

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**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.**

# 1. Tartalom

---

1.	Tartalom .....	2
2.	Rövidítések jegyzéke.....	5
3.	Bevezetés.....	8
4.	Irodalmi áttekintés .....	10
4.1	Vörösvérsejtek fiziológiája, hemolízis, hemorrhágia .....	10
4.1.1	A vörösvérsejtek differenciálódása .....	10
4.1.2	A hemoglobin, mint a vörösvérsejtek legfőbb alkotóeleme.....	11
4.1.3	A VVT antioxidáns rendszere, öregedése .....	11
4.1.4	A haptoglobin, hemopexin, hem oxigenáz-1 alkotta védelmi rendszer .....	13
4.1.5	Hemolízis, hemorrhagia, VVT eredetű veszély asszociált molekuláris mintázatok .....	15
4.2	A Hb oxidációja, a hem és oxidált hemoglobin formák proinflammatorikus tulajdonságai.....	17
4.2.1	A hemoglobin oxidációja .....	17
4.2.2	A hem veleszületett immun receptorokon kifejtett proinflammatorikus hatásai .....	18
4.2.3	Az oxidált Hb-formák proinflammatorikus tulajdonságai .....	20
4.3	Az endotélsejtek szerepe gyulladási folyamatokban .....	21
4.3.1	Az endotélsejtek jellemzői, funkciója .....	21
4.3.2	Az endotélsejtek barrier funkciója .....	21
4.3.3	A vaszkuláris tónus és a hemosztázis szabályozása.....	23
4.3.4	Az endotélsejtek aktivációja, adhéziós molekulák szerepe a gyulladásban.....	23
4.3.5	NLRP3 inflammaszóma aktiváció endotélsejteken.....	25
4.4	A koraszülötteket érintő intraventriculáris vérzés (IVH), a hem és oxidált Hb formák szerepe.....	25
4.4.1	A központi idegrendszer felépítése, a vér-agy gát szerepe .....	25
4.4.2	Az intraventriculáris vérzés előfordulása koraszülöttekben .....	26
4.4.3	A hem és oxidált Hb formák szerepe a koponyaűri vérzéseknél .....	27
5.	Célkitűzések .....	29
6.	Anyagok és módszerek.....	30
6.1	Anyagok.....	30

6.2	Állatkísérletek.....	30
6.3	Humán umbilikális véna endotélsejtek (HUVEC) izolálása és tenyésztése .....	31
6.4	Humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejtek (HBEC) tenyésztése .....	31
6.5	Humán Hb preparálása .....	32
6.6	Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	33
6.7	Western blot analízis .....	33
6.8	ROS képződés vizsgálata.....	34
6.9	IL-1 $\beta$ szekréció vizsgálata HUVEC-en .....	34
6.10	A betegetől származó CSF minták gyűjtése .....	34
6.11	Hb, metHb, ferrylHb, totál hem, szabad hem és bilirubin szintek meghatározása CSF-ből.....	35
6.12	Az endotél egysejtréteg integritásának vizsgálata .....	35
6.13	A szolubilis VCAM-1, ICAM-1 és IL-8 szintek meghatározása CSF mintákban ....	35
6.14	A sejtek életképességének vizsgálata .....	35
6.15	Statisztikai analízis .....	36
7.	Eredmények.....	37
7.1	A hem és oxidált Hb formák hatása HUVEC sejtre .....	37
7.1.1	A hem proinflammatorikus jellege és hatása az IL-1 $\beta$ szekréciójára <i>in vivo</i> .....	37
7.1.2	A hem fokozza a HUVEC NLRP3 expresszióját és az IL-1 $\beta$ szekrécióját.....	38
7.1.3	A hem magas koncentrációban csökkenti a HUVEC viabilitását.....	39
7.1.4	A hem integritása kulcsfontosságú a HUVEC hem-által indukált IL-1 $\beta$ termelésében.....	40
7.1.5	A fokozott ROS képződés szerepet játszik a HUVEC sejtek hem-mediálta IL-1 $\beta$ termelésében.....	41
7.1.6	A hem komplexálása a proinflammatorikus hatás csökkenésével jár .....	42
7.1.7	Az oxidált Hb formák nem váltják ki inflammaszóma aktivációját endotélsejteken .....	43
7.1.8	Az NLRP3 szerepe a hem-mediált IL-1 $\beta$ termelésben.....	45
7.2	Az oxidált Hb formák és a hem szerepe IVH-t követően.....	46
7.2.1	A különböző Hb formák, szabad hem és bilirubin felhalmozódása a cerebrospinalis folyadékban (CSF) intraventriculáris vérzést (IVH) követően .....	46
7.2.2	A szabad hem és az oxidált Hb formák prooxidáns és proinflammatorikus hatása humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejtekre .....	51
7.2.3	A hem és a proinflammatorikus markerek korrelációja IVH-t követően nyert CSF mintákban .....	55

