

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Combi Zsolt**

**A kénhidrogén homeosztázis szabályozása humán  
kalcifikált szívbillentyűben: molekuláris mechanizmusok,  
farmakológiai vonatkozások**

**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2024**

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **A kénhidrogén homeosztázis szabályozása humán kalcifikált szívbillentyűben: molekuláris mechanizmusok, farmakológiai vonatkozások**

**Combi Zsolt**

**Témavezető: Prof. Dr. Balla József**



**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2024**

# TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	5
1. BEVEZETÉS .....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	8
2.1 A valvuláris kalcifikáció .....	8
2.1.1 A valvuláris kalcifikáció epidemiológiája és legfőbb rizikó faktorai .....	8
2.1.2 Az aortabillentyűk anatómiája, szerkezete, működése .....	8
2.1.3 A szívbillentyű kalcifikáció patobiológiája.....	10
2.2 A szívbillentyűk meszesedése és a gyulladás közötti összefüggések .....	12
2.3 A kénhidrogén endogén bioszintézise.....	13
2.4 A kénhidrogén katabolizmusa a mitokondriumban .....	15
2.5 A kénhidrogén donor molekulák jellemzői.....	17
2.6 A kénhidrogén terápia alkalmazásának lehetőségei a szív- és érrendszeri megbetegedésekben .....	19
3. CÉLKITŰZÉSEK .....	21
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	22
4.1 A kísérletek során használt vegyszerek és reagensek .....	22
4.2 Humán szövetminták feldolgozása, sejtek izolálása, tenyésztése .....	22
4.3 Az állatkísérletek kivitelezése .....	23
4.4 Egér aortabillentyűk <i>ex vivo</i> kezelése.....	24
4.5 A kalcifikáció indukálása, kalciummérés, Alizarin Red S festés.....	24
4.6 Alkalikus foszfatáz enzim kimutatása .....	25
4.7 Gyulladás indukálása humán egészséges és meszes aorta szívbillentyűből származó VIC-ben .....	26
4.8 RNS izolálás és a valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) kivitelezése .....	26
4.9 Fehérjék analízise Western blot technikával.....	27
4.10 Immunfluoreszcens festés.....	28
4.11 Immunhisztokémiai (IHC) festés egér szívbillentyűből .....	29
4.12 Nukleáris és citoplazmatikus fehérje extrakció .....	30
4.13 CSE, CBS és NF- $\kappa$ B géncsendesítése .....	30
4.14 Az NF- $\kappa$ B farmakológiai gátlása .....	31
4.15 Immunhisztokémia humán szívbillentyű szövetből .....	31
4.16 A kénhidrogén szintek meghatározása sejtlizátumokból módosított metilénkék módszerrel .....	32
4.17 Cisztein, cisztationin, lantionin és homocisztein mérése LC-MS/MS módszerrel.....	33

4.18 A biológiailag hozzáférhető H <sub>2</sub> S detektálása LC-MS/MS technikával .....	34
4.19 A fehérje perszulfidáció meghatározása LC-MS/MS módszerrel .....	34
4.20 Kísérleti egységek.....	35
4.21 Statisztikai elemzés.....	35
5. EREDMÉNYEK .....	36
5.1 A humán kalcifikált aortabillentyűkben a gyulladást kiváltó citokinek expressziója megemelkedik.....	36
5.2 Az exogén módon beadott H <sub>2</sub> S gátolja a gyulladás kialakulását apolipoprotein E-hiányos egerek (ApoE <sup>-/-</sup> ) aortabillentyűiben.....	37
5.3 Az endogén H <sub>2</sub> S termelés csökkenése fokozza a nagy koncentrációjú foszfát által kiváltott gyulladást a humán szívbillentyű intersticiális sejtekben .....	39
5.4 A H <sub>2</sub> S akadályozza a gyulladós folyamatok progresszióját az NF-κB aktivitás gátlásán keresztül.....	41
5.5 Az NF-κB aktiválása elősegíti a RUNX2 nukleáris transzlokációját és ezt követően a szívbillentyű intersticiális sejtek mineralizációját .....	43
5.6 ApoE <sup>-/-</sup> egerek szívbillentyű intersticiális sejtjeiben a kalcifikáció során, az NF-κB és a RUNX2 fokozott expressziója és nukleáris kolokalizációja következik be – a kénhidrogén mindkét folyamatot gátolja .....	44
5.7 A CAVD-ben az emelkedett CSE szint és az alacsony biológiailag hozzáférhető H <sub>2</sub> S szint együtt jár a proinflammatorikus citokinek fokozott expressziójával .....	46
5.8 A VIC sejtek mineralizációja és gyulladós válasza magas foszfátkoncentrációra .....	49
5.9 A proinflammatorikus citokinek fokozzák a CAVD betegekből származó VIC sejtek mineralizációját .....	51
5.10 Az egészséges aortabillentyűkből származó VIC sejtekben a meszesedés átmeneti gátlását a proinflammatorikus citokinek okozzák .....	51
5.11 A CSE/H <sub>2</sub> S szabályozza a humán egészséges aortabillentyűből származó VIC sejtek meszesedésének IL-1β és TNF-α által kiváltott átmeneti gátlását .....	53
5.12 A H <sub>2</sub> S mitokondriális metabolizmusa megnövekedett a CAVD-betegek aortabillentyűiben .....	56
5.13 A mitokondriális kénhidrogén donor gátolja a magas foszfátszint által kiváltott kalcifikációt a humán aortabillentyű intersticiális sejtekben.....	60
5.14 A mitokondriális kénhidrogén donor gátolja a magas foszfátszint által kiváltott gyulladást a humán aortabillentyű intersticiális sejtjeiben .....	64
6. MEGBESZÉLÉS.....	67
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	73
8. SUMMARY .....	74
9. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI, A JELÖLT SAJÁT MEGÁLLAPÍTÁSAI:.....	75
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	77

11. TÁRGYSZAVAK: KEYWORDS .....	85
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	86
13. FÜGGELÉK.....	87

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A magyarra nehezen fordítható rövidítéseket angolul jelöltem.

3-MST: 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz

$\alpha$ -SMA: alfa-simaizom-aktin

ALP: alkalikus foszfatáz

AP72: ((4 methoxyphenyl) (piperidin-1-yl) phosphinodithioc acid)

AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl) phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide]

ApoE<sup>-/-</sup>: apolipoprotein E deficiens egér

BCA: bicinkoninsav

CAT: cisztein-aminotranszferáz

CAV: kalcifikált aorta billentyű

CAVD: kalcifikált aorta billentyű betegség

CAV-VICs: kalcifikált aorta billentyűből származó valvuláris intersticiális sejtek

CBS: cisztationin- $\beta$ -szintáz

CHAPS: (3-[(3-kolamidopropil)-dimetil-ammónium]-1-propánszulfonát)

CKD: krónikus veseelégtelenség

CSE: cisztationin- $\gamma$ -liáz

CSSC: cisztin

Cys: cisztein

DAO: D-aminosav-oxidáz

DMEM: Dulbecco-féle módosított sejttenyésztő tápfolyadék

DMSO: dimetil-szulfoxid

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ESRD: végstádiumú veseelégtelenség

ETC: elektrontranszport lánc

ETHE1: perszulfid dioxigenáz

EV: extacelluláris vezikula

FA: hangyasav

FBS: magzati szarvasmarha szérum

GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát-dehidrogenáz

GY4137: (P-(4-Methoxyphenyl)-P-4-morpholinylphosphinodithioic acid morpholine salt)

H&E: hematoxiniln és eozin festés  
HAV: egészséges aorta billentyű  
HAV-VICs: egészséges aorta billentyűből származó valvuláris intersticiális sejtek  
Hcy: homocisztein  
HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav  
HRP: tormaperoxidáz  
IHC: immunhisztokémia  
IL-1 $\beta$ : interleukin-1 béta  
LC-MS/MS: folyadékromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria  
MB: metilén kék  
MPST: merkaptó-piruvát szulfur-transzferáz  
mRNA: hírvivő ribonukleinsav  
MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid  
NF- $\kappa$ B: tumor nekrozis faktor alfa  
NNDP: dimetil-p-fenilén-diamin-dihidroklorid  
PBS: foszfáttal-pufferelt sóoldat  
RIPA: radioimmunprecipitációs puffer  
RNS: ribonukleinsav  
RUNX2: runt-related transcription factor 2  
RT-qPCR: valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció  
SDS-PAGE: nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis  
siRNS: kis interferáló ribonukleinsav  
SO: szulfit-oxidáz  
SQR: szulfid-kinon-reduktáz  
STED: Stimulated Emission Depletion  
TCA: triklórecetsav  
TNF- $\alpha$ : tumor nekrozis faktor alfa  
Tris-HCl: Trisz-(hidroximetil)-amino-metán  
TST: tioszulfát szulfur-transzferáz  
ttkg: testtömeg kilogramm  
VEC: valvuláris endotél sejtek  
VICs: valvuláris intersticiális sejtek

# 1. BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet kimutatásai alapján, 2023-ban, világszerte, továbbra is a szív- és érrendszeri megbetegedések a felelősek a legtöbb halálozásért. A betegcsoport kialakulásának hátterében, nagyon gyakran a kardiovaszkuláris kalcifikáció áll. Egy olyan komplex betegségről van szó, amely egyaránt jellemző a nagyerekre, aortákra, arteriolákra és a szívbillentyűkre, és az esetek többségében krónikus veseelégtelenség kíséri.

A valvuláris megbetegedések számos típusát, a szívbillentyűk szöveti mátrixát alkotó sejtek, csontsejteké történő differenciálódása okozza. A folyamat progressziója során a szívbillentyűk megvastagodása, merevsége, elcsontosodása figyelhető meg, melyek következtében részben vagy teljesen megszűnik natív funkciójuk.

A témaválasztásomat az indokolta, hogy a meszesedés patogenezisében szerepet játszó főbb jelátviteli útvonalak még nem teljesen ismertek, ezért fontos, hogy minél részletesebben feltárjuk a betegség mögött álló molekuláris biológiai mechanizmusokat.

A kutatás célja a kalcifikált szívbillentyűkben lezajló gyulladás és mineralizáció közötti kapcsolatok vizsgálata, új szignáltranszdukciós útvonalak azonosítása, a patológiás milió kialakulásáért felelős legfőbb kóroki tényezők gátlása kénhidrogént kibocsátó donor molekulákkal.

A kutatási téma fontosságát az adja, hogy a mortalitási arány ebben a betegcsoportban nagyon magas, és jelenleg nem áll rendelkezésre, a klinikai gyakorlatban alkalmazott orvosi kezelés a betegség progressziójának megállítására, vagy a meszesedés visszafordítására. Jelenleg az egyetlen megoldás, a meszesedett szívbillentyűk helyettesítése, mesterséges pl. bioprosztetikus billentyűkkel. Sajnos az intervenció után 10-15 évvel, a nagy biomechanikai igénybevétel miatt, a betegek többségénél már ismét megfigyelhető a billentyű elégtelenség.

Munkám során olyan szabályozási útvonalat és metabolikus változásokat figyeltem meg a szívbillentyűkben, amelyek a jövőben lehetséges támadási célpontokká válhatnak a kardiovaszkuláris gyógyszerfejlesztés területén.

Hipotéziseim alátámasztására és a kísérletek kivitelezéséhez, egészséges szívbillentyű mintákat gyűjtöttünk a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetéből. A szívbillentyű transzplantáción átesett betegekből származó, kalcifikált biológiai mintákat a Debreceni Egyetem Szívsebészeti Intézete biztosította számunkra.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A valvuláris kalcifikáció

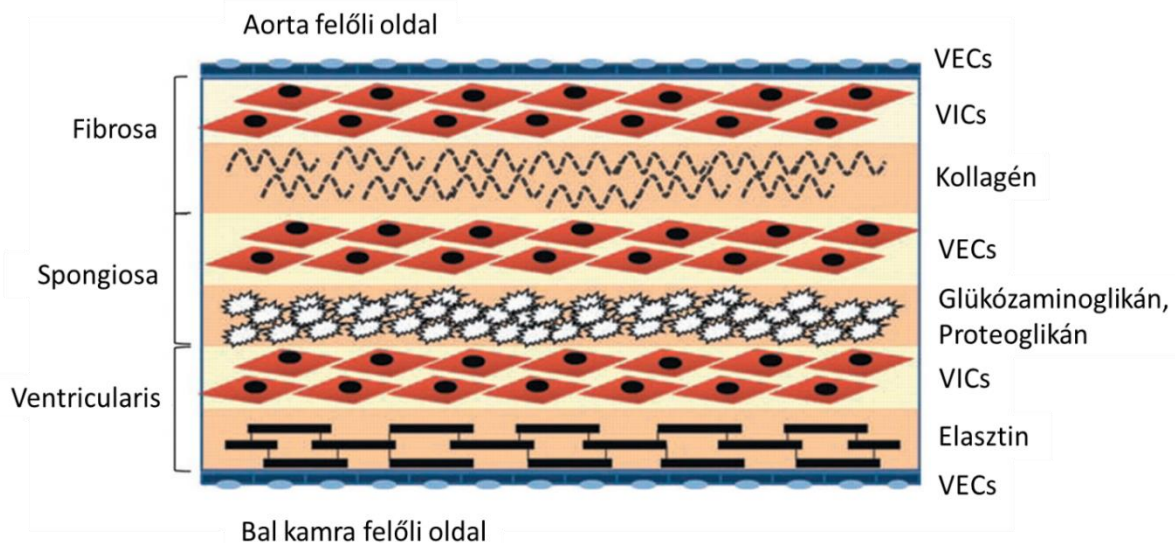
#### 2.1.1 A valvuláris kalcifikáció epidemiológiája és legfőbb rizikó faktorai

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) felmérése alapján, napjainkban a szív- és érrendszeri megbetegedésekben, világszerte több mint félmilliárd ember érintett, és 2023-ban 20,5 millió halálesetért, azaz, a globális mortalitás közel egyharmadáért felelősek (<https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>, <https://world-heart-federation.org/wp-content/uploads/World-Heart-Report-2023.pdf>). A szívbillentyű műtétek leggyakoribb oka a meszes aortabillentyű betegség (CAVD: Calcific Aortic Valve Disease) [1]. A betegség leggyakrabban a 65 év feletti népesség körében fordul elő (2–7%) [2], és gyakori rendellenesség a krónikus veseelégtelenségben (CKD: Chronic Kidney Disease) és a cukorbetegségben szenvedőknél [3]. A CAVD aránya az elmúlt 10 évben nőtt, és a betegség előfordulása a jövőben várhatóan emelkedni fog [4-7]. Egy szimulációs modell előrejelzése alapján, a meszes aortabillentyű betegségben szenvedő idős betegek száma 2050-re több mint kétszeresére fog növekedni, mind az Egyesült Államokban, mind pedig Európában [8]. A rutinszerűen alkalmazható, hatékony, konzervatív terápia hiánya miatt, továbbra is a sebészeti beavatkozás az egyetlen elérhető lehetőség a CAVD kezelésére [9-14]. A betegségnek számos kockázati tényezője van: az életvitelből adódó rizikófaktorok a mozgásszegény életmód, a túlzott foszfátbevitel, a rendszeres alkoholfogyasztás és a dohányzás. Az élettani okok közé tartozik a magas vérnyomás, a túlsúly, az alacsony sűrűségű lipoprotein emelkedett szintje a vérérumban, a diabétesz, az öregedés és a krónikus vesebetegség. A környezeti faktorok között a légszennyezettséget említhetjük. Ezek közül néhány kockázati tényező (pl. genetika, nemi identitás, családi anamnézia) nem módosítható, míg mások (pl. a dohányzás, magas vérnyomás, a csökkent fizikai aktivitás, alkoholfogyasztás) életmódbeli változtatásokkal megelőzhetők (<https://world-heart-federation.org/wp-content/uploads/World-Heart-Report-2023.pdf>).

#### 2.1.2 Az aortabillentyűk anatómiája, szerkezete, működése

A humán aorta billentyű egy rostos szerkezetű gyűrűn keresztül kapcsolódik az aortához, és egy átlagos nap folyamán 100 000-szer nyílik és záródik [1, 15, 16]. Három zsebszerű, félhold alakú, szívbillentyű tasakból áll, amelyek általában 1 mm-nél kisebb vastagságúak, és lehetővé teszik a vér egyirányú, regurgitáció nélküli áramlását a bal kamrából a szisztémás keringésbe [17-19]. Mindegyik tasakra jellemző a trilamináris szerkezet, amely

létfonosságú az aortabillentyű biomechanikai tulajdonságaihoz [15, 20]. Egy normál aortabillentyű szerkezetét, három, szövettanilag különböző réteg, a *fibrosa*, a *spongiosa* és a *ventricularis* alkotják. Legfőképp valvuláris intersticiális sejtek, (VICs: Valve Interstitial Cells) különböző alpopulációiból állnak, és különböző extracelluláris mátrix fehérjéket választanak ki. A *fibrosa* az aorta felőli oldalán helyezkedik el, főleg I-es típusú, nagy szakítószilárdságú, körkörös lefutású kollagénrostokból áll, fibroblasztok, dendritikus sejtek és ritkábban immunsejtek (makrofágok és leukociták) vannak jelen, de nagyobb arányban valvuláris intersticiális sejtek alkotják. Elsősorban a billentyűszerkezet stabilitásáért, rugalmasságáért felelős [21]. A központi réteg, a *spongiosa*, egy laza kötőszövet, glükózaminoglikánokból, proteoglikánokból (biglikán, decorin) és elasztinrostokból épül fel. Fő funkciója a szív ciklus során keletkező mechanikai igénybevétel és nyírófeszültség tompítása, az összenyomhatóság és rugalmasság fenntartása. Kevesebb sejtet tartalmaz. A *ventricularis* a bal kamra felőli oldalán található, ami kollagénben, de főként, sugárirányban elhelyezkedő elasztinrostokban gazdag, amelyek elősegítik a radiális nyíróerők elosztását. Néhány autonóm idegrost és nyirokerekek általában jelen vannak a *ventricularisban*. Az intersticiális sejtek mellett kisebb arányban fibroblasztok és simaizomsejtek is előfordulnak [18, 19, 22]



**1. ábra: Az aortabillentyű celluláris szerkezete.** A billentyű endotél sejtek (VEC) a billentyű külső felületét borítják, és elsősorban gátként működnek a gyulladásos sejtek infiltrációjának és a lipidek felhalmozódásának korlátozásában. Az aortabillentyű 3 középső rétege a *fibrosa*, a *spongiosa* és a *ventricularis*, melyeket elsősorban billentyű intersticiális sejtek (VIC) alkotják. A *fibrosa* a billentyű aorta oldalához van legközelebb, főleg I-es és III-as típusú fibrilláris kollagéneket tartalmaz, és teherviselő funkciót lát el. A *spongiosa* glükózaminoglikánokat és proteoglikánokat tartalmaz, amelyek a *fibrosa* és a *ventricularis* rétegek rugalmasságáért felelősek, mivel azok a szív ciklus során erősen nyíródnak és deformálódnak. A *ventricularis* többségében elasztin rostokat tartalmaz, melyeknek a radiális feszültség csökkentésében van szerepük. (Forrás: Jane A. Leopold, *Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification. Circulation: Cardiovascular Interventions. 2012; 5: 605–614* Átdolgozva: Rajamannan et al.

Az intersticiális sejtek egy heterogén és dinamikus sejtpopulációt alkotnak a szívbillentyűkben, melyek szintetikus, kontraktilis, oszteoblasztos és őssejt fenotípusokat hordoznak. Az embrionális progenitor sejtek aktiválódásuk után qVIC-ké (Quiescent Valve Interstitial Cells) alakulhatnak át. A qVIC-ek az intersticiális sejtek olyan fenotípusai, melyek fenntartják a billentyűk szerkezetét és működését, gátolják az angiogenezist és alfa-simaizomaktin ( $\alpha$ -SMA) negatívak. A pVIC-ek (Precursor Valve Interstitial Cells) olyan prekursor sejtek, amelyek képesek obVIC-é (Osteoblast Valve Interstitial Cells) azaz, oszteoblaszt fenotípusá differenciálódni. Az aVIC-ek (Activated Valve Interstitial Cells), azaz az aktivált VIC-ek a qVIC-ek aktivált fenotípusai, és fontos szerepük van a proliferációban, migrációban és a remodellingben, és  $\alpha$ -SMA pozitívak. Az obVIC-ek (Osteoblast Valve Interstitial Cells) az oszteoblaszt sejtekre jellemző tulajdonságokkal rendelkeznek, részt vesznek a meszesedés, a kondrogenezis és oszteogenezis folyamatában, a csontspecifikus biomarkerek szekréciója révén. A pVIC-ekből vagy az aVIC-ekből származnak [23-26]. Ezek a sejtek eltérő extracelluláris mátrix komponenseket, mátrix remodelling enzimeket, növekedési faktorokat, citokineket és kemokineket szekretálnak [27, 28]. A billentyűkben oszteoprogenitor funkcióval rendelkező sejtpopulációk is megtalálhatóak [29].

A valvuláris endoteliális sejtek (VECs: Valve Endothelial Cells) kívülről, egyrétegben borítják a billentyű felszínét. Az endotél sejtek megakadályozzák a lipid partikulumok felhalmozódását, fenntartják a billentyűk homeosztázisát, fokozzák a permeabilitását, gátolva ezzel a gyulladásos sejtek adhézióját és infiltrációját [18, 19]. Az endotélium számos biológiailag aktív molekulát szabadít fel, amelyek némelyike ellentétes hatással bír a vérkomponensekre és az alatta elhelyezkedő sejtekre [30]. Különböző hemodinamikai és mechanikai környezetnek vannak kitéve, a bal kamra felőli oldalon nagy nyíróerejű, lamináris áramlás, míg az aorta felőli oldalon kisebb nyírófeszültségű, turbulens áramlás hat rájuk. A billentyű endotél sejtjei különböznek az érrendszer endotél sejtjeitől [31]. Valójában a szívbillentyűk két oldalán lévő endotél sejtek génexpressziós mintázata is eltérő, és az aorta felőli oldalon, a meszesedésében szerepet játszó gének nagyobb aktivitást mutatnak [32].

### **2.1.3 A szívbillentyű kalcifikáció patobiológiája**

A kardiovaszkuláris kalcifikáció az egyik leggyakoribb, komplex szívbetegség a fejlett országokban, amely egyaránt jellemző a nagy- és közepes artériákra, az aortákra, a kisebb arteriolákra és a szívbillentyűkre [33-36]. Korábban egy passzív, degeneratív, az öregedéssel együtt járó folyamatként írták le, napjainkra azonban kiderült, hogy egy dinamikus, sejt és molekuláris szinten egyaránt pontosan szabályozott mechanizmusról van szó. Számos, súlyos

klinikai szövődménye lehet pl. bal kamrai hipertrófia, szívelégtelenség, szívinfarktus [37]. Továbbá jellemző az endotél sejtréteg integritásának felszakadása, plazma lipoproteinek akkumulációja, proinflammatorikus sejtek infiltrációja a szövetbe, gyulladást kiváltó citokinek megnövekedett szintje, az oszteogén transzkripciós faktorok aktiválódása, majd ennek következtében a szívbillentyű szövetre nem jellemző, csontspecifikus proteinek megjelenése, hidroxipatit kristályok képződése az extracelluláris mátrixban, melyek heterogén elváltozásokat eredményeznek a szívbillentyűk szövetében [15, 38, 39].

A szisztémás foszfát-kalcium homeosztázis szabályozási zavara, a legtöbb esetben a krónikus vesebetegség, a végstádiumú vesebetegség (ESRD: End-Stage Renal Disease), vagy csontritkulás kialakulásához vezet és szerepet játszik a CAVD felgyorsult progressziójában [40]. A CAVD-ra jellemző a magas morbiditási és mortalitási esetszám. Korábban, az oszteoporózist és a fokozott csontreszorpciós aktivitást is összefüggésbe hozták a CAVD-el, ami szintén arra utal, hogy a kalcium-foszfát anyagcsere rendellenesség, aktívan részt vesz a patogenezisében [41, 42].

A CKD-s betegekben a szív- és érrendszeri kalcifikáció egyik legpotensebb és legfontosabb induktora a szérumban emelkedett foszfát szintje [43]. Régóta ismert tény, hogy a hiperfoszfatémia, mint független kardiovaszkuláris rizikófaktor kapcsolódik a CKD-hez [44, 45]. A sejtekbe történő fokozott foszfátfelvétel, a Pit1 és a Pit2, nátrium-függő foszfát-kotranszporterekén keresztül történik [46, 47], amelyek segítségével a sejtek képesek érzékelni az extracelluláris tér foszfát koncentrációját, és túlzott mértékben expresszálódnak a meszesedő billentyűkben [48-51].

A CAVD-ben a szívbillentyűt alkotó intersticiális sejtek, csontszerű sejtekké alakulnak át, ezáltal jelentősen hozzájárulnak a szövetek mineralizációjához [1, 10]. A vaszkuláris simaizom sejtekre és a VIC-re jellemző specifikus gének, pl.  $\alpha$ -SMA aktivitása csökken [52]. Ezzel párhuzamosan azon gének expressziója fokozódik, amelyek részt vesznek az oszteogenezis és az oszteo-kondrogén folyamatokban pl. RUNX2 (runt-related transcription factor 2) [53]. A csontokban a RUNX2 egy oszteogén transzkripciós faktor, melyet az oszteoblasztok (csontsejtek) képződésének „fő mester regulátorának” tekintenek azáltal, hogy szabályozza a pluripotens mezenchimális őssejtek éretlen oszteoblasztokká, majd érett oszteoblasztokká és végül oszteocitákká történő differenciálódását [54]. Transzlokációja a citoszolból a sejtmagba, elindítja az intersticiális sejtek oszteoblaszt irányú fenotípus váltását, válaszul az olyan patológiás tényezőkre, mint a magas foszfát-tartalom. Így az ektópiás mineralizációban is fontos szerepet játszó regulációs fehérje [55]. A kalcifikáció korai szakaszában, a RUNX2 transzkripciós faktor sejtmagi lokalizációja elősegíti az alkalikus

foszfatáz enzim (ALP: Alkaline phosphatase) aktivitásának fokozódását. Az ALP az ektonukleotidázok családjába tartozó metalloenzim, amely felelős az extracelluláris nukleotidok nukleozidokká történő hidrolizálásáért, ezáltal a mineralizáció fontos szabályozója. Az extracelluláris kalcium depozitumok kialakulását gátló pirofoszfátot hasítja, így fokozza a sejtek inorganikus foszfát felvételét [56-58]. Az ektonukleotidázok kis extracelluláris vezikulákban (EV) szekretálódnak. Az EV-k kettős lipidsréteggel határolt, membrán nélküli partikulumok, melyek ektonukleotidáz aktivitása, elősegíti a szervetlen foszfát termelődését. A vezikulákban lévő megnövekedett foszfát koncentráció fokozza a kalcium-hidroxiapatit kristályok képződését, amely a bioásványok egyik fő formája a CAVD-ben [59].

A mineralizáció későbbi fázisában fokozódik a csontmátrixra jellemző gének aktivitása, melynek következtében a szívbillentyű szöveti struktúrájára nem jellemző, csontspecifikus fehérjék pl. oszteokalcin jelennek meg [60]. Az oszteokalcin egy 49 aminosavból álló polipeptid. A csontállomány második, leggyakoribb nem kollagén eredetű, csont-specifikus kalcium-kötő fehérjéje, nagy affinitással képes a hidroxiapatit kristályokhoz kötődni. Az oszteoblasztok szekretálják, termelődését a D-vitamin stimulálja. Az oszteokalcin K-vitamin függő, gamma karboxilációval, poszttranszlációs úton módosul, ami szükséges a működéséhez. Megemelkedik a csont morfogenetikus fehérjék szintje is [39, 61]. Az CAVD-ben szenvedő betegek sebészileg eltávolított aorta billentyűiben, gyakran figyelhető meg disztrófiás mineralizáció, rendezetlen meszesedési göcökkel [62]. Az explantált minták 15%-ában azonban jól szervezett csontmátrix található, oszteogén metapláziával, amely magában foglalja a lamináris csontot, oszteocitákkal, oszteoblaszt-szerű sejtekkel, csontvelővel és zsírsejtekkel [63].

## **2.2 A szívbillentyűk meszesedése és a gyulladás közötti összefüggések**

A nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) jelátviteli útvonalának indukciója a gyulladás egyik fő mediátora, amely kritikus szerepet játszik a CAVD kialakulásában és progressziójában [64]. A tumornekrózis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) által indukált nukleáris transzlokációja fokozza, a szervetlen foszfát által kiváltott meszesedést a vaszkuláris simaizom sejtekben [65].

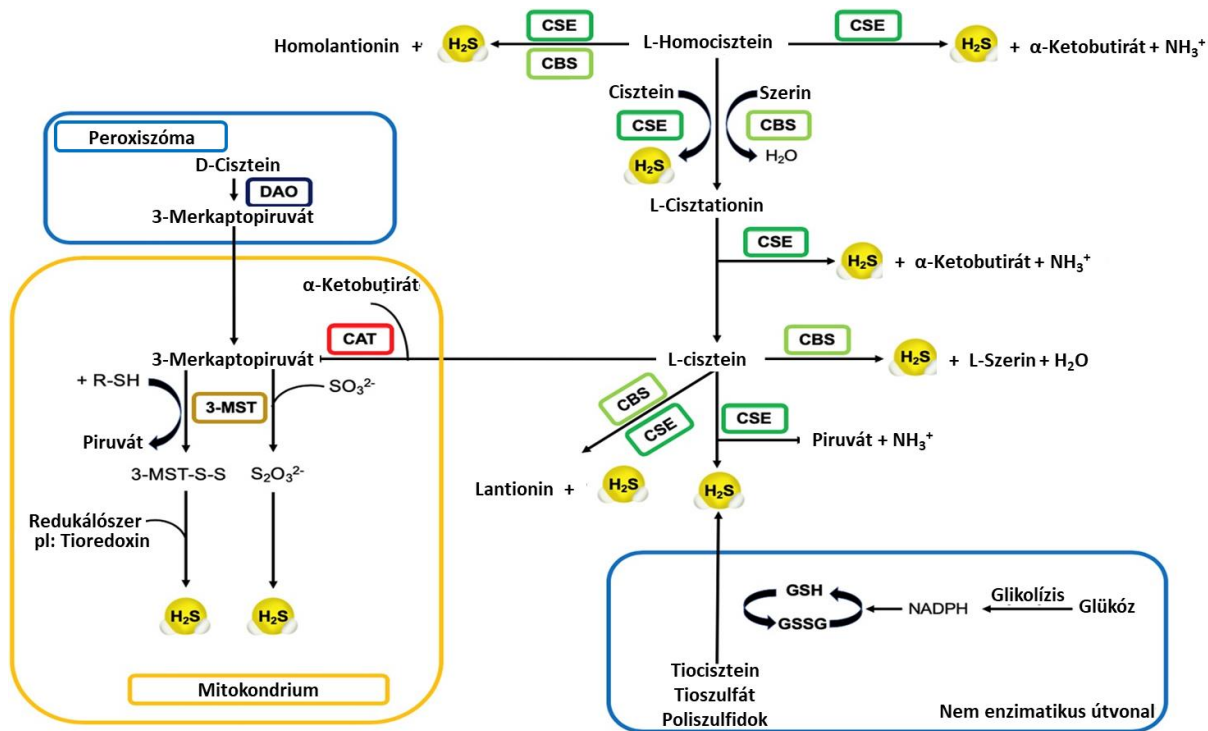
Számos munkacsoport összefoglalta munkájában, hogy a CAVD-ben minden esetben megfigyelhető a mineralizáción kívül, a zsírok felhalmozódása és a gyulladásos területek kialakulása, melyek a szívbillentyű szövetén belül, a kialakult léziók heterogenitását eredményezik. Az aorta billentyű betegségben a gyulladás, egy kritikus faktor a folyamat iniciálódásában [1, 16, 21, 66, 67].

Más kutató laboratóriumok bizonyították, hogy a gyulladás a CAVD egyik legfőbb jellemzője, továbbá a gyulladást előidéző citokinek, mint az interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) és a (TNF- $\alpha$ ) emelkedett expressziója, összefüggésben állnak a betegséggel [68, 69].

Rajamannan és munkatársai igazolták, hogy a CAVD egy olyan aktív, komplex oszteogén folyamat, melynek kialakulásában és progressziójában a gyulladás központi szerepet játszik. Kimutatták, hogy az olyan abnormális hemodinamikai erők, mint a magas vérnyomásból eredő, intenzív nyírófeszültség, a szöveti struktúra átrendeződését és gyulladást okozhatnak. Következésképpen meszesedéshez, sztenózishoz és végül szívbillentyű-elégtelenséghez vezethetnek [1, 10, 70]. Ezen kívül, 285 CAVD-s beteg szívbillentyű szövetéből készült immunhisztokémiai festések elemzése azt mutatta, hogy a minták 28,4%-ban, megfigyelhető a leukociták erőteljes infiltrációja és a TNF- $\alpha$  magas expressziója, melyek a krónikus gyulladásból következnek [69]. Egy másik kutatócsoport bemutatta, hogy az IL-1Ra (interleukin-1 receptor antagonist) hiányos egér modellben kialakult a gyulladással kísért aortabillentyű szűkület, továbbá, hogy a TNF- $\alpha$ -nak fontos szerepe van, a billentyű mineralizációjának patogenezisében [71].

### **2.3 A kénhidrogén endogén bioszintézise**

A kénhidrogént (H<sub>2</sub>S) sokáig egy színtelen, záptojás szagú, illékony, gyúlékony, korrozív, mérgező tulajdonságú gáznak tartották. Az elmúlt évtizedekben, a tudományos technológia fejlődésével, a kutatók felfedezték, hogy az emlősökben, a H<sub>2</sub>S számos fiziológiai és kóros folyamatban vesz részt. Ettől kezdve a tudományos érdeklődés megnőtt a H<sub>2</sub>S gáz transzmitter funkciójának vizsgálata iránt. Manapság a kénhidrogént a nitrogén-monoxidhoz és a szén-monoxidhoz hasonlóan egy új, gáznemű, jelátvivő molekulának tekintik, amely szabadon diffundál a sejtmembránokon. A toxicitásának elsődleges mechanizmusa, hogy szoroson kötődik a mitokondrium IV. komplexének a citokróm c-oxidázban a hem a<sub>3</sub>-as prosztetikus csoporthoz, ezáltal gátolja a mitokondriális légzést, és celluláris hipoxiát okoz. Az szervezetben enzimatis és nem enzimatis reakciók során keletkezhet (2. ábra), vagy a béltraktus mikroflórája állítja elő [72-74].



**2. ábra: Az endogén H<sub>2</sub>S bioszintézis sematikus diagramja.** A cisztationin- $\gamma$ -liáz (CSE) szubsztrátként közvetlenül L-cisztationint használ a kénhidrogén előállításához. A cisztationin- $\beta$ -szintáz (CBS) L-Cisztationint képez szerinből és homociszteinből, és emellett a ciszteinből is képes H<sub>2</sub>S-t előállítani. A ciszteint az  $\alpha$ -ketoglutaráttal együtt a cisztein-aminotranszferáz (CAT) 3-merkaptopiruváttá (3 MP) alakítja. A 3 MP-t ezután 3-merkaptopiruvát-szulfur-transzferáz (3-MST) bontja kénhidrogénné. A 3-MST D-ciszteinből mint szubsztrátból, is képes szulfidot termelni a D-aminosav-oxidáz (DAO) közreműködésével. A tiociszteint, a tioszulfát és a polyszulfidok nem enzimatis úton történő redukciója szintén hozzájárulhat H<sub>2</sub>S képződéshez. (Forrás: Yuehong Wang, Ruihuan Yu, Lingyun Wu, Guangdong Yang, *Hydrogen sulfide signaling in regulation of cell behaviors. Nitric Oxide*. 2020 Oct; **103**: 9-19)

Az emlőssejtekben az endogén kénhidrogén többségét, enzimatis úton, a cisztein metabolizmusának melléktermékeként szintetizálja a cisztationin- $\beta$ -szintáz (CBS), a cisztationin- $\gamma$ -liáz (CSE), a 3-merkaptopiruvát kéntszferáz (3-MST), valamint a cisztein-aminotranszferáz (CAT) [75]. Ezen enzimek expresszióinak eloszlása szövetspecifikus. A CBS elsősorban az idegrendszer, míg a CSE a szív- és érrendszer H<sub>2</sub>S-termelésének kritikus enzime [76]. A 3-MST a CAT-al együtt a neuronokban, a vaszkuláris endotéliumban és a retinában fordul elő nagyobb mennyiségben [77, 78]. Számos tanulmány kimutatta, hogy a H<sub>2</sub>S fontos szerepet játszik olyan patofiziológiai folyamatokban, mint például az oxidatív stressz, a gyulladás, az apoptózis és az angiogenezis. Az elmúlt években egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a H<sub>2</sub>S a szív működés kritikus szabályozója, és védő funkciója van a szívbetegségek patogenezisében [73].

