

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A hem és oxidált hemoglobin
formák endotélsejtekre kifejtett
proinflammatorikus hatása**

Erdei Judit Zsuzsa

Témavezető: Dr. Jeney Viktória



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori
Iskola

Debrecen, 2021

A hem és oxidált hemoglobin formák endotélsejtekre kifejtett proinflammatorikus hatása

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése
érdekében
az elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Erdei Judit Zsuzsa okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és
Immunbiológiai doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Jeney Viktória, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Cervenak László, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Dr. Cervenak László, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Boratkó Anita, PhD
Dr. Csuka Dorottya, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem
ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb Tanterme
2021. július 13. 11:00 óra

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A vörösvérsejt (VVT) szervezetünk leggyakrabban előforduló sejtípusa, melynek élettartama körülbelül 120 napra tehető. A VVT-k legfőbb alkotója a hemoglobin (Hb), az oxigén szállításáért felelős, négy alegységből felépülő globuláris fehérje, mely alegységenként egy-egy vas-protoporfirin IX (hem) prosztetikus csoportot is tartalmaz. A VVT-eket életútjuk végén a makrofágok fagocitálják, mely folyamat elsősorban a lépben játszódik le. A Hb lebontása ebben az esetben szabályozott mechanizmusok által történik, mely megteremti a hemvas biztonságos és effektív újrahasznosulásának a lehetőségét.

A VVT-k 1-2 %-a az érrendszeren belül lizál. Az ekkor szabaddá váló Hb, illetve hem eltávolítása a keringésből specifikus és nem specifikus Hb, illetve hemkötő fehérjék által valósul meg. A hem erős pro-oxidáns molekula, mely számos sejtípusban nagymértékben fokozza az oxidatív- és inflammatórikus stimulusokkal kiváltott sejthalált. A közelmúlt eredményei rámutattak arra is, hogy a hem veszély asszociált molekuláris mintázatként (danger/damage-associated molecular pattern: DAMP) viselkedik, és aktiválja a toll-like receptor 4 (TLR4) és a nucleotide-binding domain, leucine-rich Repeat containing 3 (NLRP3) innate immun útvonalakat makrofágokban.

A Hb oxidációja egy komplex folyamat, melynek során a hem vas egy-, illetve két-elektronos oxidációja és a globin oxidációja is bekövetkezhet. A Hb oxidációja során metHb, ferryl-, illetve oxoferrylHb, kovalens módon keresztkötött oxidált Hb formák, illetve

porfirin-globin keresztkötött formák képződhetnek, melyek kimutathatók fokozott hemolízissel járó betegségekben.

Hemolízis, hemorrhagia, VVT eredetű DAMP-ok

Mai ismereteink szerint számos megbetegedés összefüggésbe hozható a hemolízissel, illetve hemorrhagiás folyamatokkal, ami a VVT nem szabályozott lízise nyomán alakul ki. A hemolízis lehet intra- vagy extravaszkuláris és számos örökletes, illetve szerzett okra vezethető vissza. E mellett nagyon fontos megemlíteni a különféle infekciókkal összefüggésbe hozható hemolízist, melynek hátterében állhat parazita (pl. malária), vírus (pl. Dengue láz) vagy bakteriális fertőzés is.

A hemolízises megbetegedések mellett szintén említésre méltóak a hemorrhagiás megbetegedések. A leggyakoribb agyat érintő vérzés az intracerebrális hemorrhágia (ICH), melynek során az agy belsejében lévő véredény sérül és a vér az agyszövetbe szivárog. A subarahnoidális hemorrhagia (SAH), a pókhálójárta alatti vérzés. Intraventriculáris vérzés (IVH) esetén pedig a vérzés a kamrai rendszer irányába terjed.

Az intravaszkuláris hemolízist követően a keringésbe került Hb-t a haptoglobin (Hp), egy akut-fázis fehérje köti meg. A Hp-Hb komplexek a makrofágok CD163 receptorához kötődnek és receptor-mediált endocitózis által kerülnek felvételre. Az extracelluláris hem megkötésére specializálódott plazma fehérje a hemopexin (Hx). A hem-Hx komplexet a keringésből CD91 receptorokon keresztül veszik fel a sejtek receptor-mediált endocitózis révén. Miután a hem a sejtek

által felvételre kerül, a citoszólban degradálódik, mely folyamatot a hem oxigenáz-1 (HO-1) enzim katalizálja.

Masszív intravaszkuláris hemolízis esetén a Hb és hem scavenger útvonalak túltelítődnek, és a VVT-ből szabaddá váló anyagok feldúsulnak a plazmában, a szöveti állományban, illetve a CSF-ben. Számos, a VVT-ből hemolízis során kiszabaduló anyagról bizonyosodott be, hogy DAMP-ként viselkedve steril gyulladást okoz. Ebbe a csoportba tartozik az ATP, az IL-33, a hő sokk protein 70 (Hsp70), reziduális mitokondriális DNS, a ciklofilin A és a szabad hem is.

A hemoglobin oxidációja

A Hb oxidációja egy komplex folyamat, melyet több, fiziológiás körülmények között a vaszkulátúrában jelenlévő oxidáló ágens indukálhat, mint például a hidrogén-peroxid (H_2O_2) vagy a nitrogén-oxid. A folyamat első lépésében az oxiHb autooxidációja történik meg, melynek során metHb képződik. Az oxiHb 2 elektronos oxidációja során ferrylHb keletkezik, melyben a hem-vas oxyferryl formában ($Fe^{4+}=O$) van jelen. A metHb további oxidációja során ferrylHb globin gyök jön létre. A ferrylHb-ban található oxoferryl ion instabil, keletkezése után intramolekuláris elektron transzfer révén elektront vesz el a globin láncok kitüntetett aminosav oldalláncairól, és ferri formává redukálódik. A globin láncokon visszamaradt párosítatlan elektronok a Hb alegységek között stabil kovalens kötéseket alakítanak ki, ez által kovalens módon keresztkötött Hb multimerek képződnek.

A hem mediálta TLR4 és NLRP3 aktiváció

A hem TLR4 aktivációt előidéző hatását elsőként Figueiredo és munkatársai figyelték meg. Kimutatták, hogy a hem az LPS-hez hasonló mértékű TNF- α szekréciót indukál makrofágokban. Továbbá azt is kimutatták, hogy a proinflammatorikus hatás kiváltásához szükséges a hem gyűrű integritása. A makrofágok mellett a hem endotélsejtek aktivációjában is részt vesz TLR4-függő úton.

A hem proinflammatorikus hatásait vizsgálva Dutra és munkatársai kimutatták, hogy a hem IL-1 β szekréciót indukál LPS-sel előkezelt makrofágokban. Bizonyították, hogy a hem az NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül fejt ki e hatását, ugyanis kaszpáz-1 illetve NLRP3 deficiens egerekből származó makrofágokban nem tapasztaltak IL-1 β szekréciót.

