az alábbi kérdések merültek fel:

3. Hogyan hatnak egyes antioxidáns szteroid hormonok, a MPO és az indometacin izolált és fertőzött granulociták baktericid funkciójára?
4. Hogyan befolyásolja az indometacin, ösztradiol és tesztoszteron kezelés a gyulladáshoz vezető paramétereket és a bakteriémiát patkány szepszis modellen?

III. Módszerek

III.1. Vizsgálatok humán neutrofil granulocitákkal

III.1.1. A tibolon és származékainak hatása a szuperoxid termelésre

III.1.1.1. Vizsgálati egyének és sejtizolálás

Összesen 10 (férfiak és nők), 28-46 éves egészséges önkéntest – orvosokat és orvostanhallgatókat – vontunk be. A vizsgálatok a Semmelweis Egyetem Regonális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKEB) engedélyével történtek. A donorok nem dohányoztak, nem szedtek rendszeresen gyógyszert, nem volt ismert betegségük, és hozzájárultak a vizsgálatban való részvételhez. Reggel 8-9 óra között éhomi vérvétel történt EDTA tartalmú, vákuum elven működő, zárt vérvételi csövekbe. Ezt követően a neutrofil granulocitákat két órán belül izoláltuk a következőkben leírt módon.

A teljes vért Histopaque-ra (Sigma, St. Louis, MO, 1077-1) rétegeztük és a vörösvértesteket egy órán át üleptítettük. A vért ezt követően 63 ill. 72%-os Percoll gradiensén (Sigma, P-1644) 25 percig, 20°C-on, 300x g fordulatszámmal centrifugáltuk. Az így különvált granulocitákat kétszeri pufferes atmoszféra után 220x g fordulatszámon centrifugáltuk. A leülepedett sejteket néhány milliliter Hank's pufferben (Sigma, H-8264) felvettük, majd Türk oldat felhasználásával sejtszámlálást végeztünk. Az oldat sejtkoncentrációját 10^6 /ml-re állítottuk be.

III.1.1.2. A sejtek kezelése tibolonnal és származékaival

A granulocita szuszpenziókat két órán keresztül inkubáltuk 37°C-on a különböző hatóanyagok jelenlétében. A következő hormonokkal végeztük a kezeléseket, három különböző koncentrációban (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M): tibolon, 3 α -hidroxitibolon, 3 β -hidroxitibolon, Δ^4 -tibolon, 3 α -tibolon-szulfát, 3 α -17 β -tibolon-diszulfát, 3 β -tibolon-szulfát, 3 β -17 β -tibolon-diszulfát, valamint referenciaként ösztadiol (Sigma). A tibolon metabolitokat a gyártó szolgáltatta. Kontrollként hormonok hozzáadása nélkül, de egyébként azonos körülmények között inkubált sejteket használtunk.

III.1.1.3. A sejtek szuperoxid termelésének mérése

A neutrofil granulociták aktiválásához fMLP-t (N-formyl-Met-Leu-Phe, Sigma) használtunk. Az N-formilált peptidek bakteriális fehérje degradáció során keletkeznek, és elősegítik a fagocita sejtek degranulációját és szabad gyökök termelődését. Az fMLP receptora egy G-proteinhez kötött receptor, melynek stimulálása aktiválja a foszfolipáz-C-t. A keletkező másodlagos jelátvivők, a diacilglicerol és inozitol-trifoszfát aktiválják a protein kináz-C-t és kalciumiont mobilizálnak az intracelluláris raktárakból. Az intracelluláris kalciumszint növekedésének következménye a szabad gyök termelő enzimeket tartalmazó granulumok fúziója a fagoszómával, illetve a granulumok exocitózisa (degranuláció) [67].

Az fMLP stimulációt követően a kibocsátott szuperoxid gyököt a ferricitokró-m-c redukciójának fotometriás mérésével mutattuk ki [68]. A hormonokkal történt inkubációt követően a fehérvérsejt oldatokat 1 ml-es fotometriás küvetákba helyeztük és 10 µl (24 µg) citokró-m-c-t (Sigma) adtunk hozzá. A reakciót 10^{-6} M fMLP hozzáadásával indítottuk el. Ezt követően azonnal, majd 5 percen keresztül percenként mértük a citokró-m-c redukcióját Hitachi U-2001 típusú spektrofotométerrel 550 nm-en, 24°C-on, tiszta Hank's oldatot tartalmazó vakkal szemben. A nagyobb szuperoxid termelés erősebb redukciót, nagyobb optikai denzitásváltozást (ΔOD) eredményezett. A legmagasabb ΔOD -t a stimuláció után 5 perccel mértük. A citokró-m moláris extinkciós koefficienséből ($2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) és a sejtszámból kiindulva átszámítottuk a ΔOD értékeinket, és az eredményeket „nmol szuperoxid anion / 10^6 sejt”-ben adtuk meg [69]. A jobb összehasonlíthatóság érdekében a különböző szteroidok esetén mért eredményeket a kontroll százalékában adtuk meg.

III.1.1.4. A vizsgált hormonok hatása a xantin – xantin-oxidáz rendszerben

Az *ex vivo* eredmények alátámasztására a vegyületeket egy sejtmentes O_2^- termelő rendszerben, a xantin – xantin-oxidáz reakcióban is vizsgáltuk. A xantin-oxidáz a xantint húgysavvá oxidálja, miközben a molekuláris oxigén szuperoxid anionná vagy hidrogén-peroxiddá redukálódik [70]. A reakcióelegy 0,05 U/ml xantin-oxidázt (Sigma), 0,5 mM xantint (Sigma) és 0,2 mM EDTÁ-t tartalmazott 100 mM K-foszfát pufferben (pH 7,8). A hormonokat 10^{-7} M koncentrációban vizsgáltuk. A szuperoxid

termelést a fentiekhez hasonlóan, a citokróm-c redukciójával mértük 550 nm-en, 6 percig.

III.1.1.5. Statisztikai analízis

Az egyes kezelések és a kontrollok összehasonlítását az általános lineáris modellel (General Linear Models, SAS 8.2 statisztikai szoftver, Cary, NC) és Dunnett próbával végeztük. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg. Az eredményeket átlag \pm standard hibaként adtuk meg. A hibasávok az egyének közti hibákat mutatják.

III.1.2. Az indometacin és egyes szteroid hormonok hatása az intracelluláris baktérium ölésre

III.1.2.1. Vizsgálati egyének és sejtizolálás

A vizsgálatban összesen 11 (6 férfi és 5 nő), 23-40 éves egészséges önkéntestől vettünk vért, majd a granulocitákat izoláltuk a III.1.1.1. pontban leírtaknak megfelelően. A sejt koncentrációt 5×10^6 /ml-re állítottuk be.

III.1.2.2. Az Escherichia coli opszonizációja

A vizsgálathoz *E. coli* O111:K58 törzset használtunk. A baktériumtörzset egy éjszakán át 37°C-on véresagaron tenyésztettük. Egy kacsnyi baktériumot feloldottunk 200 μ l Hank's pufferben, majd négy csepp antitest hozzáadása után a szuszpenziót 37°C-on inkubáltuk 30 percen keresztül. Az antitestet az Országos Epidemiológiai Központ kifejezetten az *E. coli* O111:K58 törzsre állította elő.

III.1.2.3. A granulociták kezelése

Az 5×10^6 /ml koncentrációjú granulocita sejtoldatból 400-400 μ l-t (2×10^6) 2 órán keresztül, 37°C-os vízfürdőben inkubáltunk indometacin (10 μ g/ml, Sigma, I7378), MPO (71 ng/ml, Merck, 475911), 17 β -ösztadiol (10^{-8} M, Sigma, E8875) vagy kortizol (10^{-8} M, Sigma, H4001) jelenlétében. A kontroll sejteket hozzáadott hatóanyag nélkül inkubáltuk hasonló módon. Az inkubációt követően a neutrofileket 2×10^7 opszonizált *E.coli* baktériummal hoztuk össze, majd az elegyet további 30 percre visszahelyeztük a

vízfürdőbe. 1-1 ml jéghideg Hank's puffer hozzáadása után az elegyet 6000/min fordulatszámon 7 percig centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után az üledék sejteket megfestettük 200 µl (1,44 ml/100 ml Hank's puffer) acridin narancs festékkel (Sigma, A6014). Egy perc múlva a keverékeket 1 ml jéghideg Hank's oldattal 10 000/min fordulatszámon, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és az üledék sejtekben vizsgáltuk a bakteriális killinget.

III.1.2.4. Az intracelluláris baktériumölés vizsgálata

Az acridin narancs csak az elhalt baktériumokat festi meg, amelyek UV fényben narancssárgán fluoreszkálnak. A vizsgálatokat többször megismételtük, a bakteriális killinget UV mikroszkóp (Leica, DMRB DIC) alatt vizsgáltuk. Az elölt baktériumokat több látótérben megszámláltuk. A különböző hatóanyagokkal kezelt granulociták baktériumölésének értékelésére két rendszert állítottunk fel. Az egyik a kontroll százalékában fejezi ki a baktériumölést, ahol a kontroll minden esetben 100%. A másik értékelési formánál egy 0-5-ig terjedő skálán fejeztük ki a baktériumölést, ahol a 0-nál nem pusztult el egy baktérium sem, míg az 5-ös egy elméleti maximális killinget jelent. A párhuzamos mérések eredményeiből átlagot számítottunk.

III.2. *In vivo* patkánykísérletek

III.2.1. A kortikoszteron és kortizol gyökfogyó hatásának vizsgálata

III.2.1.1. Kísérleti állatok és kezelések

A kísérlethez 16 darab, átlagosan 500-600 g testtömegű felnőtt hím Sprague-Dawley patkányt használtunk. A patkányokat standard állatházi körülmények között, csoportonként külön ketrecekben, 22±1°C-on, 12-12 órás fényciklusokban tartottuk, a lámpákat 18:00-kor kapcsoljuk fel. Az állatokat négy egyenlő csoportra osztottuk, a kezeletlen kontroll csoport hagyományos tápot, a három kezelt csoport 10% olívaolajat és 1% koleszterint tartalmazó lipiddús tápot kapott 28 napig. A lipiddús tápot oxidatív stressz keltése céljából adtuk [71]. Az állatok az ivóvizet automata itató készülékből, szabadon fogyasztották. Két kezelt csoport ivóvizéhez kortizolt (100 µg/ml, Sigma) vagy kortikoszteront (150 µg/ml, Sigma) adtunk, a dózisokat irodalmi adatok alapján, a

patkányok átlagos napi folyadékbevitelét és testsúlyát figyelembe véve számítottuk ki [72]. Figyelembe véve, hogy egy patkány naponta átlagosan 20 ml vizet iszik, a kortizol ill. kortikoszteron napi dózisa 2 mg, ill. 3 mg volt. A lipiddús diétán tartott és a kezeletlen kontroll csoport tiszta ivóvizet kapott. Az ivóvíz és a szilárd-táp korlátlanul állt az állatok rendelkezésére. A kezelés előtt (0. nap) és a 28. nap végén a patkányok farki vénájából vérvétel történt EDTA tartalmú csövekbe.

III.2.1.2. Teljes gyökfogó kapacitás mérése

A teljes gyökfogó kapacitást (total scavenger capacity, TSC) kemilumineszcenciás assay-vel mértük (Diachem Kft, Budapest). Ezzel a módszerrel a szövet eredetétől függetlenül mérhető a teljes szabadgyök termelés [73]. 20 µl plazma mintát mikroperoxidázt, hidrogén-peroxidot és luminolt tartalmazó Tris-HCl (trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid) pufferben inkubáltunk (pH 10,5). A mikroperoxidáz – hidrogén-peroxid rendszer a Fenton reakcióban hidroxil gyököket termel. Ezek hatására a luminol gerjesztődik és fényt bocsát ki, ami luminométerrel detektálható. Ha a rendszerhez gyökfogó vegyületet, pl. vért vagy egyéb szövet-szuszpenziót adunk, akkor a kibocsátott fényintenzitás csökken. A lumineszcencia gátlása korrelál a minta redoxpotenciáljával és a TSC-sal. A luminol fényemisszióját 425 nm-en, 30 sec-ig, 37°C-on mértük. A plazma minták relatív lumineszcenciáját egy vak kontrollhoz képest határoztuk meg (minta/vak arány), és relative light unit (RLU) egységben fejeztük ki. A vak kontroll a plazmán kívül az összes reagenst tartalmazta. Az alacsonyabb RLU magasabb TSC-t, jobb antioxidáns státuszt jelent.

III.2.1.3. Statisztikai analízis

A csoportok 0. és 28. napi plazma mintájából mért átlagos RLU értékeit kétmintás, párosított t-próbával hasonlítottuk össze (SPSS v. 12 szoftvercsomag, Chicago, IL). A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

III.2.2. Az indometacin, az ösztradiol és a tesztoszteron hatásának vizsgálata patkány szepszis modellen

III.2.2.1. Kísérleti állatok

Az *in vivo* vizsgálatokat két fázisban végeztük. Mindkét kísérlethez 120-170 grammos SPF státuszú hím Wistar patkányokat {CrI.(Wi)Br.} használtunk. Az állatok az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete Kísérleti Állatházában, hatosával-nyolcasával, 2-es típusú patkánydobozban steril faforgácsos almon („Lignocell”, J. Rettenmaier & Söhne GmbH, Rosenberg, Németország) voltak elhelyezve. Ad libitum kaptak hagyományos extrudált tápot („Ssniff RZ”, Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország) és naponta friss ivóvizet.

III.2.2.2. Kezelések a vizsgálat első fázisában

Az első kísérletben 4 csoportot alakítottunk ki, csoportonként 8 állattal. 5 napon keresztül, napi egy alkalommal a patkányok gyomorszondán át a következő kezeléseket kapták: I0 és Ii csoportok: 0,8 mg indometacin [0,8 ml, 1%-os metilcellulózban oldott 1 mg/ml koncentrációjú indometacin (Sigma, 865500)], M0 és Mi csoportok: 0,8 ml 1%-os metilcellulóz oldat. A csoportok elnevezésében a nagybetű a kezelésre vonatkozik (I: indometacin, M: metilcellulóz), az „i” vagy „0” az infekcióra, ill. annak hiányára utal.

A kezelés harmadik napján az Ii és Mi csoportok tagjait *Pasteurella multocida ssp. septica* törzsszel fertőztük meg. A fertőzést megelőzően a *P. multocida ssp. septica* (P964 tenyészet) törzset 1 ml zsírszegény tejben -70°C-on tároltuk. Az izolátumot 5% (v/v) defibrinált juhvérrel dúsított Columbia agarra kikentük, és 37°C-on 24 óráig szaporítottuk. A különálló telepeket további 24 óráig inkubáltuk 37°C-on. A tenyészetet 2 ml sóoldattal lemostuk, McFarland 2,5 töménységű fiziológiás konyhasóoldatban hígítva 6×10^8 telepformáló egység/ml-re titráltuk. A patkányok 0,2 ml hígított tenyészetet ($1,2 \times 10^8$ csíra) kaptak szubkután injekció formájában. A kontroll (nem fertőzött) csoportok 0,2 ml sóoldatot kaptak szintén szubkután injekcióban.

III.2.2.3. Kezelések a vizsgálat második fázisában

A második *in vivo* kísérletben összesen 30 állatot vizsgáltunk, amelyek közül 18-at a kezelések megkezdése előtt kasztráltak. 10 napos regeneráció után 7 napon keresztül,

napi kétszer (8:30-kor és 18:00-kor) szubkután injekcióban a következő kezeléseket alkalmaztuk:

1. N0 csoport: nem kasztrált, 0,35 ml propilén-glikol;
2. NT csoport: nem kasztrált, 0,35 ml 800 µg/ml koncentrációjú tesztoszteron propilén-glikolban oldva;
3. C0 csoport: kasztrált, 0,35 ml propilén-glikol;
4. CT csoport: kasztrált, 0,35 ml 800 µg/ml koncentrációjú tesztoszteron propilén-glikolban oldva;
5. CE csoport: kasztrált, 0,35 ml 20 µg/ml koncentrációjú 17β-ösztadiol propilén-glikolban oldva.

A csoportok nevében az első betű a kasztráltsági állapotot jelöli (N: nem kasztrált, C: kasztrált), a második pedig a kezelést (0: kontroll, T: tesztoszteron, E: ösztadiol).