8.	Diszkusszió.....	57
9.	Konklúziók .....	65
10.	Összefoglalás .....	66
11.	Summary.....	68
12.	Köszönetnyilvánítás .....	70
13.	Irodalomjegyzék .....	71
14.	Publikációs lista.....	79
15.	Tárgyszavak.....	81
16.	Függelék .....	82

## 2. Rövidítések jegyzéke

---

AGE: előrehaladott glikációs végtermékek

ASC: apoptózis-asszociált „speck-like” fehérje

BBB: vér-agy gát / blood-brain barrier

BFU-E: burst-forming eritroid egység

CFU-E: kolóniaképző eritroid egység

CO: szén-monoxid

CSF: cerebrospinális folyadék

DAMP: veszély-asszociált molekuláris mintázat/ danger/damage-associated molecular pattern

EPO: eritropoetin

ET-1: endotelin-1

FeSO<sub>4</sub>: vas-szulfát

G6PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

GM: germinális mátrix

GPx: glutation peroxidázok

Gpx-1: glutation peroxidáz 1

GSH: redukált glutation

GSR: glutation-diszulfid reduktáz

GSSG: glutation diszulfid

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrogén-peroxid

Hb: hemoglobin

HBEC: humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejt

HBSS: Hank-féle pufferolt sóoldat

HDL: nagy sűrűségű lipoprotein

HMGB1: high mobility group box-1

HO-1: hem oxigenáz-1

Hp: haptoglobin  
Hsp70: hősokk protein 70  
HUVEC: humán umbilikális véna endotél sejt  
Hx: hemopexin  
ICAM: intercelluláris adhéziós molekula  
ICH: intracerebrális hemorrhágia  
IVH: intraventrikuláris vérzés  
JAM: junkciós adhéziós molekula  
JNK: c-Jun N-terminális kináz  
LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein  
LFA-1: leukocita funkcionális antigén  
LRR: C-terminális leucinban gazdag ismétlődő domén  
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz  
MHb/metHb: methemoglobin  
mtROS: mitokondriális ROS  
MyD88: myeloid differenciáló 88 faktor  
NAC: N-acetil-cisztein  
NADP<sup>+</sup>: nikotinamid adenin dinukleotid foszfát  
NADPH: redukált NADP  
NF- $\kappa$ B: nukleáris faktor kappa B  
NLRP3: nucleotide-binding domain, leucine-rich Repeat containing 3  
NO: nitrogén-oxid  
NOD/NACHT: nukleotid oligomerizációs domén  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: szuperoxid anion  
PGI<sub>2</sub>: prosztaciklin  
Prdx/PRX: peroxiredoxinok  
PPIX: protoporfirin IX

PYD: pyrin domén

ROS: reaktív oxigéngyök

SAH: subarachnoidális hemorrhágia

SOD1: szuperoxid-dizmutáz 1

Syk: lép tirozin kináz

TLR4: toll-like receptor 4

TNF- $\alpha$ : tumor nekrosis faktor alfa

Trx(ox): oxidált thioredoxin

Trx(r): redukált thioredoxin

TrxR: thioredoxin reduktáz

TxA2: tromboxán

VCAM-1: vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1

VVT: vörösvérsejt

vWF: von Willebrand faktor

### 3. Bevezetés

---

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 azonban 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. Egyes betegségekben az intravaszkuláris hemolízis oly mértéket ölthet, hogy az meghaladja a Hb- és hem-eltávolító mechanizmusok kapacitását, ami az extracelluláris hem és Hb plazmában való feldúsulásához vezet.