Az endotélsejtek jellemzői, funkciója

Az endotélsejtek barriert alkotnak a vér és a szövetek között, emellett pedig számos más folyamatban kulcsszerepet töltenek be. Funkciójuk sokrétű, részt vesznek az érfal tónusának szabályozásában, a hemosztázis fenntartásában, biztosítják az oldott tápanyagok felvételét a vérből a szövetek számára, antikoaguláns és trombozisztens felszint biztosítanak. Vazoaktív ágenseket képesek aktiválni és inaktiválni, a fehérvérsejtekkel pedig dinamikus kapcsolatban állnak, gyulladás esetén segítik azok eljutását a szövetekbe. Az endotélsejtek anti- és proinflammatorikus mediátorokat termelnek, melyek szerepet játszanak a gyulladási folyamatok szabályozásában.

NLRP3 inflammaszóma aktiváció endotélsejtekben

Az endotélsejtek expresszálják a veleszületett immunrendszer számos receptorát, melyek segítségével érzékelik és reagálnak a keringésbe jutott PAMP és DAMP molekulákra. Ennek megfelelően korábbi munkákban kimutatták, hogy az endotélsejtek expresszálják az NLRP3 inflammaszóma komponenseit, és számos DAMP-ról bebizonyították, hogy endotélsejtekben NLRP3 inflammaszóma aktivációt és IL-1 β szekréciót indukálnak. Az NLRP3 inflammaszóma aktiváció ROS termeléssel és az endotélsejtek bizonyos fokú nekrozisával jár együtt, melynek során további DAMP-ok pl. high mobility group box-1 (HMGB1), vagy ATP szabadulnak ki a nekrotizáló sejtekből. Az HMGB1 és az ATP további NLRP3 inflammaszóma aktivációt indukál, így az endotél diszfunkció tovább fokozódik. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjával összefüggő endotél diszfunkciót a diabétesz mellett számos más betegségben is megfigyelték.

Az intraventriculáris vérzés előfordulása koraszülöttekben, a hem és oxidált Hb formák szerepe

Az intraventriculáris vérzés (IVH) egy gyakorta előforduló komplikáció koraszülötteknél. A magzati agyfejlődés során a neuronok és gliasejtek az úgynevezett germinális mátrixból (GM) vándorolnak ki, mely egy erősen vaszkularizált, vékony réteg. Koraszülöttek esetében az IVH oka a GM vérzése, ami abból adódik, hogy a GM kapilláris rendszere rendkívül érzékeny és sérülékeny, így nem tud megfelelően alkalmazkodni a koraszülöttek vérnyomás-

ingadozásához. A GM-IVH-nak súlyosságát tekintve négy stádiumát különböztetjük meg.

A koponyaűri vérzéseket követően a VVT lízise és a Hb akkumulációja figyelhető meg a liquorban. A Hb mellett a Hb oxidációja során keletkező metHb jelenlétét is kimutatták humán liquor mintákban IVH-t követően, illetve *in vivo* koraszülött nyúl IVH modellt használva. Gram és munkacsoportja kimutatta, hogy a metHb és a szabad hem fokozza innate immun receptorok (TLR-4, IL1R1), pro-inflammatórikus, valamint kemotaktikus effektor molekulák (IL-1 β , TNF α , MCP-1, IL-8 és IL-6) expresszióját choroid plexus epitel sejtekben.

2. Célkitűzés

A korábbiakban tárgyalt eddigi megfigyelések, eredmények és a szakirodalom gondos áttanulmányozása után az alábbi hipotéziseket és célkitűzéseket fogalmaztuk meg.

1. Hipotézis: A hem proinflammatórikus molekula, mely *in vivo* körülmények között és *in vitro* endotélsejtekben IL-1 β szekréciót indukál.

Célkitűzés: A hem IL-1 β mRNS és fehérje expressziójára és szekréciójára kifejtett hatásának vizsgálata C57BL/6 egerekben, valamint *in vitro* körülmények között HUVEC sejteken.

2. Hipotézis: A hem az NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül fokozza az IL-1 β termelését.

Célkitűzés: Vizsgáljuk a hem hatását HUVEC NLRP3 expressziójára, valamint az NLRP3 szerepét egerek hemmel

indukált kaszpáz-1 aktivációjában és IL-1 β termelésében *in vivo* körülmények között NLRP3 deficiens egerekben.

3. Hipotézis: A hem által előidézett fokozott ROS termelésnek szerepe van az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában.

Célkitűzés: Vizsgáljuk a hem-által előidézett NLRP3 inflammaszóma aktivációt a ROS termelés gátlása mellett *in vitro* körülmények között, HUVEC sejteken.

4. Hipotézis: A hemkötő fehérjék csökkentik a hem proinflammatorikus hatását.

Célkitűzés: Vizsgáljuk az albuminnal komplexált hem IL-1 β termelésre kifejtett hatását HUVEC sejteken.

5. Hipotézis: IVH-t követően Hb oxidációs termékek akkumulálódnak a liquorban.

Célkitűzés: Különböző oxidációs állapotú Hb formák kvantitatív és kvalitatív analízise IVH-n átesett koraszülöttek liquor mintáiban.

6. Hipotézis: Az oxidált Hb formák és a szabad hem szerepet játszik az IVH-t követő neuroinflammációban.

Célkitűzés: Meghatározzuk az inflammatorikus citokinek és endotél aktivációs markerek szintjét IVH-t követően nyert liquor mintákban. Összefüggéseket keresünk a gyulladásos markerek és a különböző oxidációs állapotú Hb formák mennyisége között IVH-t követően nyert liquor mintákban. Vizsgáljuk a különböző oxidációs állapotú Hb formák hatását agyi mikrovaskuláris endotélsejtek aktivációjára.

3. Anyagok és módszerek

Állatkísérletek

Kísérleteink során negyven C57BL/6 egeret használtunk fel. Az egereket különböző dózisban hemmel, LPS-sel illetve hem + LPS-sel kezeltük intraperitoneálisan. A peritoneumba infiltrálódott leukociták számát áramlási citometriával határoztuk meg.

Sejttenyésztés

Kísérleteinket primér humán umblikális véna (HUVEC) és humán agyi mikrovaskuláris endotél sejteken (HBEC) végeztük.

Humán Hb preparálása

A Hb-t önkéntesektől vett heparinnal alvadásgátolt vérből tisztítottuk anioncserélő kromatográfiával DEAE Sepharose CL-6B töltetű oszlopon. MetHb előállításánál a Hb-t 1,5-szeres moláris mennyiségű $K_3[Fe(CN)_6]$ -al reagáltattuk, FerrylHb előállításához a Hb-t a H_2O_2 -dal oxidáltuk. Az oxidáció végeztével a mintákat dializáltuk és felhasználásig $-70^\circ C$ -on tároltuk.

Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

Az RNS-t Trizol (RNA-STAT60, Tel-Test B Labs, Alvin, TX, USA) reagenssel szolubilizáltuk és a tisztítást a gyártó által biztosított protokoll szerint végeztük. Két μg RNS-t írtunk át cDNS-sé, és a target gének amplifikációja során iTaq™ Universal Probes Supermix master mixet és validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát és a hozzá megtervezett primereket használtuk. A PCR reakciót valós idejű qPCR készülék segítségével végeztük.

Western blot analízis

A teljes sejt lizátumot 10%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membrán blokkolása után hozzáadtuk az elsődleges, majd intenzív mosást követően a másodlagos antitesteket. Az eredményt ECL reagenssel hívtuk elő, és röntgen filmen tettük láthatóvá.