A kezelés 4. napján az összes állat 0,2 ml, fiziológiás sóoldatban $2,4 \times 10^9$ telepformáló egység/ml koncentrációra hígított *P. multocida ssp. septica* törzset ($4,8 \times 10^8$ csíra/állat) kapott szubkután injekcióban.

III.2.2.4. Laboratóriumi és mikrobiológiai vizsgálatok

A fertőzés utáni 2. (első fázis), ill. 3. (második fázis) napon a patkányok dietil-éteres túlaltatása és a kipreparált hasi aortán keresztüli kivéreztetése után a levett vért laboratóriumi vizsgálatokra küldtük. A vérképet, szérum fehérjéket, C-reaktív proteint (CRP), és a 2. fázisban a szérum tesztoszteron és ösztadiol szinteket a klinikumban alkalmazott automatizált laboratóriumi módszerekkel határozták meg a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Belgyógyászati Tanszékén.

A fertőzött állatok májából és szívvéréből visszaizoláltuk a fertőző törzset. Ehhez egy kacsnyi mintát Columbia véres agarra kikentünk és 37°C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk. A kinőtt telepformáló egységek mintázata szerint az izolátumokat négy csoportba osztottuk: negatív (0 telep), néhány (1-20 telep), sűrű (de különálló telepek), szőnyegszerű szintenyészet (összefolyó telepek).

Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem TUKEB engedélyével történtek.

III.2.2.5 Statisztikai analízis

Az elemzéseket a Statistica szoftver segítségével végeztük el. A labor eredmények összehasonlítására ANOVA-t vagy Kruskal-Wallis tesztet és LSD post hoc tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

IV. Eredmények

IV.1. Humán neutrofil granulocitákkal végzett vizsgálatok eredményei

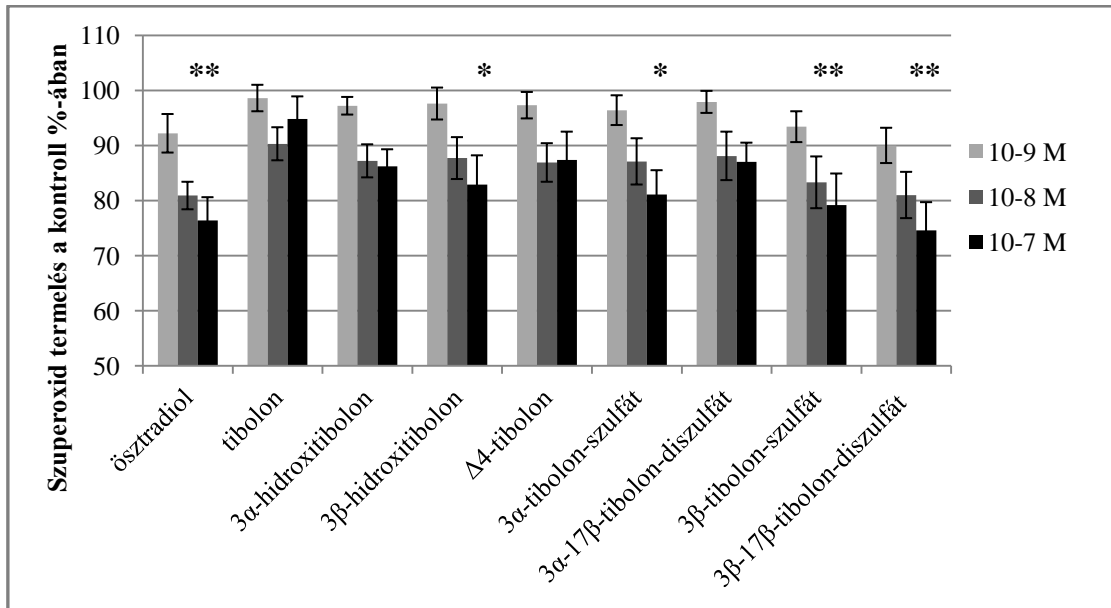
IV.1.1. A tibolon és származékainak hatása a szuperoxid termelésre

IV.1.1.1. Ex vivo szuperoxid termelés különböző koncentrációjú szteroidokkal történt inkubáció után

Az eredményeket a 3. táblázatban és az 5. ábrán mutatom be. A granulociták O_2^- termelése a 10^{-9} M koncentrációjú szteroid kezelés után nem tért el szignifikánsan a kontrolltól egyik szteroid vegyület esetében sem. 10^{-8} M koncentráció esetén az E_2 ($80,9 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$), a 3β -tibolon-szulfát ($83,3 \pm 4,7\%$, $p < 0,05$) és a 3β - 17β -tibolon-diszulfát ($81,0 \pm 4,2\%$, $p < 0,05$) csökkentette szignifikánsan a O_2^- termelést a kontrollhoz viszonyítva. 10^{-7} M koncentrációnál több metabolitnál figyeltünk meg ilyen hatást: E_2 ($76,4 \pm 4,2\%$, $p < 0,001$), 3β -hidroxitibolon ($82,9 \pm 5,3\%$, $p < 0,05$), 3α -tibolon-szulfát ($81,1 \pm 4,4\%$, $p < 0,05$), 3β -tibolon-szulfát ($79,2 \pm 5,7\%$, $p < 0,01$), 3β - 17β -tibolon-diszulfát ($74,6 \pm 5,1\%$, $p < 0,0001$). A többi szteroid metabolit (tibolon, 3α -hidroxitibolon, Δ^4 -tibolon, 3α - 17β -tibolon-diszulfát) nem csökkentette szignifikánsan a granulociták O_2^- produkcióját az említett koncentrációkban.

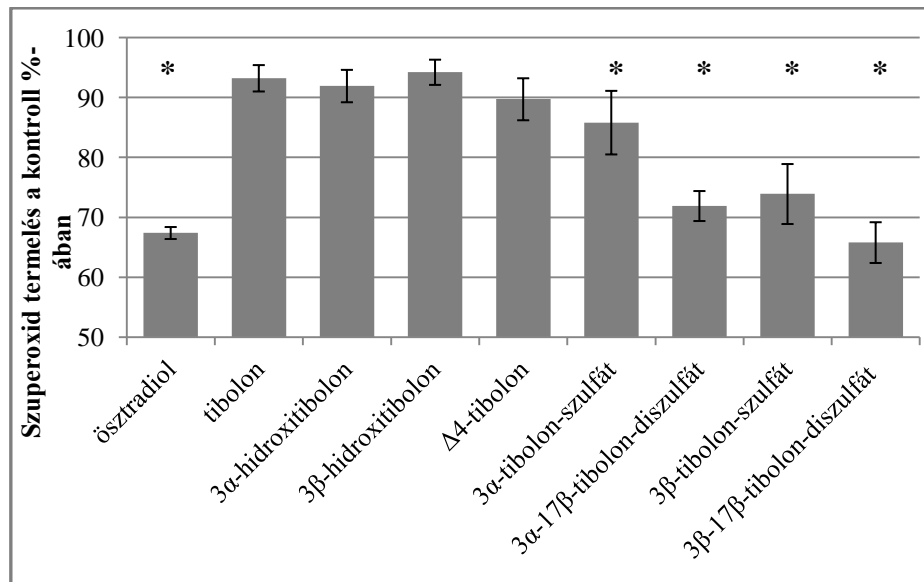
IV.1.1.2. A vizsgált hormonok hatása a xantin – xantin-oxidáz rendszerben

A xantin – xantin-oxidáz rendszerben a hormonokat csak 10^{-7} M koncentrációban vizsgáltuk. Eredményeinket a 3. táblázatban és a 6. ábrán mutatom be. Szignifikáns O_2^- csökkenést észleltünk az E_2 ($67,4 \pm 1,0\%$, $p < 0,05$), a 3α -tibolon-szulfát ($85,8 \pm 5,3\%$, $p < 0,05$), a 3α - 17β -tibolon-diszulfát ($71,9 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$), a 3β -tibolon-szulfát ($73,9 \pm 5,0\%$, $p < 0,05$) és a 3β - 17β -tibolon-diszulfát ($65,8 \pm 3,4\%$, $p < 0,05$) esetében a kontrollhoz (100%) viszonyítva. A többi szteroid metabolit (tibolon, 3α -hidroxitibolon, 3β -hidroxitibolon, Δ^4 -tibolon) nem vezetett szignifikáns O_2^- produkció csökkenéshez ebben a rendszerben.



5. ábra Humán neutrofil granulociták szuperoxid termelése a kontroll százalékában különböző koncentrációjú hormon kezelések után. A hibasávok az egyének közti szórás mutatják (n=10)

* szignifikáns eltérés a kontrollhoz (100%) képest ($p < 0,05$).



6. ábra Szuperoxid termelés a xantin – xantin-oxidáz rendszerben a kontroll százalékában 10⁻⁷ M koncentrációjú hormon kezelés után. A hibasávok az egyének közti szórás mutatják (n=10).

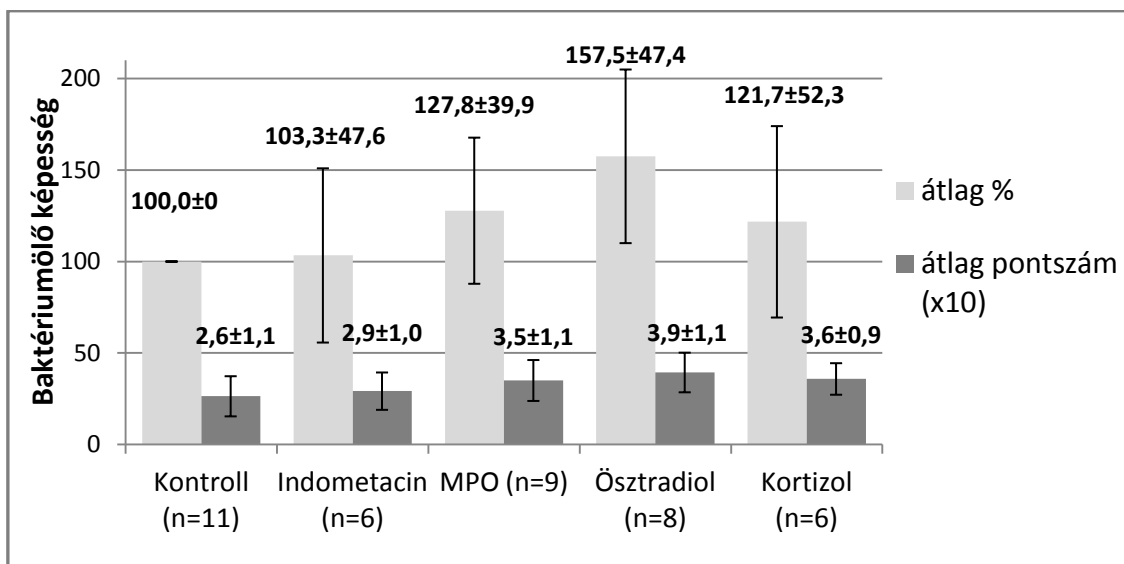
*szignifikáns eltérés a kontrollhoz (100%) képest ($p < 0,05$).

3. táblázat Humán neutrofil granulociták szuperoxid termelése a kontroll százalékában az egyes hormon kezelésekre hatására (átlag \pm SEM).
* szignifikáns szuperoxid szint változás a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

Hormon koncentráció	Ösztradiol	Tibolon	3 α -hidroxitibolon	3 β -hidroxitibolon	Δ 4-tibolon	3 α -tibolon-szulfát	3 α -17 β -tibolon-diszulfát	3 β -tibolon-szulfát	3 β -17 β -tibolon-diszulfát
10 ⁻⁹ M	92,2 \pm 3,5	98,6 \pm 2,4	97,2 \pm 1,6	97,6 \pm 2,9	97,3 \pm 2,4	96,4 \pm 2,7	97,9 \pm 2,0	93,4 \pm 2,8	90 \pm 3,2
10 ⁻⁸ M	80,9 \pm 2,5*	90,3 \pm 3,0	87,2 \pm 3,0	87,7 \pm 3,8	86,9 \pm 3,5	87,1 \pm 4,2	88,1 \pm 4,4	83,3 \pm 4,7*	81,0 \pm 4,2*
10 ⁻⁷ M	76,4 \pm 4,2*	94,8 \pm 4,1	86,2 \pm 3,1	82,9 \pm 5,3*	87,4 \pm 5,1	81,1 \pm 4,4*	87 \pm 3,5	79,2 \pm 5,7*	74,6 \pm 5,1*
XO rendszer	67,4 \pm 1,0*	93,2 \pm 2,2	91,9 \pm 2,7	94,2 \pm 2,1	89,7 \pm 3,5	85,8 \pm 5,3*	71,9 \pm 2,5*	73,9 \pm 5,0*	65,8 \pm 3,4*

IV.1.2. Az indometacin és egyes szteroid hormonok hatása az intracelluláris baktérium ölésre

Technikai problémák miatt nem minden mérés adott értékelhető eredményt, ezért a mérések száma eltér az egyes csoportokban. Az eredményeket a 7. ábrán foglaltam össze. A kis elemszám miatt statisztikai analízist nem végeztünk, így csak tendenciákról tudunk beszélni az eredmények vizsgálatakor. Indometacin kezelés hatására nem változott a neutrofilek baktériumölő képessége a kontrollhoz képest, egyik pontozó rendszerben sem ($103,3 \pm 47,6\%$ ill. $2,9 \pm 1,0$ vs $2,6 \pm 1,1$). Ezzel szemben a MPO, az E_2 és a kortizol változó mértékben fokozta a baktériumölő kapacitást: leginkább az E_2 ($57,5 \pm 47,4\%$ -kal fokozta a kontrollhoz képest), majd a MPO ($127,8 \pm 39,9\%$), legkevésbé a kortizol ($121,7 \pm 52,3\%$). A felállított pontrendszerrel vizsgálva szintén az E_2 kezelés fokozza leginkább a baktericid aktivitást, megközelítve a hipotetikus maximális killing hatást ($3,9 \pm 1,1$ vs $2,6 \pm 1,1$). A MPO és a kortizol hasonló mértékben, de az ösztradiolnál kevésbé fokozza a baktériumölő képességet ($3,5 \pm 1,1$, ill. $3,6 \pm 0,9$ vs $2,6 \pm 1,1$).



7. ábra A granulociták baktériumölő képessége indometacin, MPO, ösztadiol és kortizol kezelés után. Az eredményeket a kontroll százalékában fejeztük ki (átlag ± szórás). A jobb láthatóság érdekében a pontszámokat megszoroztam tízzel a grafikonon. A hibaszávok a szórást mutatják. MPO: mieloperoxidáz.

IV.2. Az *in vivo* patkánykísérletek eredményei

IV.2.1. A kortikoszteron és kortizol gyökfogó hatásának vizsgálata

A hagyományos tápon tartott, kezeletlen kontroll csoportnál mért relatív lumineszcencia nem változott a 28 napos vizsgálati idő alatt. A lipiddús diétás kontroll csoportnál a 28. napon magasabb volt a relatív lumineszcencia (RLU), tehát rosszabb volt a gyökfogó kapacitás, mint a vizsgálat kezdetén, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. A csökkent TSC betudható a lipidterhelés által indukált oxidatív stressznek. Mind a kortizollal ($0,076 \pm 0,037$ vs $0,11 \pm 0,021$), mind a kortikoszteronnal ($0,084 \pm 0,066$ vs $0,172 \pm 0,052$) kezelt csoportnál a 28. napon szignifikánsan alacsonyabb RLU-t, tehát jobb TSC-t mértünk, mint a 0. napon (4. táblázat).

4. táblázat Az egyes patkány csoportok jellemzői és a plazmában mért átlagos relatív lumineszcencia (átlag \pm szórás). * $p < 0,05$

Csoport	Diéta	Kezelés	Átlagos relatív lumineszcencia	
			a 0. napon	a 28. napon
Kezeletlen kontroll	hagyományos	nincs	$0,140 \pm 0,039$	$0,188 \pm 0,140$
Kontroll	lipiddús	nincs	$0,257 \pm 0,148$	$0,625 \pm 0,911$
Kortizol	lipiddús	kortizol	$0,110 \pm 0,021$	$0,076 \pm 0,037$ *
Kortikoszteron	lipiddús	kortikoszteron	$0,172 \pm 0,052$	$0,084 \pm 0,066$ *

IV.2.2. Az indometacin, az ösztradiol és a tesztoszteron hatásának vizsgálata patkány szepszis modellen

IV.2.2.1. Eredmények a vizsgálat első fázisában

IV.2.2.1.1. Az állatok klinikai követése

Az indometacin kezelés első három napján nem észleltünk változást az állatok viselkedésében. A fertőzést követő naptól az indometacinnal kezelt patkányok (mind a fertőzöttek, mind a kontrollok) bágyadtak voltak, szondázásuk nehezen volt kivihető a

tónus nélküli testtartás miatt. A kezelés negyedik napjára, tehát a fertőzés másnapjára négy állat elpusztult. Ezek közül egy az indometacinnal kezelt fertőzött csoportba (Ii), kettő az indometacinnal kezelt kontroll csoportba (I0), egy a kezeletlen, fertőzött csoportba (Mi) tartozott. A túlaltatást követően az állatok boncolása során az I0 csoportból kettő, az Ii csoportból egy egyednél ascitest állapítottunk meg.