Az extracelluláris térben a Hb oxidációja bekövetkezik. A Hb oxidációs termékek, illetve az oxidált Hb formákból szabaddá váló hem kóroki szerepét számos tanulmány vizsgálta a közelmúltban. Ezekben a tanulmányokban kimutatták, hogy a hem erős pro-oxidáns molekula, mely számos sejtípusban nagymértékben fokozza az oxidatív- és inflammatórikus stimulusokkal kiváltott sejthalált. Emellett 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 út vonalakat makrofágokban.

A hem számos hatását vizsgálták endotélsejteken, hiszen az endotélréteg képezi a vér és a szövetek közötti barriert, így hemolízis esetén az endotélsejtek vannak elsődlegesen kitéve a kiszabaduló Hb, az oxidált Hb formák, illetve a hem hatásának. Ismert, hogy a hem oxidatív stresszt és fokozott reaktív oxigéngyök (ROS) termelést indukál, fokozza az oxidáló ágensek toxikus hatását, valamint TLR4 aktivációt idéz elő endotélsejtekben.

A Hb oxidációja egy komplex folyamat, melynek során a hem vas egy-, illetve két-elektronos oxidációja és a globin oxidációja is bekövetkezik. 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. Ugyanakkor kevés információ áll rendelkezésünkre az egyes oxidált Hb formák pro-oxidáns, illetve pro-inflammatórikus tulajdonságairól.

PhD értekezésemben különböző oxidációs állapotú Hb formák és a hem NLRP3 aktiváló hatását vizsgáltam endotélsejteken, valamint intraventriculáris vérzésen átesett koraszülöttek cerebrospinális folyadékának analízisével összefüggéseket igyekeztem feltárni a különféle Hb oxidációs termékek jelenléte, illetve az IVH-t gyakran kísérő neuroinflammáció között.

## 4. Irodalmi áttekintés

---

### 4.1 Vörösvérsejtek fiziológiája, hemolízis, hemorrhágia

#### 4.1.1 A vörösvérsejtek differenciálódása

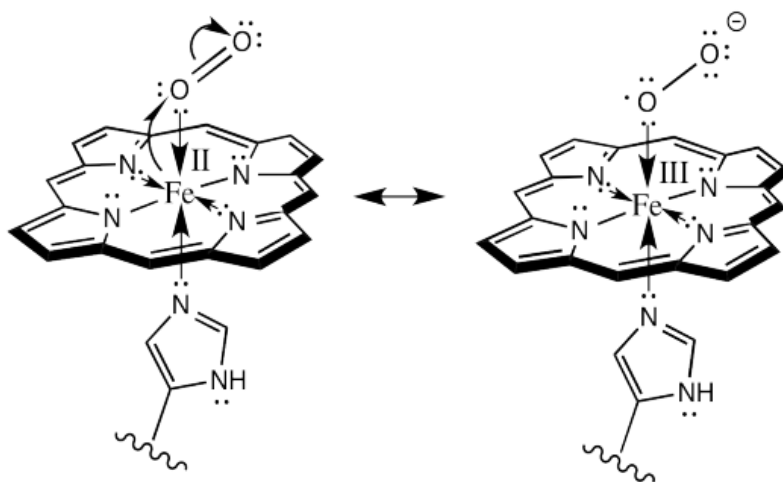
A vörösvérsejt (VVT) a humán szervezet leggyakrabban előforduló sejtípusa. Más sejtekkel ellentétben nem rendelkezik sejtmaggal, riboszómákkal és mitokondriummal, melyek más sejtípusok működéséhez és túléléséhez elengedhetetlenek. Egészséges felnőttek vére mikroliterenként körülbelül 4,5-5 millió VVT-t tartalmaz. A vörösvérsejtek élettartama a keringésben 110-120 nap. Felnőtt, egészséges emberekben másodpercenként 2 millió új VVT képződik és lép be a vérkeringésbe a csontvelőből. Ezzel egyidőben ugyanennyi előregedett VVT távozik a keringésből a retikuloendotheliális rendszeren keresztül [1].