ROS képződés vizsgálata

A ROS-képződést DCFDA (5-(6)-klorometil-2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetát, acetyl észter) módszerrel detektáltuk a gyártó utasításait követve. Néhány kísérletünkben a ROS képződést N-acetil-cisztein (NAC)-nel gátoltuk.

IL-1 β szekréció vizsgálata HUVEC-en

A sejtkezelés után a felülúszókat leszívtuk és az IL-1 β tartalmat 100 μ L hígítatlan felülúszóból ELISA módszerrel határoztuk meg, a gyártó által biztosított protokoll szerint.

A betegetől származó CSF minták gyűjtése

A vizsgálatainkhoz használt liquor minták minden egyes esetben diagnosztikából visszamaradt minták voltak, melyeket a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján gyűjtöttek. A koraszülött betegeket (n=20) III. sátidumú IVH-val diagnosztizálták. A mintavétel után a mintákat centrifugáltuk a felülúszókat szétporcióztuk, és az analízisig -70 °C-on tároltuk.

Hb, methHb, ferrylHb, totál hem, szabad hem és bilirubin szintek meghatározása CSF-ből

A CSF minták Hb, methHb és ferrylHb szintjének meghatározásához felvettük a CSF minták abszorpciós spektrumát és az 541, 576 és 630

nm-en mért abszorbanca értékekből számítottuk ki az egyes Hb oxidációs termékek koncentrációját. A CSF minták totál hem koncentrációját QuantiChrom Heme Assay Kit-tel határoztuk meg a gyártói protokoll szerint eljárva. A bilirubin szinteket kolometriásan határoztuk meg.

Az endotél egysejtréteg integritásának vizsgálata

Kísérletünkben az ECIS (electric cell-substrate impedance sensing) módszert alkalmaztuk az egysejtréteg integritásának vizsgálatára. A HBEC sejteket speciális 8 lyukú ECIS lemezen tenyésztettük. Miután a sejtek konfluenssé váltak a különböző Hb formákkal kezeltük és a teljes impedancia spektrumot vizsgáltuk ECIS Z Θ készülékkel.

A szolubilis VCAM-1, ICAM-1 és IL-8 szintek meghatározása CSF mintákban

A szolubilis VCAM-1 és ICAM-1 szinteket ELISA módszerrel határoztuk meg a gyártói utasításokat követve.

A sejtek életképességének vizsgálata

A sejtek életképességét MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) módszerrel vizsgáltuk.

Statisztikai analízis

Az eredményeket átlagérték \pm standard deviáció (SD) értékben adtuk meg. Az eredmények statisztikai analízisét GraphPad Prism 8.01 szoftverrel végeztük. Az eredményeket többszörös összehasonlítás esetén egytényezős ANOVA-t követő post hoc Tukey-féle többszörös összehasonlítás analízissel adtuk meg. A $P < 0,05$ eredményeket szignifikáns módon eltérőnek tekintettük. A korrelációs analízisek értékénél $r > 0,7$ felett tekintettük erős korrelációnak

4. Eredmények

A hem proinflammatorikus jellege és hatása az IL-1 β szekréciójára *in vivo*

Első kísérletünk célja annak a vizsgálata volt, hogy az inflammatorikus hatás együtt jár-e az IL-1 β proinflammatorikus citokin hasüregbeli szintjének emelkedésével. Ezért C57BL/6 egerek hasüregébe hemet injektáltunk 75, 150, illetve 300 nmol hem/hasüreg dózisban. A hasüregtet 16 óra elteltével kimostuk, és meghatároztuk a hasüregbe infiltrálódott monociták és neutrofil granulociták számát, valamint a mosófolyadék IL-1 β szintjét. Megállapítottuk, hogy a hem dóziszfüggő módon indukálja a monociták és a neutrofil granulociták peritonális infiltrációját. A legmagasabb dózisban (300 nmol/hasüreg) alkalmazott hem hatására a peritoneális mosófolyadék IL-1 β szintje mintegy 25-szörösére emelkedett.

A hem fokozza a HUVEC NLRP3 expresszióját és az IL-1 β szekrécióját

Egy korábbi publikációban Dutra és munkatársai kimutatták, hogy a hem aktiválja az NLRP3/ASC/kaspáz-1-et tartalmazó inflammaszóma komplexet és aktív IL-1 β képződést indukál LPS-sel előkezelt makrofágokban. Kísérletünkben a sejteket LPS-sel előkezeltünk (10 μ g/mL, 24 óra) vagy kezeletlenül hagytuk, és különböző koncentrációjú hem (10, 25, 50 μ mol/L) hatásának tettük ki. Kimutattuk, hogy a hem dóziszfüggő módon fokozta az NLRP3 mRNS szintjét. Ezt követően a hem hatását vizsgáltuk IL-1 β mRNS és fehérje expressziójára. Kimutattuk, hogy a hem magas

koncentrációban (50 $\mu\text{mol/L}$) kismértékben emeli a HUVEC IL-1 β mRNS és szekretált IL-1 β szintjét.

A hem magas koncentrációban csökkenti a HUVEC viabilitását.

Kísérletünkben a hem HUVEC-re kifejtett toxikus hatását vizsgáltuk meg LPS-sel előkezelt, illetve kezeletlen sejteken. Megállapítottuk, hogy a hem alacsonyabb koncentrációban (10, 25 $\mu\text{mol/L}$) nem befolyásolta számottevően az endotélsejtek viabilitását, még LPS-sel előkezelés esetén sem. Ugyanakkor a hem 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban alkalmazva jelentősen csökkentette a HUVEC viabilitását, mely független volt az LPS előkezeléstől.

A hem integritása kulcsfontosságú a HUVEC hem-által indukált IL-1 β termelésében

Következő kísérletünkben a hem szerkezeti sajátosságainak és komponenseinek szerepét vizsgáltuk az inflammaszóma aktivációban. Vizsgálatainkhoz PPIX-et és vas-szulfátot használtunk. Kimutattuk, hogy sem a PPIX sem és a szabad vas (Fe^{2+}) nem indukálta az IL-1 β mRNS szintjének emelkedését LPS-el előkezelt HUVEC sejteken. Ezzel összhangban, sem a PPIX sem a Fe^{2+} hatására nem tapasztaltunk emelkedést az LPS-sel előkezelt HUVEC sejtek felülülőszójának IL-1 β szintjében.

A fokozott ROS képződés szerepet játszik a HUVEC sejtek hem-mediálta IL-1 β termelésében

Elsőként az LPS hatását vizsgáltuk HUVEC ROS termelésére és a ROS termelés kismértékű fokozódását tapasztaltuk már a legalacsonyabb LPS koncentráció esetén. A hemet 12,5 és 25 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban alkalmaztuk. A hem mindkét vizsgált

koncentrációban a HUVEC ROS termelésének nagyfokú emelkedését okozta, amit az LPS előkezelés enyhén, de szignifikáns módon még tovább fokozott. Továbbá a sejteket az ismert gyökfogóval, NAC-nel kezeltük. A NAC jelentős mértékben gátolta az LPS-sel és hemmel kezelt endotélsejtek ROS termelését.