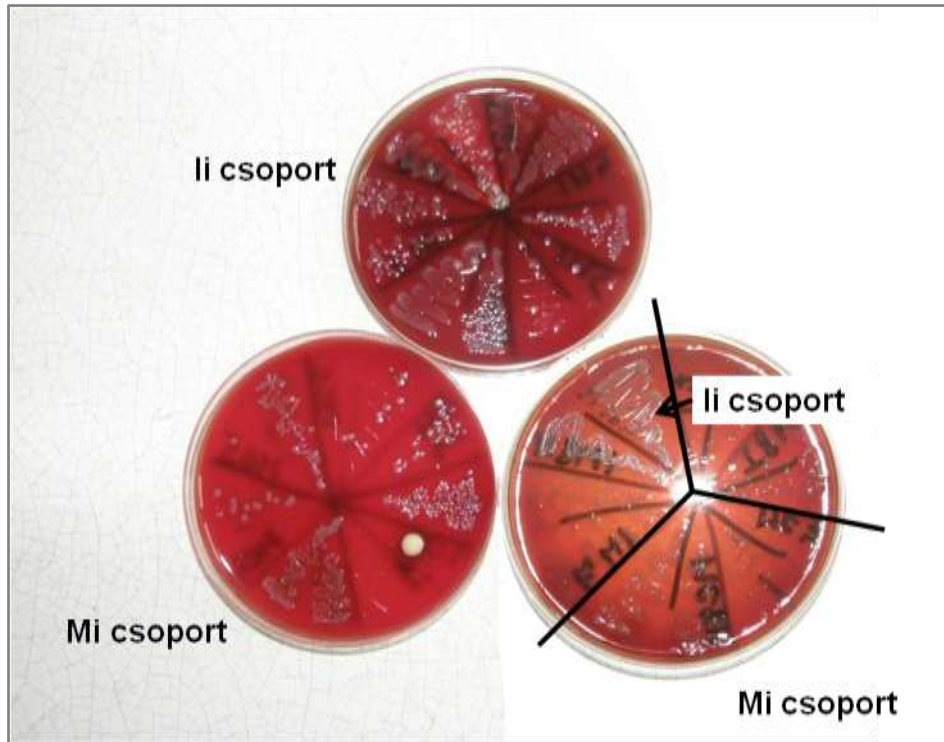
IV.2.2.1.2. Laboratóriumi és mikrobiológiai eredmények

A laboratóriumi eredményeket az 5. táblázatban foglaltam össze. A fehérvérsejt (fvs) szám szignifikánsan magasabb az Ii csoportban, mint az I0 és Mi csoportokban. Mindegyik csoportban vérszegénységet találtunk, az indometacinnal kezelt (I0, Ii) esetében a többi csoporthoz képest alacsonyabb vörösvértest (vvt), hemoglobin (Hgb) és hematokrit (Htk) értékekkel. A szérum albumin szint is alacsonyabb ebben a két csoportban. A CRP az Mi csoportban szignifikánsan magasabb, mint a többiben, és az Ii csoportban a legalacsonyabb. Néhány esetben (az M0 csoportban kettő, az I0-ban és Mi-ben egy-egy minta) a levett vér nem volt elegendő vagy bealvadt, így esetükben nem volt lehetőség laborvizsgálatokra.

A szívvérből és májból reizolált *P. multocida* tenyészeteket a könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért pontoztam a telepek száma szerint: 0 pont: negatív (0 telep); 1 pont: néhány (1-20 telep); 2 pont: sűrű (de különálló telepek); 3 pont: szőnyegszerű szintenyészet (összefolyó telepek). Az egyes csoportokban a szívvér és máj mintákból kinőtt tenyészetek pontszámait átlagoltam. Az eredményeket az 5. táblázatban közlöm, a reizolált tenyészetek a 8. ábrán láthatók. Az Ii csoport egyedeiből összességében több baktérium tenyésztett ki, mint az Mi csoportból: az átlagos pontszám 2,5, 11 mintából nőtt ki szőnyegszerű szintenyészet, és egy minta sem volt negatív. Ezzel szemben az Mi csoportban az átlagos pontszám 1,5, három minta adott szőnyegszerű tenyészetet, és három minta volt negatív. Az elhullt állatok mintáiból mindkét esetben szőnyegszerű tenyészet nőtt ki.

5. táblázat Az állatkísérlet első fázisában vizsgált csoportok jellemzői, a különböző *P. multocida* telep mintázatok száma és a laboratóriumi eredmények (átlag ± szórás). Az utolsó oszlop mutatja azokat a csoportokat, amelyek között szignifikáns különbséget észleltünk. Fvs: fehérvérsejtszám, Vvt: vörösvértestszám, Hgb: hemoglobin, Htk: hematokrit, CRP: C-reaktív protein, ns: nem szignifikáns.

	1. M0	2. I0	3. Mi	4. Ii	<i>p</i> < 0,05	
Kezelés	kontroll (metilcellulóz)	indometacin	kontroll (metilcellulóz)	indometacin		
Infekció	nem	nem	igen	igen		
Telep mintázat:			szívvér	máj	szívvér	máj
negatív (db)			2	1	0	0
néhány (db)			3	2	2	1
sűrű (db)			1	4	1	1
szőnyegszerű (db)			2	1	5	6
átlagos pontszám			1,5		2,5	
Laborvizsgálatok elemszáma	6	5	6	7		
Fvs (x10⁹/l)	7,72 ± 2,06	5,09 ± 3,53	5,95 ± 2,61	9,28 ± 1,87	4 vs 2,3	
Neutrofil granulocita (%)	18,00 ± 4,53	47,40 ± 26,10	22,83 ± 5,64	30,83 ± 9,30	ns	
Limfocita (%)	80,00 ± 4,36	49,00 ± 28,10	73,67 ± 6,47	64,50 ± 9,22	ns	
Vvt (x10¹²/l)	5,94 ± 0,68	3,86 ± 1,52	5,66 ± 0,39	3,66 ± 1,09	4 vs 1	
Hgb (g/dl)	110,0 ± 9,0	73,4 ± 29,2	105,67 ± 6,83	68,5 ± 18,22	4 vs 1	
Htk (l/l)	0,39 ± 0,03	0,26 ± 0,11	0,38 ± 0,03	0,25 ± 0,07	4 vs 1	
Összfehérje (g/l)	55,65 ± 2,49	52,2 ± 4,65	59,22 ± 3,0	42,0 ± 7,86	4 vs 3	
Albumin (g/l)	27,92 ± 0,98	22,88 ± 3,13	26,07 ± 0,65	19,8 ± 3,65	4 vs 1	
Globulin (g/l)	27,73 ± 1,63	29,32 ± 2,79	33,15 ± 2,63	22,2 ± 4,3	3 vs 1,2,4; 4 vs 1,2	
CRP (mg/dl)	300,0 ± 25,2	306,6 ± 32,9	411,67 ± 55,98	261,71 ± 72,99	3 vs 1,2,4	



8. ábra A fertőzött patkányok májából és szívvéréből reizolált *P. multocida* tenyészetek az állatkísérlet első fázisában. Az Ii csoport tagjai indometacin kezelésben részesültek, az Mi csoport a kontroll (n=8 csoportonként).

IV.2.2.2. Eredmények a vizsgálat második fázisában

IV.2.2.2.1. Az állatok klinikai követése

A kasztrációt követő 10 napos regenerációs időszak alatt a kasztrált állatok súlynövekedése elmaradt az ép állatokétól, de ettől eltekintve jól gyógyultak. A C0 (kasztrált kontroll) csoportban egy patkány klinikai előzmények nélkül, még a megfertőzés előtt váratlanul elpusztult. A boncolása során nem derült ki az elhullás oka, véresagaron tenyésztve negatív volt a máj, a szívvér és a tüdő. Az infekciót követően minden csoportban levertek, bágyadtak voltak az állatok, leginkább a C0 csoportban.

IV.2.2.2.2. Laboratóriumi és mikrobiológiai eredmények

Az eredményeket a 6. táblázatban mutatom be. A CE (kasztrált, ösztadiollal kezelt) csoportban egy minta nem volt megfelelő a laborvizsgálatokra. A fvs szám alacsonyabb volt az NT (nem kasztrált, teszoszteronnal kezelt) csoportban, mint az N0-ban (nem

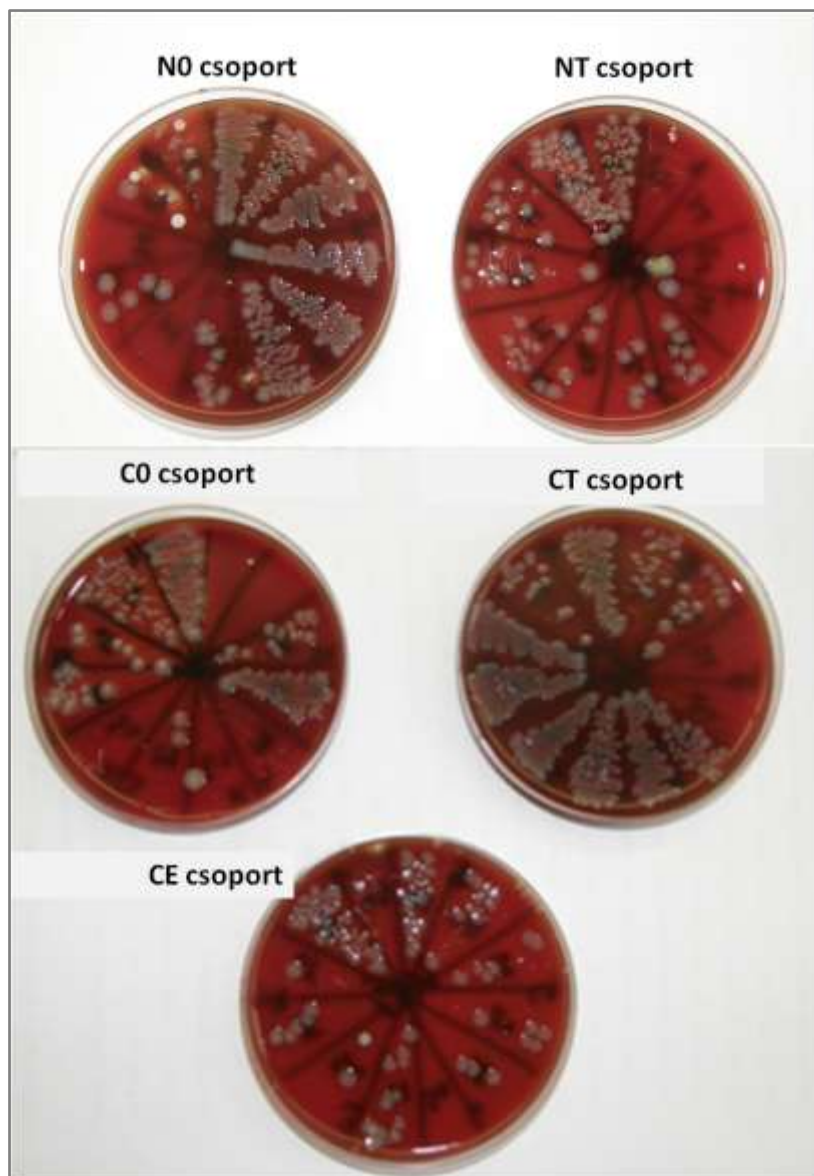
kasztrált kontroll), tehát a tesztoszteron kezelés a nem kasztrált állatoknál csökkentette a gyulladás mértékét. A kasztrált csoportokban hasonló tendenciát figyeltem meg: a CT és CE csoportokban alacsonyabb a fvs szám, mint a kontroll C0 csoportban. A CT csoportban enyhe anaemiát észleltünk, itt a vvt, Hb, Htk szignifikánsan alacsonyabb volt a nem kasztrált csoportokéhoz (N0, NT) képest. A vérlemezkeszám (tct) a CE csoportban volt a legalacsonyabb, az NT és C0 csoportokénál szignifikánsan alacsonyabb. A szérum fehérjék vonatkozásában nem volt szignifikáns eltérés a csoportok között, de minden csoportban alacsonyabb albumint mértünk, mint az első fázisban vizsgált nem fertőzött kontroll csoportban (M0). A CRP a CE csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt az összes többi csoporthoz képest. A CT csoportban is alacsonyabb CRP-t mértünk, mint a C0-ban, de ez nem volt szignifikáns eltérés. A szérum tesztoszteron szintet a kasztráció és a hormonpótlás hatékonyságának megítélése céljából mértük. Ahogy az várható volt, a kasztrált csoportokban alacsony a tesztoszteron szint, és a tesztoszteron pótlás mind az NT, mind a CT csoportban a megfelelő kontrollokhoz (N0, C0) képest emelte a szérum tesztoszteron szintet. Ösztradiol kezelés hatására a CE csoportban szignifikánsan magasabb a szérum ösztradiol szint, mint a többi csoportban.

A *P. multocida* reizolálásának eredményeit a 6. táblázat és a 9. ábra mutatja. Az NT csoportban kevesebb baktérium tenyésztett ki, mint a kontroll N0-ban (pontszám szerint 1,2 vs 1,7). A kasztrált csoportok közül a CT csoportban több kórokozó nőtt ki, mint a C0-ban (2,3 vs 1,6), a CE-ben kevesebb (1,3). A tesztoszteronnal kezelt csoportok közül a kasztrált CT-ből több baktériumot sikerült reizolálni, mint a nem kasztrált NT-ből (2,3 vs 1,2). A kezeletlen csoportok között nem volt ilyen különbség (N0: 1,7; C0: 1,6).

6. táblázat Az állatkísérlet második fázisában vizsgált csoportok jellemzői, a különböző *P. multocida* telep mintázatok száma és a laboratóriumi eredmények (átlag ± szórás). Az utolsó oszlop mutatja azokat a csoportokat, amelyek között szignifikáns különbséget észleltünk. Fvs: fehérvérsejtszám, Vvt: vörösvértestszám, Hgb: hemoglobin, Htk: hematokrit, Tct: vérlemezke, CRP: C-reaktív protein, nm: nem meghatározott, ns: nem szignifikáns.