A VVT képződés (másnéven eritropoezis) egy szigorúan szabályozott folyamat, melynek során a VVT-k folyamatosan képződnek a csontvelőben található, úgynevezett „fészkekben” vagy vérszigetekben. Az eritropoezis főbb lépéseiben elsőként a hematopoetikus őssejtek, majd a burst-forming eritroid egység (BFU-E), ezt követően a kolóniaképző eritroid egység (CFU-E), majd a proeritroblaszt, a bazofil eritroblaszt, a normoblasztok, míg végül az érett retikulociták fejlődnek ki [2, 3]. Az eritrociták képződésének „mester regulátora” az eritropoetin (EPO) nevű hormon, mely a veseglomerulusokban, a juxtaglomeruláris komplexben termelődik [4].

Az eritropoezis speciális mikrokörnyezetét, az eritroblaszt szigeteket Bessis és munkatársai jellemezték elsőként. Kimutatták, hogy az eritroblaszt sziget közepén egy makrofág található („nurse macrophage”) a differenciálódó eritroblasztokkal körülvéve [5]. Megállapították, hogy a makrofágoknak kettős szerepük van a VVT differenciálódása során; egyrészt biztosítják a vasat a hem szintézishez, másrészt fagocitálják az eritroblasztból kilökődő sejtmagot a VVT differenciálódásának végső lépésében [6]. A VVT sejtmag nélküli léte sokáig foglalkoztatta a kutatókat. Valószínűsítik, hogy a sejtmag hiánya több szempontból is előnyös a VVT számára. Egyrészt a sejtmag nélküli VVT hemoglobint (Hb) tartalma magasabb lehet, így több oxigént képes szállítani, másrészt jobban deformálható, mely fontos szempont a 6-8 µm méretű VVT 5-10 µm átmérőjű kapillárisokon való áthaladásakor [7, 8].

### 4.1.2 A hemoglobin, mint a vörösvérsejtek legfőbb alkotóeleme

A Hb elsődleges feladata az oxigén szállítása a tüdő felől a szervek irányába és a szén-dioxid eltávolítása a vérkeringésből. A VVT száraz tömegének legnagyobb hányadát, mintegy 96%-át a Hb adja. A Hb koncentráció a VVT-ken belül magas, 1 g VVT megközelítőleg 0,3 g Hb-t tartalmaz. A Hb molekula szerkezetét Perutz és munkatársai határozták meg [9]. A Hb molekula négy alegységből áll, mely mindegyike tartalmaz egy globuláris fehérjerészt és egy hozzá szorosan kapcsolódó hem prosztetikus csoportot. A hem (vas protoporfirin IX) egy 4 tagú heterociklusos gyűrűből áll, melynek közepén egy  $\text{Fe}^{2+}$  ion található. A  $\text{Fe}^{2+}$  a 4 db pirolgyűrű nitrogén atomjaihoz, illetve a globinban található hisztidin imidazol gyűrűjének nitrogén atomjához koordinálódik, a 6. koordinációs hely alkalmas az oxigén reverzibilis kötésére. A  $\text{Fe}^{2+}$  és oxigén között lévő kapcsolatot rezonancia formaként is le lehet írni, melyet az alábbi ábra szemléltet (**1. ábra**). Az egyik klasszikusnak tekinthető határszerkezeti forma a  $\text{Fe}^{2+}$  (ferro) és  $\text{O}_2$  közötti kapcsolatot szemlélteti, míg a másik a  $\text{Fe}^{3+}$  (ferri) és szuperoxid anion közötti kötődésként írható le [10].