A hem komplexálása a proinflammatorikus hatás csökkenésével jár

Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az albumin gátolja-e a hem által indukált pro-inflammatorikus válaszokat. Elsőként a hem-albumin komplex (H-A) IL-1 β expresszióra kifejtett hatását vizsgáltuk LPS-sel előkezelt, illetve kontroll HUVEC-en. A H-A a hemmel ellentétben nem váltotta ki sem az IL-1 β mRNS szint emelkedését, sem az IL-1 β szekrécióját LPS-sel előkezelt HUVEC-ben. Ezt követően vizsgáltuk az albuminnal való komplexálás hatását a hem prooxidáns viselkedésére. A H-A a hemmel ellentétben nem fokozta az LPS-sel előkezelt HUVEC ROS termelését. Végül azt vizsgáltuk, hogy a hem albuminnal való komplexálása gátolja-e a hem által előidézett hasüregi gyulladást. Ennek érdekében C57BL/6 egerek hasüregébe hemet, illetve H-A-t injektáltunk 300 nmol/egér dózisban. Megállapítottuk, hogy a hemmel ellentétben a H-A nem idézte elő a leukociták peritoneális infiltrációját.

Az oxidált Hb formák nem váltják ki az NLRP3 inflammaszóma aktivációját endotélsejteken

Elsőként a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák HO-1 indukáló képességét vizsgáltuk. A HUVEC-et Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal és hemmel kezeltük 25 μ mol/L hem koncentrációban.

Várakozásainknak megfelelően, a hem idézett elő legmarkánsabb emelkedést a HO-1 mRNA expressziójában, ugyanakkor a metHb és a ferrylHb is szignifikáns mértékben megemelte a HO-1 mRNA szintjét. Hasonló eredményre jutottunk a HO-1 fehérje expresszióját vizsgálva. A hem volt a leghatékonyabb induktor, melyet a ferrylHb, majd a metHb követett.

A következő kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák hogyan befolyásolják az intracelluláris ROS képződését. Alacsony koncentrációban (25 $\mu\text{mol/L}$) a hemmel ellentétben egyik Hb forma sem fokozta a ROS képződést HUVEC-ben. Ugyanakkor a különböző Hb formákat magas, 250 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban alkalmazva, a ROS képződés fokozódását tapasztaltuk metHb-nal, illetve ferrylHb-nal kezelt HUVEC-ben.

Ezek után azt vizsgáltuk, hogy a különböző Hb formák képesek-e IL-1 β képződést indukálni HUVEC-en. Kontroll, illetve LPS-sel előkezelt HUVEC sejteket a különböző oxidáltsági fokú Hb formákkal kezeltünk alacsony (25 $\mu\text{mol/L}$) és magas (250 $\mu\text{mol/L}$) koncentrációban. A magas koncentrációjú ferrylHb hatására az IL-1 β mRNA szint 2,2-szeres emelkedését figyeltük meg, ugyanakkor a Hb, illetve a metHb nem fokozta az IL-1 β mRNA expresszióját. Kísérletünket LPS-sel előkezelt sejteken megismételtük, és azt tapasztaltuk, hogy a Hb formák nem fokozták az LPS által indukált IL-1 β választ

Az NLRP3 szerepe a hem-mediált IL-1 β termelésben

Az NLRP3 szerepét vizsgáltuk a hem által indukált IL-1 β képződésben *in vivo* kísérleti rendszerben NLRP3 deficiens egereken.

Ehhez WT és NLRP3^{-/-} egerek hasüregébe hemet (300 nmol/egér) vagy PBS-t (kontroll) injektáltunk. A kaszpáz-1 enzim aktivációja során hasad, és egy 20 kDa (p20) méretű aktív kaszpáz-1 keletkezik. A kaszpáz p20 szintje a hemmel kezelt WT egerekben a kontroll egerekhez képest mintegy ötszörösére emelkedett, ugyanakkor a hemmel kezelt NLRP3^{-/-} egerek májában kaszpáz aktivációt nem tapasztaltunk. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a májminták IL-1 β expresszióját is. Az NLRP3 inflammaszóma komplex aktivációjának következtében az aktiválódott kaszpáz-1 hasítja a pro-IL-1 β -t, melynek következtében kialakul a 20 kDa méretű aktív IL-1 β , mely formát detektáltunk a hemmel kezelt WT egerek májmintáiban. Ezzel ellentétben, a hemmel kezelt NLRP3 deficiens egerek májában aktív IL-1 β -t nem detektáltunk.

A különböző Hb formák, szabad hem és bilirubin felhalmozódása a cerebrospinális folyadékban (CSF) intraventriculáris vérzést (IVH) követően

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy IVH-t követően a CSF-ban feldúsuló különféle Hb oxidációs termékek hozzájárulhatnak-e az IVH-t követő neuroinflammáció kialakulásához. Vizsgálatainkhoz CSF mintákat gyűjtöttünk a Debreceni Egyetem Sebészeti Klinikájának közreműködésével. A tanulmány során húsz III. stádiumú IVH-ban szenvedő betegek CSF mintáját analizáltuk. A mintáinkat három csoportba osztottuk a születés és a mintavétel között eltelt idő alapján. Az első csoportba azokat a mintákat soroltuk, melyeket a születést követő 20 napon belül vettek le (0-20), a második csoportba a 21-40. nap között levett, a 3. csoportba pedig a 41-60. nap

között levett CSF mintákat soroltuk. Meghatároztuk az egyes minták Hb, metHb és ferrylHb koncentrációját, a CSF minták látható tartományban felvett abszorpciós spektruma, és a szakirodalomban található extinciókoefficiensek alapján. A minták Hb szintje az IVH és a mintavétel között eltelt idő függvényében csökkenő tendenciát mutatott, és az IVH-t követő 41-60. nap között levett CSF mintákból Hb-t már nem tudtunk kimutatni. A Hb koncentrációkhoz hasonlóan a metHb koncentrációja magas volt az első csoport (0-20. nap) esetében, mely fokozatosan csökkent vizsgálataink ideje alatt. FerrylHb-t mindössze két, az IVH-t követő 20 napon belül levett CSF mintából tudtunk kimutatni.

A CSF mintákat SDS poliakrilamid gélelektorforézissel redukáló körülmények között komponenseire választottuk, majd Western blot módszerrel vizsgáltuk a Hb formák jelenlétét. A CSF minták különböző Hb formákat tartalmaztak. A CSF minták legnagyobb mennyiségben a 16 kDa móltömegű Hb monomert tartalmazták, de emellett Hb dimereket (32 kDa) és tetramereket (64 kDa) is ki tudtunk mutatni a CSF mintákból (**18. ábra A**). A Western blot vizsgálatokat kielemezve megállapítottuk, hogy a 0-20. nap között nyert CSF mintákban főként a monomerek jelenléte volt domináns ugyanakkor kisebb mértékben dimereket és nagyon kis mennyiségben tetramereket is tartalmazott. A Hb tetramerek aránya emelkedett a 21-40. nap között nyert CSF mintákban, míg a 41-60 nap között nyert CSF mintákban már csak tetramereket tudtunk kimutatni.

A Hb oxidációjának következtében a hem csoport ledisszociálhat a globinról, mely szabad hem megjelenéséhez vezet (nem Hb kötött

hem). Annak eldöntésére, hogy ez a folyamat lejátszódik-e az IVH-t követően a CSF-ben, elsőként a CSF minták összes hem tartalmát határoztuk meg. Az első csoportba (0-20. nap) sorolt mintákban magas hem koncentrációt, a második csoport (21-40. nap) CSF mintáiban szignifikánsan alacsonyabb hem koncentrációt mértünk míg a 41-60. nap között gyűjtött mintákban 1 $\mu\text{mol/L}$ alatti hem szintet mértünk. A hem és a Hb koncentráció között erős korrelációt találtunk ($r=0,7296$), melyből arra következtettünk, hogy várakozásunknak megfelelően a Hb a fő forrása a hemnek az általunk vizsgált CSF mintákban.