	1. N0		2. NT		3. C0		4. CT		5. CE		<i>p</i> < 0,05
Kasztrált	nem		nem		igen		igen		igen		
Kezelés	nincs		tesztoszteron		nincs		tesztoszteron		ösztadiol		
Infekció	igen		igen		igen		igen		igen		
Telep mintázat:	szívvér	máj	szívvér	máj	szívvér	máj	szívvér	máj	szívvér	máj	
negatív (db)	0	2	1	1	1	1	1	1	1	0	
néhány (db)	2	1	4	3	2	1	0	0	4	3	
sűrű (db)	2	2	0	2	0	2	1	2	1	3	
szőnyegszerű (db)	2	1	1	0	2	1	4	3	0	0	
átlagos pontszám	1,7		1,2		1,6		2,3		1,3		
Laborvizsgálatok elemszáma	6		6		5		6		5		
Fvs (x10⁹/l)	10,70 ± 4,18		5,97 ± 3,22		8,26 ± 4,62		3,61 ± 2,14		2,03 ± 1,05		1 vs 4,5
Neutrofil granulocita (%)	50,02 ± 21,82		54,30 ± 26,95		54,12 ± 19,20		38,40 ± 26,29		53,15 ± 21,23		ns
Limfocita (%)	45,20 ± 22,89		37,46 ± 28,09		39,56 ± 16,32		58,22 ± 23,98		41,15 ± 22,52		ns
Vvt (x10¹²/l)	6,63 ± 0,32		6,44 ± 0,45		5,99 ± 0,47		5,41 ± 0,86		5,95 ± 0,21		4 vs 1,2
Hgb (g/dl)	135,4 ± 4,67		132,4 ± 7,16		120,6 ± 12,46		111,4 ± 16,68		120,75 ± 4,65		4 vs 1,2
Htk (l/l)	0,41 ± 0,02		0,40 ± 0,03		0,36 ± 0,03		0,32 ± 0,05		0,35 ± 0,02		4 vs 1,2; 5 vs 1
Tct (x10⁹/l)	718,8 ± 298,45		865,4 ± 212,51		875,6 ± 170,04		696,6 ± 127,91		440,75 ± 198,01		5 vs 2,3
Összfehérje (g/l)	47,32 ± 2,02		49,53 ± 2,88		51,0 ± 4,45		46,83 ± 4,24		49,76 ± 3,71		ns
Albumin (g/l)	16,68 ± 1,17		17,55 ± 1,18		18,3 ± 1,59		17,03 ± 2,14		18,76 ± 1,5		ns
Globulin (g/l)	30,63 ± 2,67		31,98 ± 2,18		32,7 ± 4,67		29,8 ± 3,03		31,0 ± 2,53		ns
CRP (mg/dl)	375,3 ± 64,54		371,58 ± 33,56		363,3 ± 23,9		329,42 ± 52,21		149,6 ± 131,71		5 vs 1,2,3,4

Tesztoszteron (nmol/l)	21,62 ± 16,08	54,87 ± 1,55	0,87 ± 0,31	41,82 ± 12,1	0,68 ± 0,0	1 vs 2,3,4,5; 2 vs 3,5; 4 vs 3,5
Ösztradiol (pg/ml)	113,44 ± 30,62	nm	151,75 ± 13,12	nm	867,4 ± 558,15	5 vs 1,3



9. ábra A patkányok májából és szívvéréből reizolált *P. multocida* tenyészetek az állatkísérlet második fázisában. Az N0 csoport nem részesült kezelésben az infekción kívül (n=6); az NT csoport tagjai tesztoszteron kezelést kaptak (n=6); a C0 csoport tagjai kasztráltak, és nem részesültek egyéb kezelésben az infekción kívül (n=5); a CT és CE csoport kasztrált, és tesztoszteron ill. ösztradiol kezelést kapott (n=6 csoportonként).

V. Megbeszélés

Kutatócsoporthoz korábbi munkája során számos természetes szteroid hormonról kimutatta, hogy gátolja az aktivált neutrofil granulociták O_2^- termelését [5, 6]. Dolgozatomban az ösztrogén, androgén és progesztagén hatással egyaránt rendelkező szintetikus tibolon ilyen hatását vizsgáltam. A tibolon, a posztmenopauzális medicinában széles körben használt hormonpótló szer metabolitjai révén szövetspecifikus módon fejt ki hatásait. A tibolon származékok egy része hormonálisan inaktív, szulfatált formában van jelen a keringésben [49].

Eredményeink szerint az ösztradiol, és a tibolon metabolitok közül a 3β -hidroxitibolon, 3α -tibolon-szulfát, 3β -tibolon-szulfát és a 3β - 17β -tibolon-diszulfát 10^{-7} M koncentrációban csökkenti a neutrofil granulociták O_2^- produkcióját, és ezek közül a két utóbbi metabolit és az ösztradiol hatása már alacsonyabb koncentrációban (10^{-8} M) is jelentkezik. A vizsgált legalacsonyabb, 10^{-9} M koncentrációban egyik vegyület sem bizonyult hatékonynak. A sejtmentes xantin – xantin-oxidáz rendszerben kissé módosulnak az eredmények: a 3β -hidroxitibolon nem, de a 3α - 17β -tibolon-diszulfát antioxidánsnak bizonyult a 3α -tibolon-szulfát, a 3β -tibolon-szulfát és a 3β - 17β -tibolon-diszulfát mellett. A 3β -tibolon-szulfát és 3β - 17β -tibolon-diszulfát O_2^- csökkentő hatása mindhárom koncentrációban és mindkét rendszerben megközelíti, ill. eléri az ösztradiol hatását. A tibolon, a 3α -hidroxitibolon és a Δ^4 -tibolon egyik koncentrációban és rendszerben sem csökkenti a O_2^- termelést. Egyik vegyületnél sem észleltünk pro-oxidáns hatást. A használt koncentrációk megfelelnek a posztmenopauzális tibolon kezelés során elért plazmaszinteknek [59, 74], és az irodalomban és saját korábbi munkánk során *in vitro* alkalmazott dózisoknak.

Mivel a tibolon önmagában nem, de a 3β -hidroxitibolon hatékony volt, valószínű, hogy a granulocitákban nincs jelen aktív 3β -HSD, ami a tibolont 3β -hidroxitibolonná alakítaná. Erre vonatkozó irodalmi adat nem áll rendelkezésünkre, egyedül a humán promielocitás leukémia eredetű HL-60 sejtvonalban vizsgálták az aktív 3α -HSD enzim jelenlétét, amit nem sikerült igazolni [75]. Érdekes kérdés, hogy ha a 3β -hidroxitibolon hatékony, az igen hasonló szerkezetű 3α -hidroxitibolon miért nem az. A két metabolit csak a 3. szénatomon levő hidroxilcsoport térállásában tér el; úgy tűnik, ez a különbség

már elegendő az eltérő hatáshoz. A két hidroxil metabolit átalakulhat egymásba, de csak a mono- vagy diszulfát metabolitokon keresztül [76]. A tibolon metabolitok szulfatálását a szulfotranszferáz (SULT) két izoenzime, a SULT1E1 és SULT2A1 végzik [77]. A SULT izoenzimek expresszióját és aktivitását Tamura és mtsai vizsgálták humán krónikus mieloid leukémia eredetű K562 és promielociták leukémia eredetű HL-60 sejtvonalakon. A SULT2A1 izoenzimet a K562 sejtvonal kis mértékben expresszálja, de a SULT1E1 izoenzim expresszióját egyik sejtvonalban sem sikerült kimutatni [78]. Tehát feltehetőleg a granulocitákban a szulfatálás hiánya miatt nem alakulnak át egymásba a hidroxil metabolitok. Ezt támasztja alá az az eredményünk is, hogy míg a 3 β -hidroxitibolon csökkenti a O₂⁻ termelést, a 3 α -hidroxitibolonnal nem értünk el ilyen hatást.

Korábbi eredményeink szerint a progeszteron és tesztoszteron csökkenti az aktivált neutrofil granulociták O₂⁻ termelését. Ennek ellenére a progeszteron és androgén receptoron ható Δ^4 -tibolonnal nem sikerült kimutatni ezt a hatást.

A hormonálisan inaktív szulfatált metabolitok közül több is O₂⁻ csökkentőnek bizonyult. Az aktív metabolitok képződéséhez szükséges szulfatáz enzim jóformán minden szövetben jelen van [79]. Lehetséges, hogy a 3 α -tibolon-szulfát, a 3 β -tibolon-szulfát és a 3 β -17 β -tibolon-diszulfát így aktív hidroxil metabolittá alakult a kísérleti rendszerben. Mivel azonban eredményeink szerint a szulfatált metabolitok hatékonyabbak voltak a 3 β -hidroxitibolonnál, ugyanakkor az ösztrogén receptor agonista 3 α -hidroxitibolon semleges volt, valószínűbb, hogy a O₂⁻ csökkentő hatás nem receptorális úton valósul meg.

A sejtmentes xantin – xantin-oxidáz rendszerben megfigyelt O₂⁻ csökkentés is azt támasztja alá, hogy a képződött O₂⁻ anionokat semlegesítik a szulfatált tibolon származékok, és nem a keletkezésüket gátolják. Az E₂ ilyen, receptortól független scavenger hatása ismert [30], és a kísérletünkben is feltételezhető a sejtmentes rendszerben is. Ehhez azonban szükség van egy fenolos hidroxil csoportra, amivel sem a tibolon, sem származékai nem rendelkeznek. Emellett a szulfát csoport elektronakceptorként funkcionál, tehát nem redukáló csoport. Felmerül, hogy a szulfatált metabolitok xantin-oxidáz gátló hatásúak, erről azonban nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat.

Összességében tehát nem ismert az egyes tibolon metabolitok O_2^- gátló hatásának mechanizmusa, de feltehetőleg mind ösztrogén receptoron keresztül (3β -hidroxitibolon), mind nem receptor mediált úton (szulfatált metabolitok) csökkentik a O_2^- szintet granulocitkában, és ehhez nincs szükség a fenolos hidroxil csoportra.

Egyes hormonok szulfatált metabolitjainak antioxidáns hatását mások is kimutatták. Katekol-ösztrogének C17 szulfatált formái csökkentik a lipid peroxidációt patkány máj mikroszómákban [80]. Egy flavonoid, a kvercetin és a kvercetin-3-szulfát aorta simaizomsejtekben csökkenti a O_2^- termelést [81]. A DHEAS, a DHEA szulfatált származéka szintén antioxidáns hatású a gyulladást indukáló, NF- κ B mediált transzkripció gátlásán keresztül. Emellett közvetlenül is semlegesítheti a szabad gyököket, illetve serkenti az antioxidáns molekulákat, mint a GSH és tioredoxin [82].

A tibolon kezelés klinikai vizsgálatok szerint javítja a posztmenopauzális nők antioxidáns státuszát. A lipidperoxidáció csökken, a plazma α -tokoferol szint emelkedik [64]. A plazma lipid szintek változása ellentmondásos: mind az összkoleszterin, az LDL koleszterin és a triglicerid, mind a HDL szint csökken, ugyanakkor a HDL koleszterin eltávolító kapacitása nem romlik [56, 83]. Ovariectomizált, koleszterindús tápon tartott nyulaknál tibolon kezeléssel megelőzhető az atheroszklerózis, csökken a koleszterin lerakódás, a zsíros csíkok kialakulása és az endothel károsodás [58]. Az érlemezés megelőzéséhez hozzájárul az is, hogy a tibolon csökkenti a leukocita adhéziós molekulák expresszióját az endothel sejteken [84], valamint fokozza a plazma NO koncentrációját [55]. Vassalle és mtsai szerint a tibolon kezelés nem befolyásolja az oxidatív stressz paramétereit, de egy gyulladást indukáló citokin, a tumor nekrosis faktor α (TNF α) szintjét csökkenti [83].

Tekintve, hogy az oxidatív stressz lényeges szerepet játszik az öregedésben és számos megbetegedésben, az antioxidáns anyagok jótékony hatásúak lehetnek ezen betegségek megelőzésében és kezelésében. Az olyan kórképeknek, mint a magas vérnyomás, metabolikus szindróma, érlemezés, neurodegeneratív betegségek jól bevált gyógyszereit ismerjük. Ezen hatóanyagok közül néhány antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezik, mint pl. az angiotenzin-konvertáló enzim inhibitor captopril és ramipril [85, 86], egy nem szelektív β -blokkoló, a carvedilol [87], a statinok és fibrátok néhány tagja [88, 89], valamint a Parkinson-kórban alkalmazott MAO-B gátló selegilin [90]. A

tibolon a menopauzális medicinában a hormonreceptor aktiváció mellett a metabolitok antioxidáns tulajdonsága révén is jótékony hatású lehet. A hatás-szerkezeti összefüggések pontosabb megismerével a jövőben tisztán antioxidáns hatású szteroid molekulák kifejlesztése válhat lehetségessé.

Az első állatkísérletben két, *ex vivo* körülmények között antioxidáns hatású szteroid hormon, a kortizol és kortikoszteron *in vivo* antioxidáns hatását vizsgáltuk lipidterhelés indukálta oxidatív stressz mellett. A lipiddús táppal kezelt kontroll csoportban az elvárásnak megfelelően csökkent a teljes gyökfogó kapacitás, de az alacsony esetszám és az egyedek közti nagy szórás miatt ez nem érte el a szignifikancia szintjét. A 28 napos kortizol és kortikoszteron kezelés javítja az állatok antioxidáns státuszát.

A szakirodalomban ellentmondásos eredmények születtek a kortikoszteron antioxidáns hatását illetően. Caro és mtsai 4 hetes orális kortikoszteron kezelés után vizsgálták az oxidatív károsodás jeleit patkányok májában. A májsejtek mitokondriumának H_2O_2 termelése és a lipoxidáció csökkent mind az alacsonyabb (150 mg/táp kg), mind a magasabb (400 mg/táp kg) dózisú kezelés mellett, de az utóbbi esetén mitokondriális DNS károsodást észleltek [91]. Ezzel szemben Dhanabalan és mtsai szerint 15 napos szubkután (3 mg/ttkg) kortikoszteron kezelés patkányok hereszövetének mitokondriumban és mikroszómában gazdag részében fokozta a lipidperoxidációt és H_2O_2 képződést, az antioxidáns enzimek (SOD, kataláz) aktivitása pedig csökkent [92]. 16 napos szubkután (2,5 mg/ttkg/hét) dexametazon kezelés, majd az ezt követő egy hetes megvonási periódus alatt a lipidperoxidáció fokozódott a patkányok szívében és veséjében. A GSH szint először fokozódott, majd a megvonás alatt csökkent. A kataláz és SOD szintje a szívben a kezelés során csökkent, és a megvonásos idő alatt is alacsony maradt. Ezzel szemben a vesében a kataláz és SOD koncentráció a kísérlet csaknem teljes ideje alatt emelkedett. Ez a szövetspecifikus válasz feltehetőleg a vizsgált szövet domináns metabolikus aktivitásától és az adott szövetben jelen levő receptorok számától függ [93]. Rövidebb idejű orális (2 mg/ttkg/nap) dexametazon kezelés után csökkent a teljes vér és a vörösvértest GSH szintje és a vörösvértest SOD aktivitása, és a lipidperoxidációs melléktermékek, a thiobarbiturát-reaktív anyagok (TBARS) plazmaszintje fokozódott [94].

Cote és mtsai gyíkokon vizsgálták a kortikoszteron hatását, és azt találták, hogy a kezelt csoportban alacsonyabb a citoszol SOD aktivitása és fokozott a lipidperoxidáció [95]. Madaraknál hasonló hatásokat figyeltek meg. Vércsék két hetes orális kortikoszteron kezelése után a szérum ROS-ok aránya nőtt, a teljes antioxidáns kapacitás csökkent, de ez utóbbi a kezeletlen kontroll csoportra is igaz volt [96]. Brojler csirkék krónikus (14 napos) kortikoszteron kezelése fokozta a lipidperoxidációt és a plazma antioxidáns aktivitást [97]. Ezzel szemben rövid távú szubkután kortikoszteron kezelés nem befolyásolta a lipidperoxidációt és a SOD aktivitást, viszont fokozta a plazma teljes antioxidáns aktivitását. A kortikoszteron plazmaszint átmeneti emelkedése tehát nem vált ki a krónikus emelkedéshez hasonló oxidatív stresszt. A SOD plazmakoncentrációja viszonylag alacsony volt és nem változott a kísérlet során, ami arra utal, hogy nem vesz részt az oxidatív károsodás megelőzésében. Tehát a nem enzimikus antioxidánsok alkotják az első vonalbeli védelmet [98].

Az idézett, patkányokon végzett tanulmányok a hosszú távú kortikoszteroid kezelést mint a krónikus stressz modelljét értelmezték. Jelen munkánkban a lipiddús diéta eleve egy oxidatív állapotot jelent, és ebben a helyzetben a stresszhormonokkal végzett krónikus kezelés antioxidáns hatásának bizonyult. Annak ellenére, hogy a kortizol patkányokban nem természetes glukokortikoid, kimutatható hatást értünk el vele. Ez a szteroid receptorok átfedő, spektrum-szerű specificitását mutatja a hasonló szerkezetű szteroid vegyületekre.

Dolgozatom jelentős részét képezi a MPO, indometacin és egyes szteroid hormonok vizsgálata a granulociták baktericid funkciójának és szeptikus patkányok gyulladós paramétereinek tekintetében. Az *ex vivo* humán neutrofil granulocitákon végzett kísérletek során megállapítottuk, hogy az indometacin nem befolyásolja a baktériumölő képességet. A MPO, ami részt vesz a fiziológiás antibakteriális védelemben, és az antioxidáns szteroid hormonok, mint az E₂ és kortizol változóan pozitív hatással vannak a baktericid képességre. Bár ebben a vizsgálatban voltak férfi és nő donorok is, nem figyeltünk meg nemi különbségeket a granulociták baktériumölő képességét illetően.