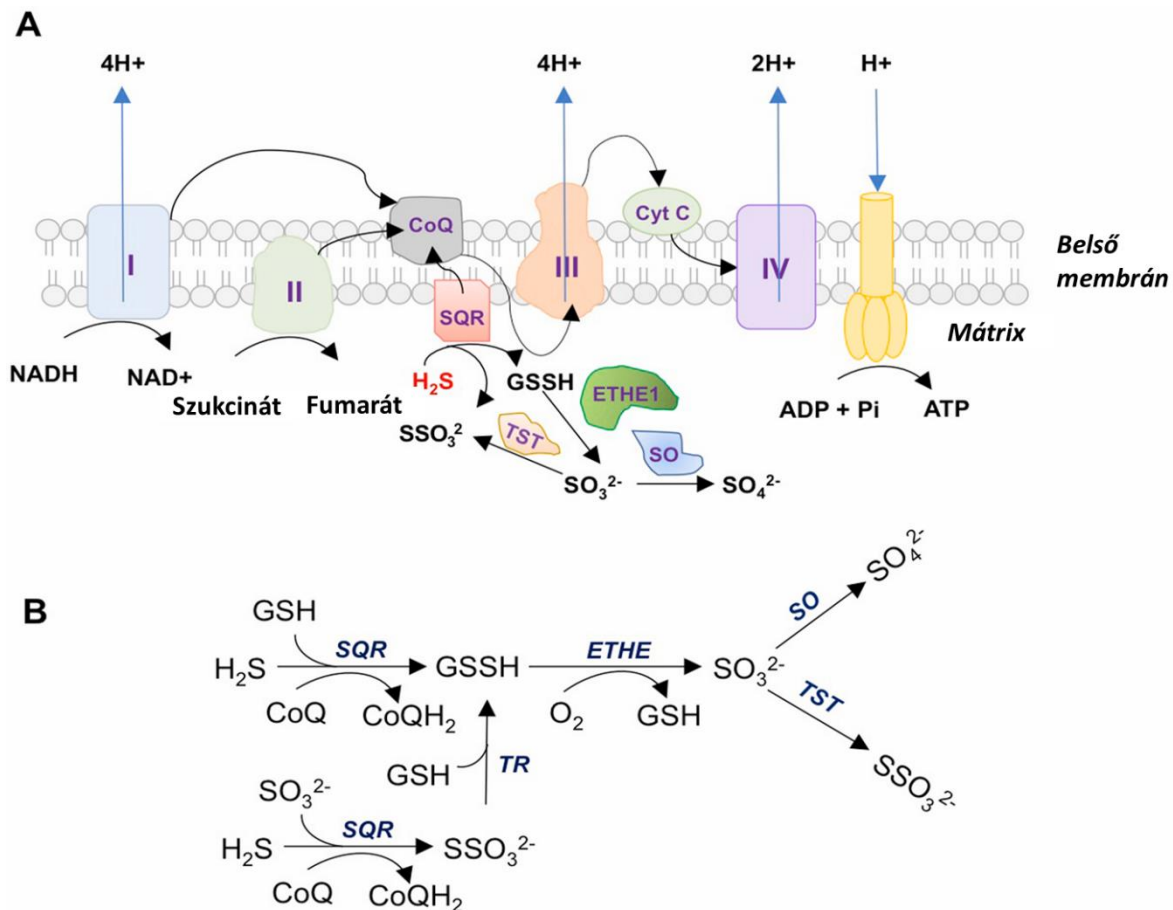
Mind a CBS, mind a CSE piridoxál-5-foszfát (PLP) függő enzimek, a citoszolban találhatóak, és főleg L-ciszteint használnak szubsztrátumként a H<sub>2</sub>S előállításához [73]. A CBS katalizálja a homocisztein (Hcy) és a szerin kondenzációját, hogy cisztationint hozzon létre, de

a Hcy-ből és L-ciszteinből is generálhat kénhidrogént [79]. A CSE katalizálja a cisztationin L-ciszteinné történő átalakulását, majd a Hcy-ből és az L-ciszteinből H<sub>2</sub>S-t termel [80]. A CBS-től és a CSE-től eltérően a 3-MST és a CAT mind a mitokondriumban, mind a citoszolban lokalizálódnak, bár a 3-MST körülbelül kétharmada a mitokondriumokban található [81]. A CAT katalizálja az L-cisztein és az  $\alpha$ -ketoglutarát közötti reakciót, ami 3-merkaptó-piruvátot eredményez, amelyből a 3-MST, H<sub>2</sub>S-t szintetizál [78]. A fenti útvonalakon kívül, Kimura munkacsoportja felfedezett egy új útvonalat, melyen keresztül az emlősök sejtei D-ciszteinből képesek hidrogén-szulfidot előállítani. A D-ciszteint a D-aminosav-oxidáz (DAO) metabolizálja 3MP-á, amely a 3-MST szubsztrátja a H<sub>2</sub>S előállításához. Ez az út csak a vesében és az agyban működik, különösen a kisagyban [82]. A mitokondriális enzimek mindegyikének az expressziós szintje és a katabolikus aktivitása befolyásolhatja a sejtek, szövetek és szervek, kénhidrogén gáznak való kitettségét. A H<sub>2</sub>S felezési ideje nagyon rövid, mivel sorozatosan perszulfiddá, szulfittá, és reverzibilisen tioszulfáttá oxidálódik, ami képes visszaalakulni H<sub>2</sub>S-é, így a sejten belül egy dinamikus egyensúly jön létre a kénhidrogén és a tioszulfát között [73].

A nem enzimátikus útvonal, magában foglalja a gyógynövényekben, például a fokhagymában található kéntartalmú molekulákból [83] vagy a tioszulfátból [84] történő H<sub>2</sub>S-termelést. Hine és munkatársai az emlősökben *in vivo* körülmények között felfedeztek egy másik, nem enzimátikus szulfid-termelő mechanizmust, amelyet a vas és a B6-vitamin katalizál [85].

## 2.4 A kénhidrogén katabolizmusa a mitokondriumban

Az H<sub>2</sub>S intracelluláris szintjét pontosan szabályozza biogenezise és oxidatív katabolizmusa a mitokondriumokban [86]. A kénhidrogén oxidációja, kén tartalmú, mitokondriális enzimek sorozatán keresztül megy végbe: szulfid-kinon-oxidoreduktáz (SQR) [87], perszulfid-dioxigenáz (ETHE1) [88], tioszulfát kéntranszferáz (TST) [89] és szulfit-oxidáz (SO) (3. ábra) [90, 91].



**3. ábra: A H<sub>2</sub>S hatása a mitokondriumokra.** A panel: A mitokondriális elektrontranszport lánc (ETC: Electron Transport Chain) és a H<sub>2</sub>S. Az ETC öt komplexből áll, amelyeket I-től V-ig jelölünk. Az I-es és II-es komplex elektronokat ad a koenzim Q (CoQ)-nak a NADH és a szukcinát oxidációja révén. Az elektronok a citokróm c-n (cytc) keresztül tovább jutnak a III-as komplexhez, majd a IV-es komplexhez (citokróm c-oxidáz). A citokróm c-oxidáz elektronokat ad át az oxigénnek (ami a terminális elektronakceptor, és vízzé redukálódik), miközben protonokat pumpál át a membránon. A proton mozgatóerőt az F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> típusú ATP-szintáz komplex (gyakran V komplexnek nevezik) használja fel az ATP ADP-ből történő képződésének katalizálására. A H<sub>2</sub>S is adhat elektronokat az ETC-nek, hogy stimulálja a mitokondriális bioenergetikát. Az elektronok a koenzim Q (CoQ) oxidációján keresztül vándorolnak, mely reakciót a szulfid-kinon-oxidoreduktáz (SQR) katalizálja, és szulfid (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), szulfát (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) és tiosulfát (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) képződik. B panel: A kénhidrogén oxidációs útja. Az SQR a H<sub>2</sub>S-t elektronakceptoroként használja és SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> vagy glutation (GSH) felhasználásával oxidálja S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>-vé és glutationperszulfiddá (GSSH). A tiosulfát-reduktáz (TR) az S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>-t GSH segítségével GSSH-á alakítja. A mitokondriális mátrixban lévő perszulfid-dioxidáz (ETHE1) a GSSH-t SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-vé oxidálja. A szulfidot a szulfitoxidáz (SO) tovább oxidálja SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-vé. A tiosulfát kén-transzferáz (TST) az SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-t S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>-vé alakítja. Így a H<sub>2</sub>S oxidációjával a mitokondriumokban SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> és S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> képződik. (Forrás: Bindu D. Paul, Solomon H. Snyder, Khosrow Kashfi, *Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. Redox Biology. 2021 Jan; 38: 9-1*)

A H<sub>2</sub>S komplex biológiai szerepét a legjobban az bizonyítja, hogy a szulfid oxidációs út enzimeit fenntartják az elektrontranszport láncot (ETC: Electron Transport Chain) azáltal, hogy elektronokat adnak át mobilis elektronhordozóknak. A SQR katalizálja a mitokondriális szulfid-oxidációs út első és legmeghatározóbb lépését. Egy mitokondriális belső membránhoz rögzített flavoenzim, amely kritikus szerepet játszik a H<sub>2</sub>S-alapú jelátvitelben, miközben az elektrontranszport lánc szabályozásán keresztül védi a mitokondriumot, a toxikusan felhalmozódó kénhidrogénnel szemben. Az SQR a H<sub>2</sub>S kételektronos oxidációja során

redukálja a koenzim Q-t (CoQ: Coenzyme Q). Fiziológias körülmények között az SQR által katalizált reakció elsődleges kén-akceptora a glutation (GSH), amely glutation-perszulfiddá (GSSH) alakul [92]. A GSSH-t ezután egy vas-függő enzim, a perszulfid-dioxigenáz tovább oxidálja, ezáltal szulfitot ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) generál, miközben redukálja a GSH-t [93]. A GSSH emellett a TST kén-transzferáz szubsztrátja is lehet, amely katalizálja a GSSH átalakulását GSH-á és a szulfit tovább oxidálódását tioszulfáttá ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) [89]. Egy alternatív katabolikus útvonalon a szulfitot, az intermembrán térben található, szulfit-oxidáz egy kételektronos reakcióban transzformálja szulfáttá ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), közben a citokróm c-Fe(III) központját vissza redukálja citokróm c-Fe(II)-vé [94]. Így a szulfidoxidációs útvonal elektronjai a mitokondriális komplex III és a komplex IV szintjén lépnek be az elektrontranszfer láncba [95].

A katabolizmus végtermékei, a tioszulfát és a szulfát a vizelettel kiürülnek a szervezetből [96].

## 2.5 A kénhidrogén donor molekulák jellemzői

Az elmúlt évtizedekben a vegyészmérnökök, jelentős erőfeszítéseket tettek a  $\text{H}_2\text{S}$ -t tartalmazó donorok szintetizálására, kutatási és terápiás felhasználás céljából. A molekulákat úgy tervezték, hogy hidrolízissel vagy más kémiai mechanizmussal szulfidot szabadítsanak fel. Kísérleti körülmények között, a kénhidrogén biológiai rendszerekbe történő bejuttatására, számos szerves szulfidsót alkalmaztak, beleértve a nátrium szulfidot ( $\text{Na}_2\text{S}$ -t) és a nátrium-hidrogén-szulfidot ( $\text{NaSH}$ ). Vizes közegben, feloldódáskor, nagyon gyorsan szabadítják fel a szulfidot, amely másodpercek alatt eloszlik. A szerves szulfidsók állatkísérletekben történő felhasználása, gyakran félrevezető eredményekhez vezethet. Az intravénás vagy intraperitoneális injekciók rendkívül magas, helyi  $\text{H}_2\text{S}$ -koncentrációt eredményezhetnek a beadás helyén, ami toxikus hatásokat válthat ki. Azt is meg kell jegyezni, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható szulfidsók általában különböző arányú szennyeződések tartalmazhatnak, ami befolyásolhatja a kísérleti eredményeket. Ezért a szerves szulfidsók - bár alkalmasak *in vitro* kísérletekre - kevésbé előnyösek *in vivo* vizsgálatokhoz [97-99]

Ebből következően, a figyelem, a szintetikus, szerves, a kénhidrogént lassan kibocsátó donor molekulák (például GYY4137) tervezése felé fordult, melyek tartós, akár több órán át tartó  $\text{H}_2\text{S}$  kiáramlást biztosítanak.

Li és munkatársainak sikerült a Lawesson-féle kéntartalmú reagensből (2,4-bis(4-methoxyphenyl) -1,3,2,4-dithiadiphosphetane-2,4-disulfide) és morfolinból egy új generációs, a szulfidot lassan generáló készítményt (GYY4137) előállítani [97]. GYY4137-ből protonálódási reakcióval, további analógokat, például AP67-et [(4-methoxyphenyl) pyrrolidin-

1-ylphosphinodithioc acid] és AP72-t [(4-methoxyphenyl) (piperidin-1-yl) phosphinodithioc acid] lehet előállítani. Ezek a termékek valószínűleg ionizáción mennek keresztül, és fiziológiás pH mellett szolúbilis sókat képeznek [100]. A biológiai rendszerekben, a stabilabb H<sub>2</sub>S-kibocsátó vegyületek, mint például az AP72, rendkívül vízdékonyak, ugyanakkor, a szulfidsóhoz képest, sokkal lassabban engedik ki a hatóanyagot [101-103]. Ezeket a kén tartalmú molekulákat, *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban is használták már, utóbbi esetben intraperitoneálisan juttatták be a szervezetbe [104-106]. A szív- és érrendszeri megbetegedésekben a kén-tartalmú vegyületek, terápiás gyógyszereként való, klinikai alkalmazhatósága, nagymértékben függ a léziók közelében lévő helyspecifikus aktivitásuktól.

Fontos megjegyezni, hogy a donorok koncentrációja nem egyenlő a teljesen felszabaduló szulfid mennyiségével, és minden lassan ható donor molekula, eltérő szulfidleadó potenciállal rendelkezik. Emellett a kutatók egyre inkább felismerik, hogy a kénhidrogént lassan leadó készítmények, valószínűleg jobban utánozzák az endogén kén pufferrendszer hatásait, mivel az oldódásuk sebessége, nem váltja ki a szulfid lokális koncentrációjának meredek emelkedését, ahogy az a szulfidsóknál megfigyelhető [102, 107].

A humán gyógyászatban való alkalmazások egyik problémája, az optimális adagolási mód megválasztása, mivel a vizsgálatok többségében a donorokat intraperitoneálisan alkalmazzák. Továbbá az emberek szív- és érrendszeri megbetegedései krónikusak, az állatkísérletek pedig általában rövid távúak az emberi alkalmazásokhoz képest. Ez szükségessé teszi a kénhidrogén hosszú távú alkalmazásának, emberekre gyakorolt hatásainak kutatását, hogy minél hatékonyabb, helyi koncentrációt találjunk, minimális toxicitás mellett. A probléma megoldása lehet a donor vegyületek szerv- vagy szövetspecifikus módon történő adagolása.

Azonban, intracelluláris szinten a hatékony dózisok, a donorok célpontjaitól függenek. Különösen a mitokondriumot célzó donoroknak, mint az AP39-nek 3 nagyságrenddel kevesebb beadott koncentrációra van szüksége ( $10^{-8}$  mol/L) a kedvező hatás eléréséhez, mint a citoszolban kibocsátó AP72-nek ( $10^{-5}$  mol/L). Fontos megjegyezni, hogy minden kísérleti molekulának, specifikus és szűk terápiás tartománya van, ami az alkalmazott dózisok beállításától is függ.

Az ilyen koncentrációk túllépése nemcsak a hatás elvesztéséhez, hanem toxicitáshoz is vezethet [108].

## 2.6 A kénhidrogén terápiás alkalmazásának lehetőségei a szív- és érrendszeri megbetegedésekben

A H<sub>2</sub>S magas szintje toxikus a biológiai rendszerekben, ugyanakkor az alacsony koncentrációjáról bebizonyosodott, hogy fontos sejtvédő folyamatokat közvetít [109, 110].

A kénhidrogénnek számos lehetséges funkciója van a fiziológiás és a kóros állapotokban, beleértve a CAVD-t is. Nagyon sok élettani folyamatot szabályoz, melyek fontosak az érrendszer homeosztázisának fenntartásában, például, az oxigénérzékelést [111], a gyulladást, az immunmodulációt [112, 113] és az oxidatív stressz elleni védelmet [114]. Ugyanakkor, a legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a csökkent H<sub>2</sub>S termelés és szöveti koncentrációja, elősegíti az érrendszeri rendellenességek kialakulását, például az érlemezésedést, az oxidatív stresszt [115] és a krónikus gyulladásokat [116].

Korábbi vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy a H<sub>2</sub>S gátolja a vaszkuláris simaizomsejtek [117] és a szívbillentyű intersticiális sejtek oszteoblaszt irányú transzdifferentiálódását, és ApoE<sup>-/-</sup> hiányos egerekben is megszünteti az aorta billentyűk meszesedését. Továbbá megfigyeltük, hogy a H<sub>2</sub>S koncentrációja csökkent a CAVD-ben szenvedő betegek billentyűszövetében. Azonosítottunk három különböző, meszesedést gátló útvonalat, melyeken keresztül a kénhidrogén kifejti hatását: a, korlátozza a szervetlen foszfát felvételét a sejtekbe, b, megakadályozza a RUNX2 sejtmagba történő transzlokációját, c, növeli a mineralizációt gátló pirofoszfát szintjét.[118].

Állatmodellben és *in vitro* kísérletekben, az endogén kénhidrogén szintézis transzszulfurációs enzimeinek (CSE és CBS) géncsendesítésével fokozódik a szív- és érrendszert érintő meszesedés [119].

CSE-deficiens egerekben, az endogén H<sub>2</sub>S képződés csökkenése elősegíti az atheróma képződést, amit az exogén NaSH kezelés kompenzál [120]. Ezen kívül, a CSE szabályozza az áramlástól függő, vaszkuláris remodellinget, az érrendszer predilekciós régióiban [121]. Humán vizsgálatok során azt találták, hogy az érrendszeri betegségben szenvedők vérmintáiban, szignifikánsan alacsonyabb volt a keringő szulfid koncentrációja, az egészséges kontrollokhoz képest [121, 122]. Továbbá, az is bizonyított, hogy az alacsonyabb H<sub>2</sub>S-szintekkel rendelkező betegeknél, a revaszkularizációs műtétet követő 36 hónapon belül, a halálozás valószínűsége jelentősen megnőtt [123].

Számos betegség társul a mitokondriális funkciók károsodásával. A mitokondriumot célzó H<sub>2</sub>S donor, az AP39 egy olyan farmakológiai készítmény, melyet elsősorban a mitokondrium fiziológiájának tanulmányozására fejlesztettek ki, és a különböző sejt típusokban

javította a mitokondriális bioenergetikát. Ugyanakkor, képes megakadályozni a reaktív oxigéngyökök képződését, és megőrzi a mitokondriális membránok integritását [124-126]. Szívtranszplantáció során, igazolták, hogy az AP39 megvédte a szívműködést az ischaemiás-reperfúziós sérüléstől [127], és hasonló hatással volt a vesegraftokra is [128]. Így ez a készítmény, nagyon ígéretesnek tűnik, a mitokondriális funkció zavarával járó betegségek kezelésében.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a kénhidrogén gátolja a szívbillentyűk meszesedését, ezért megvizsgáltuk, hogy a gyulladásban is van-e hasonló hatása.
2. Vizsgálatainknak egy másik célja volt, hogy feltárjuk a kalcifikáció és a gyulladás közötti összefüggéseket.
3. Megfigyeltük, hogy a H<sub>2</sub>S gyulladáscsökkentő hatáson keresztül, lassítja-e az aorta billentyűk meszesedésének progresszióját.
4. Hipotéziseink igazolására *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* kísérleteket terveztünk, szulfidot felszabadító donor molekulák alkalmazásával.
5. Szakirodalmi adatok hiányában, diagnosztikát terveztünk a biológiailag hozzáférhető kénhidrogén, fizioiógias koncentrációjának vizálgatára egészséges és kalcifikált szívbillentyűkben.
6. Tanulmányunk célja volt, hogy felmérje a humán egészséges és meszes aortabillentyűkből származó intersticiális sejtek választát meszesedő környezetben, proinflammatorikus citokinek jelenlétében.
7. Célunk volt bemutatni, a H<sub>2</sub>S-szint szabályozását egészséges és CAVD-betegk aortabillentyűiben.
8. Vizsgáltuk az egészséges és meszes szívbillentyűkben végbemenő metabolikus változásokat.
9. Feltételeztük, hogy a kontrol és a kalcifikált szívbillentyűkben, a kénhidrogén szint változása összefügg a mitokondriumban lezajló katabolizmusával, ezért elemeztük az oxidációjában kulcsszerepet játszó enzimek expresszióját.
10. Az AP39 egy specifikus, a mitokondriumot célzó szulfid donor, amely javítja a beteg sejtekben a mitokondrium bioenergetikáját. Megnéztük, hogy a korábban vizsgált kénhidrogén vegyületekhez hasonlóan van-e antiinflammatorikus és anti-kalcifikációs hatása.
11. Az AP39 egy lassú felezési idejű molekula, ezért célunk volt összehasonlítani a hatását, a H<sub>2</sub>S-t gyorsan kibocsátó donorral.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 A kísérletek során használt vegyszerek és reagensek

Valamennyi vegyszer analitikai reagens vagy annál jobb minőségű, és a Sigma-Aldrich-től (St Louis, MO, USA) szereztük be, kivéve azokat, amelyeknél külön feltüntettük a forgalmazó nevét. A  $\beta$ -(4-hidroxi-fenil) -etil-jód-acetamidot (HPE-IAM) a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) vásároltuk. A kísérleteinkben használt szulfid donor molekulákat - az AP39 [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl) phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide] és az AP72 (4 methoxyphenyl) (piperidin-1-yl) phosphinodithioc acid) - Matthew Whiteman és munkacsoportja szintetizálták laboratóriumunk számára [97, 100, 107]. A szulfid törzsoldatokat a kezelések előtt frissen készítettük fiziológiás sóoldatban.

### 4.2 Humán szövetminták feldolgozása, sejtek izolálása, tenyésztése

A humán, beteg aortabillentyűket (CAV: Calcific Aortic Valves) 2018 augusztusa és 2021 májusa között (58 beteg) az Egészségügyi Tudományos Tanács Regionális Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB), 61538-2/2017/EKU és 5643-2021 számú engedélyével gyűjtöttük olyan betegek műtéti mintáiból, akiknél súlyos szűkülettel járó CAVD-t diagnosztizáltak, ezért teljes aortabillentyű transzplantáción estek át. A Helszinki Nyilatkozat alapján a betegek műtét előtt, a szóbeli tájékoztatást követően, beleegyező nyilatkozatot írtak alá, melyben hozzájárulnak az eltávolított szerv kutatási célból történő felhasználásához. A mintákat az operációt követően, steril PBS (Phosphate-buffered saline) oldatban, a Debreceni Egyetem Szívsebészeti Intézetétől kaptuk. Az egészséges aortabillentyűket (HAV: Healthy Aortic Valves) a rendelkezésünkre álló információk alapján szív- és érrendszeri megbetegedésben nem szenvedett, öngyilkos vagy traumatikus események következtében elhunytak holttestéből (N=5) szereztük be a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetének közreműködésével, a ETT-TUKEB, 5038-2018 sorszámú kiadott engedélyével. A VIC-eket a szívbillentyűk szövetéből kettes típusú kollagenáz ( $600 \text{ U/mL}^{-1}$ ) (Worthington Biochemical Corporation) enzim alkalmazásával izoláltuk. A minták enzimes emésztését  $37^\circ\text{C}$ -on, 45 percig, sejtenyészítő inkubátorban végeztük. Ezt követően a sejtszuspenziót sejtenyészítő flaskába pipettáztuk, majd másnap a le nem tapadt sejteket lemostuk, és friss tápfolyadékban növesztettük tovább. Minden kísérletünket 5 különböző donortól származó sejtekkel végeztük. Az izoláláshoz és a kezelésekhez magas glükózkoncentrációjú ( $4,5 \text{ g/L}$  D-glükóz) növekedési médiumot (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium) használtunk,

melyet a kísérleti körülményektől függően 10% arányban foetális borjúszérummal (FBS: Fetal bovine serum, Life Technologies, Vienna, Austria), 100 U/mL penicillinnel, 100 U/mL streptomycinnel, továbbá L-glutaminnal és nátrium piruváttal egészítettünk ki. A sejteket 90%-os konfluencia elérése után, 2-es passzáznál kezeltük. A szakirodalomból ismert tény, hogy a fenolok nagy mennyiségű kénhidrogént képesek abszorbeálni a folyadékokból [129], ezért a szulfidos kísérleteinket, fenolvörös indikátortól mentes tápközegben végeztük.

### 4.3 Az állatkísérletek kivitelezése

Az állatokon elvégzett módszerek összhangban voltak az emberi kísérletekkel foglalkozó felelős bizottságok (intézményi és nemzeti) etikai normáival és a 2008-ban felülvizsgált 1975-ös Helsinkai Nyilatkozattal. A jelen tanulmányban elvégzett állatkísérleteket az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága a DE MÁB/157–5/2010 nyilvántartási számon hagyta jóvá, követve az állatok gondozására és felhasználására (beleértve a halászatot is) vonatkozó Intézményi és Országos Irányelveket. A C57BL/6 ApoE<sup>-/-</sup> egereket a Charles River Laboratories International Inc. cégtől vásároltuk, és a Debreceni Egyetemen speciális, szabályozott hőmérsékletű (24 °C), kórokozómentes körülmények között tartottuk, az Intézményi Etikai Bizottság irányelveinek megfelelően. Az egereket véletlenszerűen négy csoportra osztottuk. Az első csoport (N=7) nem zsírdús eledelt kapott. A második csoportba tartozó egerek (N=7) standard diétáját, 8 hetes koruktól lecseréltük atherogén diétára (15% zsír, 1,25% koleszterin, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország), ezáltal indukáltuk az aortabillentyű gyulladást és/vagy a meszesedést. Az atherogén diétával párhuzamosan a harmadik csoport állatait intraperitoneálisan AP72-vel (266 mmol/testtömeg kilogramm (ttkg); N = 7), míg a negyedik csoportba került kísérleti állatokat foszfáttal puffereelt sóoldattal oltottuk, minden második napon. 8 héten keresztül, minden második héten, az összes csoportból néhány egyed felhasználtunk, a gyulladással kapcsolatos folyamatok *in vivo* időbeni modellezése céljából. A mintákat -70 °C-on tároltuk. A szívbillentyűket és más létfontosságú szerveket (szív, máj, vese, lép, tüdő, aorta), a 8 hetes kezelés után kikapartuk és fagyasztás után, -70 °C-on tároltuk. Minden állatot lassan emelkedő, szabályozható, tömörített CO<sub>2</sub> inhalációs módszerrel altattunk el. A beavatkozások alkalmával, fájdalmat, stresszt nem okoztunk az állatoknak. Az általunk használt dózisok, nem eredményeztek pusztulást a kísérleti egyedek között. Az atherogén táplálék összetétele: nyers tápanyagok (%): nyersfehérje 19%; nyers zsír 15,2%; nyersrost 3,4%; nyershamu 6,3%; keményítő 25,6%; cukor 11,2%; adalékanyagok (kilogrammonként): A-vitamin 15 000 NE; D3-vitamin 1000 NE; E-vitamin 110 mg; K3-vitamin 5 mg; C-vitamin 0 mg; réz 13 mg.

#### 4.4 Egér aortabillentyűk *ex vivo* kezelése

A billentyűk preparálása során ügyeltünk a steril körülmények biztosítására. A minták tenyésztéséhez szükséges eszközök és reagensek is sterilek voltak. A tápfolyadékot felhasználás előtt 37 °C-os vízfürdőben felmelegítettük. A billentyű szövetét alaposan lemostuk PBS-el. Mivel egy egér aorta billentyűje sokkal kisebb, mint az emberé, egy orvosi szike segítségével, csak 4 egyforma méretű darabkára tudtuk szeletelni. Ezt követően, a kis részeket 24 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, melyet előzőleg 0,2%-os zselatinnal vontunk be. Így elkerültük a szövet darabkák idő előtti felúszását a tenyésztő médiumban. A szövettenyésztéshez DMEM magas glükóz tartalmú, fenol vörös indikátort nem tartalmazó tápfolyadékot használtunk, kiegészítve 15% FBS-el. A szöveti fragmenteket tartalmazó tenyésztőedényeket a billentyűk explantációja után, sejttenyésztő inkubátorba (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) helyeztük. A médiumot 3 naponta cseréltük, és 2 hét elteltével elvégeztük a kísérleteket. A szövet darabkák kezelése ugyanúgy történt, mint a sejttenyésztetek esetében. A humán mintákat 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 20 µmol/L AP72-vel kezeltük és kétnaponta cseréltük a kezelőoldatokat.

#### 4.5 A kalcifikáció indukálása, kalciummérés, Alizarin Red S festés

A VIC-eket 80%-os konfluencia elérésekor, 12 lyukú tenyésztőedényben növesztettük és kezeltük 5 napig, fenolvörös indikátort nem tartalmazó, magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban kiegészítve 2,5 mmol/L szervetlen foszfáttal (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oldat) és 1,8 mmol/L kalcium-kloriddal (CaCl<sub>2</sub>). Egyes kísérletekben a kezelése során a kalcifikáló tápközeget kiegészítettük 10 µmol/L AP72-vel vagy 5 nmol/L AP39-el, gyulladást kiváltó 10 nmol/L TNF-α vagy IL-1β citokinekkal. Az általunk alkalmazott foszfát- és kalcium koncentrációk megfelelően modellezik a CAVD betegek vérmintáiban mérhető szinteket. Az időfüggő kísérleteknél a tenyésztés első napját a 0. napnak tekintettük. Az 5. nap után a sejteket kétszer mostuk foszfát tartalmú sóoldattal (PBS, pH 7.4), majd 0,6 mol/L sósav oldattal dekalcifikáltuk. Ezt követően a sejteket 10 mmol/L-es koncentrációjú Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (Tris-HCl), 5 mmol/L-es koncentrációjú EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 150 mmol/L-es koncentrációjú nátrium-klorid (NaCl; pH 7,2), 1 % Triton X-100, 0,5 % Nonidet P-40 és proteáz gátló (Complete Mini, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) tartalmú lízispufferrel szolubilizáltuk, majd a minták fehérjetartalmát, BCA (Bicinchoninic Acid: bicinkoninsav) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, United States) használatával, spektrofotometriás módszerrel mértük meg. A módszer

lényege, hogy a fehérjék lúgos közegben redukálják a  $\text{Cu}^{2+}$  ionokat  $\text{Cu}^+$  ionokká. A bicinkoninsav egy nagyon specifikus kromogén reagens, mely a  $\text{Cu}^+$  ionokkal lila színű komplexet képez és abszorpciós maximuma 562 nm-en van [130]. A vizsgált fehérje koncentrációja arányos az abszorbanciával. Az összegyűjtött felülúszók kalciumtartalmát kvantitatív, kolorimetriás módszerrel (QuantiChrom Calcium Assay Kit, Gentaur; 65-DICA-500); Brussels, Belgium) határoztuk meg, és a minták fehérjetartalmára normalizáltuk. A kit-ben található egy fenolszulfonftalein festék, amely nagyon stabil kék színű komplexet képez, elsősorban a szabad kalciummal. A komplex jellegzetes elnyelési maximummal rendelkezik 612 nm-en, melynek intenzitása egyenesen arányos a mintában lévő kalcium koncentrációval. A kit használata minimálisra csökkenti az olyan anyagok által okozott interferenciát, mint a lipidek, fehérjék és egyéb ásványi elemek. Az eredményeket  $\mu\text{g}$  kalcium/mg fehérje formában ábrázoltuk.

Az extracelluláris kalcium depozitumok kvalitatív meghatározására, az Alizarin Red S festés az egyik legelterjedtebb metodika. A kísérletek lejárta után, a PBS-el történt mosást követően, szobahőmérsékleten, 10 percig 3,7%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk a sejteket. A fixálás után ismét PBS-el történt mosás következett, majd a kalcium kristályokat, 2%-os Alizarin Red S oldattal festettük, 10 percig, szobahőmérsékleten. A feleslegben maradt festőoldatot, 3 egymást követő, desztillált vizes mosással távolítottuk el. A megfestett sejteket Leica DMIL LED sztereó mikroszkóppal, Leica DMC4500 kamerával, Leica LAS szoftverrel 4.9.0 és 10x-es nagyítás alkalmazásával tettük láthatóvá. Minden egyes kísérleti csoportból 5-5 db képet készítettünk. A meszesedett (vörös színű) régiókat ImageJ szoftverrel értékeltük ki. A program alkalmazásával, a színeket elválasztottuk egymástól, és csak a vörös árnyalatot tartalmazó képeket hagytuk meg. Végül meghatároztuk a vörös színre vonatkozó, pixel denzitás értékeket, és grafikonon ábrázoltuk.

#### **4.6 Alkalikus foszfatáz enzim kimutatása**

Az alkalikus foszfatáz enzim láthatóvá tételére, 12 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük és kezeltük a sejteket 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve gyulladást kiváltó, 10 nmol/L TNF- $\alpha$  vagy IL-1 $\beta$  citokinekkal, majd a kísérlet lejárta után, kétszer PBS-el mostuk őket. A festéshez szükséges citrát törzsoldat desztillált vízzel történt 1:50 arányú hígításával citrát oldatot készítettünk, amelyet acetonnal 2:3 arányban elegyítettünk. A citrát-acetonos eleggyel 1 percig fixáltuk a sejteket, majd gyorsan, legalább 3 alkalommal mostuk őket

desztillált vízzel. A festőoldatot Naphtanol AS-MX – Fast Violet B 1:24 arányú hígításával készítettük. A keverék halványsárga színű, és fényérzékeny. A festés során a sejteket szobahőmérsékleten, sötétben, 30 percig inkubáltuk a festőoldattal, majd kétszer alaposan mostuk őket. Az eredmény vizualizálására Leica DMIL LED mikroszkópot, Leica DMC4500 kamerát és a Leica LAS Software 4.9.0 verzióját használtuk. A meszesedett régiókban a fokozott enzim expresszió lilás színű festődést mutatott, amit 10x nagyítású fényképek készítésével dokumentáltunk. A fotókat ImageJ szoftverrel elemeztük ki a fentebb leírt módon, és a lila színre vonatkozó pixel denzitás értékeket ábrázoltuk.

#### **4.7 Gyulladás indukálása humán egészséges és meszes aorta szívbillentyűből származó VIC-ben**

Humán egészséges aortabillentyűből (HAV-VIC) és meszesedett aortabillentyűből származó intersticiális sejteket (CAV-VIC) 6, 12 és 24 lyukú tenyésztőedényekben tenyésztettük és kezeltük, 5 napig magas glükózkoncentrációjú, fenolvörös indikátortól mentes növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 10 nmol/L TNF- $\alpha$  vagy IL-1 $\beta$  gyulladást kiváltó citokinekkal.

#### **4.8 RNS izolálás és a valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) kivitelezése**

A VIC-eket 12 lyukú tenyésztőedényben növesztettük és kezeltük 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 5 nmol/L AP39-el. A kísérlet végén a PBS-el történt mosást követően, RNA STAT-60 alkalmazásával, a gyártó által mellékelt használati útmutató szerint (TEL-TEST Inc., Friendswood, TX, USA) izoláltuk a sejtek teljes RNS tartalmát. Az egyes minták RNS-koncentrációját és a tisztaságát 260 és 280 nm-en kapott abszorbanciájuk arányából, NanoDrop<sup>TM</sup> 2000c spektrofotométerrel (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) határoztuk meg. Ezt követően, mintánként 1  $\mu$ g teljes RNS-ből kiindulva, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) használatával, reverz transzkripcióval komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk. A cDNS-ből, kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) számszerűsítettük a célgének mRNS (messenger RNS) szintjét, melyhez az alábbi TaqMan Gene Expression Assay-eket alkalmaztuk: TNF- $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific Inc.; HS00174128) az IL-1 $\beta$  (Thermo Fisher Scientific Inc.; HS0155410) és a GAPDH (Thermo Fisher Scientific Inc.; HS91758989128). A reakcióhoz szükséges TaqMan Universal PCR Master Mixet az Applied Biosystems (Foster City, CA) cégtől vásároltuk. Az RT-qPCR kivitelezéséhez a mintákat egyedi, 96 lyukú PCR plate-ra vittük

fel az alábbi reakcióelegyben: 10  $\mu$ l TaqMan Universal PCR Master Mixe, 1  $\mu$ l a célgénre specifikus, fluoreszcensen jelölt TaqMan Gene Expression Assay, 2  $\mu$ l cDNS minta és 7  $\mu$ l pirogén mentes víz. A futtatásokat Bio-Rad CFX96 detektáló rendszerrel végeztük. A vizsgált gének expressziójának értékeit, a GAPDH expressziójára normalizáltuk és az eredményeket diagramon ábrázoltuk.