A teljes hem és a különböző Hb formák koncentrációjának ismeretében kiszámoltuk a CSF minták szabad (nem Hb-hoz kötött) hem tartalmát. A teljes hem tartalomhoz hasonlóan, a 0-20. nap közötti liquor minták szabad hem tartalma volt a legmagasabb. Az IVH-t követő 21-40. nap közötti minták szabad hem tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a 0-20. nap között nyert CSF mintáké, míg a 41-60. nap között levett CSF mintákban 1 $\mu\text{mol/L}$ alatti szabad hem volt megtalálható. A bilirubin a hem degradációs terméke, így a következő kísérletben a CSF minták bilirubin tartalmát határoztuk meg. Legmagasabb bilirubin koncentrációja az első csoportba eső (0-20. nap) CSF mintáknak, ami fokozatosan csökkent az idő elteltével.

A szabad hem és az oxidált Hb formák prooxidáns és proinflammatorikus hatása humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejtekre

Első kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy a különböző Hb formák képesek-e HO-1-et indukálni HBEC-en. Ennek érdekében

a HBEC-eket különböző Hb formákkal és szabad hemmel kezeltük (25 $\mu\text{mol/L}$). Az oxidált Hb formák (metHb és ferrylHb) $18,2 \pm 2,6$ -szoros indukciót, illetve $12,1 \pm 3,1$ -szeres indukciót okoztak a HO-1 mRNS szintekben, míg a Hb nem indukálta a HO-1 mRNS expressziót. A szabad hem sokkal erősebb induktora volt a HO-1-nek a HBEC-ben, ugyanis közel 1000-szeres emelkedést idézett elő a HO-1 mRNS szintjében. Ezzel párhuzamosan a metHb és a ferrylHb majdnem 20-szoros indukciót idézett elő a HO-1 fehérje expressziójában, míg a szabad hem hatására megközelítőleg 200-szoros növekedést tapasztaltunk. Következő kísérletünkben a hem és a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák hatását vizsgáltuk HBEC ROS termelésére. A sejteket Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal és hemmel kezeltük 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban. A hem dóziszfüggő módon fokozta a ROS termelést HBEC-ben, ugyanakkor a Hb formák nem befolyásolták a ROS szintjét.

Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a hem, illetve a különböző oxidáltsági fokú Hb formák befolyásolják-e a HBEC egysejtréteg integritását. A vizsgálathoz a sejteket speciális ECIS elektródokat tartalmazó lemezekben tenyésztettük. A konfluencia elérése után a sejteket 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációjú Hb, metHb és ferrylHb oldatokkal kezeltük és 4 órán keresztül mértük az endotélréteg ellenállás változását ECIS Z Θ készülékkel. A HBEC sejtek integritását a ferrylHb jelentős mértékben csökkentette, ugyanakkor a Hb és a metHb nem befolyásolta az endotélréteg átteresztőképességét.

Következő kísérletünkben a hem és a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák hatását vizsgáltuk HBEC VCAM-1, ICAM-1 és IL-8 expressziójára. A HBEC sejteket Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal, valamint hemmel (25 $\mu\text{mol/L}$) kezeltünk, és 4 óra elteltével vizsgáltuk a VCAM-1, ICAM-1 és IL-18 mRNS szintjét. Kísérleteink során az LPS-t 100 ng/ml koncentrációban pozitív kontrollként alkalmaztuk. A szabad hem és a ferrylHb jelentős VCAM-1 mRNS indukciót okozott, míg a Hb és a metHb ennél kisebb mértékű, megközelítőleg 5-szörös emelkedést okozott. Ugyanezt a trendet figyeltük meg a VCAM-1 fehérje expressziójában is, a hem és ferrylHb erősebben, a Hb és a metHb kisebb mértékben fokozta a VCAM-1 expresszióját. Továbbá, a hem és a ferrylHb fokozta az ICAM-1 mRNS expresszióját, és az IL-8 szekrécióját.

A hem és a proinflammatorikus markerek korrelációja IVH-t követően nyert CSF mintákban

Az általunk nyert *in vitro* adatok alapján arra következtettünk, hogy a Hb-ból származó hem kritikus szerepet játszhat az IVH-t követő inflammatorikus válasz kiváltásában. Ezért meghatároztuk a CSF minták sVCAM-1, sICAM-1 és IL-8 szintjét. Megállapítottuk, hogy a sVCAM-1 szintje a 0-20. nap között nyert CSF mintákban volt a legmagasabb. Ezzel összehasonlítva, szignifikánsan alacsonyabb sVCAM-1 szinteket mértünk a 41-60. nap között nyert CSF mintákban. A sICAM-1 szintek az IVH és a CSF vétel ideje között eltelt idő függvényében tendenciózusan, de nem szignifikánsan csökkentek. Legmagasabb IL-8 szinteket az IVH-t követő 0-20 nap között nyert mintákban mértük, majd fokozatos csökkenést

tapasztaltunk a 21-40, illetve 41-60 nap között nyert mintákban. Mindhárom gyulladási marker szintje pozitív korrelációt mutatott a CSF össz hem szintjével.

5. Diskusszió

A különböző ismert DAMP-ok, mint például az ATP vagy HMGB-1 IL-1 β képződését idézik elő endotélsejteken az NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül. Szintén ismert az NLRP3 szerepe hiperglikémia- és hiperkoleszterinémia-asszociált endotél aktivációban. Az endotélsejtek NLRP3 inflammaszóma aktivációja szerepet játszik a hemorrhágiás sokk okozta tüdőgyulladás pathomechanizmusában.

A különböző immunreceptorok (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2) aktiválása az inflammaszóma komplex összeszerelődéséhez vezet, mely az inflammatórikus kaspázok aktivációját és IL-1 β képződését, illetve szekretálódását indukálja. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a hem IL-1 β képződését idézi elő makrofágokon NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül. Eredményeink azt mutatják, hogy a hem a makrofágok mellett endotélsejtekben is indukálja az NLRP3 inflammaszómát, így feltételezhető, hogy intravaszkuláris hemolízissel járó betegségekben az endotélsejtek hozzájárulnak a gyulladási válasz kialakulásához.