Humán vizsgálatok szerint akut stressz esetén fokozódik a granulociták száma és a fagocitózis, ugyanakkor csökken a O_2^- termelés *E.coli* stimuláció után. A fagocitózis és az intracelluláris bakteriális killing az antibakteriális védelem egymástól független folyamatai, tehát lehetséges, hogy az akut stressz eltérően hat a fagocitózisra és a O_2^- termelésre. Állatmodellen és humán granulocitákban a glukokortikoid kezelés szintén gátolja a O_2^- termelést [5, 99]. Idős felnőttekben krónikus stressz esetén a szérumszintézis arány emelkedik, *E. coli* stimuláció után a neutrofil funkció romlik, elsősorban a csökkent O_2^- termelésnek köszönhetően [100]. A neutrofilek primer granulumaiban raktározódó MPO baktericid anyagok termelődését katalizálja, ugyanakkor ezek inaktivációjában is részt vesz, és gátolja a kemoattraktánsok hatását. Ezáltal megelőzi a neutrofilek vándorlását a gyulladós területre és a túlzott immunválaszt. Az akut kortizol és E_2 kezelés neutrofileken fokozza a MPO aktivitását, tehát rövid távon javítja a baktericid funkciót [9]. Mindazonáltal a nők véréből izolált neutrofilek kevésbé reagálnak lipopoliszacharid és interferon- γ (IFN- γ) stimulációra, mint a férfiak neutrofiljei, ami magyarázatot adhat arra, hogy premenopauzás nőknél kedvezőbb a szepszis prognózisa [101].

Az *in vivo* kísérletek eredményei részben megfelelnek a fentieknek. Az állatok viselkedése, klinikai állapota, az elhullás, ascites képződés és leginkább a kórokozó visszaizolálása mind az indometacin kedvezőtlen hatását jelzik a bakteriális fertőzésre. Az indometacinnal kezelt fertőzött patkányok laboratóriumi eredményei is súlyosabb gyulladós válaszra utalnak: magasabb fehérvérsejtszám, emelkedett neutrofil arány, anaemia, alacsony szérumszintézis (összfehérje, albumin, globulin) és CRP koncentráció. A szérumszintézis a humorális immunrendszer részeként a mikroorganizmusok elleni gyulladós válasz alapját képezi. Az akut fázis reakció során az inflammatorikus citokinek (pl. interleukin-1) hatására csökken a májban az albumin szintézis, így az albumint negatív akut fázis fehérjének tekintjük. Gyulladós betegségekben gyakori a hipalbuminaemia [102]. A CRP szintén akut fázis fehérje, májbeli szintézise fokozódik akut fázis reakció során. A gyulladós folyamat több szintjén szerepet játszik: aktiválja a komplement rendszert, stimulálja a fagocitózist és kötődik az immunglobulin receptorokhoz. Biológiai funkcióját az adott körülmények határozzák meg, erősítheti és gyengítheti is a gyulladós választ [103].

Az indometacinnal kezelt, fertőzött patkányoknál az akut fázis fehérjék csökkent szérumszintje károsodott baktericid funkcióra utal. Az indometacin önmagában is csökkenti az albumin szintet. A keringésben 90-99%-a albuminhoz kötött, ezért a csökkent albumin szint fokozott szabad indometacin koncentrációhoz és az antibakteriális kapacitás további romlásához vezet [104].

Az elvárásainknak megfelelően a patkányoknál a kasztráció gyenge klinikai állapothoz vezetett. A kezeletlen csoportokban azonban a kasztrált állatok laboratóriumi és mikrobiológiai eredményei nem rosszabbak a nem kasztráltakénál. Ugyanakkor a tesztoszteronnal kezelt csoportokban a kasztráltak anaemiásak, és gyengébb a baktericid képességük a nem kasztráltakéhoz képest. A kasztrált csoportokban tesztoszteron kezelés hatására a gyulladásos paraméterek (fehérvérsejtszám, CRP) javultak, de a reizolált baktériumszám magasabb volt. A nem kasztrált állatok esetében a tesztoszteron kezelés javította a baktériumölést és csökkentette a fehérvérsejtszámot a kezeletlen csoporthoz képest. Összességében a tesztoszteron pozitívan befolyásolja a gyulladásos paramétereket a megfelelő kontrollokhoz viszonyítva.

A kasztrált állatok ösztadiol kezelése javítja legjobban a baktericid védelmet: mind a reizolált baktériumok száma, mind az alacsony CRP és fehérvérsejtszám alapján ebben a csoportban volt a legenyhébb lefolyású a fertőzés. Az ösztadiol kezelés mellett észleltük a legalacsonyabb vérlemezkeszámot, tehát feltehetőleg alacsonyabb a tromboembólia rizikója ezekben az állatokban.

Összességében a vizsgált szteroid hormonok kisebb-nagyobb mértékben mind javították a neutrofilek baktériumölő képességét, ill. a patkányok klinikai paramétereit. A glukokortikoidok és a nemi hormonok a gyulladásos válasz sok lépését befolyásolják.

A glukokortikoidok (GC) széles körben elterjedt immunszuppresszáns hatóanyagok a medicinában. Akutan gátolják a vazodilatációt, a gyulladásos károsodás utáni fokozott érfal permeabilitást és a fehérvérsejtek vándorlását a gyulladásos területre, befolyásolják a fehérvérsejt eloszlást, sejthalált vagy túlélést és a sejt differenciáció programját, ami döntő a következményes gyulladásos válasz szempontjából [105, 106]. *In vitro* monocitákban, makrofágokban, T-sejtekben fokozzák az anti-inflammatorikus interleukin-10 (IL-10) expresszióját [105].

A GC-ok legtöbb gyulladáscsökkentő és immunszuppresszáns hatása a glukokortikoid receptorhoz (GR) köthető transzkripciós változás által jön létre [105, 107], de leírtak GR-től független, perceken belül megjelenő anti-inflammatorikus hatásokat is [108, 109]. A transzkripciós szintű gátlás érintheti a gyulladáshoz való kiváltásban és fenntartásban részt vevő enzimeket, a pro-inflammatorikus citokineket, a sejtadhéziós molekulákat [105, 106]. A GR-on keresztüli gátlás nem csupán közvetlenül a DNS-hez való kötődés által, hanem a GR és egy transzkripciós faktor (pl. AP-1) közti protein-protein kötődéssel és ezen faktor gátlásával, ún. transzrepresszió útján valósul meg [105]. Érdekes módon az endotoxin terhelés előtt adott GC nem immunszuppresszáns, hanem fokozza az immunválaszt patkányok agyában és májában [110, 111].

A GR gyakorlatilag minden immunsejten expresszálódik. A GC-ok pontos hatása függ az egyes sejtek differenciáltsági és aktiváltsági állapotától. A T-sejtek érése során a CD4 és CD8 sejtmarkerek megjelenése változik: az éretlen, dupla negatív T-sejtek dupla pozitív (CD4+ CD8+) sejtekké alakulnak, majd szelekciót követően CD4+ vagy CD8+ érett sejtekké válnak. A T-sejt populáció legnagyobb részét kitevő dupla pozitív sejtek igen érzékenyek a GC indukálta apoptózisra. *In vitro* vizsgálva a GC-oknak fontos szerepük van a T-sejt szám, repertoár és funkció szabályozásában, bár az *in vivo* eredmények ellentmondásosak. A keringő B-sejtek száma szintén csökken GC-ok hatására [105, 112].

A GC-ok befolyásolják az immunsejtek differenciációs programját is. A krónikus stresszel járó állapotok és a GC kezelés hatására módosul az immunsejtek differenciációja és változik az immunválasz. A GC-ok gátolják a veleszületett és szerzett immunrendszert összekötő dendritikus sejtek érését és működését, és átprogramozzák őket ún. „tolerogénikus dendritikus sejt”-ekké, ami a T-sejtek gyenge válaszkészségéhez vezet [113–116]. Ez magyarázhatja a GC-ok hatékonyságát allergia és krónikus gyulladás esetén. A makrofág differenciáció során a GC-ok szintén egy fokozott fagocita képességgel rendelkező, anti-inflammatorikus fenotípus kialakulását serkentik. Az apoptotikus sejtek felismerése és fagocitózisa a gyulladás visszafogásának kulcslépése [117].

A nemi hormonok szintén több ponton hatnak az immunrendszerre. A makrofágok és limfociták rendelkeznek ösztadiol, tesztoszteron és progeszteron receptorral. A tesztoszteronnak és a progeszteronnak a szakirodalom szerint immunszuppresszáns, gyulladáscsökkentő hatása van, míg az E₂ koncentrációtól függően pro- vagy anti-inflammatorikus mediátor [8, 118].

A tesztoszteron és progeszteron károsítja a makrofágok TNF és NO produkcióját, csökkenti a természetes ölő (natural killer, NK) sejtek aktivitását és gátolja a proinflammatorikus citokin termelést mediáló NF- κ B jelátvitelt [8]. A tesztoszteron a B- és T-sejtekre hatva közvetlenül gátolja a szerzett immunitást, az antitest termelést és a sejtes immunválaszt [119]. A progeszteron emlősökben gátolja az antitest termelést és a sejtes immunválaszt, a makrofágok IL-1 és NO elválasztását, viszont fokozza a ROS-ok felszabadulását [120]. *In vitro* körülmények között a progeszteron magas dózisban gátolja a neutrofilek oxidatív anyagcseréjét és a limfocita reaktivitását. Ennek fontos szerepe lehet a terhesség fenntartásában, mert a méhlepény trofoblast sejtjei által termelt progeszteron révén lokálisan magas progeszteron koncentráció alakul ki, ami gátolja az idegen antigének elleni limfocita reakciót [121]. *In vivo*, magas koncentrációban adva a progeszteron marhákban nem befolyásolja a fehérvérsejtszámot, de fokozza a neutrofilek migrációját és gátolja a jodinációt. Kortizollal hasonló eredményeket értek el. A kortikoszteroidok általi fokozott neutrofil migráció hátterében az áll, hogy a kortikoszteroidok hatására a mononukleáris fagociták egy polimorf migráció stimuláló faktort bocsátanak ki. Ez gátolja a neutrofilekben a mikrotubulusok rendeződését és a degranulációt. A degranuláció során felszabaduló MPO felelős a jodinációért, tehát ha a kortikoszteroidoknak köszönhetően gátolt a degranuláció, a jodináció mértéke is csökken. Tehát mind a fokozott random migráció, mind a gátolt jodináció hátterében a kortizol általi mikrotubulus gátlás áll, és valószínűleg a progeszteron is hasonló módon fejti ki hatását [122]. A gyenge androgén hatású DHEA állatkísérletekben javítja a kísérletes szepszis kimenetelét és csökkenti a szisztémás gyulladáisos választ. Humán vizsgálatok szerint szeptikus betegeknél az alacsony DHEA szint kimerült mellkévese tartalékra utal, és rossz prognosztikai jel. Az immunsejtek képesek a DHEA metabolizálására és átalakítására további szteroid hormonokká (tesztoszteron, E₂), tehát az immunrendszeri hatások ezeken keresztül is megvalósulhatnak [123].

Az ösztrogének szerepe a gyulladáshoz vezető folyamatokban igen összetett. Ismert, hogy reprodukív életkorú nőknél kisebb a súlyos szepszis rizikója és enyhébb a betegség lefolyása, ugyanakkor fokozott az autoimmun betegségek és az infekciók előfordulása férfiakhoz képest [118, 124, 125]. Terhes nők, akiknél emelkedett a szérumban a progeszteron és E_2 szint, fogékonyabbak gombás, vírusos és bakteriális infekciókra. Nőstény patkányoknál is megfigyelték, hogy a magas ösztrogén szintű folliculáris (proestrus) fázisban a legfogékonyabbak genitális gonococcus fertőzésre, és ösztradiollal kezelt patkányoknál gonococcus fertőzést követően 12 órán belül bakterémiát alakult ki. Emellett ezen patkányok granulocitái alacsony MPO aktivitással és károsodott intracelluláris baktériumölő képességgel rendelkeztek. Ez szintén magyarázza az E_2 gyulladáscsökkentő hatását [126]. Ezzel szemben marhák nagy dózisú E_2 kezelése mellett nem változott a fehérvérsejtszám, a neutrofil migráció és MPO felszabadulás [122].

Az ösztrogének hatása egy adott helyzetben számos tényezőtől függ. Ilyen az ösztrogén szérumban való koncentrációja, az adagolás időzítése a betegség lefolyásához vagy a női nemi ciklushoz viszonyítva, a gyulladás különböző fázisaiban részt vevő sejtek, a célszerv sajátos mikrokozonyatával, és ennek következtében a változatos ösztrogén receptor (ER) expresszió a sejteken. Ez utóbbi változik a gyulladás lefolyása során. Szisztémás gyulladás, és az ezt kísérő hipoxia és oxidatív stressz esetén az ER β expresszió fokozódik, míg az ER α expresszió csökken. Így feltehetőleg az ösztrogén jelátvitel gyulladáshoz vezető folyamatokban elsősorban az ER β -n keresztül valósul meg. Ebből következik, hogy az ösztrogén hatása a betegség kezdetén, egyenletes ER α és ER β eloszlás esetén más, mint a krónikus időszakban, amikor a receptorok egyensúlya eltolódik az ER β irányába. Egyes betegségeknel fontos lehet, hogy mikor kezdjük az E_2 kezelést, mert a gyulladás kialakulása előtt adva késleltetheti azt, míg a későbbi szakban adva már nincs E_2 hatás [118].

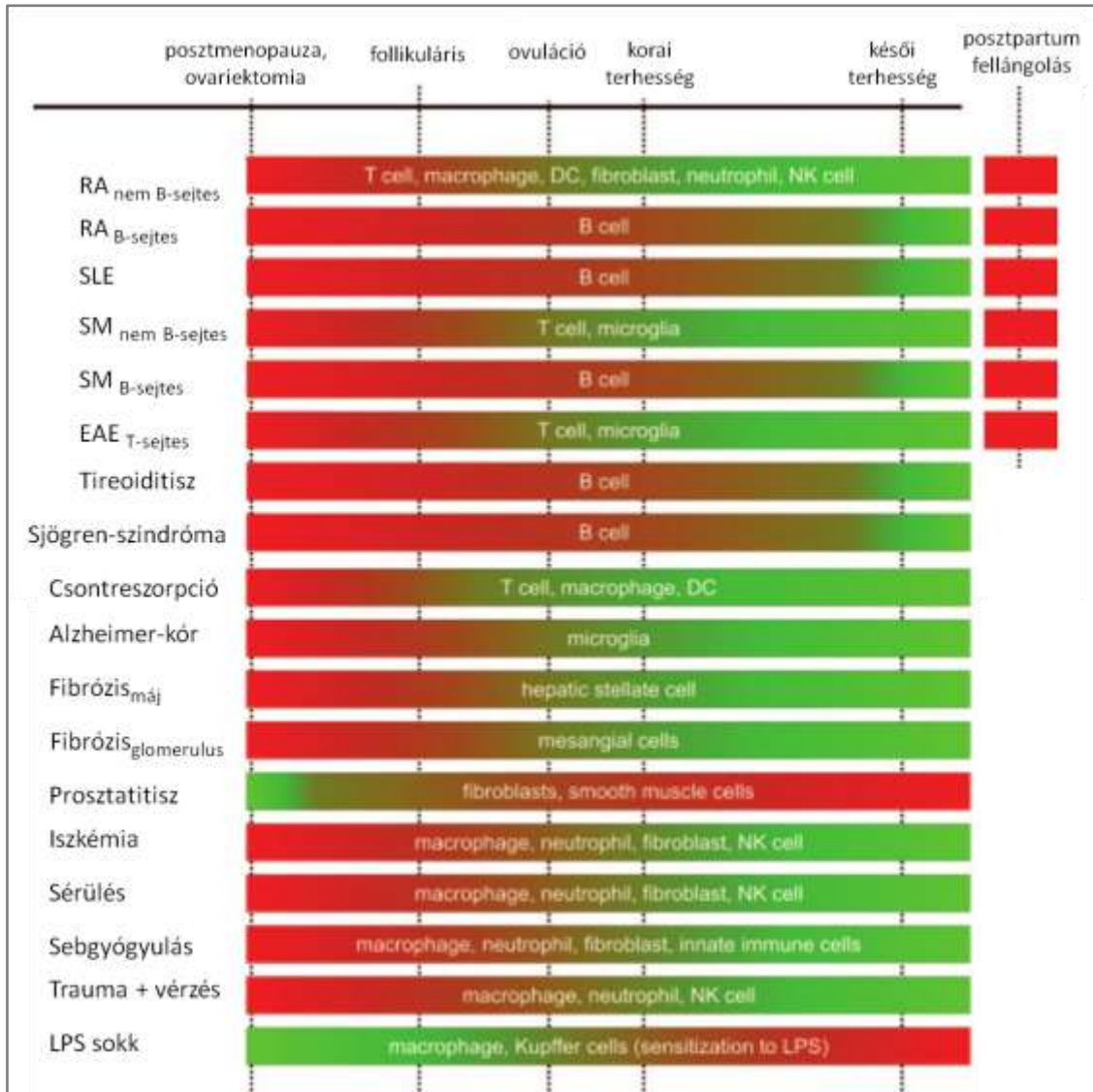
Az ösztrogén hatása a gyulladáshoz vezető folyamatban részt vevő különböző sejtípusokon eltérő lehet. Rágcsálónál és embereknél a magas koncentrációjú (terhességnek és ovuláció előtti szintnek megfelelő) ösztradiol gátolja a T-sejt mediálta B-sejt gátlást, és elősegíti a B-sejtek antitest termelését. Ugyanakkor hasonló koncentrációban az E_2 gátolja a csontvelői B-sejt előalakok képződését. A csecsemőmirigyre hatva elősegíti a

CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek képződését, és serkenti az anti-inflammatorikus IL-4, IL-10 és IFN- γ termelődést, de gátolja a TNF-et. A citokinek ilyen megoszlása anti-agresszív immunválaszhoz vezet, tehát az E₂ magas koncentrációban csökkenti a T-sejt dependens immunitást [118]. Az E₂ az NK sejtek aktivitására szintén koncentrációfüggően hat: alacsonyabb E₂ koncentrációnál fokozódik, magasabbnál gátlódik az NK sejtek aktivitása [118, 120, 127]. A 10. ábra az ösztrogén koncentrációtól függő anti-, ill. proinflammatorikus hatását mutatja egyes gyulladási kórképekben.