#### 4.9 Fehérjék analízise Western blot technikával

A VIC-et 6 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük és kezeltük, 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 10  $\mu$ mol/L AP72-vel vagy 5 nmol/L AP39-el vagy gyulladást kiváltó, 10 nmol/L TNF- $\alpha$  vagy IL-1 $\beta$  citokinekkal. A kísérletek lejárta után PBS-ben történt mosást követően, szolubilizáltuk és meghatároztuk a minták fehérjetartalmát a fentebb leírt módon. A kísérletek végén citoplazma és sejtmag frakciót, vagy teljes sejtlizátumot használtunk a vizsgálatokhoz. A lizátumokat centrifugáltuk 10 percig, 12000 rpm-el, majd  $\beta$ -merkaptóetanolt tartalmazó nátrium dodecil szulfát (SDS) oldatban, 95 °C-on, 10 percig denaturáltuk. Mindegyik mintából legalább 10 vagy 20  $\mu$ g proteint vittünk fel 10%-os nátrium dodecil szulfát-poliakrilamid gélre (SDS-PAGE). A humán egészséges és kalcifikált szövetekből közelítőleg 10-15 mm nagyságú darabokat metszettünk le, majd folyékony nitrogén alatt, dörzsmozsárban elporítottuk. A gélelektroforézishez ebben az esetben 40  $\mu$ g fehérjemintát használtunk. A futtatás 100 V feszültséggel történt. Ezt követően a gélbe került fehérjéket, 0,45  $\mu$ m pórus méretű nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A blottolást 100 V feszültséggel, 75 percig végeztük. A következő lépésben, legalább kétszer, óvatosan mostuk a membránokat TBS-T (0,1% Tween-20-al kiegészített Tris pufferelt sóoldat) mosópufferben. A blokkolás során a nem specifikus antitest kötőhelyek elfedéséhez, 6%-os tejporban, 4°C-on, 1 órán át, egy billegtetőn inkubáltuk a membránokat. Az blokkolás után ismét TBS-T-vel történt mosás következett. A mosás után a membránokat, 16 órán át, 4 °C-on, billegtetőn az alábbi elsődleges antitestekkel inkubáltuk: anti-humán TNF- $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific; PA5-19810; 400 ng/mL), anti-humán IL-1 $\beta$  (Invitrogen; 17 h18116; 400 ng/mL), anti-humán ALP (Abcam; ab65834; 1000 ng/mL), anti-humán CSE (Proteintech Group; 12217-1-AP; 1000 ng/mL), anti-humán SO (Thermo Fisher Scientific; PA5-21705; 1 mg/mL), anti-humán ETHE1 (Thermo Fisher Scientific; PA5-56040; 0,30 mg/mL), anti-humán SQR (Proteintech Group; 17256-1-AP; 550  $\mu$ g/mL), anti-humán TST (Abcam; ab166625; 0,08 mg/mL), anti-humán CBS (Proteintech Group; 14787-1-AP; 700  $\mu$ g/mL), anti-humán RUNX2 (Proteintech; 20700-1-AP; 60 ng/mL) nyúlban termeltetett anti-humán NF- $\kappa$ B (Cell Signaling Technology; D14E12; 400 ng/mL). Az antitesteket 1%-os

tejporban, 1:500 arányban hígítottuk. A 16 óra eltelte után a membránokat alaposan átmostuk TBS-T oldattal. Ezt követően 1 órán keresztül, billegtetően, 4 °C-on, torma peroxidázzal (HRP: Horseradish peroxidase) konjugált anti-nyúl (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA, NA934, 1:15000 hígításban) vagy anti-egér (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA, NA931, 1:15000 hígításban) IgG másodlagos antitesteket használtunk a membránok inkubálására. Az 1 óra lejártá után, a membránokat 3-szor 10 percen át mostuk TBS-T-vel. A kialakult antigén-antitest komplexeket torma-peroxidáz kemilumineszcenciás detektáló rendszerrel (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA; RPN2109) sötét szobában, röntgen filmen tettük láthatóvá. A jelek előhívása után a membránokról eltávolítottuk a korábban bekötődött antitesteket és ismét 6%-os tejpor oldatban blokkoltuk, majd anti-humán gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz antitesttel (GAPDH) (Cat no. N13300-221, Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO, USA) 1:1000 hígításban inkubáltuk. A másodlagos antitestet ebben az esetben is 1:15000 hígításban használtuk. Az eredmények láthatóvá tétele a fentebb említett módon történt. A GAPDH, mint háztartási fehérje előhívásával, igazoltuk, hogy minden egyes mintából, egységes fehérjemennyiséget vittünk fel az SDS-PAGE gélekre a futtatás során. Az előhívott röntgen filmeket a szkennelés után ImageJ Fiji szoftver alkalmazásával, minden esetben denzitometráltuk és a kapott értékeket a GAPDH denzitási értékeire normalizáltuk. A sejtmagi frakciók vizsgálatánál, háztartási fehérjeként a Lamin B1 (Proteintech, 12987-I-AP; 55µg/150µL) antitestet használtuk és a normalizálásokat is erre végeztük. A kapott relatív denzitási eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

#### **4.10 Immunfluoreszcens festés**

A VIC-et 24 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, 12 mm átmérőjű fedőlemezekben tenyésztettük, 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 20 µmol/L AP72-vel vagy 5 nmol/L AP39-el. A kénhidrogént kibocsátó donor molekulákkal történő kezeléseknél, minden esetben fenolvörös indikátortól mentes tápfolyadékot használtunk. A festési protokoll minden egyes lépése között, legalább háromszor PBS-el mostuk a korongokat. A kezelési idő letelte után a sejteket, a háromszori mosást követően 3,7%-os formalinnal, szobahőmérsékleten, 15 percig fixáltuk. A következő lépésben 0,3%-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk a sejteket, így fokoztuk a membránok átjárhatóságát az antitestek számára. Az aspecifikus kötőhelyek lefedése miatt, a permeabilizálás után szobahőmérsékleten, 1 órán át, 10%-os kecskeszérummal blokkoltuk a korongokat. A blokkolást követően, elsődleges antitestként, 1:500 hígításban, egérben termeltetett anti-humán TNF- $\alpha$ -t (Santa Cruz; sc-52746; 100 µg/mL) és nyúlban termeltetett

anti-humán IL-1 $\beta$ -t (Invitrogen; 17h18116; 400 ng/mL) használtuk a VIC-ben expresszáldó TNF- $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  kimutatására. A TNF- $\alpha$  antitestet kecskében termeltetett anti-egér Alexa Fluor 488 fluoroforral jelölt IGg antitesttel (Thermo Fisher Scientific; A11004), az IL-1 $\beta$ -t pedig kecskében termeltetett anti-nyúl Alexa Fluor 488 fluoroforral kojugált IGg antitesttel (Thermo Fisher Scientific; A11070 sötétben) tettük láthatóvá. Minden másodlagos antitestet 1:500 hígításban használtunk, és a fedőlemezeket szobahőmérsékleten, 1 órán át, sötétben, billegtetőn inkubáltuk. A hidroxipatit kristályokat IVISense Osteo 680 fluoreszcens próbával (OsteoSense; PerkinElmer; NEV10020EX) festettük. A sejtmagok megfestését Hoechst 33258-al végeztük. Az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor nukleáris transzlokációjának feltérképezésére, elsődleges antitestként nyúlban termeltetett anti-humán NF- $\kappa$ B-t (Cell Signalling Technology; D14E12; 400 ng/mL) használtunk, szintén 1:500 hígításban. A jelölésre másodlagos antitestként, 1:500 hígításban, kecskében termeltetett, anti-nyúl Alexa Fluor 488 fluorofórt választottunk. A festéseket Leica TCS SP8 STED-CW (Stimulated Emission Depletion-Continuous Wave: stimulált emisszió kioltás) szuperfelbontású fluoreszcens nanoszkópiával (Leica Microsystem Mannheim, Németország) fotóztuk. A rendszer 3 db folyamatos hullámú gerjesztő lézerrel (CW: folyamatos hullámú) (488, 532, 638 nm), továbbá egy szintén folyamatos hullámú 660 nm-es kioltó lézerrel rendelkezik. A képeket Leica Application Software X programmal készítettük, a Huygens Professional (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Hollandia) szoftverrel pedig dekonvolváltuk. A kiértékeléseket, ImageJ Fuji szoftverrel végeztük. Meghatároztuk az egyes fehérjék színintenzitását, továbbá a sejtmag frakciók esetében a transzkripciós faktorok kolokalizációját. A színárnyalatok százalékos területi arányát grafikonon ábrázoltuk. Az immunfluoreszcens festések (nukleusz, osteosense, IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$ ) különálló képeit az antitest kontrollokkal együtt a 3. kiegészítő ábrán mutatjuk.

#### **4.11 Immunhisztokémiai (IHC) festés egér szívbillentyűből**

A festések a Debreceni Egyetem Pathologiai Intézetében készültek. Az egér szívbillentyű szöveteket 10%-os NBF-fel fixálták egy napig. A fixálás után a mintákat etanollal dehidratálták és paraffinvaszba ágyazták. Az IHC festéseket VENTANA BenchMark Ultra automata festőkészüléken (Ventana Medical Systems) végezték, VENTANA reagensek felhasználásával, a gyártó utasításai szerint. A tárgylemezeket 72 °C-on, 4 percig, EZ Prep oldattal (Ventana Medical Systems; katalógusszám: 5279771001) paraffinmentesítették. Az antigén feltárást 100 °C-on, 52 percig, ULTRA Cell Conditioning 1 Solution (ULTRA CC1) oldattal végezték, ami Tris alapú puffert és tartósítószeret (Ventana medical systems; katalógusszám: 5424569001) tartalmazott. Az IHC-hez a következő, primer antitesteket

használtuk: anti-egér IL-1 $\beta$  (Invitrogen; 17h18116; 400 ng/mL), anti-egér TNF- $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific; PA5-19810; (400 ng/mL). A tárgylemezek detektálásához VENTANA ultraView Universal DAB kittet (Ventana medical systems; termékszám: 5269806001) használtak a gyártó utasításai szerint. Az antitest festődés intenzitását és eloszlását fénymikroszkóppal (Leica DM2500 Application Suite, Germany, VFC, Le4200 mikroszkóp, VFC, Le42t mikroszkóp Németország) figyeltük meg. A tárgylemezek szkennelése után, a kis és nagy felbontású képeket a SlideViewer 2.6 szoftverrel szerkesztettük meg. A festések színintenzitásait az ImageJ Fiji programmal elemeztük.

#### **4.12 Nukleáris és citoplazmatikus fehérje extrakció**

A VIC-eket 6 lyukú tenyésztőedényben kezeltük 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 10  $\mu$ mol/L AP72-vel. A kénhidrogént kibocsátó donor molekulával történő kezeléseknél, minden esetben fenolvörös indikátortól mentes tápfolyadékot használtunk. A kísérletek lejárta után a tápfolyadékot eltávolítottuk és a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd sejtkaparóval 2 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük. A pelletekhez jéghideg, hipotóniás, citoplazmatikus lízispuffert (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 100 mmol/L NaCl, 300 mmol/L szacharóz, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, és proteáz inhibitor oldata) adtunk hozzá. A sejtszuszpenziókat 15 percig, jégen inkubáltuk. Centrifugálás (8000 x g, 4 °C-on 15 percig) után a felülúszót, ami a citoplazmatikus fehérjefrakciót tartalmazta, 1,5 ml-es centrifugacsövekbe összegyűjtöttük. A megmaradt pelleteket kétszer mostuk PBS-sel, és jéghideg nukleáris extrakciós pufferben (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA pH 8,0 és proteáz inhibitor oldata) újra szuszpendáltuk, amit egy 27-es tűvel ellátott fecskendővel végeztünk. Végül a lizátumot 8000 x g-vel, 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk. A kapott felülúszó tartalmazta a nukleáris frakciót. A frakciók fehérjekoncentrációját a fentebb leírt módon határoztuk meg.

#### **4.13 CSE, CBS és NF- $\kappa$ B géncsendesítése**

A VIC-eket 12 lyukú tenyésztőedényben, körülbelül 70%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük antibiotikummentes tápfolyadékban. A sejtekbe Oligofectamin Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States) alkalmazásával transzfektáltuk a CSE Ambion, 4392420; s3710) és a CBS (Ambion, 4390824; s289) elleni, specifikus kis interferáló ribonukleinsavat (siRNS) és a negatív kontrol siRNS-t. Egy másik kísérletben NF- $\kappa$ B siRNS-el (Ambion, 4392420; s9505) hasonlóképpen végeztük a géncsendesítést. A transzfecció 4 órán keresztül, szérumentes tápközegben (Opti-MEM, Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA,

United States) játszódt le. Az inkubáció végén a folyamatot, 30% FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes DMEM hozzáadásával állítottuk le. Másnap a sejteket alaposan mostuk, és 2,5 mmol/L szervesen foszfáttal és 1,8 mmol/L kalcium-kloriddal kezeltük, illetve egy másik kísérletben a kalcifikáló kezelőoldatot, kiegészítettük 10 nmol/L TNF- $\alpha$  vagy 10 nmol/L IL-1 $\beta$  gyulladást előidéző citokinekkal. A kezeléseket kétnaponta ismételtük és 5 napig végeztük.

#### **4.14 Az NF- $\kappa$ B farmakológiai gátlása**

A VIC-et 24 lyukú tenyésztőedénybe helyezett, 12 mm átmérőjű fedőlemezeken vagy 12 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük 5 napig, magas glükózkoncentrációjú, fenolvörös indikátortól mentes növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 10  $\mu$ mol/L AP72-vel. Az NF- $\kappa$ B gátlását specifikus SC75741 inhibitorral (katalógusszám: SML2382-MG) végeztük. Az gátlószert 5 nmol/L koncentrációban alkalmaztuk.

#### **4.15 Immunhisztokémia humán szívbillentyű szövetből**

A szívbillentyűk szöveteit 10%-os (v/v) semleges pufferelt formalinnal (NBF) egy napon át rögzítették. Rögzítés után a mintákat etanollal dehidratálták és paraffiniaszba ágyazták. Az IHC festéseket VENTANA BenchMark Ultra automata festőműszeren (Ventana Medical Systems), VENTANA reagensek felhasználásával, a gyártó utasításai szerint végezték. A tárgylemezeket EZ Prep oldattal (Ventana Medical Systems; termékszám: 5279771001) 4 percig, 72 °C-on paraffinmentesítették. Az antigén feltárásához ULTRA Cell Conditioning 1 oldatot (ULTRA CC1) 100 °C-on, 52 percig használták (Tris puffert és tartósítószer tartalmaz (Ventana medical systems; termékszám: 5424569001). IHC-t a következő elsődleges antitestekkel kiviteleztek: nyúlban termeltetett anti-humán TNF- $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific; PA5-19810; 400 ng/mL); nyúlban termeltetett anti-humán IL-1 $\beta$  (Invitrogen; 17 h18116; 400 ng/mL); nyúlban termeltetett anti-humán CSE (Proteintech Group; 12217) -1-AP; 1000 ng/mL) és nyúlban termeltetett anti-humán CBS (Proteintech Group; 14787-1-AP; 700  $\mu$ g/mL. A tárgylemezeken az antitestek bekötődését VENTANA ultraView Universal DAB kromogén detektáló kittel (Ventana medical systems; termékszám: 5269806001) a gyártó utasításai szerint tették láthatóvá. A tárgylemezeken ezután a Hematoxilin és Eozin-t (H&E) 12 percig hematoxilin II-vel (Ventana Medical Systems; termékszám: 5277965001) majd Bluing reagenssel (Ventana Medical Systems; termékszám: 5266769001) festették meg. A von Kossa festéssel a szövetekben lerakódott kalcium kristályokat vizsgáljuk. Metszeteket 2%-os AgNO<sub>3</sub> oldattal kezelték és 1-1,5 órára egy nagy teljesítményű lámpa (100Watt-os halogénlámpa) elé

helyezték. A reakció során a kalcium vegyületekben a kalcium kicserélődik az ezüsttel, és egy oldhatatlan ezüstsó képződik. Fény hatására redukálódik, az ezüst kicsapódik és a kalcium lerakódás helyén fekete csapadék jön létre. Az immunjelölt tárgylemezeket alkoholban dehidratálták, majd xilolban tisztították, végül fedőlemezzel lefedték. Az antitestek festődési intenzitását és eloszlását fénymikroszkóppal (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420 kamera és Leica Application Suite V3 szoftver, Wetzlar, Németország) vizsgálták meg. A tárgylemezek szkennelése után, a kis (50  $\mu\text{m}$ ) és nagy (20  $\mu\text{m}$ ) felbontású képeket a SlideViewer 2.6 szoftverrel készítettük a saját laboratóriumunkban. A festések pixel denzitási értékeit az ImageJ Fiji programmal értékeltük ki.

#### **4.16 A kénhidrogén szintek meghatározása sejtlizátumokból módosított metilénkék módszerrel**

A szulfidszinteket cink precipitációs módszerrel mértük meg, melyet először Gilboa és Garber dolgoztak ki [131], majd A. D. Ang és munkatársai [132] módosítottak. A sejtlizátumokhoz (50  $\mu\text{l}$ ) hozzáadtunk 350  $\mu\text{l}$  1%-os cink-acetátot és 50  $\mu\text{l}$  1,5 mol/L koncentrációjú nátrium-hidroxidot, és szobahőmérsékleten, 60 percig, asztali kevertetőn inkubáltuk, hogy csapadékképzéssel a mintákban lévő szulfidot elválasszuk az egyéb kromofóroktól. Az inkubációs idő letelte után a képződött cink-szulfid csapadékot, 2000 x g-vel, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót ezután eltávolítottuk, és a visszamaradt pelletet, intenzív vortexelés közben, 1 ml desztillált vízzel mostuk. A következő lépésben ismét 2000 x g-vel, szobahőmérsékleten, 5 percig centrifugáltuk a mintákat. A felülúszót óvatosan leöntöttük, és a pelletet 160  $\mu\text{l}$  desztillált vízzel feloldottuk, majd 40  $\mu\text{l}$  előre összekevert festék oldattal (20  $\mu\text{l}$  20 mmol/L dimetil-p-fenilén-diamin-dihidroklorid (NNDP) feloldva 7,2 mol/L-es koncentrációjú sósavban) és 20  $\mu\text{l}$  30 mmol/L koncentrációjú vas (III)-klorid ( $\text{FeCl}_3$ ) feloldva 1,2 mol/L HCl-ban) inkubáltuk. A folyamat során, a szulfid reagál az NNDP-al, mely reakciót az  $\text{FeCl}_3$  katalizálja és metilénkék keletkezik. Az inkubáció sötétben történt, melynek során 1 mol/L szulfidból, 1 mol/L metilénkék képződött. 10 perc elteltével a keletkezett metilénkék karakterisztikus elnyelési hullámhosszát 667 nm-en, spektrofotométerrel (Beckman DU-800) határoztuk meg. A pontos szulfid koncentrációkat előzetesen felvett kalibrációs egyenes és a metilénkék extinkciós koefficiensének (30 200  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) segítségével számítottuk ki. Az eredményeket a minták fehérjetartalmára normalizáltuk, és  $\mu\text{mol/L}$  összes kénhidrogén/mg fehérje értékben ábrázoltuk.

#### 4.17 Cisztein, cisztationin, lantionin és homocisztein mérése LC-MS/MS módszerrel

A mérések az Országos Onkológiai Intézetben Budapesten történtek. Az analitikai kémia egyik széleskörben alkalmazott technikája a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria. A rendszer nagyon érzékeny és rendkívül specifikus, ezért alkalmas többkomponensű elegyek szétválasztására és az elválasztott alkotók detektálására. Az elválasztás a folyadékkromatográfia fizikai elveit alkalmazza, míg az analitokat a tömegspektrometria detektálja a tömeg/töltés ( $m/z$ ) hányados alapján. A kriogén módon porított, humán egészséges és kalcifikált szívbillentyű szöveteket ( $N=5$ ) CHAPS pufferben (150 mmol/L KCl, 50 mmol/L HEPES pH 7,4, 0,1% CHAPS és proteáz inhibitorok keveréke) újra szuszpendálták, és 10 másodpercig ultrahanggal szonikálták. A mintákat ezt követően centrifugálták (14 000 x g-vel, 10 percig, 4 °C-on), majd BCA módszerrel meghatározták a felülúszók fehérjekoncentrációját. Az 1 mg/mL fehérjekoncentrációjú mintákból 50  $\mu$ L-t használtak a származékképzési reakcióhoz. Az eljárást az EZ:Faast kittel (Free Amino Acid; Phenomenex, Torrance, CA, USA) végezték a gyártó utasításai szerint. Az eljárás szilárd fázisú extrakcióból, származékképzésből és végül folyadék-folyadék extrakcióból áll és jelentős költség- és időmegtakarítást jelent. Az EZ:faast módszer esetében a mintaelőkészítés során, nincs szükség a hagyományos fehérjementesítési vagy karbamideltávolítási módszerekre. A minták egy SPE szorbensen haladtak keresztül, amely megkötötte az aminosavakat, míg a fehérjéket és a karbamidot lemosták, így csak a szabad aminosavak maradtak meg. A származékképzési reakció során, 50  $\mu$ L propil-kloroformiát oldatot adtak a mintákhoz, amely az aminosavak, amin- és karboxilcsoportjait egyaránt derivatizálja, így szobahőmérsékleten, 4°C-on, több órán át vagy akár több napig stabil származékokat képeznek. Jó származékstabilitás mellett az aminosavak mennyiségi meghatározása pontosabb és megbízhatóbb, szinte egyetlen aminosavminta sem vész el a minta-előkészítés során. A mintákat egy Thermo Vanquish UHPLC rendszerrel elemezték, amely egy Thermo Q Exactive Focus tömegspektrométerhez volt kapcsolva. A kromatográfiás futási idő 12 perc volt. A könnyű mennyiségi meghatározás érdekében, az oszlopok nagy hatékonysága és felbontása teljes alapvonal-elválasztást tett lehetővé. Az eredmények kiértékelése alkalmával, az EZ:Faast kit által ajánlott cisztein, cisztationin és homocisztein  $m/z$  értékeit, míg a lantionin esetében a publikált  $m/z$  értékeket [133] vették alapul.

#### **4.18 A biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S detektálása LC-MS/MS technikával**

A mérések az Országos Onkológiai Intézetben Budapesten történtek és az Akaike és munkatársai által kidolgozott módszeren alapul [134] az alábbiak szerint: a kriogén módon porított egészséges és kalcifikált humán szívbillentyű szövetet 5 mmol/L  $\beta$ -(4-hidroxi-fenil)-etil-jód-acetamidot (HPE-IAM) tartalmazó jéghideg metanolban szuszpendálták és alkilálták. Az egyes előkészítési lépések között a mintákat folyamatosan jégen tartották. A szonikálás után a derivatizálást 37 °C-on, 20 percig végezték, majd a mintákat 14 000 x g-vel 4 °C-on, 10 percig centrifugálták. 100  $\mu$ l felülúszókat megsavanyították 5  $\mu$ l 10%-os hangyasavval, és az injekció beadása előtt 0,1%-os FA/H<sub>2</sub>O-val a kétszeresére hígították. A szöveti pelleteteket 1%-os SDS/PBS-ben feloldották, ultrahanggal kezelték, és a fehérjetartalmat BCA vizsgálattal meghatározták. A folyadékkromatográfiás-tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) méréseket Thermo Q-Exactive Focus Orbitrap tömegspektrométerrel végezték, amely egy Thermo Vanquish UHPLC-hez (ultra-nagy teljesítményű folyadékkromatográf) volt kapcsolva. A derivatizált analitokat Phenomenex Kinetex C18 (50  $\times$  2,1 mm, 2,6  $\mu$ m belső átmérőjű) oszlopon, 0,1% FA/H<sub>2</sub>O (A) és 0,1% FA/MeOH (B) eluensekkel választották el. A lineáris gradiens elúció alkalmazásával, a B eluens arányát 15 perc alatt a kezdeti 5%-ról 95%-ra növelték, majd 2 perc alatt fokozatosan csökkentették 5%-ra, és ott tartották 3 percig a következő injekció beadásáig. A kolonna hőmérséklete 30 °C, az áramlási sebesség 0,3 ml/perc, az injektálási térfogat 5  $\mu$ l volt. Az alkilezett szulfid termékek MS/MS detektálása pozitív ionizációs módban történt. Mennyiségüket egy kiválasztott molekulaion egy specifikus fragmensének vizsgálatával határozták meg. A 389 m/z értékű prekursor ion 252 m/z értékű fragmentumának kimutatására nagyobb energiájú ütközési disszociációt (HCD: Higher Energy Collision Dissociation) alkalmaztak.

#### **4.19 A fehérje perszulfidáció meghatározása LC-MS/MS módszerrel**

A mérések az Országos Onkológiai Intézetben Budapesten történtek és az Akaike és munkatársai által kidolgozott módszeren alapul [134] az alábbiak szerint: a kriogén módon porított egészséges és kalcifikált humán szívbillentyű szöveteket 5 mmol/L HPE-IAM-ot tartalmazó RIPA pufferben szuszpendálták, alkilálták és szonikálták. Szobahőmérsékleten, 14 000 x g-vel, 10 percig végzett centrifugálás után a felülúszók 100  $\mu$ l-ét, Zeba spin oszlopok segítségével (7K MWC0, 0,5 ml) sóalanították, így az alkilálószer feleslegét eltávolították. Az átfolyó minták pontos fehérjekoncentrációját BCA módszerrel mérték, majd 4  $\mu$ l 100 mmol/L DMSO-s HPE-IAM oldatot adtak hozzá. A sómentesített minták fehérjetartalmát

kiegyenlítették RIPA pufferrel, és pronázzal (3 mg/mL) 35 mmol/L Na-acetát pufferben (pH 5,0) 37 °C-on, 1 órán át emésztették. A mintákat 10%-os triklórecetsavval (TCA) megsavanyították és szobahőmérsékleten, 10 percig, 14 000 x g-vel centrifugálták. A felülúszókat az LC-MS/MS módszerrel analizálták, és a derivatizált analitokat „A biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S LC-MS/MS mérése” részben ismertetett technikával mérték. A cisztein és cisztein-perszulfid termékek MS/MS vizsgálata pozitív ionizációs módban, nagyobb energiájú ütközési disszociációval (HCD: Higher Energy Collision Dissociation) történt és a 299 m/z értékű (cisztein) és 331 m/z értékű (cisztein-perszulfid) prekursor ionok, 121 m/z értékű fragmentumát detektálták.

#### **4.20 Kísérleti egységek**

Az „N” az egyes csoportokban használt szövetminták vagy a kísérleti állatok számát mutatja. Az „n” az egymástól független kísérletek ismétléseinek számát jelöli, melyekből az eredmények származnak.

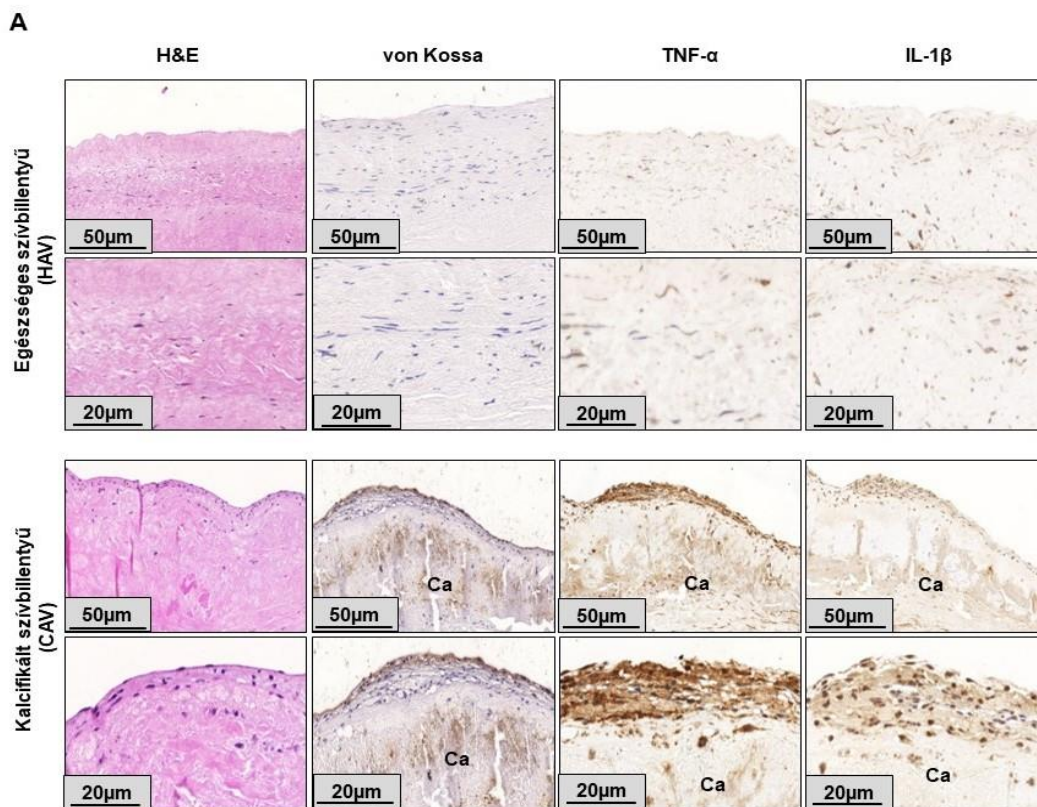
#### **4.21 Statisztikai elemzés**

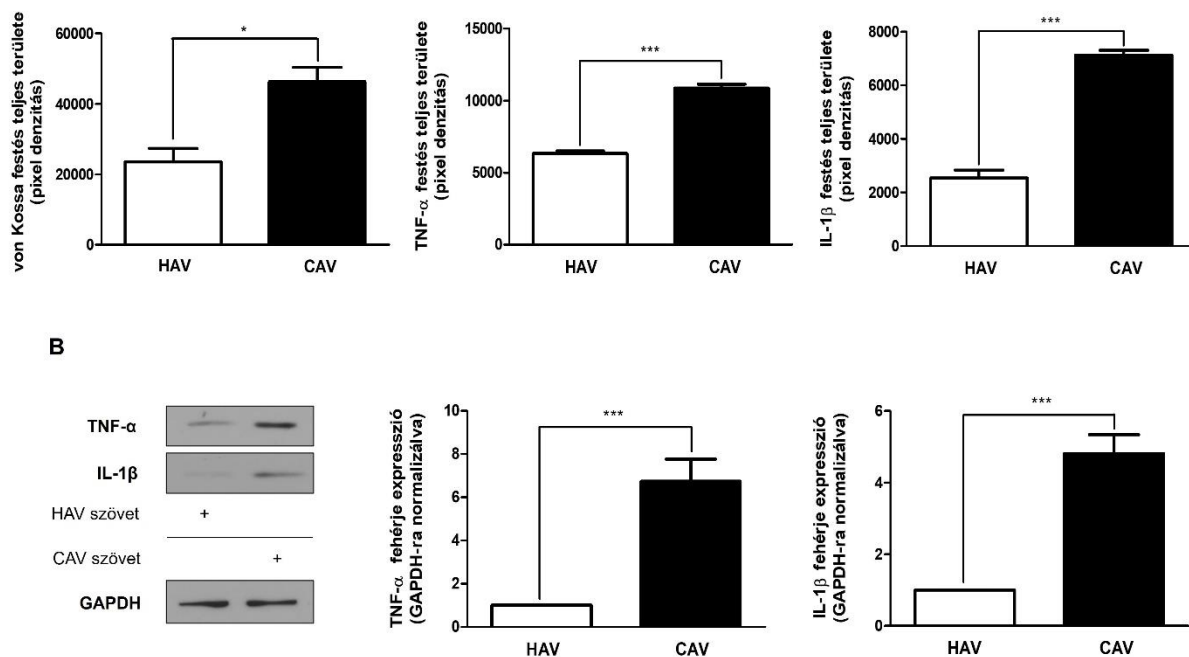
Az intersticiális sejteken végzett kísérletekből származó adatokat GraphPad Prism 5.02 statisztikai szoftverrel (GraphPad Software Inc., 7825 Fay Avenue, Suite 230 La Jolla, CA 92037) elemeztük. A diagramokon feltüntetett statisztikai eredmények, legalább három vagy öt, egymástól független kísérletből származó adatok átlagának standard hibáját jelöli. Minden statisztikai adatot átlag ± SEM értékkel adtunk meg. Két adatcsoport összehasonlítása esetén Student-féle t-próbát, kettőnél több, megegyező szórású, normális eloszlású adatcsoport összehasonlításánál egyszempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztünk, kiegészítve Bonferroni többszörös összehasonlítási utó teszttel (post hoc). Az ábrák jelmagyarázatai jelzik a szignifikáns eltéréseket a különböző p-értékek szerint: \* (p<0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001). A p<0,05 érték szignifikáns volt. Az ns. jelzés a nem szignifikáns eredményekre utal.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 A humán kalcifikált aortabillentyűkben a gyulladást kiváltó citokinek expressziója megemelkedik

A vizsgálatainkban szereplő CAV minták olyan betegekből származtak, akiknél súlyos billentyű elégteliséget diagnosztizáltak, ezért teljes aortabillentyű cserén estek át. A gyulladás kimutatására a meszesedett aortabillentyűket megfestettük proinflammatorikus citokinekre, IL-1 $\beta$ -ra és TNF- $\alpha$ -ra. A kontrol festések kivitelezéséhez használt egészséges aortabillentyűket (HAV), a rendelkezésünkre álló információk szerint, szív- és érrendszeri megbetegedésekben nem szenvedő, öngyilkossági vagy traumatikus eseményekben elhunytakból kaptuk. Az ilyen esetekben, fontos volt a billentyűk legkevesebb 20 órán belüli eltávolítása az elhunytak testéből. A CAV állapotban a von Kossa intenzív festődése súlyos billentyűmeszesedést mutatott. Amint az 4A. ábrán látható, a kalcifikált mintákban a mineralizációt, az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  fokozott expressziója követte az egészséges kontrolokhoz képest. A Western blot analízis során is kimutattuk, hogy a gyulladást elősegítő citokinek szintje szignifikánsan magasabb a CAV-ban, mint a HAV-ban (4B. ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak a korábban feltárt megfigyelésekkel, hogy a gyulladás és a meszesedés a CAVD egyik fontos jellegzetessége [1].