Ismert, hogy a makrofágok NLRP3 inflammaszóma aktivációjához két szignálra van szükség. Az első szignál főként a TLR-en vagy TNF receptor 1 és 2-n keresztül történik, mely az NF- κ B mediálta NLRP3 expressziójához vezet. A második stimulus a PAMP-ok vagy DAMP-ok által lehetséges, melyek aktiválják az

NLRP3-at. Ez az inflammaszóma platform összeszerelődéséhez, a kaspáz-1 aktivációjához, illetve az ezt követő pro-IL-1 β hasításához és az aktív citokin szekretálódásához vezet. Ezt megerősíti Dutra és munkatársainak publikációja, amelyben kimutatták, hogy az LPS előkezelés nélkülözhetetlen a hem-mediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációjához makrofágokon. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az LPS előkezelés nagymértékben fokozza a HUVEC IL-1 β szekrécióját. Az endotélsejtek hemmel indukált IL-1 β termelése messze elmarad a makrofágok IL-1 β termelésétől, ugyanakkor az endotélsejtek hemre adott válaszána mértéke összevethető a szakirodalomban korábban leírt induktorokra (ATP, HMGB1) adott válasszal. A hem magas dózisban sejtthálta indukál az endotélsejtekben, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a sejtnekrózis során az extracelluláris térbe kerülő ATP és HMGB1, - melyek ismert NLRP3 induktorok endotélsejtekben - is hozzájárulnak a hem hatásához.

A hem fokozta a HUVEC NLRP3 mRNS és fehérje expresszióját LPS jelenlétében és hiányában is. Az NLRP3 szerepét a hem-mediált IL-1 β termelésben NLRP3 deficines egérmodellben vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a hem kaspáz-1 aktivációt és pro-IL-1 β hasítást idéz elő vad típusú egerekben, ugyanakkor NLRP3 deficines egerekben nem következik be a kaspáz-1 aktiváció, és a pro-IL-1 β hasítása. Ez arra utal, hogy az NLRP3 központi szerepet játszik a hem által indukált IL-1 β termelésben.

A hem a PPIX gyűrű és egy vas ion komplexe, melyet a pirrol gyűrűk N atomjai és a vas ion közötti koordinációs kötés stabilizál.

Intracellulárisan a hem bontását a hem oxigenáz enzimes család végzi, melynek során vas, biliverdin és szén-monoxid keletkezik. A hemből ily módon kiszabaduló vas emeli a sejtek átmeneti vasraktár szintjét. Korábban kimutatták, hogy a vas NLRP3 inflammaszóma aktivációt indukál humán monocitákban. Kimutattuk, hogy a monocitákkal ellentétben a vas önmagában képtelen aktív IL-1 β képződését indukálni HUVEC sejteken. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a PPIX nem indukálja NLRP3 inflammaszóma aktivációját és IL-1 β képződését LPS-el előkezelt endotélsejteken. Eredményeink alapján tehát arra következtethetünk, hogy a hemben található koordinált vasnak kritikus szerepe van az NLRP3 inflammaszóma aktivációban és az azt követő IL-1 β képződésében és szekretálódásban.

Ismert a fokozott ROS termelés szerepe az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában, és az is, hogy a hem pro-oxidáns hatásánál fogva nagymértékben fokozza endotélsejtek ROS termelését. E mellett az LPS is fokozza a ROS termelést. Ezen tények ismeretében vizsgáltuk a ROS szerepét a hem által indukált NLRP3 inflammaszóma aktivációban. Kimutattuk, hogy az LPS sokkal gyengébb induktora a ROS termelődésének HUVEC sejteken a hemhez viszonyítva. Emellett megfigyeltük, hogy az LPS előkezelés szinergista módon fokozta a hem mediálta ROS termelést HUVEC sejteken. A ROS scavenger NAC csökkentette a hem által indukált ROS képződést, és az IL-1 β szekrécióját is HUVEC-en, ami arra utal, hogy a fokozott ROS képződés központi szerepet játszik a hem-mediált NLRP3 inflammaszóma aktivációban. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációját a fokozott ROS képződés mellett számos

egyéb tényező is befolyásolhatja. Dutra és munkatársai kimutatták, hogy a hem mediálta inflammaszóma aktiváció makrofágokban a ROS képződéstől és a K^+ ionok kiáramlásától függ, azonban a lizoszóma destabilizációjától független. További vizsgálatok szükségesek annak a megállapítására, hogy a fokozott ROS termelés mellett a fokozott K^+ ion kiáramlás és a lizoszómális destabilizáció szerepet játszik-e a hem mediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációjában HUVEC sejteken.

Az extracelluláris hem pro-oxidáns és pro-inflammatórikus hatását specifikus és nem specifikus hemkötő plazma fehérjék kontrollálják. A Hx egy akut fázis plazma fehérje, mely az ismert fehérjék közül a legnagyobb affinitással köti a hemet. Ezen tulajdonságánál fogva a Hx kulcsszereplője az extracelluláris hem elleni védelmi rendszernek. A Hx mellett számos egyéb plazmafehérje rendelkezik hemkötő kapacitással, melyek szerepe masszív intravaszkuláris hemolízis esetén jelentkezik. Mennyiségét tekintve az albumin a plazma legjelentősebb nem specifikus hemkötő fehérjéje. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az albumin gátolja a hem mediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációt az LPS-el előkezelt HUVEC sejteken *in vitro* körülmények között, illetve blokkolni tudta a peritoneális leukocita infiltrációt *in vivo* körülmények között C57BL/6 egerekben.

Korábbi munkákban kimutatták, hogy a metHb és a ferryHb hemforrásként működik az endotélsejtek számára, ugyanakkor a Hb nem. Emellett a ferryHb az NF- κ B útvonalat aktiválva fokozza az adhézións molekulák expresszióját endotélsejtekben, és növeli az

egysejtréteg átjárhatóságát. A ferrylHb ezen hatásai függetlenek a hem disszociációjától, ugyanis a szabad hem, illetve a hem disszociációjára a ferrylHb-hoz hasonlóan képes metHb nem idézi elő az endotélsejtek aktivációját és a barrier funkció romlását sem. A hem hatásának kitett endotélsejtek HO-1-et expresszálnak, mely a hem lebontásához szükséges enzim. Munkánk során bizonyítottuk, hogy az oxidált Hb formák, a metHb és a ferrylHb a hem prosztetikus csoportjukat elengedik, mialatt a HO-1 mRNS és fehérje expressziója növekszik HUVEC sejtekben. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a metHb és a ferrylHb nagyságrendekkel gyengébb induktorai a HO-1 expressziójának mint a hem.

A szabad hemről ismert, hogy fokozza a ROS képződését HUVEC sejteken. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az oxidált Hb formák, a metHb és a ferrylHb szintén fokozta az endotélsejtek ROS termelését, a hemhez viszonyítva sokkal kisebb mértékben. Figyelembe véve, hogy a fokozott ROS termelés összefügg az NLRP3 inflammaszóma aktivációjával, azt is vizsgáltuk, hogy az oxidált Hb formák képesek-e NLRP3 inflammaszóma aktivációt indukálni és ezen keresztül IL-1 β termelését indukálni HUVEC sejteken. Megállapítottuk, hogy sem a metHb sem a ferrylHb nem indukált NLRP3 inflammaszóma aktivációt HUVEC-ben, amiből arra következtettünk, hogy intravaszkuláris hemolízis esetén a Hb-ból disszociálódott hem felelős az NLRP3 inflammaszóma aktivációjáért.

Dolgozatom második részében az IVH-t követően koraszülöttektől gyűjtött CSF minták analízisét végeztük el, illetve azt vizsgáltuk, hogy lehet-e szerepe a különféle oxidáltsági állapotú Hb

formáknak az IVH-t követő neuroinflammáció kiváltásában. Az IVH egy gyakorta előforduló komplikáció koraszülöttek esetében.