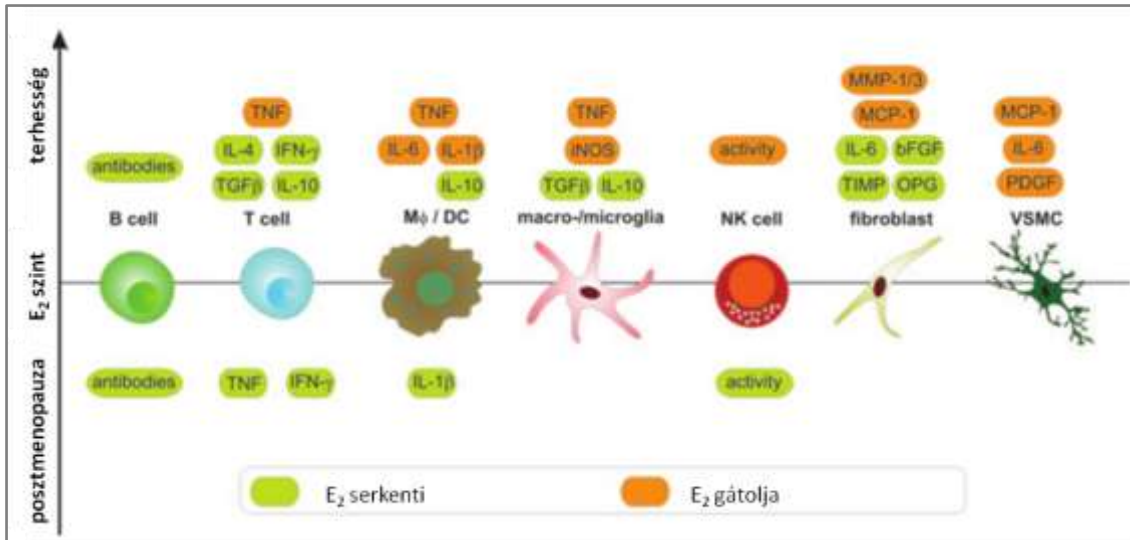
Az E₂ gátolja a monocita kemoattraktáns fehérjét (MCP-1) és a monociták és neutrofil granulociták migrációját a gyulladt területekre, ezáltal csökkentve a gyulladás súlyosságát. Egér és humán vizsgálatokban monocita/makrofágon ovuláció körüli és korai terhességnek megfelelő E₂ szint mellett fokozódik a proinflammatorikus IL-1 β és TNF termelődés, míg magasabb E₂ koncentráció esetén az IL-1, IL-6 és TNF szekréció csökken [118, 124]. A T-sejtekben is észlelhető TNF gátlás magas E₂ koncentrációnál feltehetőleg az NF- κ B gátlásán keresztül valósul meg [128]. Az ösztradiol-ösztrogén receptor komplex közvetlenül antagonizálja az NF- κ B-t az IL-6 promotor régióánál [124], valamint az E₂ gátolja az NF- κ B egyik alegységének DNS kötését és transzkripciós aktivitását. Az NF- κ B gátlása magas E₂ szintek mellett (perioovuláció, terhesség) anti-inflammatorikus jelnek tekinthető. Hasonlóan, a gyulladásban fontos szerepet játszó adhéziós molekulák membrán expressziója is magas E₂ szintnél gátlódik, míg alacsonyabb E₂ szinteknél (ovarium eltávolítás, posztmenopauza) inkább fokozódik [118].

Összességében magas E₂ koncentráció mellett a gyulladási paraméterek, mint az NK sejtek aktivitása, NF- κ B, sejtadhéziós molekulák, proinflammatorikus citokinek, fehérvérsejtek migrációja gátlódnak, míg az anti-inflammatorikus citokinek stimulálódnak (11. ábra). Alacsonyabb E₂ koncentrációnál fokozódnak a gyulladási paraméterek, a légzési robbanás és a fagocitózis, aktiválódnak az NK sejtek. Ezek a folyamatok segítenek megküzdeni a bakteriális fertőzések kritikus szakaszával, és ennek tulajdonítható a bakteriális fertőzések jobb kimenetele és a szepszis kisebb rizikója nőknél. Az E₂ koncentráció szerinti dichotómia nem észlelhető a B-sejtekben, mert az antitest termelés mind alacsony, mind magas E₂ szintnél fokozódik. Ennek terhességben van jelentősége, mivel a magas E₂ és progeszteron szint miatt immunszuppresszív

folyamatok zajlanak, és a B-sejtek aktiválása a legfontosabb mechanizmus a fertőzések kivédésére. A fenti, főleg *in vitro* eredményeket számos *in vivo* kísérlettel is megerősítették (referenciák: [118]).



10. ábra Az ösztrogén szint és a gyulladásos betegségek közti összefüggés. A piros színezés az adott ösztrogén koncentráció gyulladásos hatását, míg a zöld az anti-inflammatorikus hatást jelzi. B-sejt predománns betegségekben bármely ösztrogén szint proinflammatorikus, de olyan betegségekben, ahol nincs jelen erős B-sejt aktivitás, az ösztrogénnek kettős szerepe van: alacsony koncentrációban serkenti, magas koncentrációban gátolja a betegség progresszióját. Prosztatagyulladás és lipopoliszacharid (LPS) indukálta sokk esetében az ösztrogén érzékenyíti a gyulladásos választ. RA: reumatoid artritisz; SLE: szisztémás lupus erythematosus; SM: szklerózis multiplex; EAE: kísérleti autoimmun agyvelőgyulladás [118].



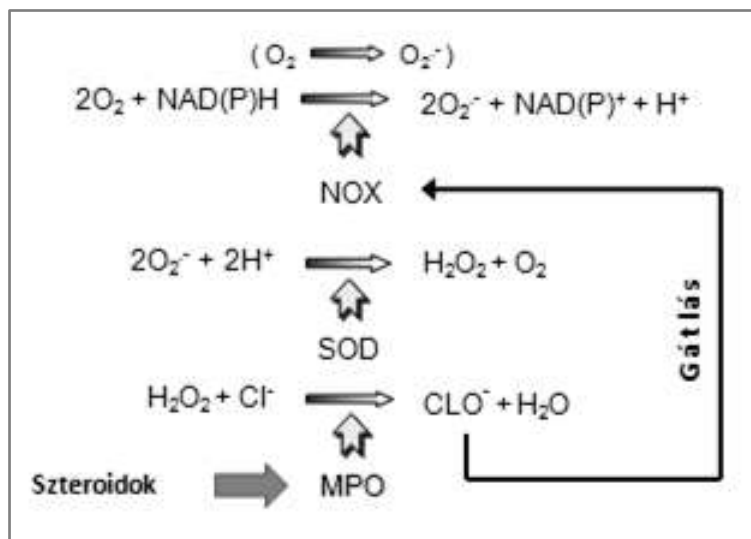
11. ábra Az ösztrogén hatása a különböző sejtípusok fontos pro- és anti-inflammatorikus útvonalaira. Az y tengely mutatja az ösztrogén koncentrációt. Az ösztrogén a zölddel jelzett anyagokat serkenti, a narancssárgával jelölteket gátolja. DC: dendritikus sejt; NK: természetes ölő sejt; VSMC: vaszkuláris simaizomsejt; TGF β : transzformáló növekedési faktor β ; MMP-1/3: mátrix metalloproteináz-1/3; MCP-1: monocita kemoattraktáns fehérje-1; bFGF: bázikus fibroblaszt növekedési faktor; TIMP: mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitora; OPG: osteoprotegerin; PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor [118].

Látható, hogy nem egyértelműek az összefüggések a szteroid hormonok és a gyulladáshoz vezető jelenségek között. Ennek oka lehet a különböző modellek használata (humán, rágcsáló, hal, sejtvonal), illetve a trauma vagy infekció kezdete és a mérés között eltelt idő különböző hossza. Ugyanis a trauma korai szakaszában az akut fázis válasz a hormonszintek változásával jár [124], tehát az ezt követő hormonvizsgálatok már nem az egészséges állapotot tükrözik.

Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint az antioxidáns szteroidok fokozzák a neutrofil granulociták MPO aktivitását, és így az általa katalizált peroxidáció végtermékének, a hipoklorit anionnak a koncentrációját [9, 18, 129]. A hipoklorit gátolja a O₂⁻ termelést a NOX-ra ható negatív feedback révén (12. ábra). Így a szuperoxidból származó hipoklorit koncentráció is csökken, és a NOX negatív feedback gátlása feloldódik, ismét fokozódik a O₂⁻ termelés. Az indometacin kezelés ezzel szemben az ellentétes irányba hat [9]. A MPO és indometacin hatása az adott helyzetben

feltehetőleg nagy mértékben függ a kezelés időtartamától. Vizsgálatunkban a granulociták két órás indometacin kezelése nem okozott jelentős változást, míg a MPO fokozta a baktériumölő képességet. Patkányoknál az öt napos indometacin adagolás hatására romlott a fertőzéssel való megküzdő képesség, feltehetőleg a hipoklorit anion koncentráció csökkenése miatt. Hipotézisünk szerint ez a NOX-ra való negatív feedback feloldásán keresztül végülis fokozná a O_2^- termelődést és a baktericid képességet. Ez a feltételezett szabályozó mechanizmus azonban nem érte el ezt a szintet, mert a korai szakaszban a csökkent hipoklorit szint meghatározta a fertőzés lefolyását. A tesztoszteron és E_2 kezelés ugyanakkor feltehetőleg fokozta a MPO aktivitást, ami baktericid képessége révén javíthatta a kezelt patkányok megküzdését az infekcióval.

Mivel két, egymástól nagyon különböző kísérleti modellen vizsgáltuk a bakteriális infekcióra adott választ, az eredményeket nehéz egymással összehasonlítani. A nemi hormonok számos veleszületett és szerzett immunológiai folyamatban szerepet játszanak, és az immunrendszer sok sejttípusa rendelkezik nemi hormon receptorokkal. Az ösztradiollal kezelt neutrofilek kifejezettebb baktériumölő képessége csak egyike e sokrétű szabályozásnak, és *in vivo* a szteroid hormonok sokkal összetettebb folyamatokban vesznek részt.



12. ábra A reaktív oxigén származékok termelődése a NADPH-oxidáz (NOX), szuperoxid-dizmutáz (SOD) és mieloperoxidáz (MPO) által katalizált reakciókban. A szteroid hormonok serkentik a MPO-t, és a hipoklorit (ClO^-) gátolja a NOX-t.

VI. Következtetések

1. Az ösztradiol és a tibolon egyes metabolitjai – 3β -tibolon-szulfát, 3β - 17β -tibolon-diszulfát és magasabb koncentrációban a 3β -hidroxitibolon és 3α -tibolon-szulfát is – csökkentik az aktivált izolált humán neutrofil granulociták szuperoxid termelését.
2. Az ösztradiol és a tibolon szulfatált metabolitjai (3α -tibolon-szulfát, 3α - 17β -tibolon-diszulfát, 3β -tibolon-szulfát, 3β - 17β -tibolon-diszulfát) csökkentik a xantin – xantin-oxidáz rendszer szuperoxid termelését. Ezek alapján feltételezhető, hogy a tibolonnak a posztmenopauzális medicinában ismert jótékony hatásai részben a gyökfogó kapacitásának köszönhetőek.
3. Lipiddús tápon tartott patkányok plazmájának teljes gyökfogó kapacitása csökken. A hosszú távú kortikoszteron, ill. kortizol kezelés szignifikánsan javítja a gyökfogó kapacitást. A kortikoszteron és kortizol tehát antioxidáns hatású a vizsgálati körülmények között. Ennek, valamint egyéb szteroid hormonok ilyen hatásának ismeretében lehetőség nyílik az antioxidáns tulajdonság háttérében álló szerkezeti összefüggések vizsgálatára.
4. Az akut mieloperoxidáz, ösztradiol és kortizol kezelés javítja, a MPO inhibitor indometacin nem befolyásolja izolált humán neutrofil granulociták baktériumölő képességét.
5. Az indometacin kezelés és a kasztráció gyengíti a szeptikus patkányok immunválaszát és klinikai állapotát. Az indometacin feltehetőleg fokozza a bakteriális infekciók mortalitását.
6. Ezzel szemben a tesztoszteron, és még inkább az ösztradiol jótékony hatású szeptikus patkányokban. A tesztoszteronnal nem egyértelműek az eredmények, azonban az ösztradiol hatása kapcsán felmerülhet, hogy a rövid távú ösztrogén kezelést szeptikus állapotú betegek adjuváns terápiájának részeként vizsgálják. Ezt megelőzően azonban további, nagyobb elemszámú állatkísérletekre lenne szükség.

VII.1. Összefoglalás

Néhány természetes szteroid vegyület, így a nemi hormonok nagy része és a kortizol humán neutrofil granulocitákon antioxidáns hatással bír. Ennek mechanizmusa nem teljesen ismert, de részben a mieloperoxidáz (MPO) aktivitásának fokozásán, és a következményes negatív feedback-szerű NADPH-oxidáz gátláson keresztül valósul meg.

Munkámban egy szintetikus szteroid, a tibolon és származékainak szuperoxid csökkentő hatását vizsgáltam. Bár a tibolon önmagában nem csökkenti az aktivált granulociták szuperoxid termelését, néhány metabolitja – 3 β -hidroxitibolon, 3 α -tibolon-szulfát, 3 β -tibolon-szulfát, 3 β -17 β -tibolon-diszulfát – hatékonyak bizonyult.

A stresszhormonként számon tartott kortikoszteron és kortizol antioxidáns hatását patkánykísérletben igazoltuk. Oxidatív stressz keltése céljából lipiddús diétán tartott patkányok vérében a teljes gyökfogó kapacitás nő négy hetes kortikoszteron ill. kortizol kezelés után.

A MPO elsődleges fiziológiás szerepe a granulocita aktivációja során a szabad gyökök termelésének katalizálása és a fagocitált baktérium elpusztítása. A MPO és az aktivitását fokozó ösztradiol és kortizol javítja az *E. colival* fertőzött granulociták intracelluláris baktériumölő képességét két órás kezelés után. Ezzel szemben a MPO inhibitor indometacinnak nincs számottevő hatása a baktericid funkcióra.

A fenti kísérlet folytatásaként patkánymodellen vizsgáltuk az indometacin, a tesztoszteron és az ösztradiol hatását a szepszis kimenetelére. Az indometacin kezelés gyenge általános állapothoz és jelentős bakteriémiához vezet a májból és vérből reizolált baktériumok száma alapján. A tesztoszteron hatása kasztrált állatokban gyengébb, mint nem kasztráltaknál, de összességében jótékony hatású széptikus patkányokban. Az ösztradiol kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak a bakteriémia és a gyulladáshoz laborparaméterek mérséklésében.