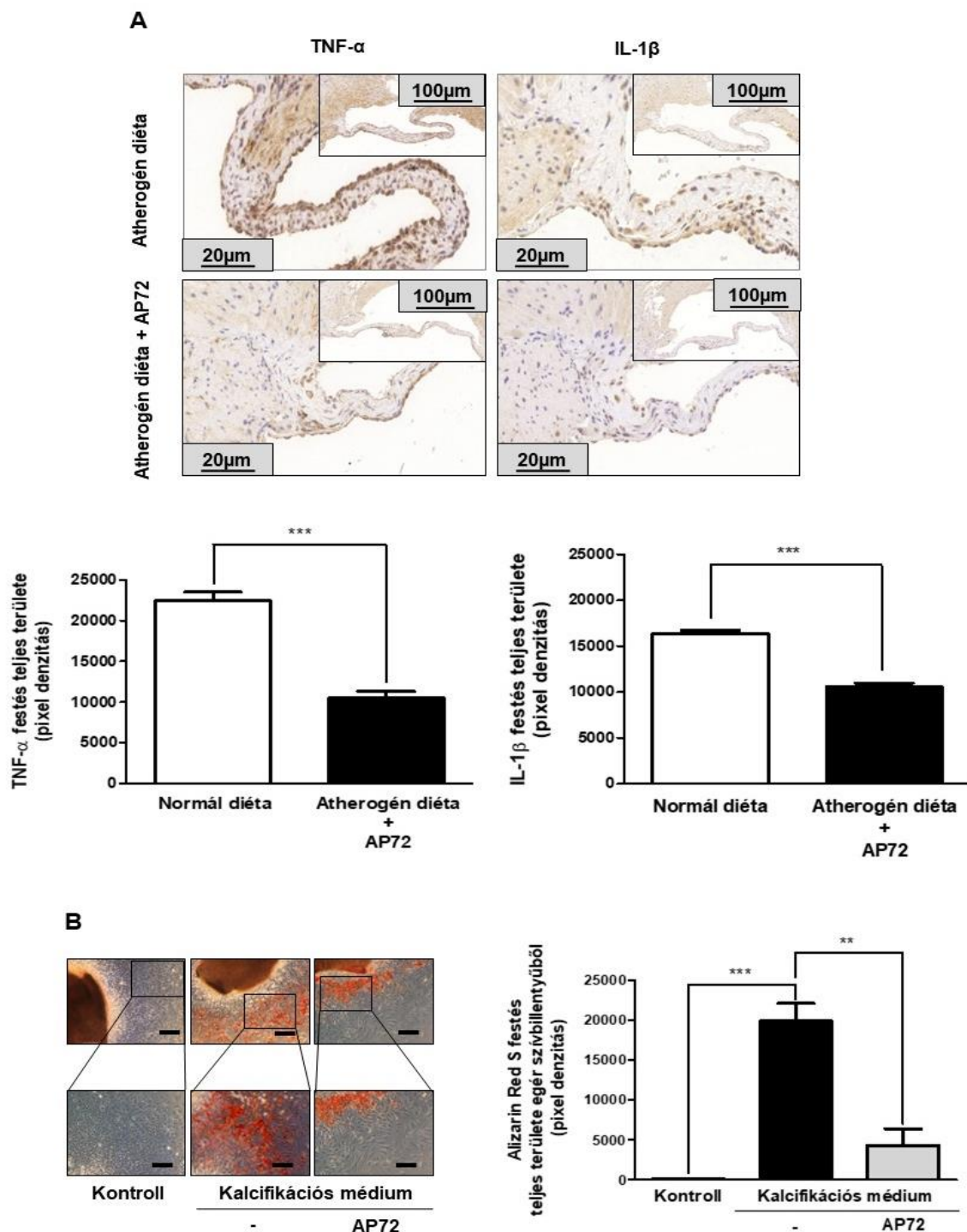


**4. ábra: A humán calcifikált aortabillentyűk egyik legfontosabb jellemzője a gyulladásos citokinek magas expressziója.** A) Az immunhisztokémiai festések reprezentatív mikroszkópos felvételei láthatóak. A HAV (felső képek; N=3) és CAV (alsó képek, N=5) szövetanyagából a Hematoxilin és eozin, von Kossa, TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$  immunhisztokémiai festéseket a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetének munkatársai készítették. Az elkészült IHC festésekből, a szkennelés követően, kis (50  $\mu$ m) és nagy (20  $\mu$ m) felbontású képeket készítettünk és a kiértékelés során a pixel denzitást mutattuk be. B) A festési eredmények alátámasztására, HAV és CAV szövetekből az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  fehérjék expresszióját Western blot analízissel is megvizsgáltuk és a denzitás értékeket GAPDH-ra normalizáltuk. Az eredmények kiértékelésénél Student-féle t-próbát használtunk és három vagy öt független kísérlet átlagos  $\pm$  S.D értékét ábrázoltuk. \* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5.2 Az exogén módon beadott H<sub>2</sub>S gátolja a gyulladás kialakulását apolipoprotein E-hiányos egerek (ApoE<sup>-/-</sup>) aortabillentyűiben

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a kénhidrogén, zsírdús diétával etetett, ApoE<sup>-/-</sup> egerekben megakadályozta az aortabillentyűk meszesedését [118, 135]. Megvizsgáltuk, hogy a hasonló körülmények között, zsírban gazdag diétán tartott, ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyűiben a kialakult gyulladást is befolyásolja-e a H<sub>2</sub>S. Kísérleteinkben az AP72-t, egy lassú felezési idejű, szulfidot kibocsátó donor vegyületet alkalmaztunk, amelyről kutatócsoportunk korábban bemutatta, hogy a humán szívbillentyűk mineralizációját erősen gátolja [118]. Az AP72 szulfid tartalmú vegyületet a kísérletbe vont egerekbe, kétnaponta, intraperitoneális módszerrel, 266 mmol/ttkg dózisban juttattuk be. Az eredményeink alapján, a vizsgált kénhidrogén vegyület szignifikánsan gátolta az aortabillentyűk megvastagodását és az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  gyulladásos citokinek expresszióját (5A. ábra). Hasonlóan a humán CAV-hoz (4A. ábra), a magas zsírtartalmú étrenddel táplált ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyűiben, az IL-1 $\beta$ -re és TNF- $\alpha$ -ra pozitív festődést mutató intersticiális sejtek száma jóval kifejezettebb volt a

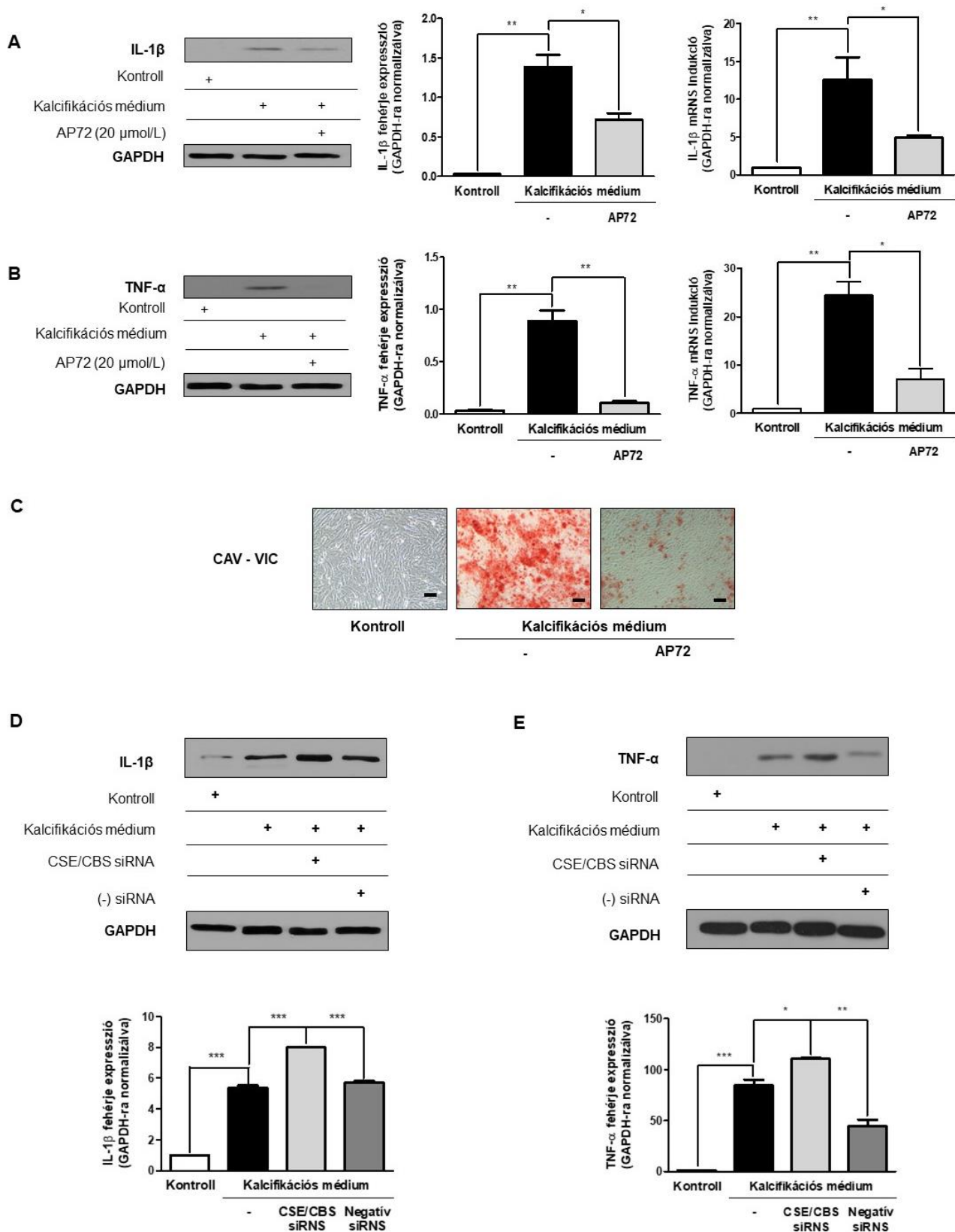
kontrol egerekhez képest. Amint az 5A. ábrán látható, az AP72-kezelés jelentősen csökkentette mind az IL-1 $\beta$ , mind a TNF- $\alpha$  expresszióját magas zsírtartalmú étrenddel táplált ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyű szövetében. Hasonló eredményeket figyeltünk meg *ex vivo* kísérleti körülmények között is. ApoE<sup>-/-</sup> egerek billentyűiből 2 mm-es szövetdarabkákat metszettünk le, és tenyésztettünk, majd a meszesedés kiváltására nagy foszfát-expozíciót alkalmaztunk. Jól látható, hogy az Alizarin Red S festés az AP72-vel kezelt billentyű intersticiális sejtek meszesedését szignifikánsan csökkentette (5B. ábra).



**5. ábra A kénhidrogén szignifikánsan gátolja a gyulladást és a kalcifikációt.** A) Az ApoE<sup>-/-</sup> egereket 8 hetes koruktól kezdve zsírban gazdag étrenden tartottuk. Velük párhuzamosan az egerek egy másik csoportja az atherogén táplálék mellett, kétnaponta, intraperitoneálisan, AP72 szulfid donorral, exogén kénhidrogén kezelésben részesült. A kísérletek 8 hét után jártak le. Az atherogén étrenden tartott ApoE<sup>-/-</sup> egerek (felső képek, N=5) és a magas zsírtartalmú táplálék mellett AP72-vel (266 mmol/ttkg) oltott egerek aortabillentyűiből (alsó panelek; N=5) a TNF- $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  immunhisztokémiai festéseket a Debreceni Egyetem Pathologiai Intézetének munkatársai végezték. A gyulladós területek arányának számszerűsítése ImageJ szoftver alkalmazásával történt. A kiértékelésnél Student-féle t-próbát használtunk és 5 különböző mérés eredményeit ábrázoltuk átlag  $\pm$ S.D formában. B) Az ábrán látható *ex vivo* kísérlet kivitelezése az alábbi módon történt: ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyűiből 2 mm-es nagyságú szövetdarabkákat metszettünk, majd 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 5 napig, magas glükózkoncentrációjú növekedési tápközegben, meszesedést kiváltó tápközegben (2,5 mmol/L koncentrációjú szerves foszfát oldattal és 1,8 mmol/L koncentrációjú kalcium-klorid oldattal kiegészített növekedési médium) önmagában, vagy kiegészítve 20  $\mu$ mol/L AP72-vel. Az ApoE<sup>-/-</sup> egerek szívbillentyű szövetéből származó intersticiális sejtekben, az extracelluláris kalcium depozitumok kialakulását, kvalitatív módon, Alizarin Red S festéssel szemléltettük. Az eredmények azt mutatták, hogy az AP72 jelentősen csökkentette a kalcifikáció további progresszióját, ApoE<sup>-/-</sup> egér *ex vivo* kísérletekben. Az elmeszesedett területek vörös színű festődést mutattak, melyek kvantálását ImageJ szoftverrel elemeztük, és a vörös színre vonatkozó pixel denzitást ábrázoltuk. A kapott értékeket Bonferroni többszörös összehasonlító utó teszttel elemeztük, és öt egymástól független kísérlet átlagértékeként ábrázoltuk. \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001.

### **5.3 Az endogén H<sub>2</sub>S termelés csökkenése fokozza a nagy koncentrációjú foszfát által kiváltott gyulladást a humán szívbillentyű intersticiális sejtekben**

Ahogy az várható volt, a nagy koncentrációjú foszfát kezelés hatására a humán aortabillentyűből származó intersticiális sejtekben is jelentős meszesedés alakult ki. Továbbá megfigyeltük, hogy a magas foszfát expozíciónak kitett humán VIC-ben, az IL-1 $\beta$ , és a TNF- $\alpha$  gyulladást elősegítő citokinek, mind transzlációs szinten (6A. és B. bal oldali ábra) és transzkripciós szinten (6A. és B. jobb oldali ábra) egyaránt erősen indukálódott. A sejtek AP72-vel történt kezelését követően, szignifikánsan csökkent az extracelluláris mátrixban a kalcium depozitumok felhalmozódása, ami együtt járt a gyulladást elősegítő citokinek indukciójának csökkenésével (6A-C. ábra). Munkacsoportunk korábban megfigyelte, hogy a CSE és a CBS - a fiziológiás kénhidrogén képződéséért felelős legfőbb enzimek - expressziójának csökkenésével, az endogén H<sub>2</sub>S termelődése is mérséklődik, amely elősegíti a VIC-ek meszesedését [118]. Így az endogén H<sub>2</sub>S gyulladásgátló hatásának tesztelésére, a CSE és a CBS gének működésének gátlásával kísérleteket végeztünk. Eredményeink azt mutatták, hogy a magas foszfát expozíciónak kitett VIC-ben, a CSE és a CBS gének specifikus, kis interferáló RNS-vel történt kettős géncsendesítése, nagymértékben fokozta az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  gyulladást kiváltó citokinek expresszióját (6D. és E ábra). Kísérleteink alapján arra következtettünk, hogy kalcifikációs körülmények között, a kénhidrogén a gyulladás progresszióját szabályozza.

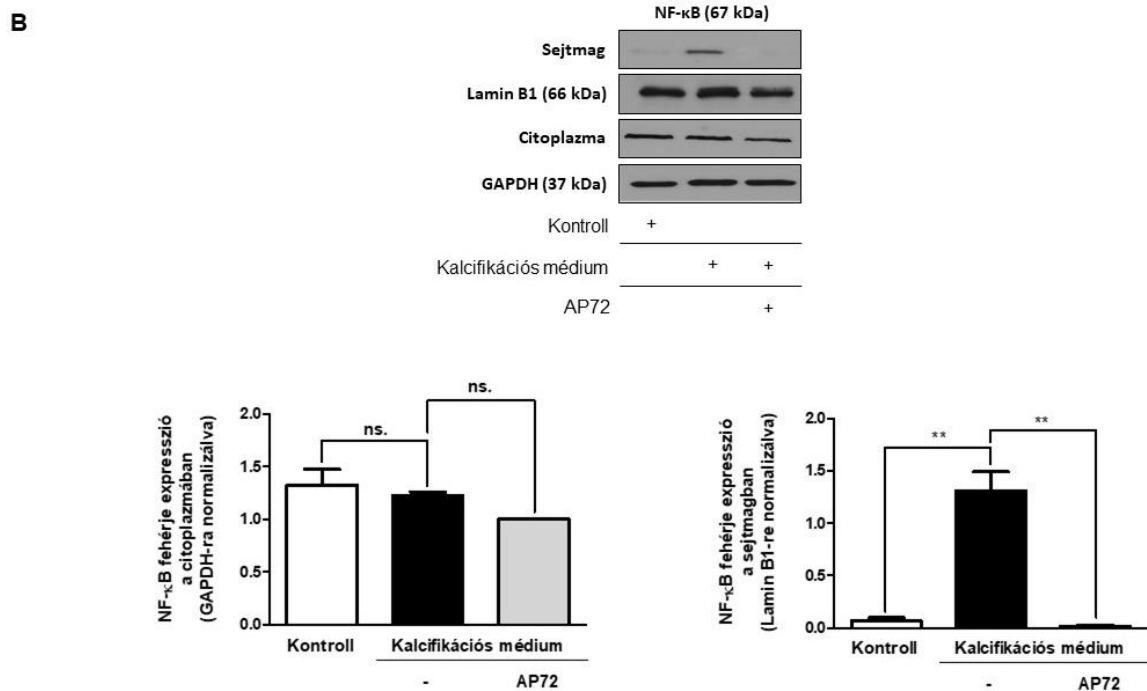
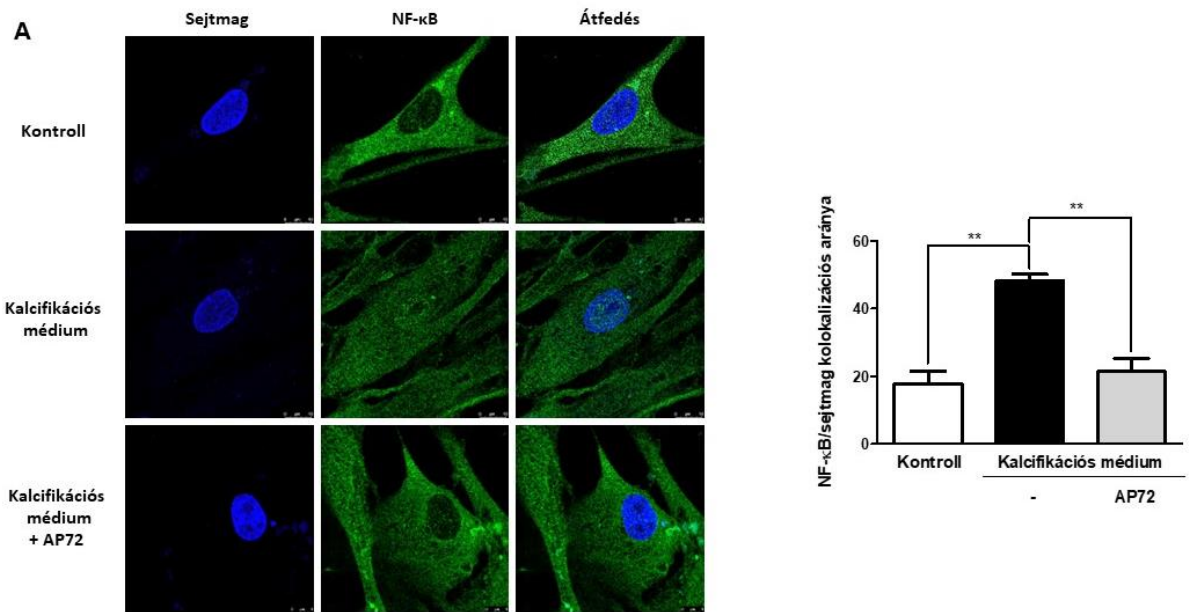


**6. ábra: A kénhidrogén szabályozza a gyulladást elősegítő citokinek expresszióját** A humán, kalcifikált aorta billentyűkből származó, valvuláris intersticiális sejteket 6 lyukú és 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 5 napig, magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, meszesedést kiváltó médiumban (2,5 mmol/L szervezetlen foszfát és 1,8 mmol/L kalcium-klorid) önmagában, vagy kiegészítve 20  $\mu$ mol/L AP72-vel. (A) Az IL-1 $\beta$  és a (B) TNF- $\alpha$  fehérjeexpressziókat Western blot, míg a mRNA szinteket RT-qPCR módszerekkel határoztuk meg, melyeket mindkét technikánál GAPDH-ra normalizáltunk. (C) A kalcifikáció előrehaladtával az

extracelluláris mátrixban felhalmozódó kalcium kristályokat Alizarin Red S festéssel tettük láthatóvá. A meszes területek arányát ImageJ program alkalmazásával, a vörös színre vonatkozóan kvantáltuk. Az siRNS felhasználásával végzett CSE és CBS kettős géncsendesítés sikerességét Western blot technikával igazoltuk. A főbb endogén kénhidrogén termelő enzimek géncsendesítése során, a gyulladást elősegítő citokinek, mint az (D) IL1- $\beta$  és a (E) TNF- $\alpha$  expressziója szignifikáns növekedést mutatott. A Western blot során az előhívott filmeket ImageJ szoftver alkalmazásával értékeltük ki és a denzitometráls után GAPDH-ra normalizáltuk. Az eredményeket egyszempontos variancia analízissel, kiegészítve Bonferroni többszörös összehasonlító utó teszttel elemeztük ki, és öt egymástól független kísérlet átlagértékeként ábrázoltuk. \*P<0,01; \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001.

#### **5.4 A H<sub>2</sub>S akadályozza a gyulladós folyamatok progresszióját az NF- $\kappa$ B aktivitás gátlásán keresztül**

Jól ismert, hogy az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor szabályozza a gyulladást elindító jelátviteli útvonalat, és aktiválása a nukleáris transzlokációján alapul, amelyet gyulladást kiváltó citokinek, mint például az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  expressziói követnek [64]. Korábban más munkacsoportok bizonyították, hogy a H<sub>2</sub>S képes az NF- $\kappa$ B transzszulfurálására, ami a nukleáris transzlokációjának gátlását eredményezi [65, 102, 136]. Így megvizsgáltuk, hogy az AP72 befolyásolja-e az NF- $\kappa$ B aktiválódását meszesedést kiváltó tápközegben tartott sejtekben. Az immunfluoreszcens festések konfokális mikroszkópos kiértékelése azt mutatta, hogy az NF- $\kappa$ B a növekedési médiumban tenyésztett szívbillentyű intersticiális sejtek citoplazmájában található (7A. ábra; felső panelek). A sejtek foszfátexpozíciója azonban kiváltotta az NF- $\kappa$ B transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba (7A. ábra; középső panelek). Amint azt a 7A. ábra (alsó panel) bemutatja, az AP72 megakadályozta az NF- $\kappa$ B megjelenését a meszesedést kiváltó médiumban tartott VIC-ek sejtmagjában. Az immunfluoreszcens festések eredményeinek megerősítésére a VIC-ek citoplazma és sejtmag frakcióit Western blot analízissel is megvizsgáltuk NF- $\kappa$ B-ra. Eredményeink azt mutatták, hogy az NF- $\kappa$ B a sejtmagban a foszfát expozíció hatására jelent meg (7B. ábra), míg szintje csökkent a citoplazmatikus frakcióban. Fontos megfigyelés volt, hogy transzlációs szinten is igazolni tudtuk, hogy a nagy koncentrációjú foszfátnak kitett VIC-ben, az AP72 kezelés szignifikánsan gátolta az NF- $\kappa$ B transzlokációját a nukleuszba (7B. ábra).

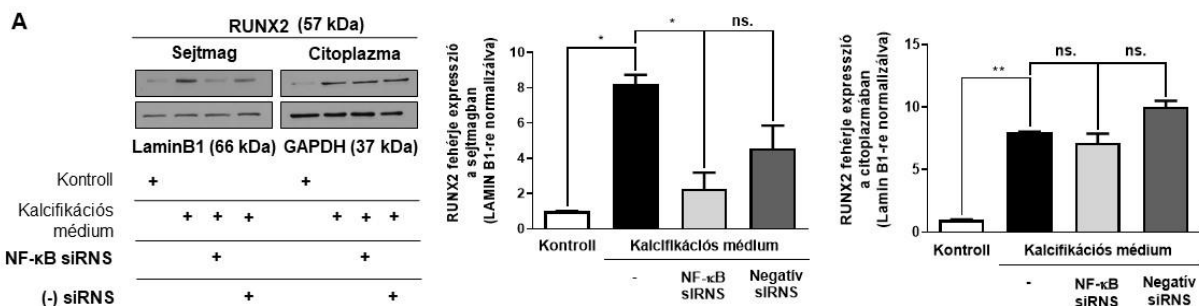


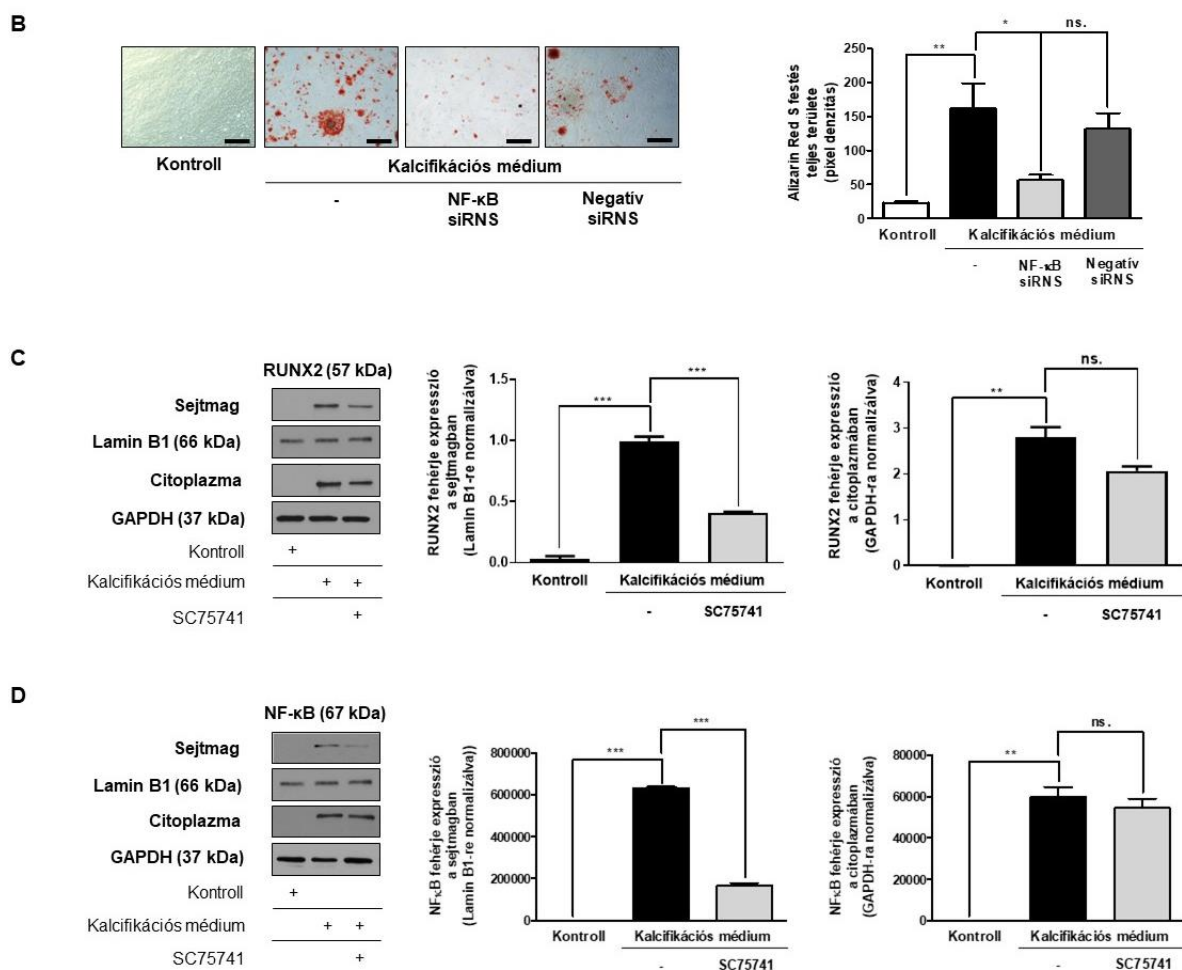
**7. ábra: AP72 szupplementáció gátolja az NF-κB nukleáris transzlokációját** A VIC sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, 12 mm átmérőjű fedőlemezekre tenyésztettük, 5 napig magas glükózkonzentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 20 μmol/L AP72-vel. A) A sejtek DNS-ét Hoechst 33258-al (kék színű) festettük meg, míg az NF-κB-t nyúlban termeltetett, anti-humán NF-κB elsődleges antitesttel jelöltük. A citoplazmatikus és a sejtmagi lokalizációját 1:500 hígításban, kecskében termeltetett, anti-nyúl Alexa Fluor 488 fluorofórral tettük láthatóvá. A festésekről a reprezentatív képeket Leica TCS SP8 kapuzott STED-CW szuperfelbontású nanoszkopecs technikával készítettük. A fotókat Huygens Professional szoftver alkalmazásával dekonvolváltuk. A sejtmag/NF-κB kolokalizációs arányát az 5A. ábra jobb oldali panelje mutatja. A kiértékeléshez ImageJ szoftvert használtunk, és az átfedést mutató képeken a pixel intenzitást ábrázoltuk. B) Az immunfluoreszcens festési eredmények megerősítésére, a VIC sejtek citoplazmatikus és nukleáris frakciójából, Western blot technikával is kimutattuk az NF-κB expresszióját. Az előhívott fehérjesávok intenzitását nukleáris frakció esetén Lamin B1-re, citoplazma frakciónál GAPDH-ra normalizáltuk ImageJ

szoftver alkalmazásával. Az eredményeket öt független kísérlet átlagértékeként mutattuk be. Ns.: nem szignifikáns; \*P<0,01; \*\*P<0,001.

## 5.5 Az NF-κB aktiválása elősegíti a RUNX2 nukleáris transzlokációját és ezt követően a szívbillentyű intersticiális sejtek mineralizációját

A RUNX2 az oszteogén folyamatok kulcsfontosságú transzkripciós faktora, amely a vaszkuláris simaizomsejtek és a szívbillentyű intersticiális sejtjeinek korai oszteoblaszt irányú transzdifferentiálódását szabályozza. Kíváncsiak voltunk, hogy meszesedést kiváltó körülmények között, van-e kapcsolat az NF-κB és a RUNX2 transzkripciós faktorok között humán VIC-ben. A kísérletek tervezése során, humán VIC-et tenyésztettünk kalcifikációs tápközegben, ahol az NF-κB gén aktivitását géncsökkentéssel csökkentettük. Amint az várható volt, a nagy foszfát expozíció hatására a RUNX2 szintje jelentősen megemelkedett a sejtmagban. Az NF-κB specifikus siRNS-el történt géncsökkentését követően azt tapasztaltuk, hogy nagymértékben csökkentette a RUNX2 nukleáris transzlokációját (8A. ábra). Ennek a megfigyelésnek a megerősítésére az NF-κB aktivitását egy másik útvonalon, farmakológiai inhibitor (SC75741) alkalmazásával is legátoltuk. Az eredmények egyértelműen mutatják, hogy a sejtek kezelése az SC75741 szintetikus NF-κB inhibitorral szignifikánsan csökkentette mind az NF-κB gyulladást szabályozó transzkripciós faktor (8D. ábra), mind a RUNX2 kalcifikációt szabályozó transzkripciós faktor megjelenését a nukleuszban (8C. ábra). Annak érdekében, hogy további megerősítést kapjunk arra vonatkozóan, hogy a VIC-k gyulladós folyamata szabályozza az NF-κB-n keresztül a mineralizációt, a sejteket ismét meszesedést kiváltó médiumban tenyésztettünk, ahol az NF-κB gént újra elcsendesítettük, és követtük a kalcium felhalmozódását az extracelluláris mátrixban. Fontos, hogy a meszesedést kiváltó miliőben növesztett sejtek extracelluláris mátrixában, az NF-κB gén aktivitásának csökkentése gátolta a kalcium depozitumok felhalmozódását (5B. ábra).



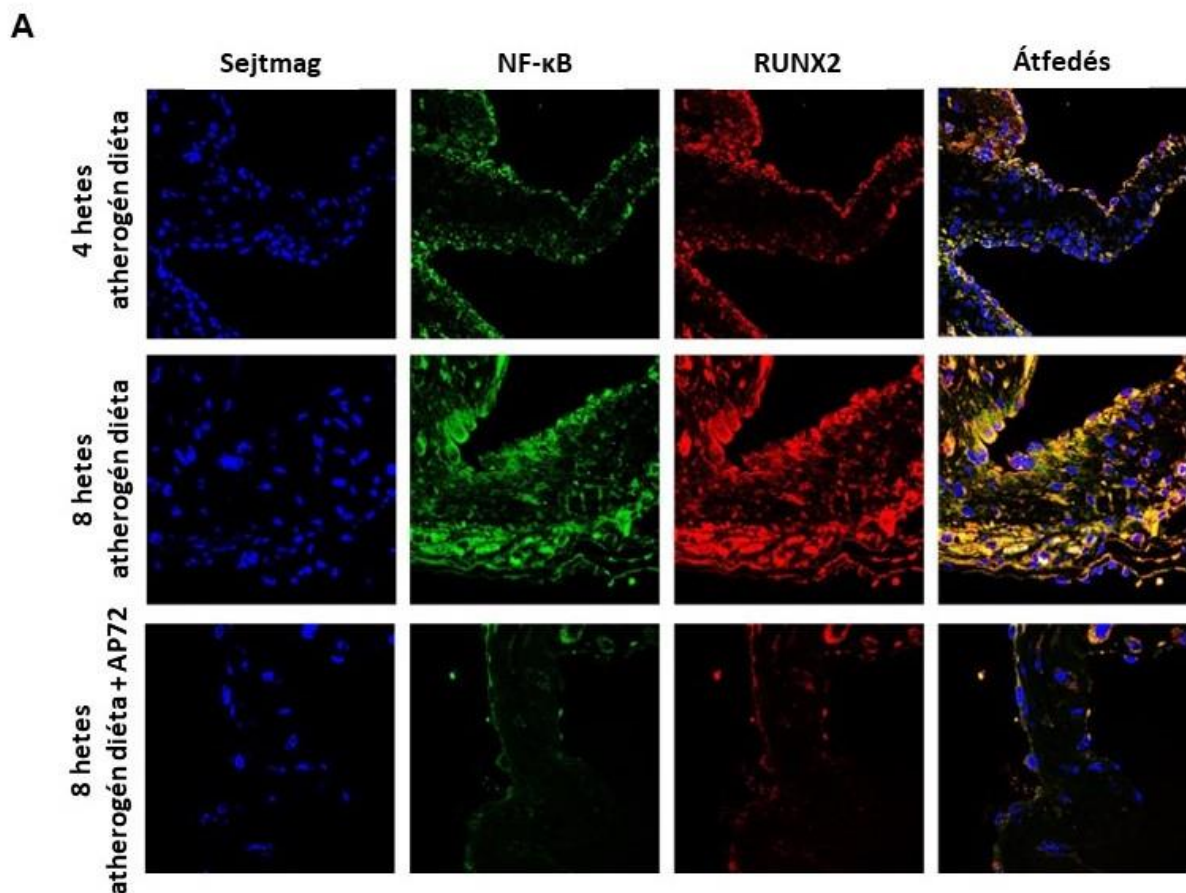


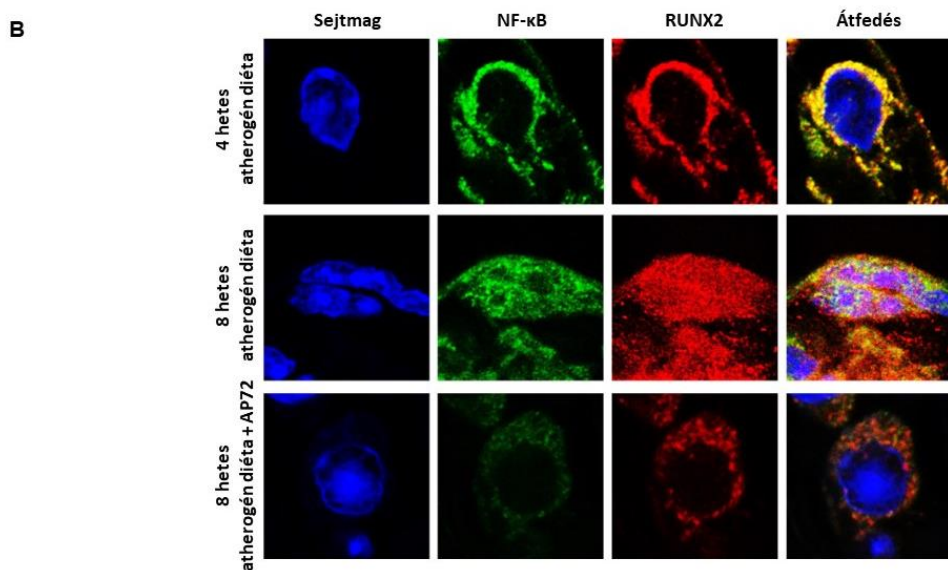
**8. ábra: Az NF-κB géncsökkentés csökkenti a RUNX2 nukleáris transzlokációját.** A VIC sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 5 napig, magas glükózkonzentrációjú növekedési médiumban vagy kalcifikációs tápközegben. Ezt követően az NF-κB-ra specifikus siRNA segítségével géncsökkentést végeztünk. A) Kimutattuk, hogy az NF-κB gén aktivitásának csökkenése gátolta a RUNX2 sejtmagi lokalizációját. Az siRNA hatékonyságának és a hipotézisünk igazolására a VIC sejtekből citoplazmát és sejtmagot izoláltunk, majd Western blot módszert használva, röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá a fehérjesávok intenzitását. A denzitometrálas során a nukleáris frakciók esetében a Lamin B1-re, a citoplazma frakciónál a GAPDH-ra normalizáltunk. B) Az NF-κB géncsökkentés során, szignifikánsan megemelkedett az extracelluláris kalcium tartalom, melynek vizualizálására Alizarin Red S festést végeztünk. A meszesedett területek arányát ImageJ szoftverrel értékeltük ki. Az NF-κB farmakológiai gátlását SC75741 inhibitorral végeztük. C) Az NF-κB és D) a RUNX2 fehérjék expresszióját Western blot technikával mutattuk ki a VIC sejtek citoplazmatikus és sejtmagi frakciójából. A fehérjesávok intenzitását a nukleusz esetében a Lamin B1-re, a citoplazma mintáknál a GAPDH-ra normalizáltuk. Az eredményeket öt független kísérlet átlagértékeként ábrázoltuk. *Ns.*: nem jelentős; \* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ .

### 5.6 ApoE<sup>-/-</sup> egerek szívbillentyű intersticiális sejtjeiben a kalcifikáció során, az NF-κB és a RUNX2 fokozott expressziója és nukleáris kolokalizációja következik be – a kénhidrogén mindkét folyamatot gátolja

A nagy zsírtartalmú étrenden tartott ApoE<sup>-/-</sup> egerekben kialakul a szívbillentyűk meszesedése [118]. Munkacsoportunk korábban a CAVD-ben kimutatta, hogy a szívbillentyűk

meszesedése, súlyos gyulladással jár együtt [137] (4. ábra). Mivel *in vitro* kísérleteinkben a H<sub>2</sub>S gátolta mind az NF-κB, mind a RUNX2 nukleáris transzlokációját, és a RUNX2 sejtmagi lokalizációja NF-κB-függőnek bizonyult, megvizsgáltuk a lokalizációjukat a zsírdús étrenden tartott ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyűiben. A kénhidrogén szabályozó hatását, intraperitoneálisan beadott AP72 donor molekulával modelleztük. Amint azt a kettős immunhisztokémiai festések mutatják, az atherogén étrenden tartott ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyűiben az NF-κB és a RUNX2 expressziója a 8. héten volt a legnagyobb (9A. ábra). A kísérleti állatok AP72-vel való kezelése szignifikánsan gyengébb festődést eredményezett mind az NF-κB, mind a RUNX2 esetében az aortabillentyűk szövetében. Konfokális mikroszkópos vizsgálattal kimutattuk, hogy az NF-κB és RUNX2 transzkripciós faktorok, a 4. héten főleg a sejtek perinukleáris területén lokalizálódtak, majd 8. héten már transzlokálódtak a sejtmagba. A STED nanoszkópia alkalmazása a szívbillentyűmintákon azt mutatta, hogy az NF-κB és a RUNX2 kolokalizálódott a sejtek perinukleáris régióiban és a sejtmagokban (a kolokalizációs arány: 60,75% ± 7%). A zsírdús étrenden tartott ApoE<sup>-/-</sup> egerek AP72-vel történt kezelése, jelentősen csökkentette az NF-κB és RUNX2 sejtmagban való megjelenését (9. A és B. ábra).