Elsődleges célunk a koraszülöttektől IVH-t követően gyűjtött CSF minták Hb tartalmának kvalitatív és kvantitatív analízise volt, azzal a céllal, hogy jobban megismerjük a Hb akkumulációjának kinetikáját és a Hb oxidálódása során képződő termékeket. Fontos megemlítenünk, hogy a CSF minták diagnosztikai céllal kerültek levételre, így a mintavétel időpontját befolyásolni nem tudtuk. A mintákat az összehasonlíthatóság érdekében önkényesen három csoportba rendeztük attól függően, hogy hány nap telt el az IVH és a mintavétel között. Az így létrehozott 3 csoport a következő volt: 0-20. nap, 21-40. nap, 41-60. nap. Kimutattuk, hogy az IVH-t követően a Hb akkumulálódik a liquorban, és oxidációja során metHb, ferrylHb, illetve kovalensen kereszt kötött oxidált globin multimerek képződnek. Az általunk vizsgált CSF minták esetében a metHb szintje a 0-20. nap között nyert mintákban $80,51 \pm 77,65 \mu\text{mol/L}$ volt, mely nagyságrendi egyezést mutat az előző tanulmányokban mért értékekkel ($\sim 40 \mu\text{mol/L}$), melyet az IVH-t követő harmadik napon mértek koraszülött nyúl modellben.

A Hb peroxidok hatására bekövetkező két-elektronos oxidációja során ferrylHb képződik, melyben a vas oxidációs állapota +4. A vas +4-es oxidációs állapotban instabil, ennek ellenére jelenlétét korábban vérből fiziológias és patofiziológias körülmények között is kimutatták, azonban jelenlétét a liquorban korábban nem vizsgálták. Az általunk vizsgált liquor minták közül kettő esetében sikerült ferrylHb jelenlétét kimutatni a 0-20. nap közötti minták csoportjában.

A ferrylHb-ban lévő +4-es oxidációs állapotú vas oxidálja a közelében lévő globin lánc egyes aminosav egységeit. A globin láncon visszamaradó párosítatlan elektronok pedig kovalens keresztkötéseket hoznak létre a globin láncok között. Ily módon képződött kovalens módon keresztkötött oxidált Hb molekulákat korábban kimutatták plazmából, vizeletből, illetve bevérzett atheroszklerotikus plakokkból. Vizsgálataink során elsőként detektáltunk kovalensen keresztkötött oxidált Hb multimereket liquor mintákban az IVH-t követő különböző időpontokban.

Intravaszkuláris hemolízist követően a plazmából az extracelluláris Hb eltávolítása a Hp-CD163 útvonalon történik. A plazmához hasonlóan a Hp jelen van a liquorban is, azonban a plazmához viszonyítva jóval alacsonyabb koncentrációban. Koraszülöttek esetén a liquor Hp tartalma, illetve Hb kötő kapacitása nem ismert, irodalmi és saját eredményeink azonban arra engednek következtetni, hogy IVH-t követően a liquor Hb kötő kapacitása nem elégséges, ami a Hb akkumulációjához és oxidációjához vezet. Így a Hb és a Hb oxidációs termékek az IVH-t követően az intraventriculáris térből bejuthatnak a periventriculáris fehér állományba és hozzájárulhatnak az IVH-t követő neuroinflammáció kialakulásához.

A liquorokban a teljes és a szabad hem tartalmat is meghatároztuk. A szabad, azaz Hb-nal nem asszociált hem koncentrációja az IVH-t követő 0-20. nap között nyert mintákban széles határok között (42-717 $\mu\text{mol/L}$) mozgott. A szabad hem forrása

valószínűsíthetően a metHb és a ferrylHb, mely sokkal kevésbé szorosan köti a hem prosztetikus csoportot, mint a Hb.

Az intravaszkuláris hemolízis során a plazmába került szabad hemet a Hx köti meg, és a CD91 receptoron keresztül távolítja el a keringésből. A Hx-CD91 rendszer megtalálható a központi idegrendszerben is, és ismert, hogy rendkívül fontos szerepet tölt be a hem által okozott toxicitás csökkentésében szubarachnodiális vérzés után. Nincs adat a koraszülöttek központi idegrendszerének hem stressz elleni védelméről és a liquor Hx szintjéről. Eredményeink arra utalnak, hogy koraszülöttekben IVH-t követően a Hx-CD91 útvonal túltelítődik, ami a hem liquorban való felhalmozódásához vezet.

A 21-40. nap között nyert liquor mintákban a Hb, metHb, ferrylHb, hem és szabad hem koncentrációja is alacsonyabb volt a 0-20. nap között nyert mintákkal összehasonlítva. A 41-60. nap között gyűjtött liquor minták esetén csak néhány mintában tudunk csekély mennyiségű hemet kimutatni. Ez egy aktív vagy passzív lassú eltávolítási mechanizmusra utal.

A kovalens módon keresztkötött Hb multimerek jelenlétét vizsgáltuk IVH-t követően a liquor mintákban és megfigyeltük, hogy az idő függvényében egyre nagyobb multimerek voltak jelen a liquorban. Így a 0-20. nap között nyert liquor mintákban a Hb monomer és a dimer volt a domináns forma, ugyanakkor a 41-60. nap között nyert mintákban csak Hb tetramert tudunk kimutatni. Mivel ezen mintákban korábban hem jelenlétét nem tudtuk bizonyítani, feltételezhetjük, hogy ezen globin tetramerekről a hem prosztetikus csoport már korábban disszociált. Ezen forma jelenléte a 41-60. nap

között vizsgált mintákban arra enged következtetni, hogy a kovalens módon keresztkötött oxidált Hb formák eltávolítására nincs, vagy nagyon lassú mechanizmus van a központi idegrendszerben.

A vér-agy gát megakadályozza a vér alakos elemeinek és patogéneknek a bejutását az agy parenchymájába, emellett szabályozza a molekulák transzportját is a plazma és a központi idegrendszer között. Az agyi mikrovaszkuláris endotélsejtek által alkotott egyrétegű felület fontos alkotója a vér-agy gátnak és meghatározó módon hozzájárul a neuroinflammatorikus válaszhoz, főként a leukociták adhéziójával és az inflammatorikus sejtek transzmigrációjával a központi idegrendszerbe. Ezért vizsgáltuk az IVH-t követően koraszülöttek liquor mintáiból kimutatott különböző Hb formák hatását HBEC sejtek aktivációjára.

Kimutattuk, hogy a hem $50 \mu\text{mol/L}$ feletti koncentrációban nagymértékben fokozza a HBEC sejtek ROS termelését, és sejthalált indukál. Ugyanakkor a Hb, illetve az oxidált Hb formák nem fokozták a ROS termelést és nem voltak toxikusak HBEC sejtekre. A liquor minták szabad hem koncentrációja a 0-20. nap között nyert minták szinte mindegyikében meghaladta az $50 \mu\text{mol/L}$ -t, néhány mintában pedig extrém magas $250 \mu\text{mol/L}$ feletti szabad hem koncentrációt mértünk. A HBEC egysejtréteg integritását vizsgálva kimutattuk, hogy a kovalens módon keresztkötött Hb formákat tartalmazó ferrylHb növeli az egysejtréteg átjárhatóságát.