Összességében tehát a MPO, az ösztradiol és a kortizol javítják a granulociták baktériumölő képességét. Az indometacin kezelés és a kasztráció károsodott immunválaszhoz és gyenge klinikai állapothoz vezet széptikus patkányoknál, ugyanakkor a tesztoszteron és még inkább az ösztradiol kezelés jótékony hatású.

VII.2. Summary

A number of natural steroid structures, like most sex hormones and cortisol have antioxidant effect on human neutrophil granulocytes. The exact mechanism of this is unknown; however, it has been attributed at least in part to the increased activity of myeloperoxidase (MPO) and the subsequent negative feedback-like inhibitory effect on NADPH oxidase.

In my work I aimed to evaluate the superoxide inhibiting effect of the synthetic steroid tibolone and its metabolites. Although tibolone itself does not reduce superoxide production of activated neutrophil granulocytes, some of its metabolites – 3 β -hydroxytibolone, 3 α -sulfated-tibolone, 3 β -sulfated-tibolone and 3 β -17 β -disulfated-tibolone – seem to be efficient.

We proved the antioxidant capacity of two stress hormones, corticosterone and cortisol in a rat model. Rats were kept on a lipid rich diet in order to induce oxidative stress. A four-week treatment with corticosterone or cortisol increases the total scavenger capacity of blood samples.

The primary role of MPO during granulocyte activation is the promotion of free radical production and the killing of phagocytosed bacteria. MPO and two hormones that enhance its activity, estradiol and cortisol increase intracellular bactericidal capacity of granulocytes infected with *E. coli*. On the contrary, MPO inhibitor indomethacin does not have a remarkable effect on bactericidal function.

As a sequel to the above experiment, the effect of indomethacin, testosterone, and estradiol was tested on the outcome of sepsis in a rat model. Indomethacin treatment resulted in weak clinical state and remarkable number of bacteria reisolated from the liver and blood. The effect of testosterone is milder in castrated animals than in not castrated ones, but on the whole it is beneficial in septic rats. Estradiol treatment is the most effective in reducing bacteraemia and inflammatory parameters.

Conclusively, MPO, estradiol, and cortisol enhance intracellular bactericidal activity of neutrophil granulocytes. Indomethacin and castration lead to damaged immune response and weak clinical state in septic rats, while testosterone, and even more, estradiol have beneficial effect.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calò L a. (2013) **The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts.** *Mediators Inflamm*, **2013**:714653.
2. Gomes MB, Negrato CA. (2014) **Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases.** *Diabetol Metab Syndr*, **6**:80.
3. Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. (2014) **Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants.** *J Res Med Sci*, **19**:358–67.
4. Kumar S, Lata K, Mukhopadhyay S, Mukherjee TK. (2010) **Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective.** *Biochim Biophys Acta*, **1800**:1127–35.
5. Békési G, Kakucs R, Várbíró S, Rácz K, Sprintz D, Fehér J, Székács B. (2000) **In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes.** *Steroids*, **65**:889–94.
6. Békési G, Rácz K, Hrabák a, Kakucs R, Várbíró S, Magyar Z, Fehér J, Dinya E, Pázmány T, Paku S, Székács B. (2004) **Systematic investigation of different steroid precursors with respect to their effect on superoxide anion production by human neutrophil granulocytes.** *Horm Metab Res*, **36**:155–63.
7. Katsenos CS, Antonopoulou AN, Apostolidou EN, Ioakeimidou A, Kalpakou GT, Papanikolaou MN, Pistiki AC, Mpalla MC, Paraschos MD, Patrani M a, Pratikaki ME, Retsas T a, Savva A a, Vassiliagkou SD, Lekkou A a, Dimopoulou I, Routsis C, Mandragos KE (2014) **Early administration of hydrocortisone replacement after the advent of septic shock: impact on survival and immune response*.** *Crit Care Med*, **42**:1651–7.
8. Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. (2009) **Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis.** *Neuroimmunomodulation*, **16**:106–13.
9. Békési G, Kakucs R, Sándor J, Sárváry E, Kocsis I, Sprintz D, Várbíró S, Magyar Z, Hrabák a, Fehér J, Székács B. (2001) **Plasma concentration of myeloperoxidase enzyme in pre- and post-climacterial people: related superoxide anion generation.** *Exp Gerontol*, **37**:137–48.
10. D'Autréaux B, Toledano MB. (2007) **ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**:813–24.
11. Nauseef WM, Metcalf J a, Root RK. (1983) **Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils.** *Blood*, **61**:483–92.

12. Babior BM. (2000) **Phagocytes and oxidative stress.** *Am J Med*, **109**:33–44.
13. Gil del Valle L. (2011) **Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans.** *Biomed Aging Pathol*, **1**:1–7.
14. Muzykantov VR. (2001) **Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium.** *J Control Release*, **71**:1–21.
15. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. (2006) **Membrane transport of hydrogen peroxide.** *Biochim Biophys Acta*, **1758**:994–1003.
16. Zhang R, Brennan M, Fu X, Aviles R, Pearce G, Penn M, Topol E, Sprecher D, Hazen S. (2001) **Association Between Myeloperoxidase Levels and Risk of Coronary Artery Disease.** *JAMA J Am Med Assoc*, **286**:2136–2142.
17. Jandl RC, André-Schwartz J, Borges-DuBois L, Kipnes RS, McMurrich BJ, Babior BM. (1978) **Termination of the respiratory burst in human neutrophils.** *J Clin Invest*, **61**:1176–85.
18. Békési G, Kakucs R, Varbiro S, Feher J, Pazmany T, Magyar Z, Sprintz D, Szekacs B. (2001) **Induced myeloperoxidase activity and related superoxide inhibition during hormone replacement therapy.** *BJOG*, **108**:474–81.
19. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNVR. (2006) **Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective.** *J Control Release*, **113**:189–207.
20. Deroo BJ, Hewitt SC, Peddada SD, Korach KS. (2004) **Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus.** *Endocrinology*, **145**:5485–92.
21. Tam NNC, Gao Y, Leung Y, Ho S-M. (2003) **Androgenic Regulation of Oxidative Stress in the Rat Prostate.** *Am J Pathol*, **163**:2513–2522.
22. Gao J, Sun H-Y, Zhu Z-R, Ding Z, Zhu L. (2005) **Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone are related to up-regulation of thioredoxin in SH-SY5Y cells.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **37**:119–25.
23. Lee SY, Andoh T, Murphy DL, Chiueh CC. (2003) **17beta-estradiol activates ICI 162,780-sensitive estrogen receptors and cyclic GMP-dependent thioredoxin expression for neuroprotection.** *FASEB J*, **17**:947–8.
24. Marumo T, Schini-kerth VB, Brandes RP, Busse R. (1998) **Glucocorticoids Inhibit Superoxide Anion Production and p22 Phox mRNA Expression in Human Aortic Smooth Muscle Cells.** *Hypertension*, **32**:1083–1088.
25. Szeffler SJ, Norton CE, Ball B, Gross JM, Aida Y, Pabst MJ. (1989) **IFN-gamma and LPS overcome glucocorticoid inhibition of priming for superoxide release in human monocytes.** *J Immunol*, **142**:3985–92.

26. Wagner a H, Schroeter MR, Hecker M. (2001) **17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells.** *FASEB J*, **15**:2121–30.
27. Adler I, Tulassay Z, Stark J, Marczell I, Nagy-Repas P, Varbiro S, Magyar Z, Szekacs B, Racz K, Bekesi G. (2012) **The effect of certain steroid hormones on the expression of genes involved in the metabolism of free radicals.** *Gynecol Endocrinol*, **28**:912–6.
28. Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. (2005) **Progesterone Antagonizes the Vasoprotective Effect of Estrogen on Antioxidant Enzyme Expression and Function.** *Circ Res*, **97**:1046–54.
29. Long F, Wang Y-X, Liu L, Zhou J, Cui R-Y, Jiang C-L. (2005) **Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages.** *Steroids*, **70**:55–61.
30. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post a, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. (1997) **Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship.** *Mol Pharmacol*, **51**:535–41.
31. Green PS, Gordon K, Simpkins JW. (1997) **Phenolic A ring requirement for the neuroprotective effects of steroids.** *J Steroid Biochem Mol Biol*, **63**:229–35.
32. Green PS, Bishop J, Simpkins JW. (1997) **17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells.** *J Neurosci*, **17**:511–5.
33. Friedl R, Brunner M, Moeslinger T, Spieckermann PG. (2000) **Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages.** *Life Sci*, **68**:417–29.
34. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. (2003) **Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen.** *Circ Res*, **93**:170–7.
35. Schmidt a J, Krieg J-C, Vedder H. (2005) **Effects of steroid hormones on catalase activity in neuronal and glial cell systems.** *Eur Neuropsychopharmacol*, **15**:177–83.
36. Ozacmak VH, Sayan H. (2009) **The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia.** *Physiol Res*, **58**:909–12.
37. Kumtepe Y, Borekci B, Karaca M, Salman S, Alp HH, Suleyman H. (2009) **Effect of acute and chronic administration of progesterone, estrogen, FSH and LH on oxidant and antioxidant parameters in rat gastric tissue.** *Chem Biol Interact*, **182**:1–6.

38. Massafra C. (1997) **Effects of Estradiol and Medroxyprogesterone-Acetate Treatment on Erythrocyte Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Plasma Levels in Amenorrhoeic Women.** *J Clin Endocrinol Metab*, **82**:173–175.
39. Moorthy K, Sharma D, Basir SF, Baquer NZ. (2005) **Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats.** *Exp Gerontol*, **40**:295–302.
40. Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó F V, Viña J. (2003) **Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males.** *Free Radic Biol Med*, **34**:546–552.
41. Prasad S, Kalra N, Shukla Y. (2006) **Modulatory effects of diallyl sulfide against testosterone- induced oxidative stress in Swiss albino mice.** *Asian J Androl*, **8**:719–23.
42. Marin DP, Bolin AP, dos Santos RDCM, Curi R, Otton R. (2010) **Testosterone suppresses oxidative stress in human neutrophils.** *Cell Biochem Funct*, **28**:394–402.
43. Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S. (2001) **Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism.** *Brain Res*, **892**:255–62.
44. Magyar Z, Békési G, Rácz K, Fehér J, Schaff Z, Lengyel G, Blázovics A, Illyés G, Szombath D, Hrabák A, Székács B, Gergics P, Marczell I, Dinya E, Rigó J, Tulassay Z. (2011) **Increased Total Scavenger Capacity and Decreased Liver Fat Content in Rats Fed Dehydroepiandrosterone and Its Sulphate on a High-Fat Diet.** *Gerontology*, **57**:343–9.
45. Raubenheimer PJ, Young E a, Andrew R, Seckl JR. (2006) **The role of corticosterone in human hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback.** *Clin Endocrinol (Oxf)*, **65**:22–6.
46. Pereira B, Costa Rosa LFB, Safi DA, Bechara EJH, Curi R. (1995) **Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages.** *Biochem Pharmacol*, **50**:2093–2098.
47. Goncharova ND, Shmaliy A V, Bogatyrenko TN, Koltover VK. (2006) **Correlation between activity of antioxidant enzymes and circadian rhythms of corticosteroids in Macaca mulatta monkeys of different age.** *Exp Gerontol*, **41**:778–83.
48. Prázný M, Ježková J, Horová E, Lazárová V, Hána V, Kvasnicka J, Pecen L, Marek J, Škrha J, Kršek M. (2008) **Impaired Microvascular Reactivity and Endothelial Function in Patients with Cushing's Syndrome: Influence of Arterial Hypertension.** *Physiol Res*, **57**:13–22.
49. Kloosterboer HJ. (2004) **Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone.** *Maturitas*, **48 Suppl 1**:S30–40.

50. De Gooyer ME, Overklift Vaupel Kleyn GT, Smits KC, Ederveen AG., Verheul HA, Kloosterboer HJ. (2001) **Tibolone: a compound with tissue specific inhibitory effects on sulfatase.** *Mol Cell Endocrinol*, **183**:55–62.
51. Ederveen AG, Kloosterboer HJ. (2001) **Tibolone exerts its protective effect on trabecular bone loss through the estrogen receptor.** *J Bone Miner Res*, **16**:1651–7.
52. Simoncini T, Genazzani AR. (2000) **Tibolone inhibits leukocyte adhesion molecule expression in human endothelial cells.** *Mol Cell Endocrinol*, **162**:87–94.
53. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Garibaldi S, Genazzani AR. (2004) **Tibolone activates nitric oxide synthesis in human endothelial cells.** *J Clin Endocrinol Metab*, **89**:4594–600.
54. Haenggi W, Bersinger N, Mueller M, Birkhaeuser M. (1999) **Decrease of serum endothelin levels with postmenopausal hormone replacement therapy or tibolone.** *Gynecol Endocrinol*, **13**:202–5.
55. Cicinelli E, Ignarro LJ, Galantino P, Pinto V, Barba B, Schonauer S. (2002) **Effects of tibolone on plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women.** *Fertil Steril*, **78**:464–8.
56. Ossewaarde ME, Dallinga-Thie GM, Bots ML, van der Schouw YT, Rabelink TJ, Grobbee DE, Westerveld HT. (2003) **Treatment with hormone replacement therapy lowers remnant lipoprotein particles in healthy postmenopausal women: results from a randomized trial.** *Eur J Clin Invest*, **33**:376–382.
57. De Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM, Martinez PE. (2008) **Estradiol valerate and tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats.** *Biogerontology*, **9**:285–98.
58. Zandberg P, Peters JLM, Demacker PNM, Smit MJ, de Reeder EG, Meuleman DG. (1998) **Tibolone Prevents Atherosclerotic Lesion Formation in Cholesterol-Fed, Ovariectomized Rabbits.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**:1844–1854.
59. Kloosterboer HJ. (2011) **Historical milestones in the development of tibolone (Livial®).** *Climacteric*, **14**:609–21.
60. Chetrite G, Kloosterboer H, Philippe J, Pasqualini J. (1999) **Effects of Org OD14 (Livial) and its metabolites on 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in hormone-dependent MCF-7 and T-47D breast cancer cells.** *Anticancer Res*, **19**:261–7.
61. Chetrite G, Kloosterboer H, Philippe J, Pasqualini J. (1999) **Effect of Org OD14 (LIVIAL) and its metabolites on human estrogen sulphotransferase activity in the hormone-dependent MCF-7 and T-47D, and the hormone-independent MDA-MB-231, breast cancer cell lines.** *Anticancer Res*, **19**:269–75.

62. Petit E, Courtin A, Kloosterboer HJ, Rostène W, Forgez P, Gompel A. (2009) **Progestins induce catalase activities in breast cancer cells through PRB isoform: correlation with cell growth inhibition.** *J Steroid Biochem Mol Biol*, **115**:153–60.
63. Farfán-García ED, Castillo-Hernández MC, Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Gallardo JM, Guerra-Araiza C. (2014) **Tibolone prevents oxidation and ameliorates cholinergic deficit induced by ozone exposure in the male rat hippocampus.** *Neurochem Res*, **39**:1776–86.
64. Vural P, Akgu C, Canbaz M. (2005) **Effects of menopause and tibolone on antioxidants in postmenopausal women.** *Ann Clin Biochem*, **42**:220–223.
65. Mukai K, Daifuku K, Yokoyama S, Nakano M. (1990) **Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogens in solution.** *Biochim Biophys Acta*, **1035**:348–352.
66. De Oliveira MC, Martins-Maciel ER, Comar JF, Yamamoto NS, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Salgueiro-Pagadigorria CL. (2011) **Tibolone impairs glucose and fatty acid metabolism and induces oxidative stress in livers from female rats.** *Eur J Pharmacol*, **668**:248–56.
67. Darvas Z, László V. **A sejtek működésének szabályozása.** In: Darvas Z, László V, *Sejtbiológia Egyetemi Jegyzet*. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2002:229–245.
68. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. (1973) **Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.** *J Clin Invest*, **52**:741–744.
69. Pick E, Keisari Y. (1981) **Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Production by Chemically Elicited Peritoneal Macrophages-Induction by Multiple Nonphagocytic Stimuli.** *Cell Immunol*, **59**:301–318.
70. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. (1993) **Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa.** *J Reprod Fertil*, **97**:441–450.
71. Wu T, Chen G, Chen X, Wang Q, Wang G (2015) **Anti-hyperlipidemic and Anti-oxidative Effects of Gelsemine in High-Fat-Diet-Fed Rabbits.** *Cell Biochem Biophys* **71**:337-44.
72. Enkel T, Koch M. (2009) **Chronic corticosterone treatment impairs trace conditioning in rats with a neonatal medial prefrontal cortex lesion.** *Behav Brain Res*, **203**:173–9.
73. Blázovics A, Kovács Á, Lugasi A, Hagymási K, Bíró L, Fehér J. (1999) **Antioxidant Defense in Erythrocytes and Plasma of Patients with Active and Quiescent Crohn Disease and Ulcerative Colitis: A Chemiluminescent Study.** *Clin Chem*, **45**:895–896.