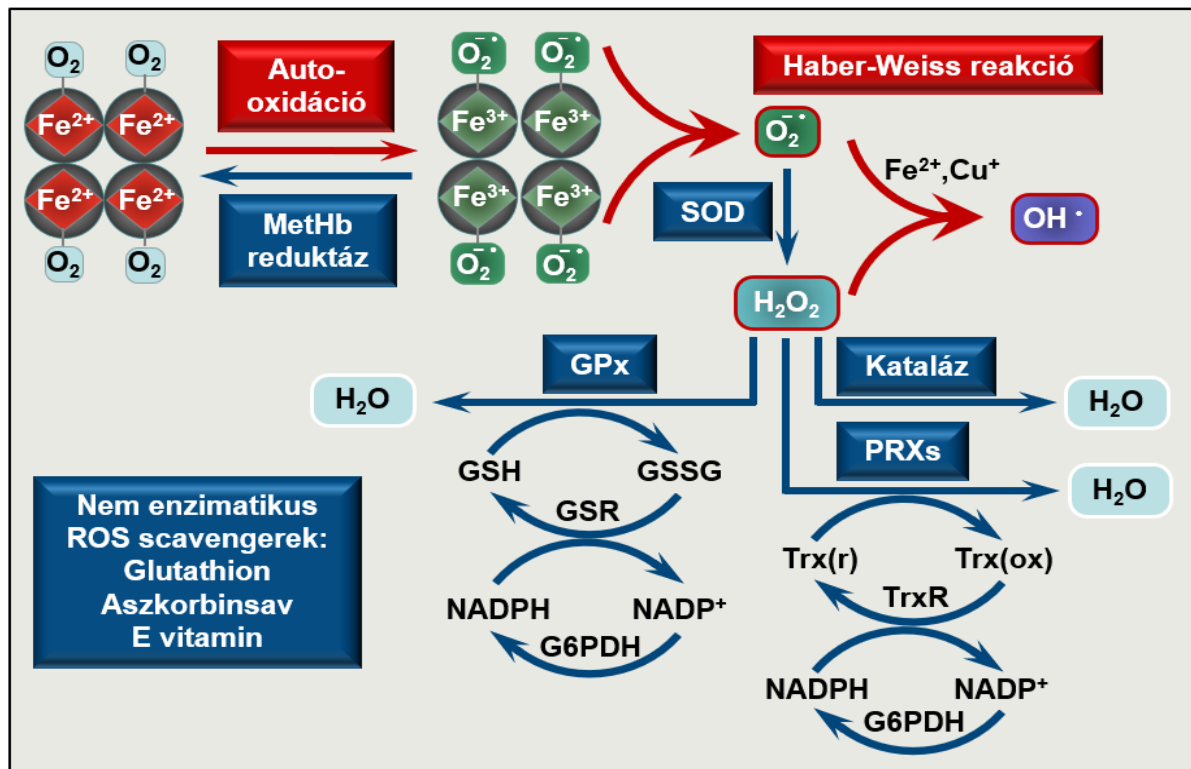
**1. ábra** A vas és az oxigén kapcsolatát leíró határszerkezeti formák. A  $\text{Fe}^{2+}$  és oxigén közötti kapcsolatban elektronvándorlással  $\text{Fe}^{3+}$  és szuperoxid anion alakulhat ki. Forrás: <https://employees.csbsju.edu/cschaller/Reactivity/oxygen/ORbinding.htm>, Structure & Reactivity in Organic, Biological and Inorganic Chemistry by Chris Schaller.

### 4.1.3 A VVT antioxidáns rendszere, öregedése

Fiziológiás körülmények között a VVT-ben található Hb 1-2%-a methemoglobin (metHb) formában van jelen. A metHb-ban a hemvas oxidációs állapota +3, és úgy képződik, hogy bekötődése után az oxigénmolekula ( $\text{O}_2$ ) nagyobb elektronegativitásának köszönhetően egy elektront maga felé vonzva szuperoxid anionként ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) válik le a Hb-ról (**1. ábra**). A

szuperoxid anion egy reaktív oxigéngyök (ROS), mely károsíthatja a VVT membránt, illetve részt vehet más ROS formák kialakulásában.