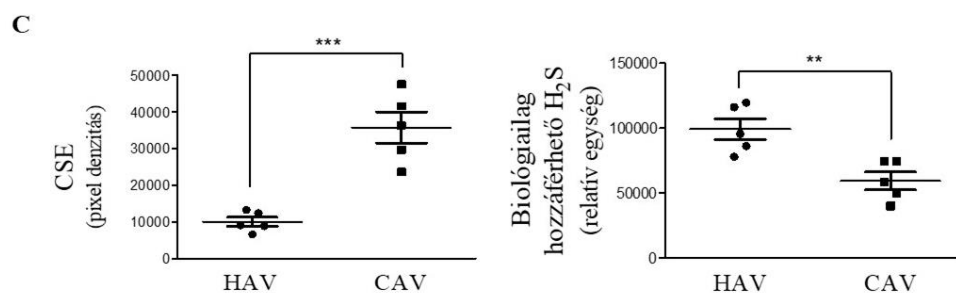
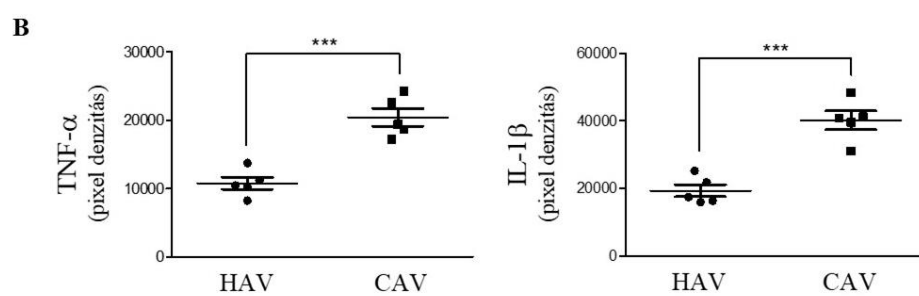
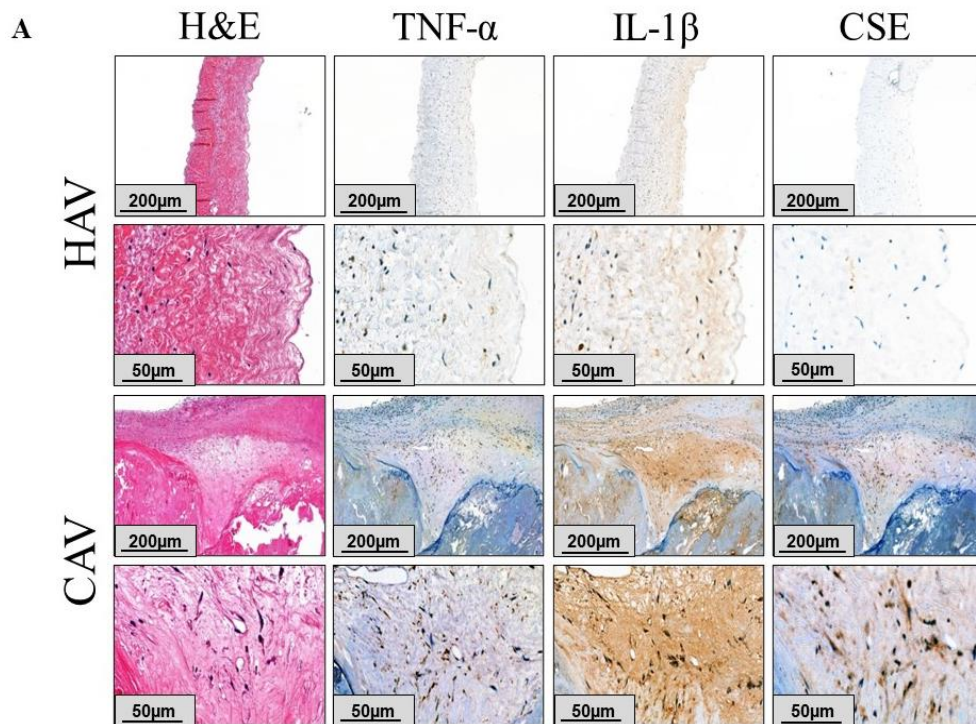


**9. ábra: A kénhidrogén csökkenti az NF-κB és a RUNX2 expresszióját ApoE<sup>-/-</sup> egerek szívbillentyűiben.** ApoE<sup>-/-</sup> egereket 8 hetes koruktól magas zsírtartalmú étrenden tartottuk 8 héten át. A kontroll egereket intraperitoneálisan oltottuk, sóoldattal, 4 vagy 8 hétig. A kontroll csoporttal párhuzamosan a H<sub>2</sub>S-el kezelt kísérleti állatokat szintén intraperitoneálisan injektáltunk AP72-vel 4 vagy 8 hétig. Az ApoE<sup>-/-</sup> egerek szívbillentyű szövetét alkotó intersticiális sejtek sejtmagjait Hoechst 33258-al (DNS, kék szín), az NF-κB-t Alexa Flour 488 másodlagos antitesttel (zöld szín), a RUNX2-t Alexa Flour 647 másodlagos antitesttel (piros szín) jelöltük meg. Az ábrán az NF-κB és a RUNX2 kettős immunfluoreszcens festésből készült reprezentatív, kis felbontású képek (A panel), és a nagy felbontású képek (B panel) láthatóak. A fotókat Leica TCS SP8 kapuzott STED-CW nanoszkópiával készítettük és a Huygens Professional szoftverrel dekonvolváltuk. A képek kiértékeléséhez ImageJ szoftvert alkalmaztunk, és az NF-κB esetében a zöld, a RUNX2 esetében a piros színek intenzitását ábrázoltuk. Fentebbi eredményeink alapján, fontosnak tartottuk bemutatni az NF-κB/sejtmag és a RUNX2/sejtmag kolokalizációs arányát, utalva ezzel a gyulladás és a valvuláris mineralizáció közötti kapcsolatra. A kolokalizációs arányokat ugyancsak ImageJ szoftverrel számítottuk ki. Az eredményeket öt független kísérlet átlagértékeként ismertettük. \*P<0,01; \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001.

### 5.7 A CAVD-ben az emelkedett CSE szint és az alacsony biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S szint együtt jár a proinflammatorikus citokinek fokozott expressziójával

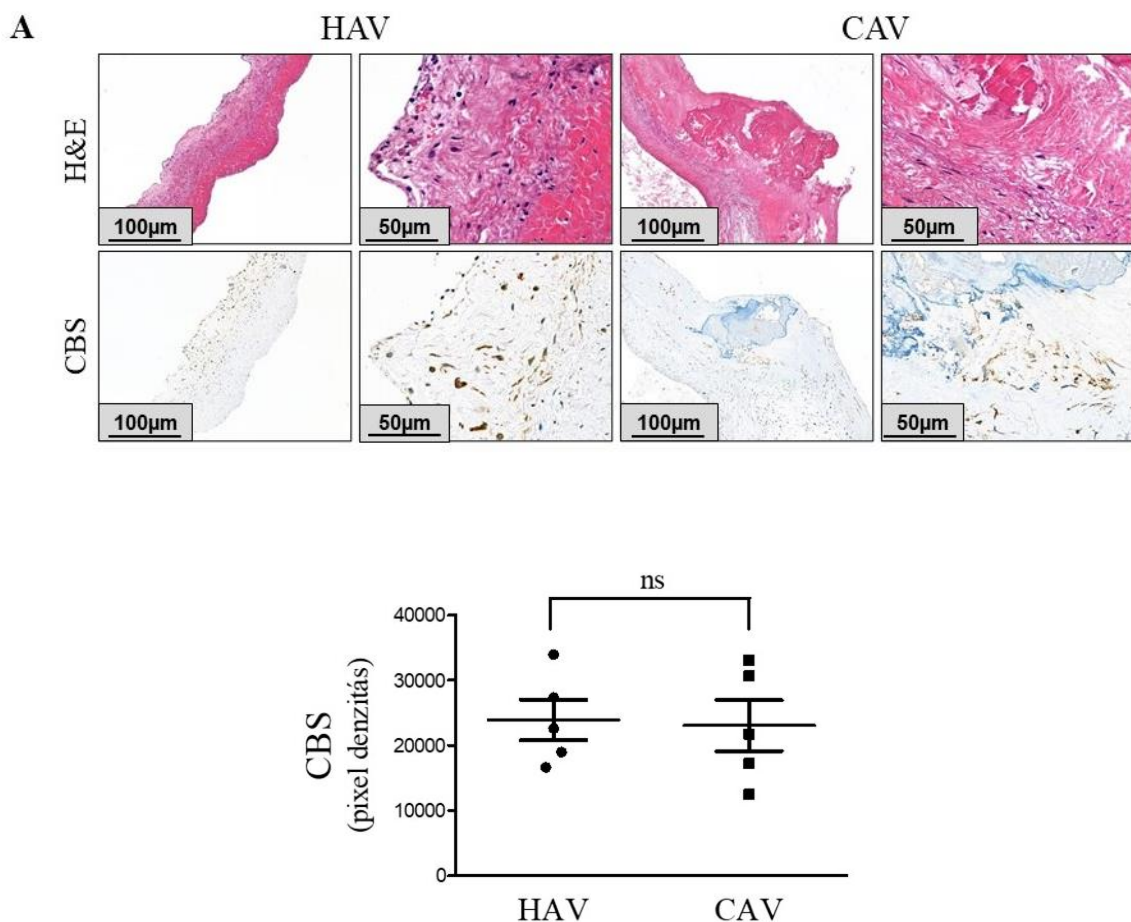
Ismert tény, hogy a CAVD egy gyulladásos betegség [1, 16] és a H<sub>2</sub>S pedig szabályozza a vaszkuláris meszesedést, ezért megvizsgáltuk a proinflammatorikus citokinek és a CSE expresszióját a humán aortabillentyűkben. Az aortabillentyű cserén átesett, súlyos CAVD-el diagnosztizált betegek szívbillentyűit megfestettük IL-1β és TNF-α gyulladást elősegítő citokinekre, valamint CSE-ra. A kontroll mintákhoz egészséges aortabillentyűket kaptunk öngyilkossági vagy traumatikus eseményekben elhunytakból, és a rendelkezésünkre álló információk alapján, szív- és érrendszeri betegségekben nem szenvedtek. Amint az a 10. ábra; A és B panelen látható, a kalcifikációt az IL-1β és a TNF-α proinflammatorikus citokinek fokozott expressziója kísérte a meszes aortabillentyűkben (CAV). Megfigyeltük, hogy a CAVD-el diagnosztizált betegek aortabillentyűiben a CSE-expresszió szignifikánsan megemelkedett

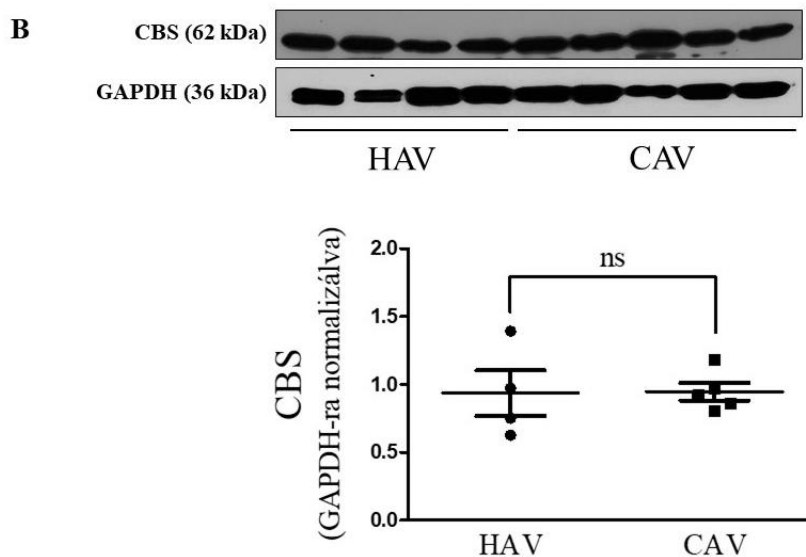
az egészségesekhez képest (10. ábra; A panel/jobb oldal és 10 ábra; C panel/bal oldal). Mivel a CAVD-betegek aortabillentyűiben emelkedett CSE-szintet találtunk, megmértük a biológiailag hozzáférhető  $H_2S$ -szinteket a CAVD-betegekből és az egészséges egyénekből származó szívbillentyű szövetekben. A vizsgálatok kivitelezéséhez folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS/MS) módszert alkalmaztunk. Meglepő módon a CAVD-betegek aortabillentyű szövetében jelentősen alacsonyabb volt a biológiailag hozzáférhető  $H_2S$ -szint, mint a HAV-szövetekben (10. ábra; C panel; jobb oldal).



**10. ábra: A biológiailag hozzáférhető kénhidrogén szint csökkenése és a gyulladással kapcsolatos citokinek nagymértékű expressziója jellemző a humán meszes aortabillentyűkre.** A H&E, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és CSE immunhisztokémiai festéseket végeztünk a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetéből kapott egészséges (HAV; N=5), valamint a teljes aortabillentyű transzplantáción átesett CAVD-val diagnosztizált betegek meszes aortabillentyűin (CAV; N=5), melyeket a Szívsebészeti Intézet biztosított számunkra. Az A, panelen láthatóak a festésekből elkészült kis felbontású (200  $\mu$ m) és a nagy felbontású (50  $\mu$ m) képek. A B, bal oldali panelen a TNF- $\alpha$ , míg a B, jobb oldali panelen az IL-1 $\beta$  szövetmetszetek kvantitatív analízise látható és az ábrázolt pixel denzitási értékek (N=5) számításához ImageJ képelemző szoftvert használtunk. A szövetmetszetek CSE festődésének kvantitatív elemzését szintén ImageJ szoftverrel (N = 5) végeztük (C, bal oldali panel). Az egészséges és a meszes aortabillentyűk (N=5) biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S-szintjeit (C, jobb oldali panel) LC-MS/MS módszerrel mérték és a kapott eredményeket relatív egységben ábrázoltuk. A statisztikai kiértékelések Student-féle t-próbával készültek, és öt független kísérlet átlagértékeként ábrázoltuk. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

A CSE mellett a CBS egy másik enzim, amely katalizálja az endogén kénhidrogén bioszintézisét. Emiatt megvizsgáltuk a CBS expresszióját humán egészséges és meszesedett aortabillentyűkben. Az immunhisztokémiai és Western blot elemzések egyértelműen azt mutatták, hogy a CBS-szint nem változott a CAV-ben a HAV-hez képest (11. ábra A és B panelek).



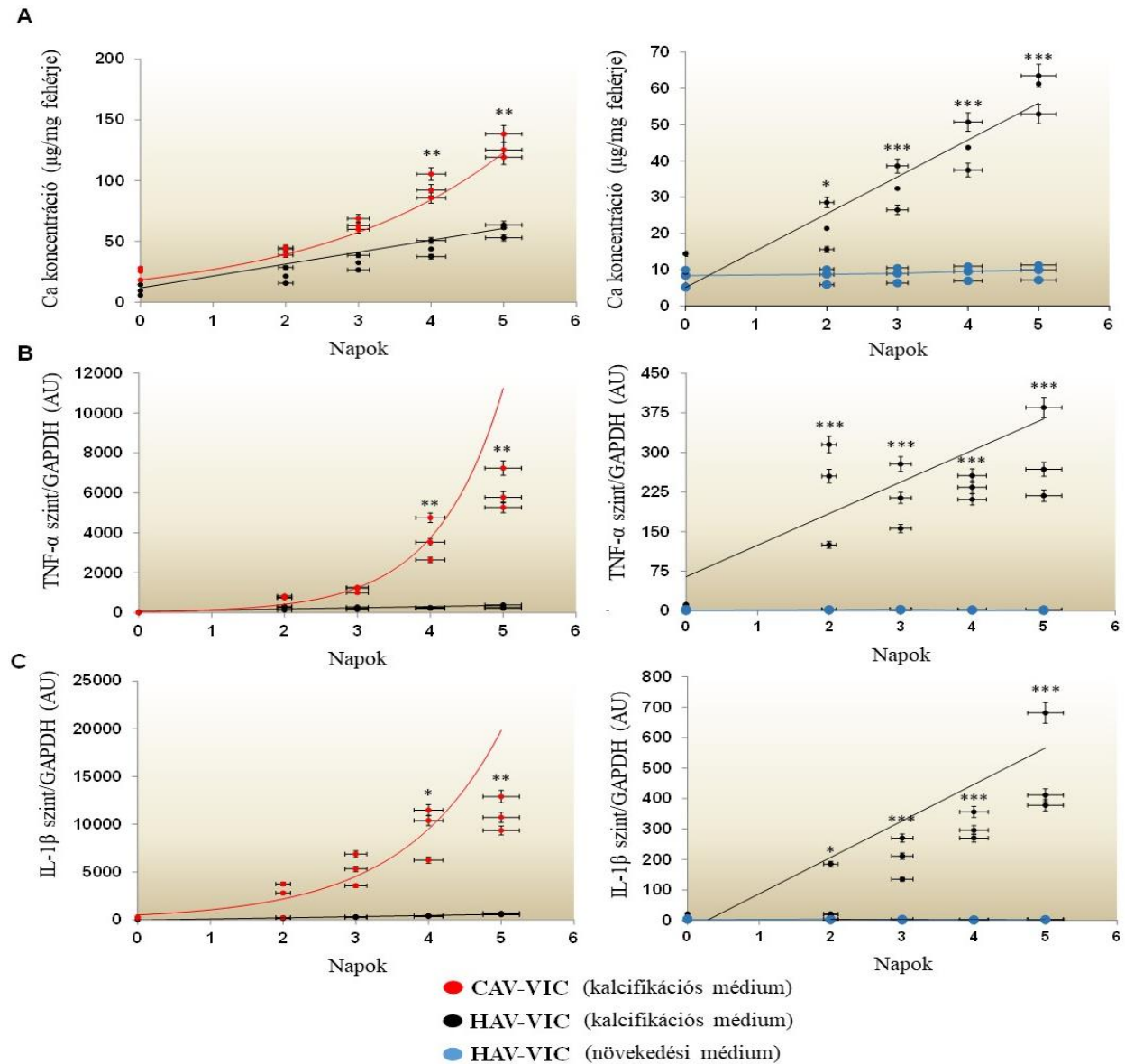


**11. ábra: A cisztationin béta-szintáz expressziója nem változik a CAVD-ben.** (A) Hematoxilin és eozin, valamint CBS immunhisztokémiai (IHC) festéseket végeztünk a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetéből származó egészséges aortabillentyűkön (HAV) (N=5) és a debreceni Egyetem Szívsebészeti Intézete által rendelkezésünkre bocsátott, meszes aortabillentyűkön (CAV), melyek CAVD-el diagnosztizált betegektől származtak, akik teljes aortabillentyű cserén estek át (N=5). A festésekből kis felbontású 100  $\mu\text{m}$ -es és nagy felbontású 50  $\mu\text{m}$ -es képeket készítettünk. (B) A festési eredmények alátámasztására, a HAV (N=4) és a CAV (N = 5) szöveteket kriogén módon porítottuk, majd lízis pufferrel homogenizáltuk, és háromszor 5 másodpercig szonikáltuk, miközben a mintákat jégen tartottuk. Az egészséges (N=4) és a meszesedett (N=5) humán aortabillentyűkből kapott sejt-lizátumokból Western blot technikával is kimutattuk a CBS fehérje expresszióját, melyet GAPDH-ra normalizáltunk. A CBS Western blotok kvantitatív analízisét ImageJ szoftver segítségével készítettük. Az eredményeket Student-féle t-próbával elemeztük, négy és öt független minta átlagértékeként ábrázoltuk. Ns: nem szignifikáns; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5.8 A VIC sejtek mineralizációja és gyulladásoos válasza magas foszfátkoncentrációra

A VIC sejtek mineralizációs potenciáljának és a meszesedést kiváltó ingerekre adott gyulladásoos válaszanak felmérésére a HAV és CAV szövetekből izolált intersticiális sejteket magas foszfátkoncentrációjú környezetnek tettünk ki, amely kiváltja a sejtek oszteoblaszt irányú fenotípus váltását [138]. Amint azt a 11. ábrán a bal oldali panelek mutatják, a CAVD-ben szenvedő betegekből származó VIC sejtekben a túlzott foszfát expozíció robusztus választ váltott ki, ami a kalcium extracelluláris mátrixban történő felhalmozódásában és a gyulladást kiváltó citokinek, az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  emelkedett szintjében tükröződik (piros vonalak). Az egészséges donoroktól származó VIC sejtekben szignifikánsan kevesebb kalciumlerakódást és alacsonyabb IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  expressziót figyeeltünk meg (fekete vonalak), mint a CAVD betegekből származó sejteknél (piros vonalak). Megvizsgáltuk a sejtés válaszokat az egészséges emberekből származó VIC sejtekben (11. ábra, jobb oldali panelek), amelyeket kalcifikációt kiváltó tápközegben tenyésztettünk (fekete vonalak), összehasonlítva a növekedési médiumban tartott sejtekkel (kék vonalak). Figyelembe kell venni, hogy a jobb oldali panelek y tengelyein

lévő értékek lényegesen alacsonyabbak, mint a bal oldali paneleken lévők. Amint a jobb oldali paneleken látható (11. ábra), a nagy foszfát koncentráció eredményeként fokozódott a meszesedés, valamint az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  szintje is megemelkedett a HAV szövetekből származó VIC sejtekben, míg a növekedési médiumban tartott sejtekben a kalcifikációs és a gyulladásos válasz nem aktiválódott (kék vonalak).



**11. ábra: A szívbillentyű intersticiális sejtek mineralizációs potenciálja és gyulladásos válasza magas foszfátszintre.** A meszes (CAV-VIC) és az egészséges aortabillentyűkből (HAV-VIC) izolált intersticiális sejteket (VIC) 2,5 mmol/L szervesen foszfáttal és 1,8 mmol/L kalcium-kloriddal kiegészített meszesedést kiváltó médiumban tenyésztettük 5 napon keresztül. Az A panelen a kalcifikációs vagy növekedési tápfolyadékban növesztett VIC sejtekből mért, és a fehérje tartalomra normalizált extracelluláris mátrix kalciumtartalma látható (n=3). A kalcifikációs vagy növekedési tápközegben tenyésztett VIC sejtek GAPDH-ra normalizált TNF- $\alpha$  szintjeit (n=3) ábrázoltuk a B panelen. A kalcifikációs médiumban vagy növekedési médiumban tenyésztett VIC sejtek GAPDH-ra normalizált IL-1 $\beta$  szintjeit (n=3) a C panelen szemléltettük. A piros vonalak a meszesedést indukáló tápközegben tenyésztett CAV-VIC-et, a fekete vonalak a meszesedést indukáló tápközegben tenyésztett HAV-VIC-

et, míg a kék vonalak a növekedési médiumban tenyésztett HAV-VIC-et jelölik. Az eredményeket Student-féle t-próbával elemeztük, és három független kísérlet átlagértékeiként ábrázoltuk. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

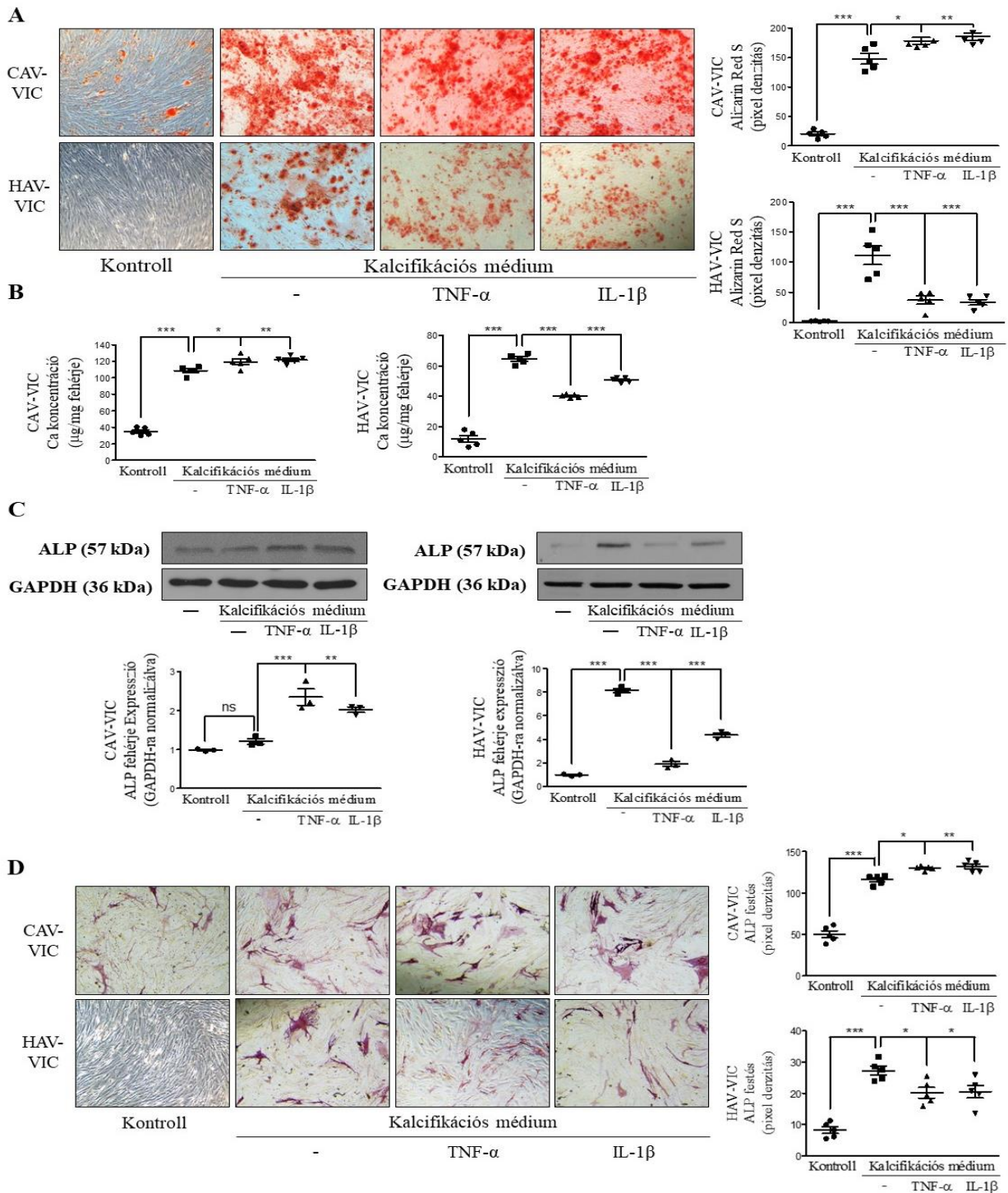
### **5.9 A proinflammatorikus citokinek fokozzák a CAVD betegekből származó VIC sejtek mineralizációját**

A proinflammatorikus citokinek központi szerepet játszanak a CAVD kialakulásában és progressziójában, ezért megvizsgáltuk, hogy az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  citokinek fokozzák-e az emelkedett foszfáttartalom által kiváltott meszesedést a VIC sejtekben. Amint a 12. ábra; A felső paneljén és a B bal oldali paneljén látható, a CAVD-betegekből származó VIC sejtek foszfáttal kezelése, kiváltotta a kalcium depozitumok lerakódását az extracelluláris mátrixban. Az IL-1 $\beta$  vagy a TNF- $\alpha$  proinflammatorikus citokinekkel történt kezeléseket követően a kalcium fokozott felhalmozódását tapasztaltuk ezekben a sejtekben a csak foszfáttal kezelt sejtekhez képest (12. ábra; A felső panelje és a B bal oldali panelje). Ennek megfelelően a CAVD-s betegek VIC sejtjeiben, az IL-1 $\beta$  vagy TNF- $\alpha$  kezelés a nagy foszfátkoncentrációjú tápközegben tovább növelte az alkalikus foszfatáz enzim expresszióját, amit a Western blot analízis is alátámasztott (12. ábra; C bal oldali panelje), és ezt a fokozott indukciót az ALP-festés is igazolta (12. ábra; D felső panelek). Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a hipotézisünkkel, hogy a VIC-ek oszteoblaszt fenotípussá történő transzdifferentiálódása összefügg a gyulladással.

### **5.10 Az egészséges aortabillentyűkből származó VIC sejtekben a meszesedés átmeneti gátlását a proinflammatorikus citokinek okozzák**

Meglepetésünkre, amikor a HAV szövetekből származó VIC sejteket IL-1 $\beta$  vagy TNF- $\alpha$  proinflammatorikus citokinekkel kezeltük, a nagy foszfát koncentráció által kiváltott meszesedés nem következett be. Amint az a 12. ábra; A alsó paneljein és a B jobb oldali paneljein látható, a magas foszfáttartalmú közegben tenyésztett egészséges aortabillentyűkből származó VIC sejtek extracelluláris mátrixában fokozódott a kalcium felhalmozódása (második panel). Fontos megfigyelés a 12. ábra; A alsó harmadik és negyedik paneljei és a B jobb paneljei alapján, hogy az 5 napig, IL-1 $\beta$  vagy TNF- $\alpha$  kezelésnek kitett sejtekben, szignifikánsan csökkent a kalcium lerakódása, ugyanakkor ez az anti-kalcifikációs hatás a 14. napon már nem volt kimutatható (13. ábra; A panel). Ennek megfelelően mindkét proinflammatorikus citokin gátolta az oszteoblaszt-specifikus gén, az ALP expresszióját, amit a Western blot analízis (12. ábra C jobb panelje) és az ALP-festések (12. ábra; D alsó paneljei) is igazoltak. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az egészséges aortabillentyűkből származó VIC sejtekben, az IL-1 $\beta$  és a

TNF- $\alpha$  kezelés, átmenetileg képes gátolni a magas foszfátszint által kiváltott oszteoblaszt irányú fenotípus váltást.

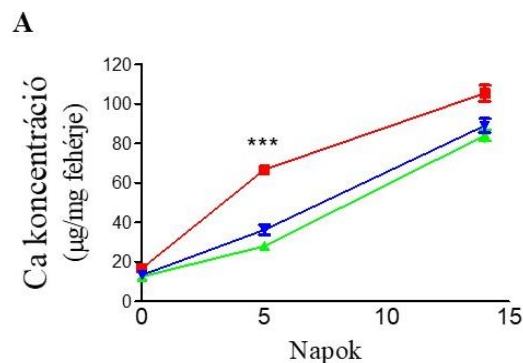


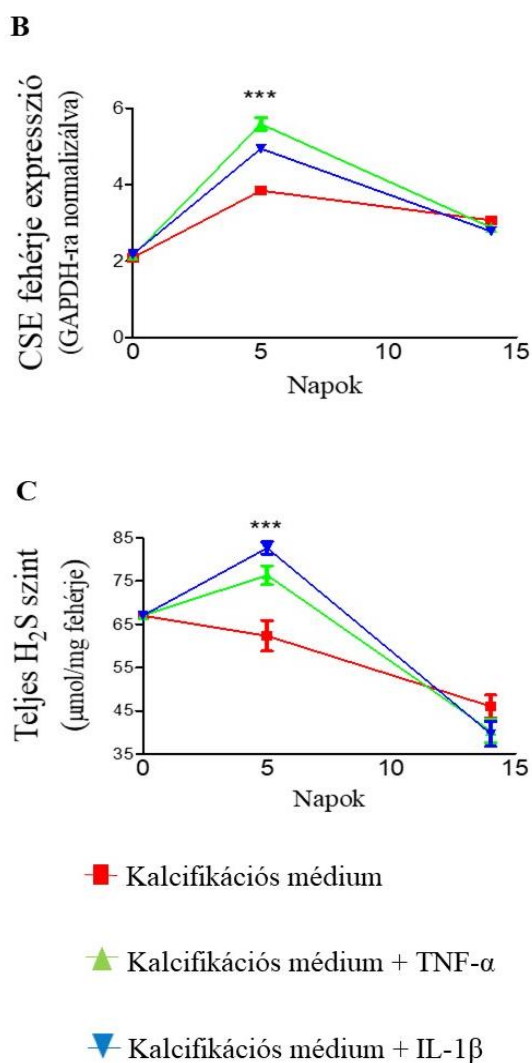
**12. ábra: A szívbillentyű intersticiális sejtek jellegzetes meszesedési reakciója a proinflammatorikus citokinekre a betegség állapotától függően.** A meszes aortabillentyűkből (CAV-VIC) vagy az egészséges aortabillentyűkből (HAV-VIC) izolált intersticiális sejteket (VIC) növekedési médiumban, vagy 2,5 mmol/L szervetlen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó médiumban tenyésztettük 5 napig, minden második nap megismételve a kezeléseket. A kalcifikációs médiumban tartott VIC sejteket TNF- $\alpha$  (10 nmol/L) vagy IL-1 $\beta$  (10 nmol/L) proinflammatorikus citokinekkal kezeltük 5 napon keresztül. Az A panelen a CAV-VIC sejtek (felső panelek) és a HAV-VIC sejtek (alsó panelek) extracelluláris mátrixában felhalmozódó kalcium depozitumok

Alizarin Red S-el történt festése látható. A meszesedett területek vörös színűre festődtek, melyek kvantitatív elemzését ImageJ szoftver alkalmazásával végeztük (n=5). A B panelen a CAV-VIC és HAV-VIC sejtek fehérjére normalizált extracelluláris kalciumtartalmát szemléltettük (n=5). A C panelen a CAV-VIC sejtek (bal oldali panelek) és a HAV-VIC sejtek (jobb oldali panelek) GAPDH-ra normalizált ALP fehérje expresszióját Western blot módszerrel határoztuk meg (n=3). Az ALP Western blotok kvantitatív analízisét ImageJ szoftver alkalmazásával számítottuk ki. A D panelen a CAV-VIC sejtek (felső panelek) és a HAV-VIC sejtek (alsó panelek) ALP-festése látható. A CAV-VIC sejtek és HAV-VIC sejtek ALP-festődésének kvantitatív elemzését ugyancsak az ImageJ szoftverrel számítottuk ki (n=5). Az eredmények kiértékelésénél egyszempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztünk, kiegészítve Bonferroni többszörös összehasonlítási utó teszttel, és három (C panel) vagy öt (A, B, D panelek) egymástól független kísérlet átlagértékeit ábrázoltuk. Az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  kezeléseket a kalcifikációs médiummal hasonlítottuk össze. Ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 5.11 A CSE/H<sub>2</sub>S szabályozza a humán egészséges aortabillentyűből származó VIC sejtek meszesedésének IL-1 $\beta$ és TNF- $\alpha$ által kiváltott átmeneti gátlását

Az előző eredmények alapján, a HAV-VIC sejtekben a foszfát-indukálta meszesedés progresszióját, a proinflammatorikus citokinek átmenetileg képesek gátolni. Azonban a folyamat háttérében álló molekuláris mechanizmusok nem ismertek, ezért feltárásukra módosított metilénkék módszerrel megvizsgáltuk a sejtekben endogén úton képződött H<sub>2</sub>S szinteket. A nagy foszfáttartalmú tápközegben tartott egészséges aortabillentyűkből izolált VIC sejtekben a teljes H<sub>2</sub>S-szint fokozatos csökkenését figyeltük meg (13. ábra; C. panel). Ezzel szemben a proinflammatorikus IL-1 $\beta$  vagy TNF- $\alpha$  citokinekkal kezelt sejtekben a kénhidrogén szint az 5. napig emelkedett, majd azt követően a 14. napra fokozatosan lecsökkent (13. ábra; C panel). Korábban számos aktivátort, köztük az IL-1 $\beta$ -t vagy a TNF- $\alpha$ -t azonosítottunk, melyek képesek a CSE enzim expresszióját indukálni vaszkuláris sejtekben [135]. Ezért megvizsgáltuk a CSE enzim expressziójának változását HAV-VIC sejtekben. Mind az IL-1 $\beta$ , mind a TNF- $\alpha$  szignifikánsan növelte a CSE enzimfehérje szintjét a HAV-VIC sejtekben (13. ábra; B panel), ami a mineralizáció CSE által közvetített szabályozására utal az endogén H<sub>2</sub>S termelésén keresztül.