74. Vos R, Krebbers S, Verhoeven C, Delbressine L. (2002) **The in vivo human metabolism of tibolone.** *Drug Metab Dispos*, **30**:106–112.
75. Bunce CM, Mountford JC, French PJ, Mole DJ, Durham J, Michell RH, Brown G. (1996) **Potential of myeloid differentiation by anti-inflammatory agents, by steroids and by retinoic acid involves a single intracellular target, probably an enzyme of the aldoketoreductase family.** *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, **1311**:189–198.
76. Romano D, Ferrario V, Mora D, Lenna R, Molinari F. (2008) **Enantioselective production of 3-hydroxy metabolites of tibolone by yeast reduction.** *Steroids*, **73**:112–5.
77. Falany JL, Falany CN. (2007) **Interactions of the human cytosolic sulfotransferases and steroid sulfatase in the metabolism of tibolone and raloxifene.** *J Steroid Biochem Mol Biol*, **107**:202–10.
78. Tamura H, Taniguchi K, Hayashi E, Hiyoshi Y, Nagai F. (2001) **Expression Profiling of Sulfotransferases in Human Cell Lines Derived from Extra-Hepatic Tissues.** *Biol Pharmaceutical Bull*, **24**:1258–1262.
79. Kloosterboer H. (2001) **Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action.** *J Steroid Biochem Mol Biol*, **76**:231–238.
80. Takanashi K, Watanabe K, Yoshizawa I. (1995) **On the inhibitory effect of C17-sulfconjugated catechol estrogens upon lipid peroxidation of rat liver microsomes.** *Biol Pharmaceutical Bull*, **18**:1120–1125.
81. Lodi F, Jimenez R, Moreno L, Kroon P a, Needs PW, Hughes D a, Santos-Buelga C, Gonzalez-Paramas A, Cogolludo A, Lopez-Sepulveda R, Duarte J, Perez-Vizcaino F. (2009) **Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta.** *Atherosclerosis*, **204**:34–9.
82. Iwasaki Y, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Kambayashi M, Nakashima N. (2004) **Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect.** *J Clin Endocrinol Metab*, **89**:3449–54.
83. Vassalle C, Cicinelli E, Lello S, Mercuri A, Battaglia D, Maffei S. (2011) **Effects of menopause and tibolone on different cardiovascular biomarkers in healthy women.** *Gynecol Endocrinol*, **27**:163–9.
84. Sator K, Sator MO, Sator PG, Egarter C, Huber JC. (2006) **Effects of tibolone on selectins in postmenopausal women.** *Maturitas*, **53**:166–70.
85. Benzie IF, Tomlinson B. (1998) **Antioxidant power of angiotensin-converting enzyme inhibitors in vitro.** *Br J Clin Pharmacol*, **45**:168–9.

86. Keles MS, Bayir Y, Suleyman H, Halici Z. (2009) **Investigation of effects of Lacidipine, Ramipril and Valsartan on DNA damage and oxidative stress occurred in acute and chronic periods following isoproterenol-induced myocardial infarct in rats.** *Mol Cell Biochem*, **328**:109–17.
87. Gáspárová Z, Ondrejčková O, Gajdošíková A, Gajdošík A, Snirc V, Stolc S. (2010) **Oxidative stress induced by the Fe/ascorbic acid system or model ischemia in vitro: effect of carvedilol and pyridoindole antioxidant SMe1EC2 in young and adult rat brain tissue.** *Interdiscip Toxicol*, **3**:122–6.
88. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, Le N-A, Jones D, Quyyumi AA. (2012) **The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin.** *J Clin Lipidol*, **6**:42–9.
89. Heller FR, Descamps O, HondekJijn JC. (1998) **LDL oxidation: therapeutic perspectives.** *Atherosclerosis*, **137 Suppl**:S25–31.
90. Foley P, Gerlach M, Youdim MBH, Riederer P. (2000) **MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders?** *Parkinsonism Relat Disord*, **6**:25–47.
91. Caro P, Gómez J, Sanz A, Portero-Otín M, Pamplona R, Barja G. (2007) **Effect of graded corticosterone treatment on aging-related markers of oxidative stress in rat liver mitochondria.** *Biogerontology*, **8**:1–11.
92. Dhanabalan S, Mathur PP. (2009) **Low dose of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces testicular oxidative stress in adult rats under the influence of corticosterone.** *Exp Toxicol Pathol*, **61**:415–23.
93. Rajashree S, Puvanakrishnan R. (1998) **Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats.** *Mol Cell Biochem*, **181**:77–85.
94. Orzechowski a, Ostaszewski P, Wilczak J, Jank M, Bałasińska B, Wareski P, Fuller J. (2002) **Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery.** *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **49**:256–63.
95. Cote J, Meylan S, Clobert J, Voituron Y. (2010) **Carotenoid-based coloration, oxidative stress and corticosterone in common lizards.** *J Exp Biol*, **213**(Pt 12):2116–24.
96. Costantini D, Fanfani A, Dell'omo G. (2008) **Effects of corticosteroids on oxidative damage and circulating carotenoids in captive adult kestrels (*Falco tinnunculus*).** *J Comp Physiol B*, **178**:829–35.

97. Lin H, Decuypere E, Buyse J. (2004) **Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) 1. Chronic exposure.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **139**:737–44.
98. Lin H, Decuypere E, Buyse J. (2004) **Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) 2. Short-term effect.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **139**:745–51.
99. Khanfer R, Phillips AC, Carroll D, Lord JM. (2010) **Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress.** *Psychosom Med*, **72**:636–40.
100. Khanfer R, Lord JM, Phillips AC. (2011) **Neutrophil function and cortisol:DHEAS ratio in bereaved older adults.** *Brain Behav Immun*, **25**:1182–6.
101. Aomatsu M, Kato T, Kasahara E, Kitagawa S. (2013) **Gender difference in tumor necrosis factor- α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- γ .** *Biochem Biophys Res Commun*, **441**:220–5.
102. Moshage HJ, Janssen J a, Franssen JH, Hafkenscheid JC, Yap SH. (1987) **Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation.** *J Clin Invest*, **79**:1635–41.
103. Black S, Kushner I, Samols D. (2004) **C-reactive Protein.** *J Biol Chem*, **279**:48487–90.
104. De Oliveira Assis T, da Silva TG, de Souza Franco E, Rezende Leite AC, de Moraes SRA, de Sousa Maia MB. (2011) **Impact of early malnourishment on the chronic inflammatory response and its implications for the effect of indomethacin on Wistar rats.** *Br J Nutr*, **106**:845–51.
105. Coutinho AE, Chapman KE. (2011) **The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights.** *Mol Cell Endocrinol*, **335**:2–13.
106. Perretti M, Ahluwalia A. (2000) **The microcirculation and inflammation : Site of Action for Glucocorticoids.** *Microcirculation*, **7**:147–161.
107. Ashwell JD, Lu FWM, Vacchio MS. (2000) **Glucocorticoids in T cell development and function.** *Annu Rev Immunol*, **18**:309–345.
108. Croxtall JD, van Hal PTW, Choudhury Q, Gilroy DW, Flower RJ. (2002) **Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in A549 cells.** *Br J Pharmacol*, **135**:511–9.
109. Limbourg FP, Huang Z, Plumier J-C, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schütz G, Moskowitz M a, Liao JK. (2002) **Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids.** *J Clin Invest*, **110**:1729–38.

110. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM. (2009) **The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation.** *Neuron*, **64**:33–9.
111. Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SF. (2010) **Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide.** *Brain Behav Immun*, **24**:19–30.
112. Purton JF, Monk J a., Liddicoat DR, Kyparissoudis K, Sakkal S, Richardson SJ, Godfrey DI, Cole TJ. (2004) **Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death.** *J Immunol*, **173**:3816–3824.
113. Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff TH, Melief CJ, Ofringa R. (2000) **Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10.** *Blood*, **95**:3162–7.
114. Chamorro S, García-Vallejo JJ, Unger WWJ, Fernandes RJ, Bruijns SCM, Laban S, Roep BO, 't Hart B a, van Kooyk Y. (2009) **TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program.** *J Immunol*, **183**:2984–94.
115. Luther C, Adamopoulou E, Stoeckle C, Brucklacher-Waldert V, Rosenkranz D, Stoltze L, Lauer S, Poeschel S, Melms A, Tolosa E. (2009) **Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients.** *J Immunol*, **183**:841–8.
116. Rutella S, Lemoli RM. (2004) **Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications.** *Immunol Lett*, **94**:11–26.
117. Fadok V a, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. (1998) **Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.** *J Clin Invest*, **101**:890–8.
118. Straub RH. (2007) **The complex role of estrogens in inflammation.** *Endocr Rev*, **28**:521–74.
119. Sasaki M, Fujii Y, Iwamoto M, Ikadai H. (2013) **Effect of sex steroids on Babesia microti infection in mice.** *Am J Trop Med Hyg*, **88**:367–75.
120. Watanuki H, Yamaguchi T, Sakai M. (2002) **Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11-ketotestosterone.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **132**:407–13.

121. Clemens L, Siiteri P, Stites D. (1979) **Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy.** *J Immunol*, **122**:1978–1985.
122. Roth JA, Kaeberle ML, Hsu WH. (1982) **Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers.** *Infect Immun*, **35**:997–1002.
123. Oberbeck R, Kobbe P. (2010) **Dehydroepiandrosterone (DHEA): A steroid with multiple effects. Is there any possible option in the treatment of critical illness?** *Curr Med Chem*, **17**:1039–1047.
124. Gee AC, Sawai RS, Differding J, Muller P, Underwood S, Schreiber MA. (2008) **The influence of sex hormones on coagulation and inflammation in the trauma patient.** *Shock*, **29**:334–341.
125. Zhang H, Bain JL, Caskey CP, Sandifer LC, Johnson RB. (2011) **Effects of gender on serum biomarkers of systemic inflammation coincident to experimentally-induced periapical lesions.** *Arch Oral Biol*, **56**:168–76.
126. Kita E, Takahashi S, Yasui K, Kashiba S. (1985) **Effect of estrogen (17 beta-estradiol) on the susceptibility of mice to disseminated gonococcal infection.** *Infect Immun*, **49**:238–43.
127. Seaman WE, Blackman MA, Gindhart TD, Roubinian JR, Loeb JM, Talal N. (1978) **β-estradiol reduces natural killer cells in mice.** *J Immunol*, **121**:2193–2198.
128. Biswas DK, Singh S, Shi Q, Pardee AB, Iglehart JD. (2005) **Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling.** *Sci STKE*, **2005**:pe27.
129. Jansson G. (1991) **Oestrogen-induced enhancement of myeloperoxidase activity in human polymorphonuclear leukocytes--a possible cause of oxidative stress in inflammatory cells.** *Free Radic Res Commun*, **14**:195–208.

IX. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. **Stark J**, Tulassay Z, Lengyel G, Szombath D, Szekacs B, Adler I, Marczell I, Nagy-Repas P, Dinya E, Bekesi G (2013) Increased total scavenger capacity in rats fed corticosterone and cortisol on lipid-rich diet. *Acta Physiol Hung.* 100: 84-88. **IF: 0,747**
2. **Stark J**, Varga Z, Ghidán A, Vajdovich P, Szombath D, Marczell I, Várbíró S, Dinya E, Magyar T, Tulassay Z, Székács B, Nagy K, Rácz K, Békési G (2014) The effect of indomethacin, myeloperoxidase, and certain steroid hormones on bactericidal activity: an ex vivo and in vivo experimental study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 13: 27-35. **IF: 1,514 (2013)**
3. **Stark J**, Varbiro S, Sipos M, Tulassay Z, Sara L, Adler I, Dinya E, Magyar Z, Szekacs B, Marczell I, Kloosterboer HJ, Racz K, Bekesi G (2015) Antioxidant effect of the active metabolites of tibolone. *Gynecol Endocrinol.* 31: 31-35. **IF: 1,136 (2013) Megosztott elsőszerzős cikk.**

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

1. **Stark J**, Zágoni T, Tóth M, Gutaj P, Tulassay Zs (2010) A csontsűrűség vizsgálata irritábilis bél szindrómában. *Magyar Belorvosi Archívum*, 63: 443-448.
2. Marczell I, Tulassay Zs, Békési G, Tóth M, Patócs A, **Stark J**, Rácz K (2012) A sejtfelszíni szteroidreceptorok szerepe és azok klinikai vonatkozásai. *Magyar Belorvosi Archívum*, 65: 289-297.
3. Bekesi G, Tulassay Z, Lengyel G, Schaff Z, Szombath D, **Stark J**, Marczell I, Nagy-Repas P, Adler I, Dinya E, Racz K, Magyar K (2012) The effect of selegiline on total scavenger capacity and liver fat content: a preliminary study in an animal model. *J Neural Transm.* 119: 25-30. **IF: 3,052**
4. Adler I, Tulassay Z, **Stark J**, Marczell I, Nagy-Repas P, Varbiro S, Magyar Z, Szekacs B, Racz K, Bekesi G (2012) The effect of certain steroid hormones on the expression of genes involved in the metabolism of free radicals. *Gynecol Endocrinol.* 28: 912-6 **IF: 1,303**

Az értekezés témájához nem kapcsolódó könyvfejezet:

Békési G., **Stark J.**: Endokrin betegségek időskorban. In: Tulassay Zs, Békési G, Rác K (szerk.), A belgyógyászat alapjai fogorvosok számára. Medicina Kiadó, Budapest, 2014

X. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Rácz Károly professzor úrnak, a II. sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának és programvezetőmnek a munkám elvégzéséhez szükséges körülmények és feltételek biztosításáért. Köszönöm Tulassay Zsolt professzor úrnak, a Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola volt vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a Ph.D. munkám megvalósítását.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Békési Gábornak, a II. sz. Belgyógyászati Klinika docensének, hogy kutatócsoportjába bevett, szakmai fejlődésemet folyamatosan segítette, munkám során végig bátorított. Hálás vagyok bizalmáért és emberségéért, amivel engem is a tudomány iránti alázatra tanított.

Külön köszönet illeti Dr. Patócs Attilát, az Endokrinológiai Genetika Laboratórium vezetőjét, amiért háttérrel biztosított és hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönöm Dinya Elek professzor úrnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítséget.

Ez a munka nem jöhetett volna létre társszerzőim fáradhatatlan munkája nélkül. Külön köszönöm Dr. Várbíró Szabolcsnak, a II. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársának a tibolonnal végzett kísérletekhez való hozzájárulást, Helenius J. Kloosterboernek, a hajdani Organon cég munkatársának a tibolon metabolitok rendelkezésünkre bocsátását. Köszönettel tartozom Dr. Ghidán Ágostonnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársának a mikrobiológiai vizsgálatokban nyújtott segítségért, Dr. Varga Zsuzsannának, az MTA Állatorvosi-tudományi Kutatóintézet munkatársának és Dr. Vajdovich Péternek, a Szent István Egyetem munkatársának az állatkísérletekben való közreműködésükért.

Végtelenül hálás vagyok Nagy Krisztina asszisztensnőnek a laboratóriumi mérések során nyújtott pótolhatatlan munkájáért.

Nagy segítségemre voltak a Központi Izotópdiaosztikai és Endokrin Laboratórium munkatársai, az Endokrinológiai Genetika Laboratórium volt és jelenlegi Ph.D. hallgatói és munkatársai, akik barátsággal vettek körül munkám során. Külön kiemelem Dr. Marczell Istvánt, akinek a biztatása nélkül most nem tartanék itt.

Köszönöm továbbá a II. sz. Belgyógyászati Klinika orvosainak és ápolóinak a támogatását, valamint a véradó önkéntesek segítségét.

Nem utolsó sorban hálás vagyok szüleimnek, nagyszüleimnek, vőlegényemnek, egész családomnak és barátaimnak, akik segítettek pályakezdésemet, és példájukkal, folyamatos biztatásukkal, lelki támogatásukkal kísérték és kísérik munkám során.