A HO-1, mely a hem lebontását katalizáló enzim, ICH-t követően indukálódik a központi idegrendszer különböző sejtjeiben, mint például az asztrocitákban, mikrogliaokban és endotélsejtekben.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a hem mellett az oxidált Hb formák (metHb, ferrylHb) is indukálják a HO-1 expresszióját HBEC sejteken.

Az adhézions molekulák központi szerepet töltenek be a gyulladási reakcióban a leukociták endotélfelszínhez való kikapadásában és transzmigrációjában. Normál körülmények között a vaszkuláris endotéliumra jellemző az adhézions molekulák alacsony expressziója. Agyvérzések esetén lokális gyulladási válasz alakul ki és a szolubilis adhézions molekulák (E-szelektin, ICAM-1, VCAM-1 és L-szelektin), illetve az inflammatórikus citokinek szintje megemelkedik a liquorban. A gyulladási válasz feltételezhetően a fehér állomány sérülésével jár.

A hemről ismert, hogy endotélsejt aktivációt indukál, melyet az adhézions molekulák fokozott expressziója és emelkedett proinflammatórikus citokin (IL-6, IL-8) termelés jellemez. Az IVH-t követően nyert CSF minták analízise során kimutattuk, hogy a VCAM-1, ICAM-1 és IL-8 szintje korrelál a CSF-ben található hem koncentrációjával. Megállapítottuk, hogy agyi mikrovaszkuláris endotélsejtek aktivációjához a hem mellett a ferrylHb is hozzájárulhat.

6. Összefoglalás

A hemolízissel járó betegségekből gyakran megfigyelhető a gyulladás patogének jelenléte nélkül. Ennek oka a hemolízis során a véráramba kerülő DAMP-ok által keltett gyulladás. A VVT-k lízise során a keringésbe kerülő Hb oxidációja során metHb és ferrylHb keletkezik, melyekről a hem prosztetikus csoport leválik. A hem proinflammatórikus jellegének egyik megnyilvánulása a

makrofágokban megfigyelt NLRP3 inflammaszóma aktiváció és IL-1 β szekréció.

Az endotélsejtek kitüntetett szerepet játszanak a gyulladási folyamatokban, így jelen munkánk célja, a hem és az oxidált Hb formák hatásának vizsgálata volt endotélsejtek aktivációjára. Kimutattuk, hogy a hem LPS-sel előkezelt HUVEC-ben IL-1 β szekréciót indukál. *In vivo* körülmények között a hem kaszpáz-1 aktivációt és aktív IL-1 β képződést indukál, NLRP3-függő módon. Bizonyítottuk, hogy a hem által keltett proinflammatorikus válaszban fontos szerepe van a reaktív oxigénradikáloknak, ugyanis a gyökfogy tulajdonságú NAC gátolta a hem által indukált IL-1 β képződést.

Kimutattuk továbbá, hogy az albumin gátolni képes a hem mediálta IL-1 β termelést HUVEC sejteken *in vitro*, illetve blokkolta a hem által indukált peritoneális leukocita infiltrációt *in vivo* körülmények között C57BL/6 egerekben.

A hem és az oxidált Hb formák gyulladáskeltő szerepét vizsgáltuk IVH-val összefüggésben. Kimutattuk, hogy IVH-t követően hem, Hb, metHb, ferrylHb, illetve kovalensen kereszt kötött oxidált globin multimerek akumulálódnak a liquorban. A különböző oxidáltsági fokú Hb formák közül a ferrylHb a leginkább proinflammatorikus jellegű, mely fokozza adhéziós molekulák és proinflammatorikus citokinek expresszióját agyi mikrovaszkuláris endotélsejtekben, valamint rontja az egysejtréteg integritását.

Összességében jelen munka hozzájárulhat a VVT eredetű DAMP-ok NLRP3 inflammaszóma aktivációjában betöltött

szerepének megértéséhez, valamint az oxidált Hb formák IVH pathogenezisében betöltött kóroki szerepének tisztázásához.

7. Saját közlemények jegyzéke



**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/9/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Erdei Judit Zsuzsa

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

1. Erdei, J. Z., Tóth, A., Nagy, A., Nyakundi, B. B., Fejes, Z., Nagy, B. J., Novák, L., Bognár, L., Balogh, E., Paragh, G., Kappelmayer, J., Bácsi, A., Jeney, V.: The Role of Hemoglobin Oxidation Products in Triggering Inflammatory Response Upon Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants.
Front. Immunol. 11, 228, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00228>
IF: 5.085 (2019)
2. Erdei, J. Z., Tóth, A., Balogh, E., Nyakundi, B. B., Bányai, E., Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Induction Of NLRP3 Inflammation Activation By Heme In Human Endothelial Cells.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-14, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4310816>
IF: 4.888

További közlemények

3. Fejes, Z., Erdei, J. Z., Pócsi, M., Takai, J., Jeney, V., Nagy, A., Varga, A., Bácsi, A., Bognár, L., Novák, L., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Elevated Pro-Inflammatory Cell-Free MicroRNA Levels in Cerebrospinal Fluid of Premature Infants after Intraventricular Hemorrhage.
Int. J. Mol. Sci. 21 (18), 6870-, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186870>
IF: 4.556 (2019)
4. Nyakundi, B. B., Erdei, J. Z., Tóth, A., Balogh, E., Nagy, A., Nagy, B. J., Novák, L., Bognár, L., Paragh, G., Kappelmayer, J., Jeney, V.: Formation and Detection of Highly Oxidized Hemoglobin Forms in Biological Fluids during Hemolytic Conditions.
Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020, 1-13, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8929020>
IF: 5.076 (2019)





5. Nyakundi, B. B., Tóth, A., Balogh, E., Nagy, B. J., Erdei, J. Z., Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL1[beta] production upon intravascular hemolysis.
Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis. 1865 (2), 464-475, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.030>
IF: 4.352

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,937

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,953

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, 2021.01.08.



8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék elsőként köszönetet mondani témavezetőmnek, *Dr. Jeney Viktóriának* a rendkívül magas színvonalú szakmai irányításáért, útmutatásaiért és folyamatos segítségért, illetve külön köszönöm végtelen türelmét. Az elmúlt évek során bármikor fordulhattam hozzá tanácsért, támogatása nélkülözhetetlen volt számomra és nagyon sokat tanultam tőle a munka precíz kivitelezéséről.

Köszönöm *Dr. Paragh György* és *Dr. Papp Zoltán* professzor uraknak, hogy az általuk vezetett intézetekben végezhettem munkám egy részét.

Szintén hálásan köszönöm a Vaszkuláris Pathofiziológiai Kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak támogatását, külön kiemelve *Dr. Balogh Enikőt*, *Tóth Andreát* és *Dr. Benard Bogonko Nyakundit*, nélkülözhetetlen segítségükért a minden napokban, folyamatos biztatásukért, és az évek alatt kialakult barátságunkért.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni a publikációk *társszerzőinek*, rendkívül értékes munkájukért és szakmai támogatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a *családomnak* és *barátaimnak*, szeretetüket és biztatásukat. Külön kiemelném *Édesanyámat* és *Páromat*, köszönöm a támogatásukat, hogy mindig mellettem álltak és folyamatosan bíztattak, nélkülük e munka nem születhetett volna meg.

A munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (NKFIH, K116024 és K131535), a Magyar Tudományos Akadémia 96050 számú, valamint az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 számú projektek támogatásával valósult meg.