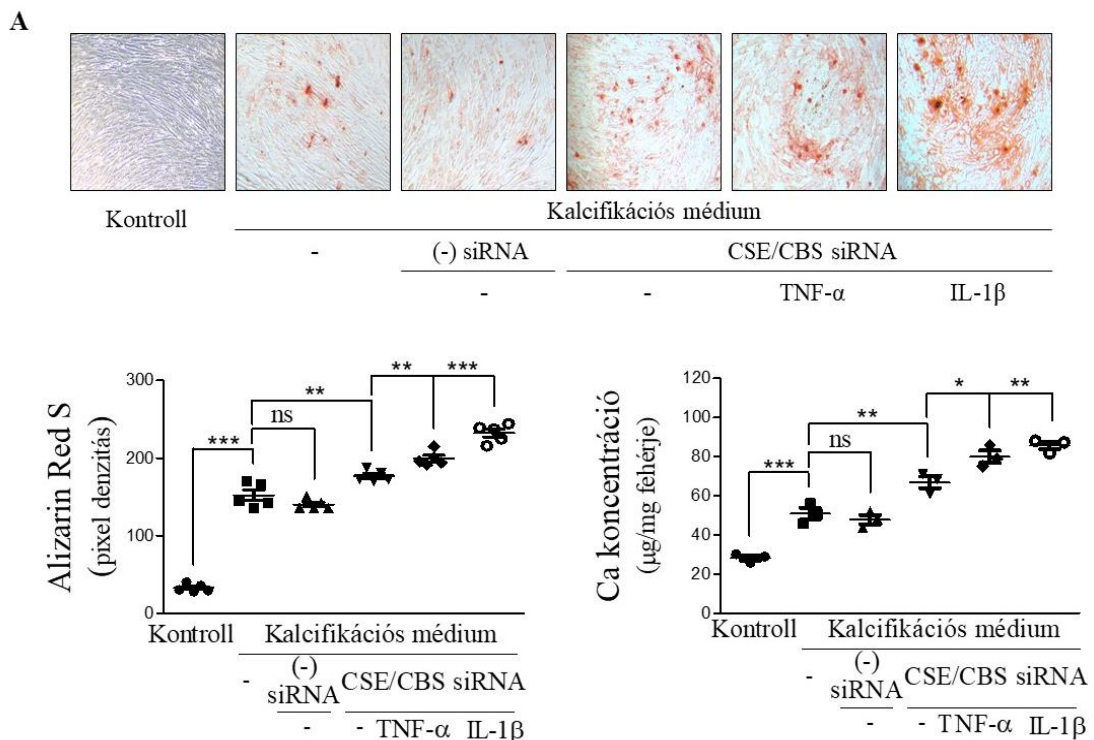


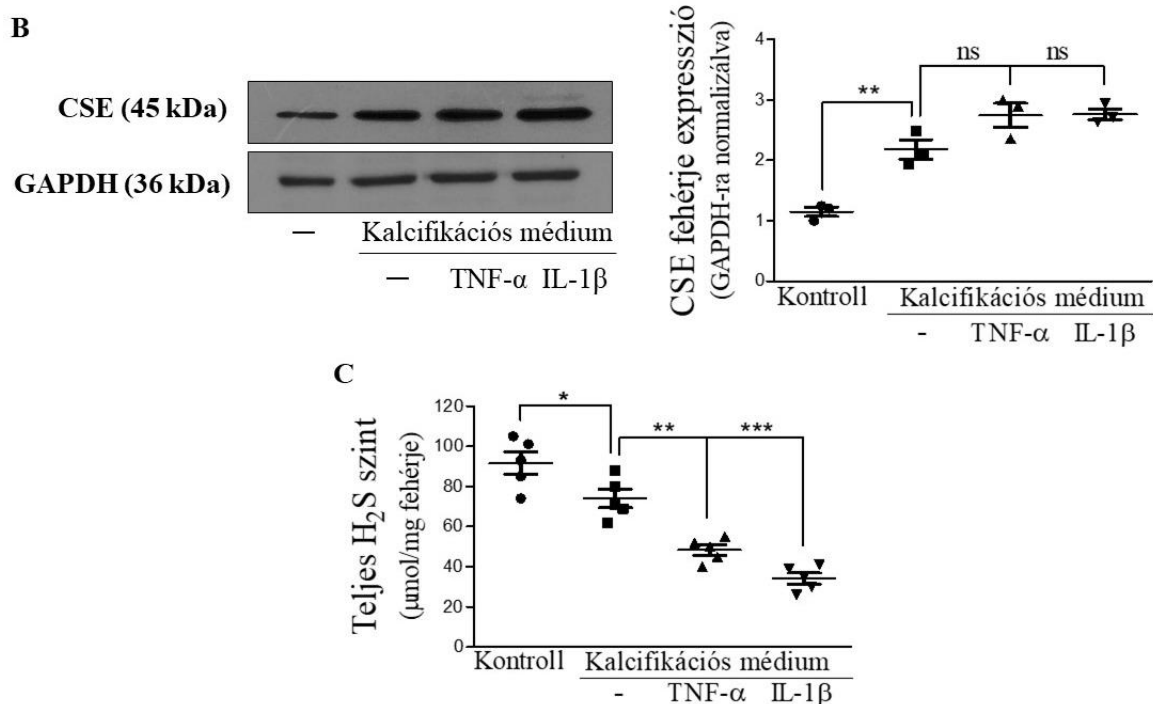
**13. ábra: Az aortabillentyű intersticiális sejtek meszesedésének proinflammatorikus citokinek által kiváltott átmeneti gátlása fokozott cisztationin- $\gamma$ -liáz expresszióval és H<sub>2</sub>S-termeléssel jár együtt.** Az egészséges aortabillentyűkből (HAV-VIC) izolált intersticiális sejteket 2,5 mmol/L szervesen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban tenyésztettük 5 és 14 napon keresztül, és a kezeléseket kétnaponta megismételtük. A kalcifikációs tápközegben növesztett VIC sejtek két másik csoportját TNF- $\alpha$ -val (10 nmol/L) vagy IL-1 $\beta$ -val (10 nmol/L) szupplementáltuk 5 és 14 napig. Az A panelen a HAV-VIC sejtek extracelluláris mátrixának a fehérjetartalomra normalizált kalcium koncentrációja látható, az idő függvényében (n=3). A B panelen a GAPDH-ra normalizált CSE fehérje expresszióját szemléltetjük HAV-VIC sejtekben, amelyeket TNF- $\alpha$ -val (10 nmol/L) vagy IL-1 $\beta$ -val (10 nmol/L) kiegészített vagy a proinflammatorikus citokinek nélküli kalcifikációs médiumban tenyésztettük 5 és 14 napig (n=3). A CSE fehérje expresszióját az idő függvényében, a Western blotok denzitási értékei alapján ábrázoltuk. A C panelen a módosított metilénkék módszerrel meghatározott és a HAV-VIC sejtek fehérje tartalmára normalizált H<sub>2</sub>S képződést mutatjuk az idő függvényében (n=3). Az eredmények kiértékelésénél egyszempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztünk, kiegészítve Bonferroni többszörös összehasonlítási utó teszttel, és három egymástól független kísérlet átlagértékeit ábrázoltuk. Ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Korábban megfigyeltük, hogy az endogén kénhidrogén termelés mérséklése a CSE és a CBS kénhidrogén termelő enzimek expressziójának csökkentésével elősegíti a VIC-ek kalcifikációját [118]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a proinflammatorikus citokinek átmeneti,

meszesedést gátló hatása függ-e a CSE-szinttől. Azt az eredményt kaptuk, hogy a meszesedést kiváltó környezetben, amikor 5 napig a CSE és CBS génekre specifikus, kis interferáló RNS-ek használatával csökkentettük a kénhidrogén termelő enzimek expresszióját, mind az IL-1 $\beta$ , mind a TNF- $\alpha$  proinflammatorikus citokinek elvesztették a kalcifikációt gátló hatásukat, amit a HAV sejtek extracelluláris mátrixában végbement kalcium lerakódás jelentős növekedése tükrözött (14. ábra; A panel).

Megvizsgáltuk, hogy a CAVD-betegek aortabillentyűből izolált intersticiális sejtekben, a CSE-szintje emelkedett-e a proinflammatorikus citokin kezelés hatására. Amint az a 14. ábra; B paneljén látható, míg az inorganikus foszfát önmagában adva, jelentősen megnövelte a CSE fehérje expresszióját, addig sem az IL-1 $\beta$ , sem a TNF- $\alpha$  nem változtatta meg a szintjét. Ezzel szemben a nagy foszfáttartalmú médiumban tenyésztett intersticiális sejtekben a módosított metilénkék módszerrel mért teljes H<sub>2</sub>S szint szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll médiumban tartott sejtekhez képest (14. ábra; C panel). Ezen túlmenően, amikor a kalcifikációs médiumot kiegészítettük IL-1 $\beta$ -val vagy TNF- $\alpha$ -val, a citokin kezelés tovább csökkentette a teljes, endogén H<sub>2</sub>S szintet (14. ábra; C panel).



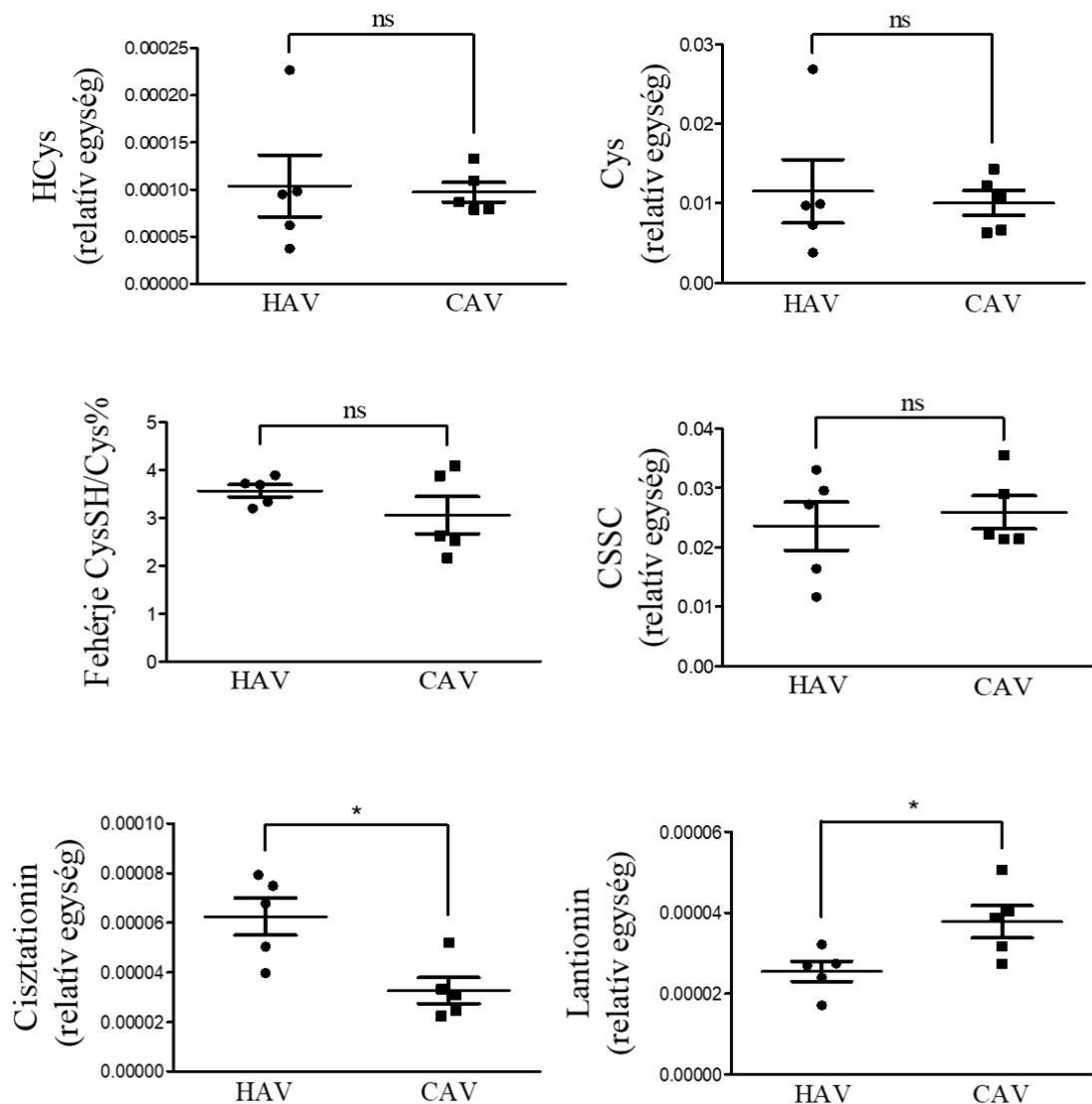


**14. ábra:** Az egészséges aortabillentyűből származó intersticiális sejtekben, a cisztationin- $\gamma$ -liáz által termelt kénhidrogén közvetíti a kalcifikáció átmeneti gátlását, és ezt a hatást a proinflammatorikus citokinek váltják ki. Egészséges aortabillentyűkből izolált intersticiális sejtekben (HAV-VIC) a CSE és CBS endogén kénhidrogén termelő enzimek expresszióját géncsendesítéssel csökkentettük. A géncsendesítés után a sejteket növekedési médiumban, vagy 2,5 mmol/L szervesen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban önmagában, vagy kiegészítve TNF- $\alpha$ -al (10 nmol/L) vagy IL-1 $\beta$ -al (10 nmol/L) tenyésztettük 5 napig. A kezeléseket kétnaponta megismételtük. Az A panelen a HAV-VIC sejtek extracelluláris mátrixában felhalmozódott kalcium depozitumok Alizarin Red S festődése látható (felső panel), melynek kvantitatív elemzését (bal oldali panel) ImageJ szoftverrel végeztük (n=5). A jobb oldali panelen, a HAV-VIC sejtek fehérje tartalmára normalizált extracelluláris mátrix kalciumtartalmát mutattuk be (n=3). A B panelen a meszes aortabillentyűkből izolált intersticiális sejtekben (CAV-VIC), Western blot módszerrel meghatározott és GAPDH-ra normalizált CSE fehérjeszinteket elemeztük (n=3). A CSE Western blotok kvantitatív analízisét ImageJ szoftverrel számítottuk ki (n=3). A C panelen a módosított metilénkék módszerrel mért és a CAV-VIC sejtek fehérje tartalmára normalizált H<sub>2</sub>S termelődést szemléltettük (n=5). Az eredmények kiértékelésénél egyszempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztünk, kiegészítve Bonferroni többszörös összehasonlítási utó teszttel, és három vagy öt egymástól független kísérlet átlagértékeit ábrázoltuk. Ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 5.12 A H<sub>2</sub>S mitokondriális metabolizmusa megnövekedett a CAVD-betegek aortabillentyűiben

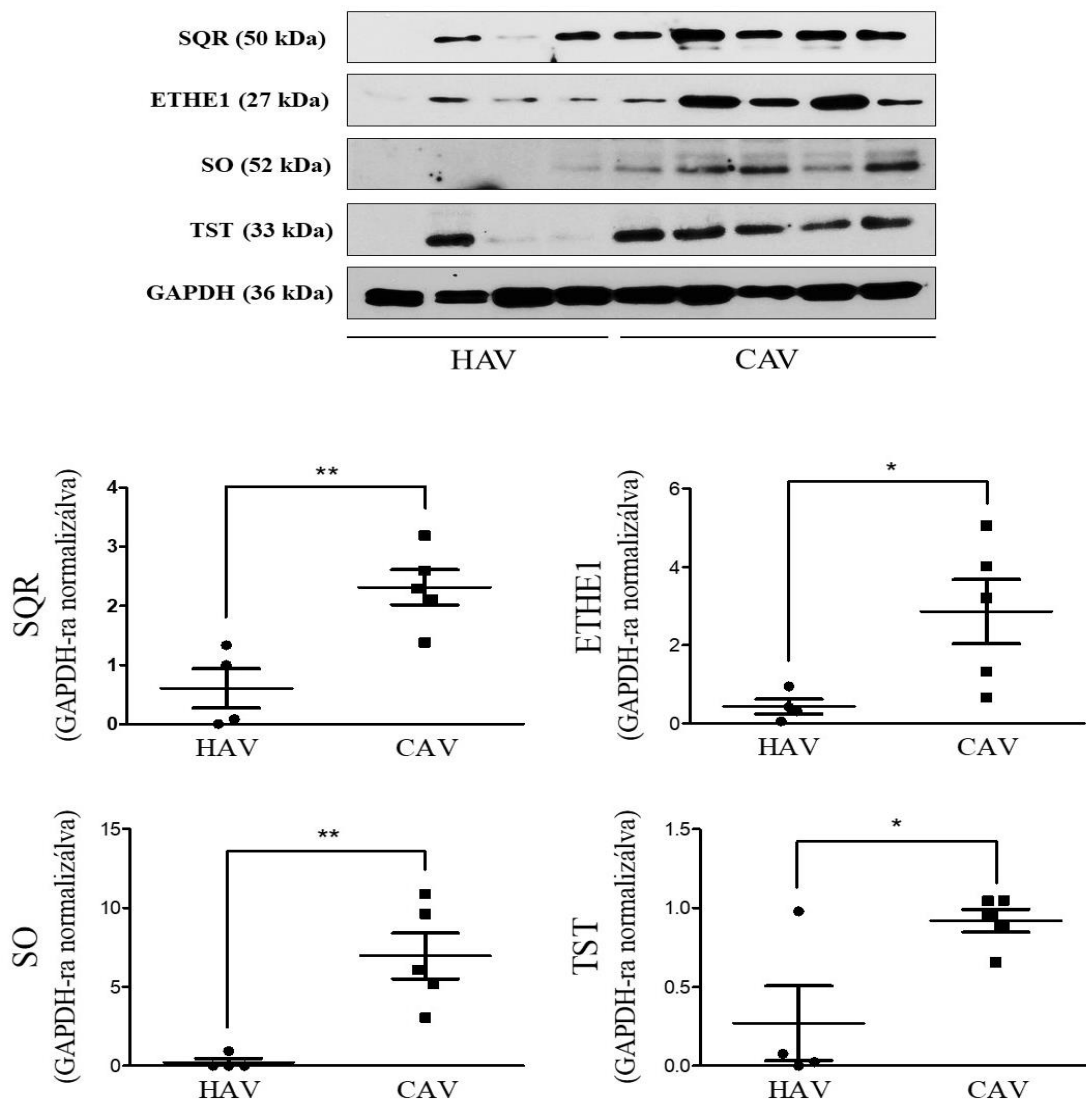
A CSE fokozott expresszióját, csökkent H<sub>2</sub>S-szint kísérte a CAVD-betegek aortabillentyűiben az egészséges kontrollokhoz képest (10 ábra; C panel). Ez az ellentmondásos megfigyelés arra utalhat, hogy a CSE aktivitása csökken a CAVD betegek aortabillentyű szöveteiben, ami csökkent H<sub>2</sub>S-termeléshez vezet. Ezért, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a transzszulfurációs folyamat enzimaktivitásaiba, kén metabolom elemzéseket végeztünk. A cisztein, és a homocisztein szintje hasonló volt, míg a cisztationin szintje alacsonyabb volt a

CAVD-betegek aortabillentyűiben, mint az egészséges aortabillentyűkben (15. ábra). Ezek az analitok nem csak szubsztrátok, hanem különböző enzimátikus útvonalakon a CSE és más transzszulfurációs enzimek termékei is lehetnek, így egymással összekapcsolt enzimátikus útvonalakon keletkeznek és használják fel őket. A lantionin leginkább a CSE enzim  $H_2S$ -termelésének a mellékterméke, amely akkor keletkezik, amikor az enzim 2 cisztein molekulát használ fel a kénhidrogén szintézishez. Ezért megmértük a lantionin szintet az aortabillentyűk szöveteiben. Fontos, hogy a CAVD-betegek aortabillentyűiben a lantionin szint magasabb volt, mint az egészséges aortabillentyűkben (15. ábra).



**15. ábra: A meszesedett humán aortabillentyűkben a cisztationin- $\gamma$ -liáz enzim aktívan működik.** Az egészséges (HAV) (N=5) és a meszesedett aortabillentyűket (CAVD) (N=5) kriogén módon porítottuk, és CHAPS vagy RIPA pufferben (CysSH/Cys arányok) újraszuszpendáltuk, majd 10 másodpercig, folyamatosan jégen tartva ultrahanggal szonikáltuk. Az ábrán az egészséges és a meszesedett aortabillentyűk Cys, CSSC, HCys, cisztationin, lantionin szintjeit és a fehérje CysSH/Cys arányát mutattuk be. A méréseket LC-MS/MS módszer alkalmazásával végezték a Budapesti Onkológiai Intézetben. A statisztikai kiértékelések Student-féle t-próbával készültek, és öt független mérés átlagértékeként ábrázoltuk. Ns: nem szignifikáns; \* $p < 0,05$ .

Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a CSE enzim működőképes a CAVD-betegek aortabillentyűiben. Erre a megfigyelésre alapozva feltételeztük, hogy a kalcifikált aortabillentyűkben, a biológiailag hozzáférhető kénhidrogén alacsonyabb szintje, fokozott CSE-expresszió mellett, a H<sub>2</sub>S megnövekedett metabolikus fluxusának a következménye. Ezért megvizsgáltuk az SQR, ETHE1, SO és TST fehérjék expresszióját, amelyek a H<sub>2</sub>S mitokondriális katabolizmusában részt vevő kulcsfontosságú enzimek. Amint azt a 16. ábra mutatja, ezen enzimek expressziója szignifikánsan magasabb volt a CAVD-betegek meszesedett aortabillentyűiben, mint az egészséges aortabillentyűkben, ami valóban a kénhidrogén katabolizmus megnövekedett sebességére utal. Ez megmagyarázhatja a megemelkedett CSE expresszió mellett megfigyelt, alacsonyabb biológiailag hozzáférhető kénhidrogén szinteket.

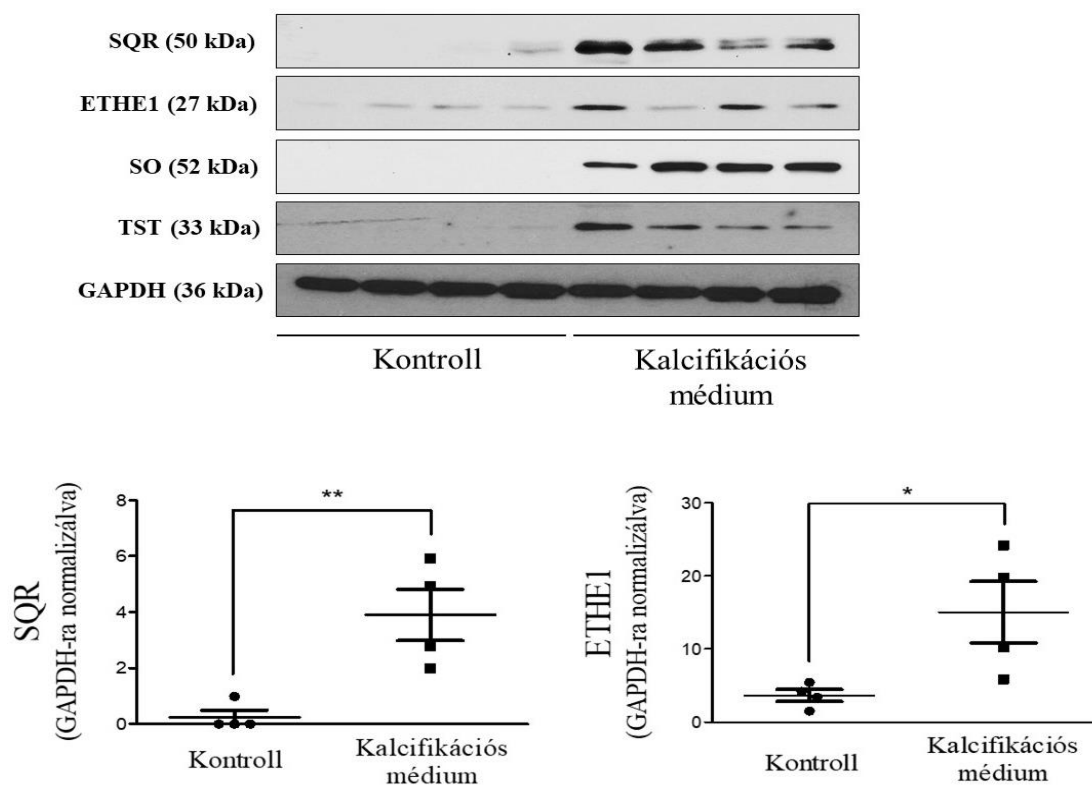


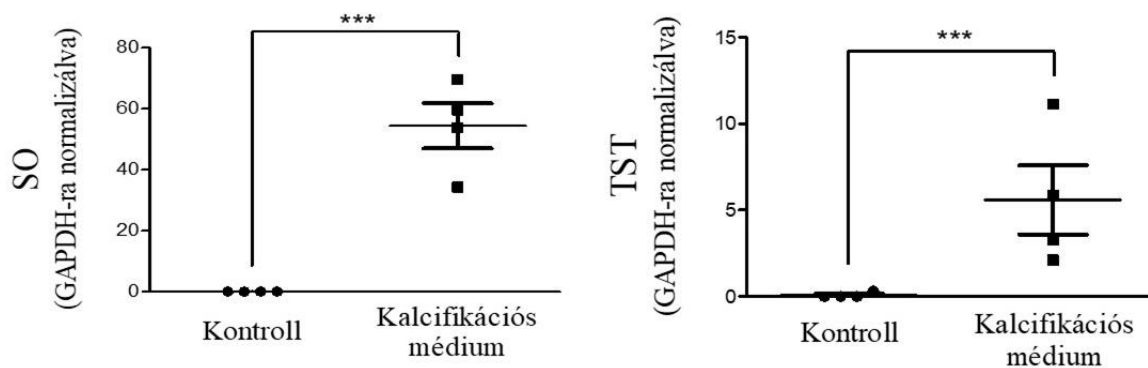
16. ábra: A H<sub>2</sub>S-anyagcserében részt vevő mitokondriális enzimek felregulálódnak a humán kalcifikált aortabillentyűkben. A humán egészséges (HAV) (N=4) és a kalcifikált aortabillentyűket (CAV) (N=5) kriogén

módon porítottuk, majd lízispuffer használatával lízáltuk a szöveteket. Ezt követően háromszor 5 másodperces ultrahangos kezelést végeztünk, miközben a mintákat folyamatosan jégen tartottuk. A humán egészséges (N=4) és a kalcifikált aortabillentyűkben (N=5, a) a GAPDH-ra normalizált SQR, ETHE1, SO és TST enzimfehérjék expresszióját Western blot módszerrel határoztuk meg. A Western blotok kvantitatív elemzését ImageJ szoftverrel végeztük. A denzitometriai eredményeket Student-féle t-próbával értékeltük ki, és öt független mérés átlagértékeként ábrázoltuk. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Ezek az enzimek a cisztein-perszulfid metabolizmusában is részt vesznek [134, 139], ezért a transzperszulfidációs reakciókat figyelembe véve megmértük a fehérje perszulfidáció szintjét az egészséges és a kalcifikált aortabillentyűkben. Amint azt a 15. ábrán bemutattuk, nem találtunk szignifikáns különbséget a fehérjék perszulfidációs (CysSH/Cys%) szintjei tekintetében az egészséges és kalcifikált aortabillentyűk között.

Mivel a vaszkuláris kalcifikáció egyik legerősebb ismert induktora a megemelkedett szérum foszfátszint [34, 138, 140], ezért megvizsgáltuk, hogy a VIC-ek túlzott foszfátexpozíciója megváltoztatja-e, a H<sub>2</sub>S oxidációjában szerepet játszó mitokondriális enzimek expresszióját. Fontos, hogy a foszfátban gazdag médiumban tenyésztett egészséges VIC sejtek fokozott SQR, ETHE1, SO és TST expressziót mutattak. Ezek az eredmények, valamint az a megfigyelés, hogy a kontroll körülményekhez képest a 14 napig magas foszfáttartalmú tápfolyadékban tenyésztett HAV-VIC sejtek fokozott CSE-expressziót és alacsonyabb H<sub>2</sub>S szintet mutattak (13. ábra; B és C panelek, 14. ábra B és C panelek), arra utal, hogy a nagy foszfát expozíció valóban magasabb szulfid-fluxust indukál.



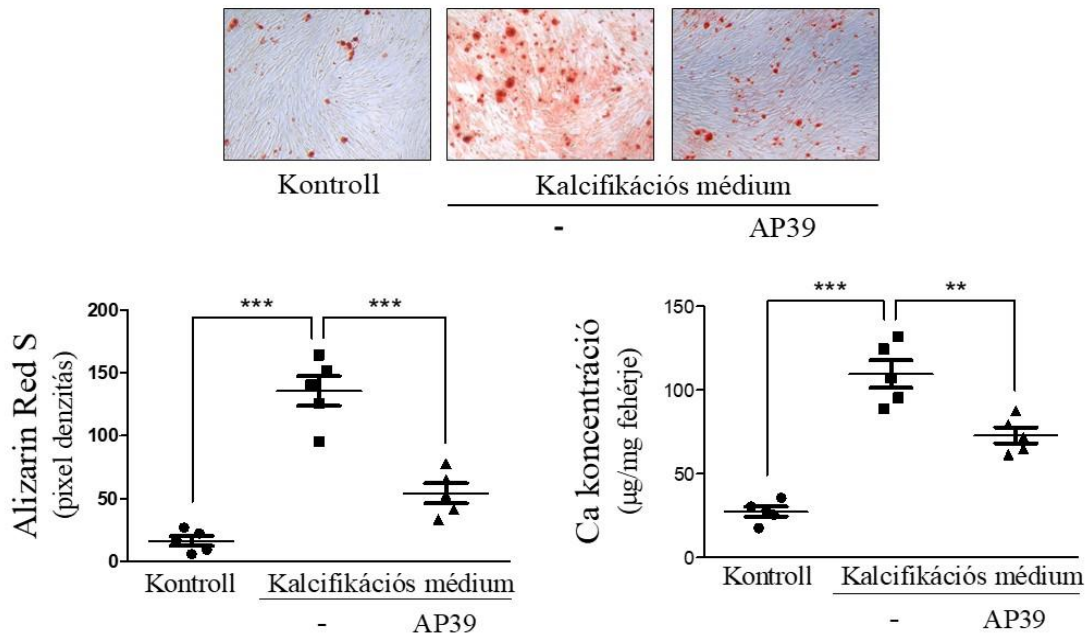


**17. ábra:** Az egészséges aortabillentyűk intersticiális sejtjeiben, a kalcifikációt kiváltó ingerek hatására fokozódik az SQR, ETHE1, SO és TST enzimek expressziója. Az egészséges aortabillentyűkből (HAV-VIC) izolált intersticiális sejteket növekedési médiumban, vagy 2,5 mmol/L szervesen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban tenyésztettük 5 napig, és minden második napon cseréltük a tápfolyadékot. A kontroll és a kalcifikált sejtizátumokból a GAPDH-ra normalizált SQR, ETHE1, SO és TST fehérjék expressziós profilját Western blot módszerrel határoztuk meg (N=4). Az SQR, ETHE1, SO és TST Western blotok kvantitatív elemzését ImageJ szoftverrel elemeztük ki (N=4). A kapott denzitometrálnálási eredményeket Student-féle t-próbával értékeltük ki, és négy független mérés átlagértékéként ábrázoltuk. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

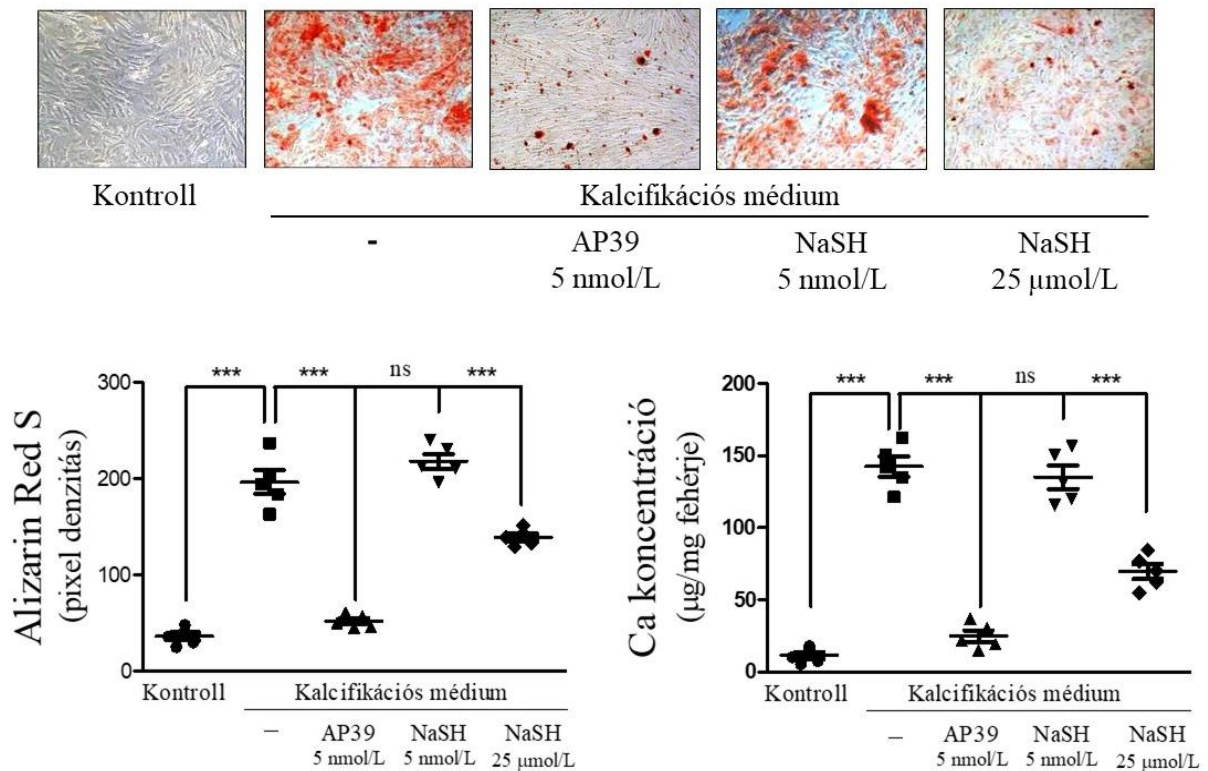
### 5.13 A mitokondriális kénhidrogén donor gátolja a magas foszfátszint által kiváltott kalcifikációt a humán aortabillentyű intersticiális sejtekben

A mitokondriumot célzó  $H_2S$  donorok [125, 141] egy új módszert kínálnak annak tesztelésére, hogy a mitokondriumokban helyreállított kénhidrogén szint megakadályozhatja-e a VIC sejtek oszteoblaszt fenotípussá történő transzdzifferenciálódását. A CAVD-betegekből származó aortabillentyű intersticiális sejteket, nagy foszfát koncentrációjú médiumban, AP39 vegyülettel kezeltük, ami egy specifikus, a mitokondriumot célzó, kénhidrogént felszabadító donor molekula, és vizsgáltuk a kalcifikációra gyakorolt hatását. Amint az várható volt, a nagy foszfátkoncentráció mellett, a VIC sejtek, oszteoblaszt fenotípus váltása beindult, amit a kalcium felhalmozódása is tükröz a sejtek extracelluláris mátrixában. A VIC sejtek mitokondriumait célzó kénhidrogén kezelés, AP39 donor alkalmazásával, jelentősen csökkentette az extracelluláris kalcium felhalmozódását, amit az Alizarin Red S festések és a közvetlen kalciummérések is mutattak (18. ábra; A panel), megerősítve ezzel a mitokondriális  $H_2S$  metabolizmus kulcsszerepét az aortabillentyű integritásának fenntartásában.

A



B

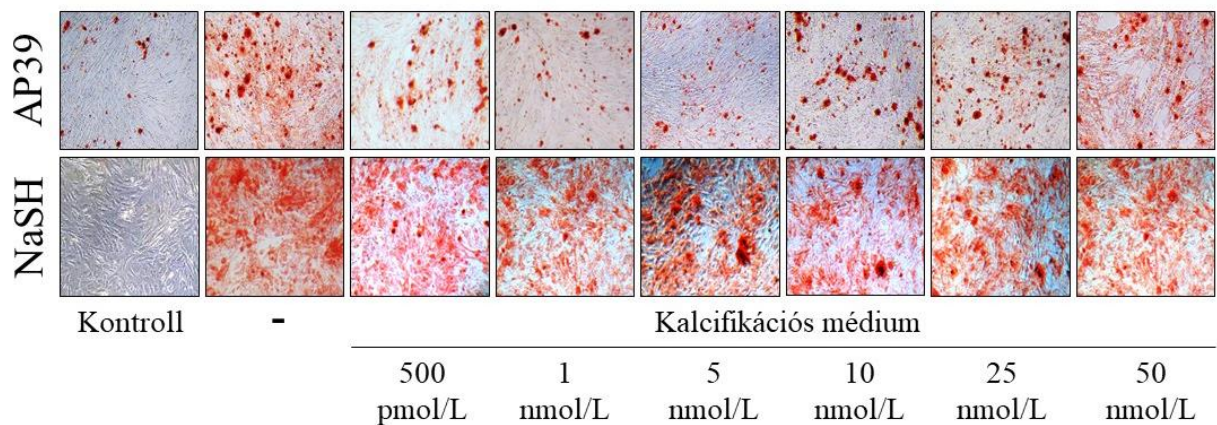


**18. ábra: A mitokondriumokat célzó H<sub>2</sub>S donor megakadályozza a humán, kalcifikált aortabillentyűből származó intersticiális sejtek további mineralizációját.** A kalcifikált aortabillentyűkből izolált intersticiális sejteket (CAV-VIC) növekedési médiumban, vagy 2,5 mmol/L szervetlen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban tenyésztettük öt napig, minden második nap cserélve a tápfolyadékot. A kénhidrogén donor molekulák hatásának vizsgálatához kalcifikációs tápfolyadékot kiegészítettük [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl) phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide]-al (AP39) (5 nmol/L) vagy nátrium-hidrogén-szulfiddal (NaSH) (5 nmol/L; 25 µmol/L) (A és B panelek). Az A paneleken a CAV-VIC sejtek

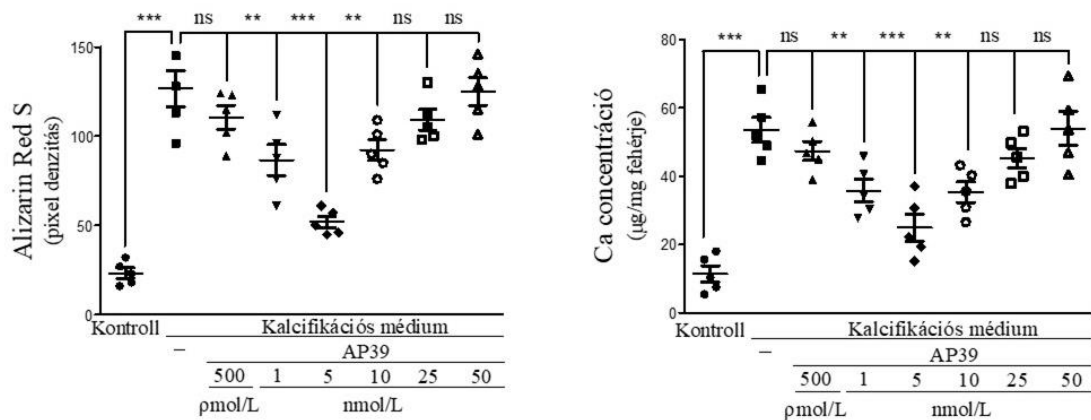
Alizarin Red S festéseit és a fehérjére normalizált extracelluláris kalciumtartalmat mutattuk be (n=5). Az Alizarin Red S festések kvantitatív elemzését ImageJ szoftverrel végeztük (n=5). A B panelen összehasonlítottuk a speciális mitokondriumban ható AP39 és a citoplazmában ható NaSH kénhidrogén donormolekulák kalcifikációt gátló hatását. Alizarin Red S festéseket készítettünk és meghatároztuk a kezeléseket után a sejtek extracelluláris kalcium tartalmát. Az eredményeket egyszempontos variancia analízissel, kiegészítve Bonferroni többszörös összehasonlító utó teszttel elemeztük ki, és öt egymástól független kísérlet átlagértékeként ábrázoltuk. Ns: nem szignifikáns; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Kísérleteinkben a citoplazmatikus kénhidrogén hatásainak kizárására NaSH-t (általános H<sub>2</sub>S donor) alkalmaztunk, és összehasonlítottuk az AP39-el. Amint az 1. kiegészítő ábrán látható, a CAV-VIC sejtekben az AP39 optimális koncentrációja a magas foszfáttartalom által kiváltott kalcifikáció gátlásában 5 nmol/L volt. Ezzel szemben a NaSH nem befolyásolta a VIC sejtek meszesedését ugyanebben a koncentrációban (1. kiegészítő ábra). Az AP39 molekulának 5 nmol/L koncentrációban kifejtett, kalcifikációt gátló hatását a NaSH esetében 25 µmol/L dózis alkalmazásával érték el (18. ábra és 2. kiegészítő ábra). Ha összehasonlítottuk az AP39 és a NaSH hatékonyságát a kalcifikáció gátlásában, az AP39 59,8 ± 8%-kal bizonyult hatékonyabbnak, 5000-szer kisebb koncentráció mellett, mint a NaSH (18. ábra).

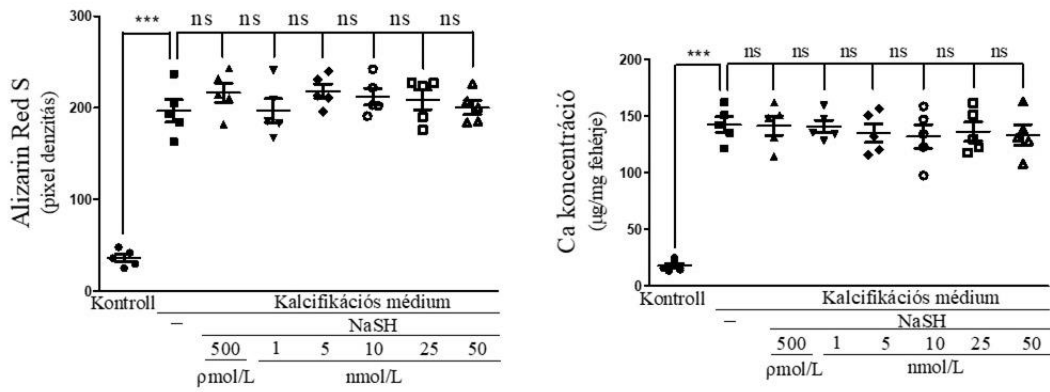
**A**



**B**

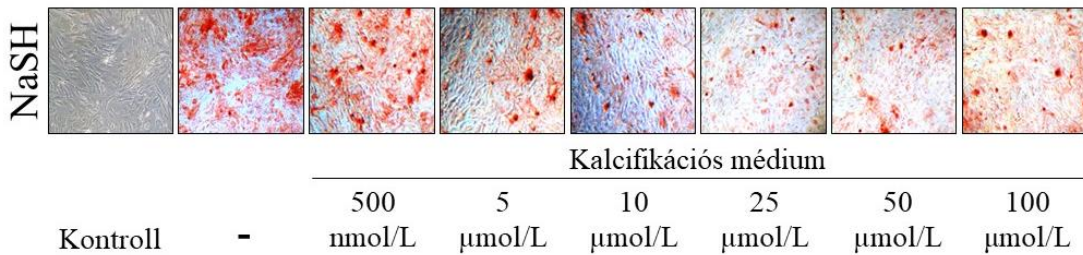


C

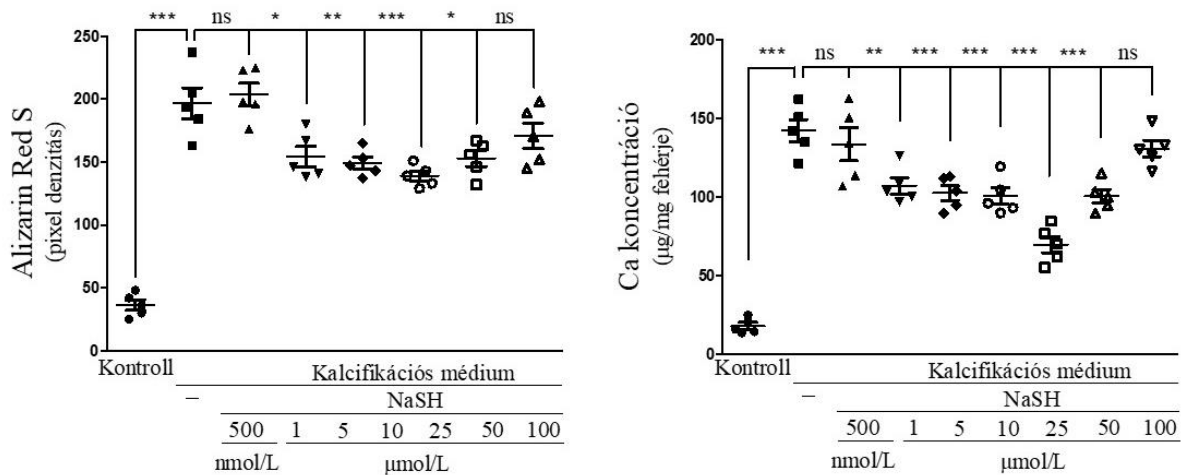


**1. Kiegészítő ábra: A mitokondriumot célzó AP39 kénhidrogén donor molekula dóziszfüggő módon, hatékonyabban gátolja a kalcifikációt, mint a citoplazmatikus NaSH.** A kalcifikált aortabílyükből izolált intersticiális sejteket (CAV-VIC) növekedési médiumban, vagy 2,5 mmol/L szervetlen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban tenyésztettük öt napig, minden második nap cserélve a tápfolyadékot. A kénhidrogén donor molekulák hatásának vizsgálatához, a kalcifikációs tápfolyadékot különböző dózisokban kiegészítettük (500 pmol/L; 1 nmol/L; 5 nmol/L; 10 nmol/L; 25 nmol/L; 50 nmol/L) AP39-el [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl) phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide] vagy nátrium-hidrogén-szulfiddal (NaSH). Az A - C paneleken az extracelluláris kalcium felhalmozódását ábrázoltuk. Alizarin Red S festéssel igazoltuk az AP39 (A panel, felső sor) és a NaSH (A panel, alsó sor) kalcifikációra kifejtett hatását. Az AP39 dóziszfüggő módon gátolta a kalcifikált aortabílyükből származó intersticiális sejtek extracelluláris mátrixában a kalcium depozitumok felhalmozódását 1 nmol/L; 5 nmol/L és 10 nmol/L-es koncentrációkban, amit az Alizarin Red S festések kvantálásával (B panel bal oldal) és az extracelluláris kalcium koncentráció kvantitatív mérésével (B panel jobb oldal) is igazoltunk. Ugyanezekben a dózisokban alkalmazott NaSH-ot összehasonlítva az AP39-el azt az eredményt kaptuk, hogy nem volt hatása a valvuláris intersticiális sejtek mineralizációjára (C panel).

A



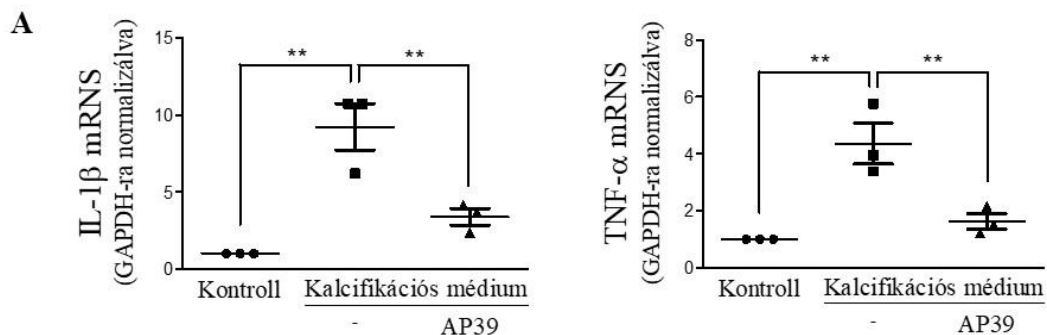
B

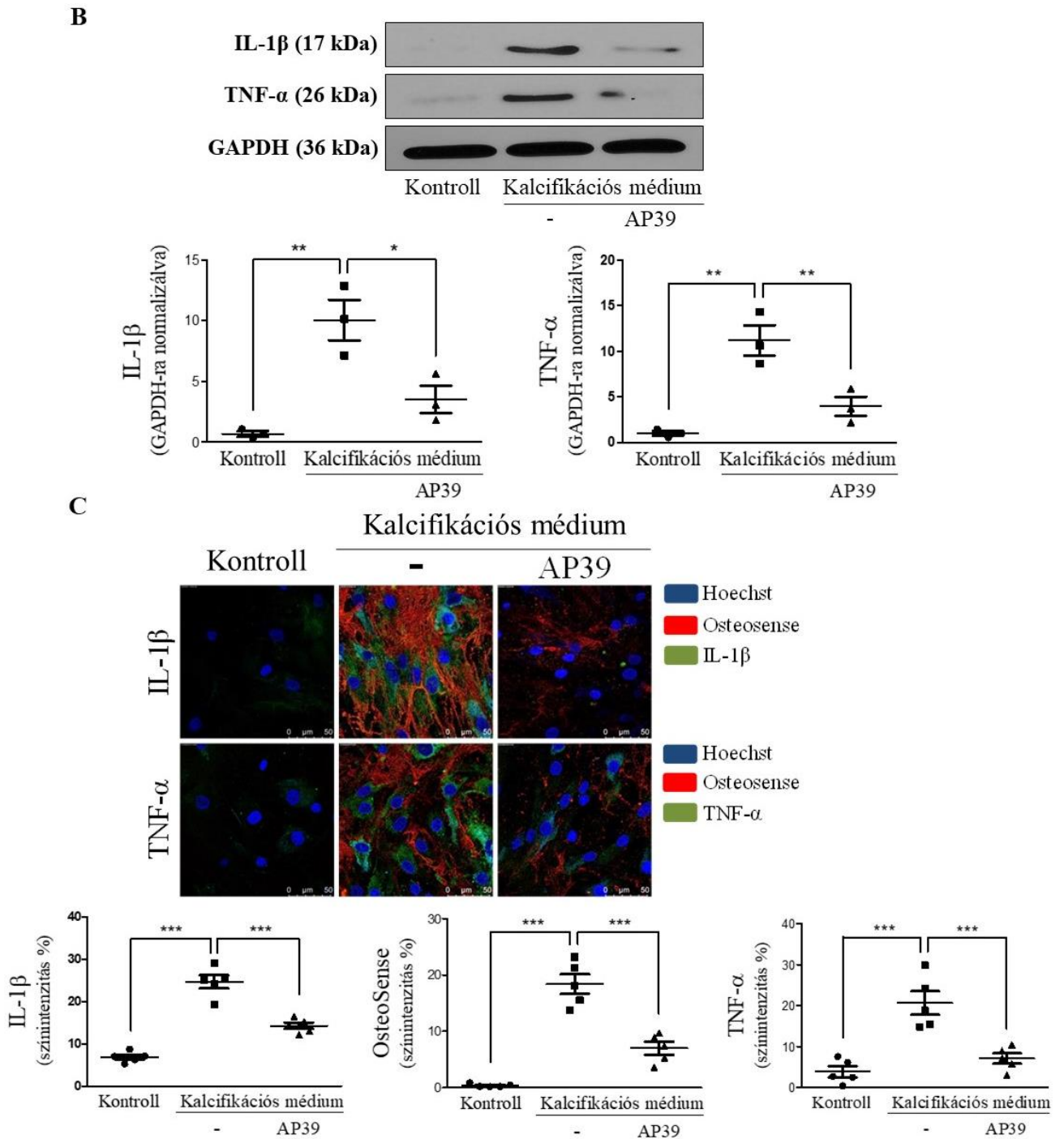


**2. Kiegészítő ábra: Az NaSH, a kénhidrogént gyorsan kibocsátó donor molekula, dózisfüggő módon csökkentette az aortabillentyűből származó valvuláris intersticiális sejtek mineralizációját.** A kalcifikált aortabillentyűkből izolált intersticiális sejteket (CAV-VIC) növekedési médiumban, vagy 2,5 mmol/L szervesen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban tenyésztettük öt napig, minden második nap cserélve a tápfolyadékot. A kénhidrogént gyorsan felszabadító donor molekula hatásának vizsgálatához, a kalcifikációs tápfolyadékot különböző dózisokban kiegészítettük (500 nmol/L; 1  $\mu$ mol/L; 5  $\mu$ mol/L; 10  $\mu$ mol/L; 25  $\mu$ mol/L; 50  $\mu$ mol/L; 100  $\mu$ mol/L) NaSH-al. Az A panelen Alizarin Red S festéssel igazoltuk a kalcifikációt gátló hatást. A B panel, bal oldalán az Alizarin Red S festések kvantálását szemléltettük, melyet ImageJ szoftver alkalmazásával számítottunk ki. Az extracelluláris kalcium koncentrációk mérési eredményeit a B panel jobb oldalán ábrázoltuk. Az eredmények alapján a leghatásosabbnak a 25  $\mu$ mol/L dózisban alkalmazott NaSH bizonyult.

### 5.14 A mitokondriális kénhidrogén donor gátolja a magas foszfátszint által kiváltott gyulladást a humán aortabillentyű intersticiális sejtjeiben

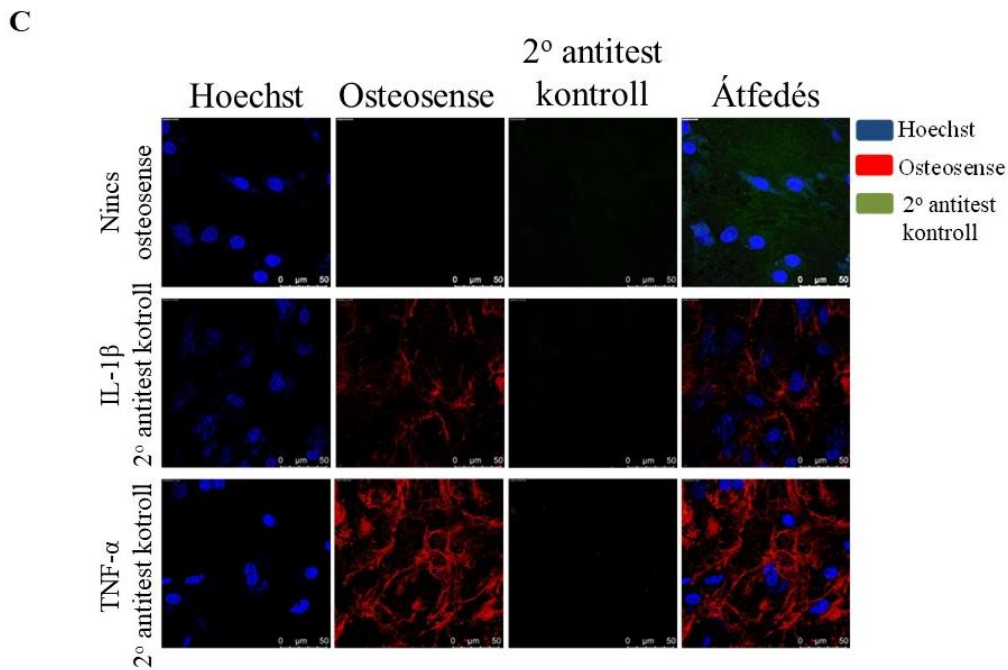
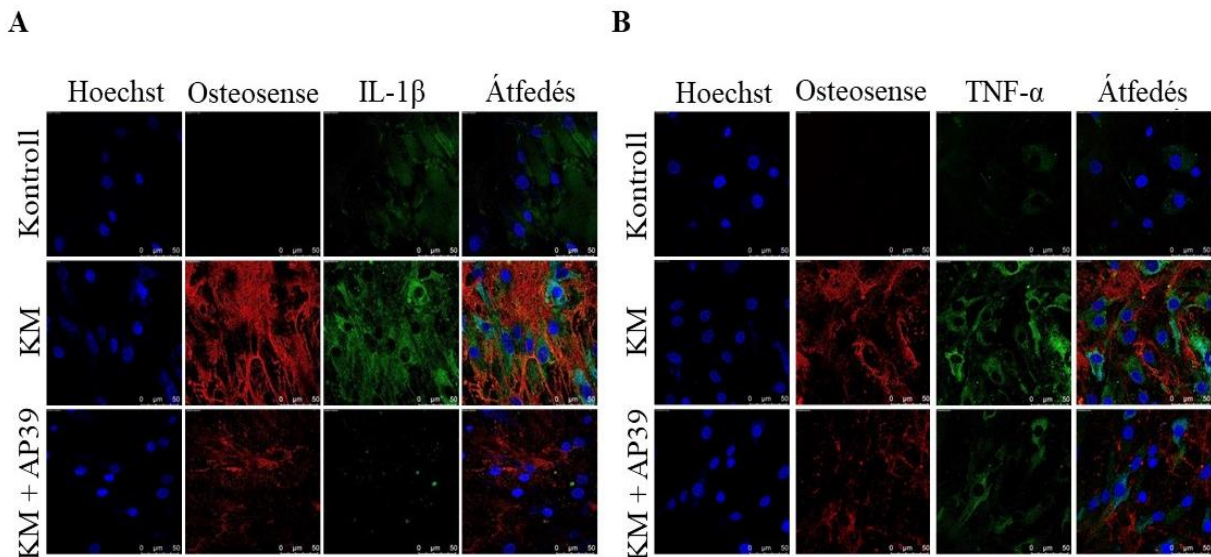
Mivel a kalcifikáció és a gyulladás folyamata összefügg a CAVD patogenezisében [1, 16, 69], ezért megvizsgáltuk, hogy az AP39 mitokondriális H<sub>2</sub>S donor molekula befolyásolja-e a VIC sejtek gyulladását. Ahogy az várható volt, a gyulladásos citokinek, mint az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  expressziója, transzkripciós és transzlációs szinten egyaránt, szignifikánsan megemelkedett, a kalcifikációs médiumban tartott humán intersticiális sejtekben (19. ábra; A–C panelig). Azonban a sejtek AP39-el történt kezelése jelentősen csökkentette a magas foszfátszint miatt megemelkedett proinflammatorikus citokinek szintjét (19. ábra; A–C panelig). A specifikus, mitokondriumot célzó H<sub>2</sub>S donor gyulladásgátló hatásának további igazolására, immunfluoreszcens festéseket is végeztünk kalcifikációra (Osteosense), valamint IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  gyulladásos citokinekre. Az immunfluoreszcens festések vizualizálása STED-CW nanoszkóp technológia alkalmazásával történt. A 19. ábra; C paneljén látható, hogy a sejteket magas foszfát tartalmú médiumban tenyésztettük, és a kalcium felhalmozódása az extracelluláris mátrixban jelentősen megemelkedett, amit az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  erős festődése kísért. A kiértékelés során egyértelművé vált, hogy az AP39 kezelés szignifikánsan gátolta a kalcium felhalmozódását az extracelluláris mátrixban, és megakadályozta az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  expresszióját (19. ábra C panel).





**19. ábra: A mitokondriumot célzó H<sub>2</sub>S donor gátolja az aortabillentyű intersticiális sejtek gyulladását.** Az egészséges aortabillentyűkből izolált intersticiális sejteket (HAV-VIC) növekedési médiumban, vagy 2,5 mmol/L szervetlen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban tenyésztettük öt napig, magában vagy kiegészítve 5 nmol/L AP39-el [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl) phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide]. A kezelő oldatokat minden második nap frissre cseréltük. Az A panelen a proinflammatorikus citokinek, az IL-1β (bal oldali panel) és a TNF-α (jobb oldali panel) relatív génexpresszióját mutattuk HAV-VIC sejtekben, amelyek elemzéséhez Real-Time qPCR (n=3) módszert használtunk. A B panelen a GAPDH-ra normalizált, IL-1β, a TNF-α citokinek fehérje expressziós profilját ábrázoltuk HAV-VIC sejtekben, melyet Western blot módszer segítségével határoztunk meg. Az IL-1β és a TNF-α optikai denzitás mennyiségi meghatározását ImageJ szoftverrel számítottuk ki. A C panelen, fedőlemezekon tenyésztettük a HAV-VIC sejteket növekedési médiumban, 2,5 mmol/L szervetlen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazó kalcifikációs médiumban önmagában vagy kiegészítve 5 nmol/L AP39 kénhidrogént felszabadító vegyülettel, 5 napig. A sejtek

magi DNS-ét Hoechst 33258-al (kék szín), az IL-1 $\beta$ -t Alexa Fluor 488 másodlagos antitesttel (zöld szín), míg a TNF- $\alpha$ -t szintén Alexa Fluor 488 másodlagos antitesttel (zöld szín) és a kialakult hidroxipatit kristályokat Osteosense fluoreszcens próbával (piros) festettük meg. Az eredményekről készült képek Leica TCS SP8 kapuzott STED-CW nanoszkópiával készültek. A fotókat Huygens Professional szoftverrel dekonvolváltuk. Az IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  és az Osteosense festések színintenzitását ImageJ szoftverrel számítottuk ki. Az ábrákon egy-egy kiválasztott reprezentatív, 50  $\mu$ m-es felbontású képet mutattunk (n=5). Az eredményeket egyszempontos variancia analízissel, kiegészítve Bonferroni többszörös összehasonlító utó teszttel elemeztük ki, és öt egymástól független kísérlet átlagértékeként ábrázoltuk. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.



3. Kiegészítő ábra: A másodlagos antitest kontrollok immunfluoreszcens festései.

## 6. MEGBESZÉLÉS

Ez a tanulmány az első, amely rávilágít az NF- $\kappa$ B és a RUNX2, mint a gyulladás és a valvuláris mineralizáció közötti kapcsolatra, és bemutatja, hogy a kénhidrogén hogyan szabályozza a proinflammatorikus citokinek expresszióját, majd ezt követően megakadályozza az aortabillentyű meszesedésének további progresszióját. A CAVD-ben a meszesedés mellett a gyulladás egy fontos patológias folyamat, ami az érintett aortabillentyű szövet heterogenitását eredményezi. A szövet mineralizációs állapotának megkülönböztetésében a meszes és nem meszes területek aránya ad támpontot [38, 39, 66, 142]. A CAVD egy aktív, sejt- és molekuláris szinten egyaránt jól szabályozott gyulladásos betegség. Ahogy azt a National Heart Lung and Blood Institute [1] és más kutatócsoportok kimutatták [10, 16, 21, 39, 55, 67, 143, 144], a gyulladás egy kritikus iniciációs tényező a szívbillentyű betegségek kialakulásában. Megjegyzendő, hogy a specifikus molekuláris- és biokémiai mechanizmusok, azonban mind a mai napig, nem teljesen ismertek.

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a RUNX2 oszteogén transzkripció faktor kulcsfontosságú szerepet játszik a szív- és érrendszeri meszesedésekben, beleértve a CAVD-t is [1, 118, 137, 145, 146]. Például az intracelluláris foszfátszint emelkedése elősegíti a RUNX2 nukleáris transzlokációját, ami a sejtek oszteoblaszt fenotípus váltását eredményezi [55]. A RUNX2 upregulációja egy maladaptív válasz az érrendszer sérülése során, urémiás környezetben és hiperglikémiás [147] körülmények között, és ez potenciális terápiás célpont lehet az erek mineralizációjában [148]. Munkacsoportunk [118, 137] és mások [55, 146, 147] korábbi vizsgálataikban kimutatták a RUNX2-t a szívbillentyűszövetet alkotó intersticiális sejtek magjában, amely az oszteoblaszt irányú fenotípus váltás egyik korai jele.

Megfigyeltük, hogy a kénhidrogén CSE és a CBS enzimek által történő endogén termelése, valamint a H<sub>2</sub>S-t felszabadító donor molekulák, mint például az AP72 alkalmazása, gátolja az aortabillentyű meszesedés kialakulását ApoE<sup>-/-</sup> egerekben, és a megakadályozza a humán szívbillentyű intersticiális sejtek oszteoblaszt-szerű sejtekké történő transzdifferentiálódását [118]. Három különböző meszesedést gátló útvonalat figyeltük meg, melyek szabályozásán keresztül a kénhidrogén kifejtheti hatását: I. gátolja a RUNX2 nukleáris transzlokációját, II. csökkenti a szervesen foszfátfelvételt a sejtekbe és III. elősegíti a pirofoszfát, mint anti-kalcifikációs vegyület képződését. Ezek a korábbi tanulmányok és eredményeink arra készítetnek bennünket, hogy megvizsgáljuk, a H<sub>2</sub>S gyulladás csökkentő hatása hozzájárulhat-e az aortabillentyű mineralizációjának gátlásához, és ez a mechanizmus a RUNX2 szabályozásán keresztül történik-e az intersticiális sejtekben.

Az AP72 kiváló vízdékonysággal és lassú H<sub>2</sub>S-termeléssel rendelkező donor molekula, összehasonlítva a szulfidot gyorsan kibocsátó vegyületekkel, mint például a Na<sub>2</sub>S és a NaSH [101-103]. Egyre inkább felismerik a tényt, hogy a kénhidrogént lassan felszabadító donorok potenciálisan jobban utánozzák az endogén H<sub>2</sub>S pufferrendszer hatásait, mivel alacsony szulfidszintjüket lassan generálják [101, 102, 136]. Ezért kísérleteinkhez AP72 vegyületet használtuk. Fontos eredmény, hogy a H<sub>2</sub>S exogén úton történő beadása megszüntette az ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyűiben, a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott gyulladást, amelyet a TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$  szintek csökkenése tükröz (5. ábra). Ennek megfelelően a magas foszfát expozíció által kiváltott TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$  szintek emelkedése csökkent a humán szívbillentyű intersticiális sejtekben AP72-vel történt kezelés után. Annak vizsgálatára, hogy az endogén kénhidrogén termelésnek van-e gyulladáscsökkentő hatása, géncsendesítéssel mérsékeljük a CSE és a CBS gének aktivitását. Mivel a CSE/CBS expresszió közötti kölcsönhatást Nandi és Mishra tárta fel, bizonyítva, hogy a CBS hiánya felszabályozza a CSE fehérjeszinteket [149], kettős géncsendesítést alkalmaztunk. Az endogén H<sub>2</sub>S termelés csökkentése fokozta a TNF- $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  szintjének foszfát által kiváltott emelkedését a szívbillentyű intersticiális sejtjeiben. Ez az eredmény egyértelműen jelzi az endogén kénhidrogén termelés által a gyulladás szabályozását.

A proinflammatorikus citokinek, az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  expresszióját az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációja szabályozza [64]. Nemrég kiderült, hogy az NF- $\kappa$ B aktiválódását a kénhidrogén gátolja [65]. Ez a tanulmány arra készítetett bennünket, hogy megvizsgáljuk, hogy a gyulladás és a meszesedés összefügg-e a fő szabályozó transzkripciós faktorok, az NF- $\kappa$ B és a RUNX2 szintjén. A fenti megállapításokat megerősítve, az AP72 megakadályozta az NF- $\kappa$ B transzlokációját a sejtmagba a nagy foszfát koncentrációnak kitett szívbillentyű intersticiális sejtekben (7. ábra). Azt is megfigyeltük, hogy a RUNX2 aktiválódását gátolja a H<sub>2</sub>S [118]. Ezért az NF- $\kappa$ B aktivitását géncsendesítéssel, valamint farmakológiai inhibitor alkalmazásával korlátoztuk, majd a RUNX2 aktiválódását nyomon követtük a foszfát kezelésnek kitett szívbillentyű intersticiális sejtekben. Fontos eredmény, hogy a foszfát nem indukálta a RUNX2 transzlokációját a sejtmagokba az NF- $\kappa$ B-t nem expresszáló sejtekben, ami kapcsolatot jelez a gyulladást elősegítő és az oszteogén jelátviteli útvonalak között. Az eredményeink megerősítésére *in vivo* kísérleteket végeztünk és kimutattuk, hogy az NF- $\kappa$ B és a RUNX2 expressziója az aortabillentyű meszesedése során az ApoE<sup>-/-</sup> egerekben megnőtt, azonban a kénhidrogén terápia mindkét transzkripciós faktor szintjét jelentősen csökkentette (9. ábra). Az aortabillentyű meszesedésének progressziója során, erős kolokalizációt figyeltünk meg az NF- $\kappa$ B és a RUNX2 között a perinukleáris régióban és a sejtmagokban az intersticiális sejtekben

(9. ábra). Vizsgálatunk tehát azt sugallja, hogy a RUNX2, kénhidrogén (CSE/CBS) általi szabályozása az NF- $\kappa$ B-n keresztül történik, ami anti-kalcifikációt eredményez, és ezáltal kapcsolatot teremt a gyulladás és a mineralizáció között a CAVD-ben.

Elsőként mutattuk be a CAVD-betegek aortabillentyűiből izolált intersticiális sejtek kénhidrogén szintjének metabolikus szabályozása és a mineralizáció folyamata közötti kapcsolatot. Hipotézisünket arra alapoztuk, hogy az egészséges aortabillentyűkhöz képest, a CAVD-betegek aortabillentyűiben szignifikánsan alacsonyabb kénhidrogén szinteket mutattunk ki, melyhez a H<sub>2</sub>S-t generáló CSE enzim (10. ábra C panel), valamint az oxidációjában részt vevő mitokondriális enzimek (16. ábra) magasabb expressziója társult. Ennek megfelelően az egészséges humán aortabillentyűkből izolált VIC sejtek, a kalcifikációs milióban utánozzák a patológiás állapotra jellemző transzszulfurációs enzimek expressziós profilját, azaz a CSE megnövekedett expresszióját (13. ábra B panel), valamint a mitokondriális kénhidrogén oxidáció kulcsenzimeinek, az SQR, az ETHE1, az SO és a TST emelkedett szintjeit (17. ábra). Feltételezzük, hogy a CAVD aortabillentyűkben, és a belőlük izolált VIC sejtekben megfigyelt, alacsonyabb biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S szintek (13. ábra C panel), a kalcifikációs környezet által kiváltott, és megnövekedett mitokondriális kénhidrogén fogyasztási rátának a következménye.

A H<sub>2</sub>S megnövekedett mitokondriális katabolizmusa megmagyarázhatja az általunk megfigyelt alacsonyabb, biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S-szinteket, azonban ismert, hogy ezt a jelenséget más mechanizmusok is okozhatják. A CSE megemelkedett expressziója nem feltétlenül jár együtt a H<sub>2</sub>S-termelés sebességének az emelkedésével a kalcifikált aortabillentyűkben. Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CSE enzim képes foszforilálódni a Ser377 aminosavon, és ez az enzim aktivitásának csökkenéséhez vezethet [150]. Mindazonáltal az egészséges szövetekhez képest, a CAVD-betegek aortabillentyűiben megfigyelt emelkedett lantionin szint arra utalt, hogy a CSE enzim aktív, és a H<sub>2</sub>S-képződés mértéke akár meg is emelkedhet a CAVD-ben (15. ábra).

A másik fontos, endogén kénhidrogén termelő enzim, a CBS megváltozott expressziója újabb magyarázatot adna a CAVD-ben tapasztalható alacsony biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S szintekre. Azonban immunhisztokémiai és Western blot analízisekkel kimutattuk, hogy a CBS expressziója a kalcifikált aortabillentyűkben hasonló volt az egészséges aortabillentyűben megfigyelthez (11. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a CAVD-ben kimutatott alacsonyabb biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S szintek nincsenek összefüggésben a CBS működésével.

A H<sub>2</sub>S egy fontos jelátviteli molekula, amely az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kapott a szív- és érrendszerben betöltött sokoldalú funkciói miatt [111, 112, 151]. Laboratóriumunk korábban a kénhidrogénről kimutatta, hogy a CSE általi endogén termelésén és az exogén módon beadott kénhidrogént felszabadító donor molekulákon keresztül, egyrészt gátolja az aortabillentyű meszesedését ApoE<sup>-/-</sup> egerekben, másrészt gátolja a humán valvuláris intersticiális sejtek és a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblaszt irányú transzdifferentiálódását [117, 118].

A cisztein perszulfidáció és a mitokondriális elektrontranszport lánc feltételezett kölcsönhatásai miatt, a kénhidrogén katabolizmusa során aktiválódó enzimek, köztük az SQR, ETHE1, SO és TST expressziói fokozódhatnak a perszulfidok/poliszulfidok metabolizmusa során is [134, 139]. Ugyanakkor a H<sub>2</sub>S képződése indukálhatja is a perszulfidok/poliszulfidok megemelkedett szintjét vagy metabolizmusát [152-157]. Azt is meg kell jegyezni, hogy a reaktív kénformák (beleértve a H<sub>2</sub>S-t is) mérésére jelenleg rendelkezésre álló legkorszerűbb detektálási módszerek, mesterségesen módosíthatják azok fajlagosságát [154, 155]. Ezért nagyon nehéz megkülönböztetni, hogy a megfigyelt biológiai hatást a kénhidrogén vagy a perszulfidok/poliszulfidok közvetítik. Ennek ellenére megmértük a teljes fehérje perszulfidációs szintjét az egészséges és a kalcifikált aortabillentyűkben. A vizsgálat során változatlan fehérje CysSH/Cys% perszulfid szinteket figyeltünk meg, amelyek a fent említett detektálási problémák miatt, nem zárják ki a perszulfidok szerepét, ugyanakkor nem támasztják alá a kénhidrogén közvetlen szerepét sem a vizsgálati rendszereinkben (15. ábra).

A proinflammatorikus citokinek, mint az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  fokozott expressziója összefüggésben áll a CAVD-el, ezért a gyulladás a betegség egyik legfőbb ismertetőjele [1, 16, 66, 68]). A CAVD egy aktív, komplex, oszteogén folyamat, melynek kialakulásában és progressziójában a gyulladás központi szerepet játszik. Ezek az ismeretek arra készítettek bennünket, hogy tanulmányozzuk az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  humán VIC sejtekre kifejtett hatását, kalcifikációs körülmények között. Amint azt korábban feltártuk, mind az IL-1 $\beta$ , mind a TNF- $\alpha$  elősegítette a humán VIC sejtek meszesedését, függetlenül a sejtek eredetétől, pontosabban attól, hogy egészséges személyek vagy CAVD-betegek aortabillentyűiből származnak (11. ábra). Ugyan a sejtek eredetétől függően, jelentős különbségek vannak a sejtes válaszok mértékét és időtartamát illetően, amit a kalcifikáció erőssége és a gyulladásos citokinek termelése is tükröz, ezeknek a válaszoknak a végső iránya ugyanaz volt mindkét állapotban (11. ábra). A kalcifikáció progressziója gyorsabb volt, az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  szintézise pedig kifejezettebb a CAVD-betegek intersticiális sejtjeiben (11. ábra), ami a beteg aortabillentyűk

kalcifikációs környezetének, és ezáltal öröklött oszteoblaszt fenotípusú elkötelezettségüknek tulajdonítható.

Lagoutte és munkatársai bizonyították, hogy a kénhidrogén jelentős szerepet játszik az emlőssejtek bioenergetikájában a mitokondriális elektrontranszport lánc stimulálásával [93]. A mitokondriumot célzó H<sub>2</sub>S donorral, az AP39-el végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy jótékony hatást gyakorol a sejtek bioenergetikai paramétereire [125, 141]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a kénhidrogén szintek mitokondriumokban történő helyreállítása, specifikus, mitokondriumot célzó szulfid donorral, szabályozza-e a VIC sejtek kalcifikációját. Az AP39 molekulának a VIC sejtekben megfigyelt kalcifikációt gátló hatása, alátámasztja a mitokondriális kénhidrogén metabolizmus alapvető szerepét az aortabillentyű integritásának megőrzésében (18 - 19. ábra).

Vizsgálataink során a kénhidrogén mérések nem voltak specifikusak a mitokondriumokra, ezért kísérleteket végeztünk NaSH-al (általános H<sub>2</sub>S donor) és összehasonlítottuk az AP39-el, hogy kizárjuk a citoplazmatikus kénhidrogén hatását a VIC sejtek kalcifikációjának gátlásában. A NaSH nem befolyásolta a VIC sejtek mineralizációját 5 nmol/l dózisonál, ami az AP39 optimális koncentrációja volt (18. ábra és az 1. kiegészítő ábra). Ha összehasonlítottuk az AP39 és a NaSH hatékonyságát, azt találtuk, hogy a mitokondriumot célzó AP39 kénhidrogén donor, hatékonyabb volt 5000-szer alacsonyabb koncentrációban (18. ábra és az 1. kiegészítő ábra). Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy a mitokondriális kénhidrogén kritikus szerepet játszik a VIC sejtek kalcifikációjának gátlásában. A mineralizáció progressziójának mérséklése és a proinflammatorikus citokinek expressziójának csökkenése az alacsony koncentrációjú AP39 kezelés hatására, összhangban van a korábbi megfigyelésekkel, amelyek a kalcifikáció és a gyulladás közötti patofiziológiai összefüggést mutatják a CAVD-ben ([1, 16, 69, 158] (19. ábra).

Fontos eredményünk, hogy az egészséges aortabillentyűkből származó intersticiális sejtek kalcifikációjának és oszteoblaszt fenotípus-váltásának átmeneti gátlását figyeltük meg az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  kezelés hatására, szemben a CAVD-betegekből izolált sejtekkel (12. ábra; A–D panelig). A proinflammatorikus citokineknek ez az előnyös tulajdonsága a H<sub>2</sub>S biogenezisével is összefüggésbe hozható, mivel mind az IL-1 $\beta$ , mind a TNF- $\alpha$  fokozta a CSE expresszióját, aminek eredményeként a kénhidrogén szintek növekedését figyeltük meg (13. ábra B és C panelek). Annak tesztelésére, hogy a CSE enzim által termelt kénhidrogén felelős-e a VIC sejtek kalcifikációjának és oszteoblaszt irányú fenotípus váltásának gátlásáért, géncsendesítéssel csökkentettük a CSE és a CBS enzimek expresszióját. Számos különböző biológiai rendszerben végzett vizsgálat kimutatta, hogy a szulfid/perszulfid termelő aktivitást

figyelembe véve a CSE és a CBS bizonyos mértékig kompenzálni tudják egymást [86, 149, 159], ezért ezen enzimek kettős géncsendesítését alkalmaztuk. Az endogén kénhidrogén termelés csökkenése a meszesedést gátló hatások elvesztéséhez vezetett kalcifikációs környezetben. Ez azt jelenti, hogy a CSE által termelt kénhidrogén részt vett a VIC sejtek kalcifikációjának átmeneti gátlásában, amelyet a TNF- $\alpha$  vagy az IL-1 $\beta$  indukált (14. ábra).

A valvuláris intersticiális sejtekhez hasonlóan, a CSE expresszióját a TNF- $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  fokozhatja az érrendszer más sejtjeiben is, beleértve a simaizomsejteket, az endotéliumot és a makrofágokat. A CSE a vaszkuláris patológiákban szerepet játszó, biológiailag aktív molekulákkal vagy kóros anyagcseretermékekkel is indukálható, mint például az oxidált LDL-hez kapcsolódó peroxidok, az ateroszklerotikus plakk lipidek, valamint a hem vagy az oxidált hemoglobin [135]. Ezek az összetevők a CAVD kialakulásához is szorosan kapcsolódnak [1, 16] és hozzájárulhatnak a CSE fokozott expressziójához az aortabillentyűkben.

Feltételezzük, hogy kalcifikációs környezetben [1, 16] a megnövekedett, mitokondriális katabolizmus sebessége miatt, az endogén kénhidrogén szint jelentősen lecsökken, ami elősegíti a VIC sejtek meszesedését a CAVD-ben. Azonban a CSE enzim expressziójának upregulációja fokozott kénhidrogén generálással jár, amely egy adaptív, anti-kalcifikációs védőmechanizmust biztosít a sejtek számára.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Ismert tény, hogy a gyulladás kulcsszerepet játszik a CAVD patogenezisében és az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor a gyulladás egyik központi szabályozója. A proinflammatorikus citokinek, mint az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  expressziója szignifikánsan megemelkedett a CAVD-ben szenvedő betegek és zsírdús étrenden tartott ApoE<sup>-/-</sup> egerek meszesedő aortabillentyűiben. Munkacsoportunk korábban bemutatta, hogy a kénhidrogén gátolja a humán aortabillentyűben a meszesedést. Ezt igazolták kísérleti eredményeink, ugyanis az endogén H<sub>2</sub>S-termelő enzimek, a CSE és a CBS kettős géncsendesítése fokozta a mineralizációt és a gyulladást a humán kalcifikált aortabillentyűből izolált VIC sejtekben. Megvizsgáltuk, hogy a kénhidrogén az anti-kalcifikációs hatását, a gyulladás csökkentésén keresztül fejt-e ki. Eredményeink alapján, az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor géncsendesítése vagy farmakológiai gátlása megakadályozta a RUNX2 – a csontképződést szabályozó transzkripciós faktor - nukleáris transzlokációját, ami gátolta a VIC sejtek meszesedését.

Megfigyeltük, hogy H<sub>2</sub>S-t felszabadító AP72 donor molekulával történt kezelés, megakadályozta az ApoE<sup>-/-</sup> egerek aortabillentyűiben és humán VIC sejtekben az NF- $\kappa$ B és a RUNX2 nukleáris transzlokációját, amely csökkent citokinválaszt eredményezett.

Elsőként bizonyítottuk, hogy a RUNX2 kénhidrogén (CSE/CBS) általi szabályozása az NF- $\kappa$ B-n keresztül történik, ami kapcsolatot teremt a gyulladás és a valvuláris mineralizáció között.

Feltártuk a humán aortabillentyűk H<sub>2</sub>S-szintjének metabolikus szabályozását. A CSE enzim magasabb expressziója ellenére, alacsonyabb biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S és magasabb IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  szinteket mutattunk ki CAVD betegek aortabillentyűiben az egészséges egyénekhez képest. Az eredmények tükrében, elsőként elemeztük a H<sub>2</sub>S mitokondriális oxidációjában részt vevő enzimeket, köztük a SQR, az ETHE1, az SO és a TST szerepét a valvuláris mineralizációban.

Bemutattuk az AP39, egy specifikus, a mitokondriumot célzó H<sub>2</sub>S-t kibocsátó donor molekula, anti-kalcifikációs és anti-inflammatorikus hatását.

Az értekezés klinikai relevanciája, hogy az általunk vizsgált kénhidrogént felszabadító donor molekulák hosszú felezési idejűek, így a hatóanyagot lassan, szabályozott módon adják le, ezáltal biztosítják a fiziológiásan tolerálható kénhidrogén koncentrációt, így a jövőben a szív- és érrendszeri megbetegedések kezelésében potenciális gyógyszerjelöltékké válhatnak.

## 8. SUMMARY

It is well known that inflammation plays a key role in the pathogenesis of CAVD, and the NF- $\kappa$ B transcription factor is a central regulator of inflammation. The expression of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  is significantly elevated in the calcifying aortic valves of patients with CAVD and in ApoE<sup>-/-</sup> mice on a high-fat diet. Our research group previously demonstrated that hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) inhibits calcification in human aortic valves. This was confirmed by our experimental results, as dual gene silencing of endogenous H<sub>2</sub>S-producing enzymes, CSE and CBS, enhanced mineralization and inflammation in VIC cells isolated from human calcified aortic valves. We investigated whether H<sub>2</sub>S exerts its anti-calcification effects through the reduction of inflammation. Based on our results, silencing or pharmacological inhibition of the NF- $\kappa$ B transcription factor prevented the nuclear translocation of RUNX2, a transcription factor that regulates bone formation, thereby inhibiting calcification in VIC cells.

We observed that treatment with the H<sub>2</sub>S-releasing donor molecule AP72 prevented the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and RUNX2 in the aortic valves of ApoE<sup>-/-</sup> mice and human VIC cells, resulting in a reduced cytokine response. For the first time, we demonstrated that the regulation of RUNX2 by hydrogen sulfide (CSE/CBS) occurs via NF- $\kappa$ B, establishing a link between inflammation and valvular mineralization.

We explored the metabolic regulation of H<sub>2</sub>S levels in human aortic valves. Despite the higher expression of the CSE enzyme, we identified lower biologically available H<sub>2</sub>S and higher levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the aortic valves of CAVD patients compared to healthy donors. We were the first to analyze the role of enzymes involved in the mitochondrial oxidation of H<sub>2</sub>S, including SQR, ETHE1, SO, and TST in valvular mineralization.

We demonstrated the anti-calcification and anti-inflammatory effects of AP39, a specific mitochondria-targeting H<sub>2</sub>S-releasing donor molecule.

The clinical relevance of the dissertation lies in the fact that the H<sub>2</sub>S-releasing donor molecules we studied have a long half-life, thus providing the active substance in a slow and controlled manner, ensuring physiologically tolerable H<sub>2</sub>S concentrations. Therefore, in the future, they could become potential drug candidates for the treatment of cardiovascular diseases.

## 9. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI, A JELÖLT SAJÁT MEGÁLLAPÍTÁSAI:

A CSE/CBS által termelt H<sub>2</sub>S gátolja az aorta billentyűből izolált intersticiális sejtek gyulladását és meszesedését.

A H<sub>2</sub>S-t felszabadító donor molekulák csökkentik az aorta billentyűből izolált intersticiális sejtek gyulladását és kalcifikációját.

A H<sub>2</sub>S megakadályozza a gyulladás és a meszesedés kialakulását az apolipoprotein E hiányos egerek aortabillentyűjében.

A H<sub>2</sub>S gátolja az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációját és az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  expresszióját.

A RUNX2 aktivációja és nukleáris transzlokációja az NF- $\kappa$ B által szabályozott kalcifikációt kiváltó milióban.

A gyulladás és a mineralizáció folyamatát a két fő transzkripciós faktorok, az NF- $\kappa$ B és a RUNX2 kapcsolják össze.

A CSE enzim magasabb expressziója ellenére, alacsonyabb a biológiailag hozzáférhető H<sub>2</sub>S és magasabb az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  szintje a CAVD-betegek aortabillentyű szövetében az egészséges egyénekéhez képest.

Az egészséges humán aorta billentyűből izolált VIC-ek utánozzák a humán patológiát, meszesedést kiváltó körülmények között, mivel az emelkedett CSE-expresszió itt is alacsony H<sub>2</sub>S-szinttel jár.

A H<sub>2</sub>S-katabolizmusban részt vevő mitokondriális enzimek, köztük a SQR, a ETHE1, a SO és a TST expressziója fokozottan szabályozott a meszes aortabillentyű szövetekben, amely az endogén H<sub>2</sub>S szintek csökkenéséhez vezet.

Hasonló fehérje expressziós mintázatot mutattak a VIC-ek magas foszfát expozícióra adott válaszként *in vitro* kísérletekben.

Egy specifikus, a mitokondrium bioenergetikáját javító H<sub>2</sub>S donor, csökkentette a gyulladást és a kalcifikációt a VIC-ben.

Mindkét proinflammatorikus citokin (IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$ ) fokozta a meszesedést a meszes aortabillentyűkből származó VIC-ben. Ezzel szemben az egészséges billentyűből izolált

sejtekben a mechanizmus elején, átmenetileg gátolták a meszesedését, mely hatás a CSE-indukción és az endogén H<sub>2</sub>S-generáláson keresztül közvetített.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Rajamannan, N.M., et al., Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, 2011. 124(16): p. 1783-91.
2. Vahanian, A., et al., 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*, 2022. 43(7): p. 561-632.
3. Marwick, T.H., et al., Chronic kidney disease and valvular heart disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*, 2019. 96(4): p. 836-849.
4. d'Arcy, J.L., et al., Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. *Heart*, 2011. 97(2): p. 91-3.
5. Iung, B. and A. Vahanian, Degenerative calcific aortic stenosis: a natural history. *Heart*, 2012. 98 Suppl 4: p. iv7-13.
6. Osnabrugge, R.L., et al., Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(11): p. 1002-12.
7. Thaden, J.J., V.T. Nkomo, and M. Enriquez-Sarano, The global burden of aortic stenosis. *Prog Cardiovasc Dis*, 2014. 56(6): p. 565-71.
8. Santangelo, G., et al., The Global Burden of Valvular Heart Disease: From Clinical Epidemiology to Management. *J Clin Med*, 2023. 12(6).
9. Cho, K.I., et al., Inflammatory and metabolic mechanisms underlying the calcific aortic valve disease. *Atherosclerosis*, 2018. 277: p. 60-65.
10. Kostyunin, A.E., et al., Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol*, 2019. 132: p. 189-209.
11. Lindman, B.R., R.O. Bonow, and C.M. Otto, Current management of calcific aortic stenosis. *Circ Res*, 2013. 113(2): p. 223-37.
12. Marquis-Gravel, G., et al., Medical Treatment of Aortic Stenosis. *Circulation*, 2016. 134(22): p. 1766-1784.
13. Nishimura, R.A., et al., 2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 2017. 135(25): p. e1159-e1195.
14. Salas, M.J., et al., Medical therapy for calcific aortic stenosis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012. 17(2): p. 133-8.
15. Lindman, B.R., et al., Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. 2: p. 16006.
16. Yutzey, K.E., et al., Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. 34(11): p. 2387-93.
17. Liao, L., L.A. Allen, and D.J. Whellan, Economic burden of heart failure in the elderly. *Pharmacoeconomics*, 2008. 26(6): p. 447-62.
18. Otto, C.M., et al., Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 1994. 90(2): p. 844-53.
19. Chen, J.H. and C.A. Simmons, Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ Res*, 2011. 108(12): p. 1510-24.

20. Tseng, H. and K.J. Grande-Allen, Elastic fibers in the aortic valve spongiosa: a fresh perspective on its structure and role in overall tissue function. *Acta Biomater*, 2011. 7(5): p. 2101-8.
21. Dweck, M.R., N.A. Boon, and D.E. Newby, Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 60(19): p. 1854-63.
22. Mathieu, P., R. Bouchareb, and M.C. Boulanger, Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease. *J Immunol Res*, 2015. 2015: p. 851945.
23. Della Rocca, F., et al., Cell composition of the human pulmonary valve: a comparative study with the aortic valve--the VESALIO Project. *Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum labore Ingegno Obtinebitur. Ann Thorac Surg*, 2000. 70(5): p. 1594-600.
24. Mulholland, D.L. and A.I. Gotlieb, Cell biology of valvular interstitial cells. *Can J Cardiol*, 1996. 12(3): p. 231-6.
25. Taylor, P.M., S.P. Allen, and M.H. Yacoub, Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J Heart Valve Dis*, 2000. 9(1): p. 150-8.
26. Taylor, P.M., et al., The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. 35(2): p. 113-8.
27. Sappino, A.P., W. Schürch, and G. Gabbiani, Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*, 1990. 63(2): p. 144-61.
28. Smith, R.S., et al., Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol*, 1997. 151(2): p. 317-22.
29. Chen, J.H., et al., Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol*, 2009. 174(3): p. 1109-19.
30. Vanhoutte, P.M., et al., Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009. 196(2): p. 193-222.
31. Butcher, J.T., et al., Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1429-34.
32. Simmons, C.A., et al., Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*, 2005. 96(7): p. 792-9.
33. Moe, S.M. and N.X. Chen, Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2008. 19(2): p. 213-6.
34. Goodman, W.G., et al., Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med*, 2000. 342(20): p. 1478-83.
35. Noordzij, M., et al., Progression of aortic calcification is associated with disorders of mineral metabolism and mortality in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. 26(5): p. 1662-9.
36. Nigwekar, S.U., R. Thadhani, and V.M. Brandenburg, Calciphylaxis. *N Engl J Med*, 2018. 378(18): p. 1704-1714.
37. Cannata-Andía, J.B., et al., Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(12 Suppl 3): p. S267-73.
38. Mohler, E.R., 3rd, Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol*, 2004. 94(11): p. 1396-402, a6.
39. Speer, M.Y. and C.M. Giachelli, Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol*, 2004. 13(2): p. 63-70.
40. Brandenburg, V.M., A. Schuh, and R. Kramann, Valvular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2019. 26(6): p. 464-471.

41. Skolnick, A.H., et al., Osteoporosis treatment and progression of aortic stenosis. *Am J Cardiol*, 2009. 104(1): p. 122-4.
42. Pfister, R., et al., Inverse association between bone mineral density and risk of aortic stenosis in men and women in EPIC-Norfolk prospective study. *Int J Cardiol*, 2015. 178: p. 29-30.
43. Becs, G., et al., Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*, 2016. 20(2): p. 217-30.
44. Kestenbaum, B., et al., Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(2): p. 520-8.
45. Block, G.A., et al., Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis*, 1998. 31(4): p. 607-17.
46. Crouthamel, M.H., et al., Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. 33(11): p. 2625-32.
47. Li, X., H.Y. Yang, and C.M. Giachelli, Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*, 2006. 98(7): p. 905-12.
48. El Husseini, D., et al., High expression of the Pi-transporter SLC20A1/Pit1 in calcific aortic valve disease promotes mineralization through regulation of Akt-1. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e53393.
49. Hruska, K.A., et al., Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2008. 74(2): p. 148-57.
50. Giachelli, C.M., The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int*, 2009. 75(9): p. 890-7.
51. Adeney, K.L., et al., Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20(2): p. 381-7.
52. Steitz, S.A., et al., Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res*, 2001. 89(12): p. 1147-54.
53. Sun, Y., et al., Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res*, 2012. 111(5): p. 543-52.
54. Franceschi, R.T. and G. Xiao, Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem*, 2003. 88(3): p. 446-54.
55. Ducy, P., et al., Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997. 89(5): p. 747-54.
56. Mathieu, P., et al., Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis*, 2005. 14(3): p. 353-7.
57. Côté, N., et al., ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. 52(5): p. 1191-202.
58. Mahmut, A., et al., Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. *Cardiovasc Res*, 2015. 106(1): p. 109-20.
59. Bertazzo, S., et al., Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nat Mater*, 2013. 12(6): p. 576-83.
60. Rajamannan, N.M., et al., Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*, 2003. 107(17): p. 2181-4.
61. Hruska, K.A., S. Mathew, and G. Saab, Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res*, 2005. 97(2): p. 105-14.

62. Bertazzo, S. and E. Gentleman, Aortic valve calcification: a bone of contention. *Eur Heart J*, 2017. 38(16): p. 1189-1193.
63. Torre, M., et al., Osseous and chondromatous metaplasia in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 2016. 25(1): p. 18-24.
64. Liu, T., et al., NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2017. 2: p. 17023-.
65. Zhao, G., et al., Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression. *Kidney Int*, 2012. 82(1): p. 34-44.
66. Mohler, E.R., 3rd, et al., Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*, 2001. 103(11): p. 1522-8.
67. Freeman, R.V. and C.M. Otto, Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*, 2005. 111(24): p. 3316-26.
68. O'Brien, K.D., et al., Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation*, 1995. 92(8): p. 2163-8.
69. Coté, N., et al., Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation*, 2013. 36(3): p. 573-81.
70. Baumgartner, H., et al., 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*, 2017. 38(36): p. 2739-2791.
71. Isoda, K., et al., Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(4): p. 708-15.
72. Wang, R., Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb j*, 2002. 16(13): p. 1792-8.
73. Wang, R., Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, 2012. 92(2): p. 791-896.
74. Nicholls, P. and J.K. Kim, Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system. *Can J Biochem*, 1982. 60(6): p. 613-23.
75. Wagner, F., et al., Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide--the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Crit Care*, 2009. 13(3): p. 213.
76. Yang, C., et al., Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in HaCaT cells through inhibition of ROS/NF- $\kappa$ B/COX-2 pathway. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e21971.
77. Mikami, Y., et al., Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem J*, 2011. 439(3): p. 479-85.
78. Shibuya, N., et al., 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal*, 2009. 11(4): p. 703-14.
79. Chen, X., K.H. Jhee, and W.D. Kruger, Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem*, 2004. 279(50): p. 52082-6.
80. Kabil, O., et al., The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H<sub>2</sub>S production in murine tissues. *Antioxid Redox Signal*, 2011. 15(2): p. 363-72.
81. Lavu, M., S. Bhushan, and D.J. Lefer, Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, 2011. 120(6): p. 219-29.
82. Shibuya, N., et al., A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun*, 2013. 4: p. 1366.
83. Benavides, G.A., et al., Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(46): p. 17977-82.
84. Olson, K.R., et al., Thiosulfate: a readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013. 305(6): p. R592-603.

85. Yang, J., et al., Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B(6). *Commun Biol*, 2019. 2: p. 194.
86. Kožich, V., et al., Human ultrarare genetic disorders of sulfur metabolism demonstrate redundancies in H<sub>2</sub>S homeostasis. *Redox Biol*, 2022. 58: p. 102517.
87. Hildebrandt, T.M. and M.K. Grieshaber, Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *Febs j*, 2008. 275(13): p. 3352-61.
88. Kabil, O. and R. Banerjee, Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H<sub>2</sub>S catabolism. *J Biol Chem*, 2012. 287(53): p. 44561-7.
89. Libiad, M., A. Sriraman, and R. Banerjee, Polymorphic Variants of Human Rhodanese Exhibit Differences in Thermal Stability and Sulfur Transfer Kinetics. *J Biol Chem*, 2015. 290(39): p. 23579-88.
90. Feng, C., G. Tollin, and J.H. Enemark, Sulfite oxidizing enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1774(5): p. 527-39.
91. Mellis, A.T., et al., The role of glutamate oxaloacetate transaminases in sulfite biosynthesis and H<sub>2</sub>S metabolism. *Redox Biol*, 2021. 38: p. 101800.
92. Jackson, M.R., S.L. Melideo, and M.S. Jorns, Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry*, 2012. 51(34): p. 6804-15.
93. Lagoutte, E., et al., Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1797(8): p. 1500-11.
94. Johnson-Winters, K., et al., Effects of interdomain tether length and flexibility on the kinetics of intramolecular electron transfer in human sulfite oxidase. *Biochemistry*, 2010. 49(6): p. 1290-6.
95. Libiad, M., et al., Hydrogen sulfide perturbs mitochondrial bioenergetics and triggers metabolic reprogramming in colon cells. *J Biol Chem*, 2019. 294(32): p. 12077-12090.
96. Togawa, T., et al., High performance liquid chromatographic determination of bound sulfide and sulfite and thiosulfate at their low levels in human serum by pre-column fluorescence derivatization with monobromobimane. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1992. 40(11): p. 3000-4.
97. Li, L., et al., Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 2008. 117(18): p. 2351-60.
98. Whiteman, M., et al., Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clin Sci (Lond)*, 2011. 121(11): p. 459-88.
99. DeLeon, E.R., G.F. Stoy, and K.R. Olson, Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Anal Biochem*, 2012. 421(1): p. 203-7.
100. Kulkarni-Chitnis, M., et al., Inhibitory action of novel hydrogen sulfide donors on bovine isolated posterior ciliary arteries. *Exp Eye Res*, 2015. 134: p. 73-9.
101. Kang, J., D.L. Neill, and M. Xian, Phosphonothioate-Based Hydrogen Sulfide Releasing Reagents: Chemistry and Biological Applications. *Front Pharmacol*, 2017. 8: p. 457.
102. Nagy, P., et al., Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1840(2): p. 876-91.
103. Chitnis, M.K., et al., Pharmacological actions of the slow release hydrogen sulfide donor GYY4137 on phenylephrine-induced tone in isolated bovine ciliary artery. *Exp Eye Res*, 2013. 116: p. 350-4.

104. Zhao, Y., H. Wang, and M. Xian, Cysteine-activated hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors. *J Am Chem Soc*, 2011. 133(1): p. 15-7.
105. Zhao, Y., et al., Controllable hydrogen sulfide donors and their activity against myocardial ischemia-reperfusion injury. *ACS Chem Biol*, 2013. 8(6): p. 1283-90.
106. Roger, T., et al., New biologically active hydrogen sulfide donors. *Chembiochem*, 2013. 14(17): p. 2268-71.
107. Whiteman, M., et al., Phosphinodithioate and Phosphoramidodithioate Hydrogen Sulfide Donors. *Handb Exp Pharmacol*, 2015. 230: p. 337-63.
108. Malone Rubright, S.L., L.L. Pearce, and J. Peterson, Environmental toxicology of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide*, 2017. 71: p. 1-13.
109. Aschner, M., et al., Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) Signaling as a Protective Mechanism against Endogenous and Exogenous Neurotoxicants. *Curr Neuropharmacol*, 2022. 20(10): p. 1908-1924.
110. Szabo, C. and A. Papapetropoulos, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H<sub>2</sub>S Levels: H<sub>2</sub>S Donors and H<sub>2</sub>S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev*, 2017. 69(4): p. 497-564.
111. Olson, K.R. and N.L. Whitfield, Hydrogen sulfide and oxygen sensing in the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*, 2010. 12(10): p. 1219-34.
112. Dilek, N., et al., Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system. *Pharmacol Res*, 2020. 161: p. 105119.
113. Li, M., J. Mao, and Y. Zhu, New Therapeutic Approaches Using Hydrogen Sulfide Donors in Inflammation and Immune Response. *Antioxid Redox Signal*, 2021. 35(5): p. 341-356.
114. Ahmad, A., et al., AP39, A Mitochondrially Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Exerts Protective Effects in Renal Epithelial Cells Subjected to Oxidative Stress in Vitro and in Acute Renal Injury in Vivo. *Shock*, 2016. 45(1): p. 88-97.
115. Batty, M., M.R. Bennett, and E. Yu, The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells*, 2022. 11(23).
116. Kuiper, J., et al., Immunomodulation of the inflammatory response in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2007. 18(5): p. 521-6.
117. Zavaczki, E., et al., Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*, 2011. 80(7): p. 731-9.
118. Sikura, K., et al., Hydrogen sulfide inhibits calcification of heart valves; implications for calcific aortic valve disease. *Br J Pharmacol*, 2020. 177(4): p. 793-809.
119. Rose, P., P.K. Moore, and Y.Z. Zhu, H<sub>2</sub>S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci*, 2017. 74(8): p. 1391-1412.
120. Mani, S., et al., Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*, 2013. 127(25): p. 2523-34.
121. Yuan, S., et al., Cystathionine  $\gamma$ -Lyase Modulates Flow-Dependent Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. 38(9): p. 2126-2136.
122. Jiang, H.L., et al., [Changes of the new gaseous transmitter H<sub>2</sub>S in patients with coronary heart disease]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005. 25(8): p. 951-4.
123. Longchamp, A., et al., Plasma Hydrogen Sulfide Is Positively Associated With Post-operative Survival in Patients Undergoing Surgical Revascularization. *Front Cardiovasc Med*, 2021. 8: p. 750926.
124. Karwi, Q.G., et al., AP39, a mitochondria-targeting hydrogen sulfide (H<sub>2</sub> S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling. *Br J Pharmacol*, 2017. 174(4): p. 287-301.

125. Gerő, D., et al., The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular endothelial cells in vitro. *Pharmacol Res*, 2016. 113(Pt A): p. 186-198.
126. Le Trionnaire, S., et al., The synthesis and functional evaluation of a mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5-yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphonium bromide (AP39). *MedChemComm*, 2014. 5(6): p. 728-736.
127. Zhu, C., et al., Supplementing preservation solution with mitochondria-targeted H<sub>2</sub> S donor AP39 protects cardiac grafts from prolonged cold ischemia-reperfusion injury in heart transplantation. *Am J Transplant*, 2019. 19(11): p. 3139-3148.
128. Lobb, I., et al., Hydrogen Sulfide Protects Renal Grafts Against Prolonged Cold Ischemia-Reperfusion Injury via Specific Mitochondrial Actions. *Am J Transplant*, 2017. 17(2): p. 341-352.
129. Huang, K., et al., Highly efficient and selective absorption of H<sub>2</sub>S in phenolic ionic liquids: A cooperative result of anionic strong basicity and cationic hydrogen-bond donation. *Chemical Engineering Science*, 2017. 173: p. 253-263.
130. Smith, P.K., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985. 150(1): p. 76-85.
131. Gilboa-Garber, N., Direct spectrophotometric determination of inorganic sulfide in biological materials and in other complex mixtures. *Anal Biochem*, 1971. 43(1): p. 129-33.
132. Ang, A.D., et al., Measuring free tissue sulfide. *Advances in Biological Chemistry*, 2012. Vol.02No.04: p. 6.
133. Kožich, V., et al., Thioethers as markers of hydrogen sulfide production in homocystinurias. *Biochimie*, 2016. 126: p. 14-20.
134. Akaike, T., et al., Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun*, 2017. 8(1): p. 1177.
135. Potor, L., et al., Hydrogen Sulfide Abrogates Hemoglobin-Lipid Interaction in Atherosclerotic Lesion. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. 2018: p. 3812568.
136. Whiteman, M., et al., The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal*, 2010. 12(10): p. 1147-54.
137. Sikura, K., et al., Potential Role of H-Ferritin in Mitigating Valvular Mineralization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. 39(3): p. 413-431.
138. Jono, S., et al., Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*, 2000. 87(7): p. E10-7.
139. Marutani, E., et al., Sulfide catabolism ameliorates hypoxic brain injury. *Nat Commun*, 2021. 12(1): p. 3108.
140. London, G.M., et al., Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. 18(9): p. 1731-40.
141. Szczesny, B., et al., AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide*, 2014. 41: p. 120-30.
142. Lusic, A.J., R. Mar, and P. Pajukanta, Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2004. 5: p. 189-218.
143. Di Iorio, B.R., et al., Cardiac vascular calcification and QT interval in ESRD patients: is there a link? *Blood Purif*, 2006. 24(5-6): p. 451-9.

144. Mazzone, A., et al., Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(9): p. 1670-6.
145. Hosen, M.J., et al., Perturbation of specific pro-mineralizing signalling pathways in human and murine pseudoxanthoma elasticum. *Orphanet J Rare Dis*, 2014. 9: p. 66.
146. Raaz, U., et al., Transcription Factor Runx2 Promotes Aortic Fibrosis and Stiffness in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ Res*, 2015. 117(6): p. 513-24.
147. Moradi, H., D.A. Sica, and K. Kalantar-Zadeh, Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, 2013. 38(2): p. 136-48.
148. Zarjou, A., et al., Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. *J Clin Invest*, 2013. 123(10): p. 4423-34.
149. Nandi, S.S. and P.K. Mishra, H(2)S and homocysteine control a novel feedback regulation of cystathionine beta synthase and cystathionine gamma lyase in cardiomyocytes. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 3639.
150. Bibli, S.I., et al., Cystathionine  $\gamma$  Lyase Sulfhydrates the RNA Binding Protein Human Antigen R to Preserve Endothelial Cell Function and Delay Atherogenesis. *Circulation*, 2019. 139(1): p. 101-114.
151. Bir, S.C. and C.G. Kevil, Sulfane sustains vascular health: insights into cystathionine  $\gamma$ -lyase function. *Circulation*, 2013. 127(25): p. 2472-4.
152. Dóka, É., et al., A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci Adv*, 2016. 2(1): p. e1500968.
153. Wedmann, R., et al., Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chem Sci*, 2016. 7(5): p. 3414-3426.
154. Bogdándi, V., et al., Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell? *Br J Pharmacol*, 2019. 176(4): p. 646-670.
155. Nagy, P., et al., Measuring Reactive Sulfur Species and Thiol Oxidation States: Challenges and Cautions in Relation to Alkylation-Based Protocols. *Antioxid Redox Signal*, 2020. 33(16): p. 1174-1189.
156. Ditrói, T., et al., Comprehensive analysis of how experimental parameters affect H(2)S measurements by the monobromobimane method. *Free Radic Biol Med*, 2019. 136: p. 146-158.
157. Shen, X., et al., Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens. *Free Radic Biol Med*, 2012. 52(11-12): p. 2276-83.
158. Éva Sikura, K., et al., Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- $\kappa$ B, a link between inflammation and mineralization. *J Adv Res*, 2021. 27: p. 165-176.
159. Erdélyi, K., et al., Reprogrammed transsulfuration promotes basal-like breast tumor progression via realigning cellular cysteine persulfidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. 118(45).

## **11. TÁRGYSZAVAK: KEYWORDS**

kénhidrogén: hydrogen sulfide

AP72: AP72

aorta billentyű: aortic valve

gyulladás: inflammation

meszes aorta billentyű betegség: calcified aortic valve disease

érelmeszesedés: atherosclerosis

krónikus veseelégtelenség: chronic kidney disease

foszfát: phosphate

mitokondriumok: mitochondria

kénhidrogén oxidáció: hydrogen sulfide oxidation

kalcifikáció: calcification

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Balla József akadémikus úrnak, aki nem csak szakmailag, hanem emberileg is támogatta tudományos előmeneteletemet, és megannyi elfoglaltsága ellenére, mindig igyekezett időt szentelni a dolgaimra. Klinikusként olyan rálátása volt a kutatómunkámra, amely nélkül ez a doktori értekezés nem jöhetett volna létre ebben a formában.

Külön szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Balla György akadémikus úrnak, aki a munkacsoporti megbeszéléseken hasznos meglátásaival, ötleteivel, tanácsaival segítette a kutatási eredményeimet.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szerafin Tamás szívsebésznek, aki több mint egy évtizede, fáradhatatlanul küldi a munkánkhoz nélkülözhetetlen szívbillentyű mintákat.

Hálával tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Potor Lászlónak, Dr. Sikura Katalinnak és Fürtös Ibolyának, akik végig segítettek az eredményeim elérésében, támogatásukra mind emberileg, mind szakmailag bármikor számíthattam.

Szeretnék köszönetet mondani munkacsoportunk minden tagjának, hogy lehetővé tették számomra a zavartalan munkavégzést.

Külön köszönöm a munkáját Dr. Hendrik Zoltánnak és Beke Líviának a szövettani munkákban nyújtott önzetlen segítségükért.

Köszönetet szeretnék mondani Nemesdy Xéniának és Szabóné Dajka Editnek az adminisztrációs ügyekben nyújtott segítségükért és Mayerné Tóth Juditnak a megrendelések és egyéb laboratóriumi dolgok intézéséért.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak, páromnak és barátaimnak, hogy az évek során végig kitartottak mellettem, támogattak, segítettek és biztattak, hogy ne adjam fel.

Édesanyámnak nagyon sok mindent köszönhetek az életemben, de sajnos a tudományos munkám elkészítését már nem élhette meg, ezért disszertációm az Ő emlékének ajánlom.

**A disszertációm támogató pályázatok:** OTKA-K 132828, GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (IRONHEARTH), EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER), TKP2020-NKA-04, 2020-4.1.1-TKP2020, TKP2021-EGA-18, ED\_18-1-2019-0028.

## 13. FÜGGELÉK

Megjelent közlemények és publikációk listája:



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/280/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

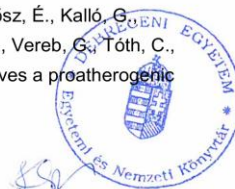
Jelölt: Combi Zsolt  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10073577

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Combi, Z.**, Potor, L., Nagy, P., Sikura, K. É., Ditrói, T., Jurányi, E. P., Galambos, K., Szerafin, T., Gergely, P., Whiteman, M., Torregrossa, R., Ding, Y., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide as an anti-calcification stratagem in human aortic valve: altered biogenesis and mitochondrial metabolism of H<sub>2</sub>S lead to H<sub>2</sub>S deficiency in calcific aortic valve disease.  
*Redox Biol.* 60, 1-19, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2023.102629>  
IF: 11.4 (2022)
2. Sikura, K. É., **Combi, Z.**, Potor, L., Szerafin, T., Hendrik, Z., Méhes, G., Gergely, P., Whiteman, M., Beke, L., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- $\kappa$ B, a link between inflammation and mineralization.  
*J. Adv. Res.* 27, 165-176, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.005>  
IF: 12.822

### További közlemények

3. Potor, L., Hendrik, Z., Patsalos, A., Katona, É., Méhes, G., Pólska, S., Csósz, É., Kalló, G., Komáromi, I., **Combi, Z.**, Posta, N., Sikura, K. É., Pethő, D., Oros, M., Vereb, G., Tóth, C., Gergely, P., Nagy, L., Balla, G., Balla, J.: Oxidation of hemoglobin drives a proatherogenic polarization of macrophages in human atherosclerosis.  
*Antioxid. Redox Signal.* 35 (12), 917-950, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2020.8234>  
IF: 7.468





4. Potor, L., Sikura, K. É., Hegedűs, H., Pethő, D., Szabó, Z., Máthéné Szigeti, Z., Pócsi, I., Trencsényi, G., Szikra, D. P., Garai, I., Gáll, T., **Combi, Z.**, Kappelmayer, J., Balla, G., Balla, J.: The Fungal Iron Chelator Desferricoprofen Inhibits Atherosclerotic Plaque Formation. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (13), 1-23, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21134746>  
IF: 5.924
5. Kristóf, E., Klusóczki, Á., Veress, R., Shaw, A., **Combi, Z.**, Varga, K., Győry, F., Balajthy, Z., Bai, P., Bacsó, Z., Fésűs, L.: Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Exp. Cell Res.* 377 (1-2), 47-55, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.015>  
IF: 3.383
6. Oláh, V., **Combi, Z.**, Szöllősi, E., Kanalas, P., Mészáros, I.: Anthocyanins: possible antioxidants against Cr(VI) induced oxidative stress in *Spirodela polyrrhiza*. *Cereal Res. Commun.* 37 (Suppl.), 533-536, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/CRC.37.2009.Suppl.4>

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 40,997**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
24,222**

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

Debrecen, 2024.05.21.