A VVT-k ROS elleni védelmét egy enzimatikus és nem-enzimatikus elemekből felépülő komplex antioxidáns rendszer biztosítja [11] (2. ábra). Az enzimatikus rendszer egyik legjelentősebb eleme a Cu/Zn szuperoxid-dizmutáz (SOD1), mely a szuperoxid anion hidrogénperoxiddá ( $H_2O_2$ ) alakulását katalizálja. A keletkező  $H_2O_2$  vízzé alakítását a kataláz, a glutation peroxidáz (Gpx-1), illetve a peroxidázok (Prdx1, Prdx2) katalizálják [11, 12].



**2. ábra A VVT antioxidáns mechanizmusai.** Az oxigén kötődése a Hb-hoz a Hb autooxidációját indítja el, melynek során MetHb ( $Fe^{3+}$ ) és szuperoxid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) képződik. A MetHb Hb-ná redukálódik, mely folyamatot a MetHb reduktáz katalizálja, a szuperoxid anion pedig  $H_2O_2$ -dá alakul át, amit a szuperoxid dizmutáz (SOD) katalizál. Átmeneti fémionok (pl.  $Fe^{2+}$  és  $Cu^{2+}$ ) jelenlétében a  $O_2^{\cdot-}$  és  $H_2O_2$  reagál egymással, mely reakcióban hidroxil gyök ( $OH^{\cdot}$ ) keletkezik (Haber Weiss reakció). A kataláz, glutation peroxidázok (GPx) és peroxidázok (PRX) a  $H_2O_2$  vízzé alakulását katalizálják. Az antioxidáns rendszer további fontos elemei a nem enzimatikus gyökfogók, mint például a glutation, aszkorbinsav és E vitamin. Rövidítések: SOD: szuperoxid dizmutáz, GPx: glutation peroxidáz, PRX: peroxidáz, GSH: redukált glutation, GSSG: glutation diszulfid, GSR: glutation-diszulfid reduktáz,  $NADP^+$ : nikotinamid adenin dinukleotid foszfát, NADPH: redukált NADP, G6PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, Trx(r): redukált thioredoxin, Trx(ox): oxidált thioredoxin, TrxR: thioredoxin reduktáz.

Emellett meg kell említenünk a redukált glutationt, az aszkorbinsavat és az E vitamint, mint a VVT legjelentősebb nem enzimátikus antioxidánsait, melyek szintén fontos szerepet játszanak a VVT ROS szintjének szabályozásában (**2. ábra**).

Az antioxidáns enzimek szerepét a VVT életidejében számos tanulmány vizsgálta. Kimutatták, hogy SOD1, Prdx1 vagy Prdx2 deficiens egerekben a VVT életideje lecsökken, melynek hátterében fokozott ROS termelés áll [13-15], ugyanakkor kataláz, illetve Gpx-1 deficiens egerekben nem tapasztaltak ehhez hasonló jelenséget [11, 16].

Érdekes módon a Hb önmagában is rendelkezik antioxidáns tulajdonságokkal, mely hozzájárul a VVT-k komplex antioxidáns védelmi rendszeréhez [10]. Ez a mechanizmus a gerincesekben az evolúció során konzervált a Hb  $\beta$ -láncának 93-as pozíciójában található ciszteinhez köthető, mely aminosav képes a hem zsebben keletkező szuperoxid anionokat semlegesíteni, és ez által csökkenteni a Hb autooxidációjának a mértékét. Végezetül, a VVT antioxidáns rendszerét a metHb reduktáz enzim teszi teljessé, mely a Hb autooxidációja során keletkező metHb-ban található +3 oxidációs állapotú hem-vasat redukálja  $Fe^{2+}$ -vé, ezáltal visszaállítva a Hb oxigénkötő-képességét [17].

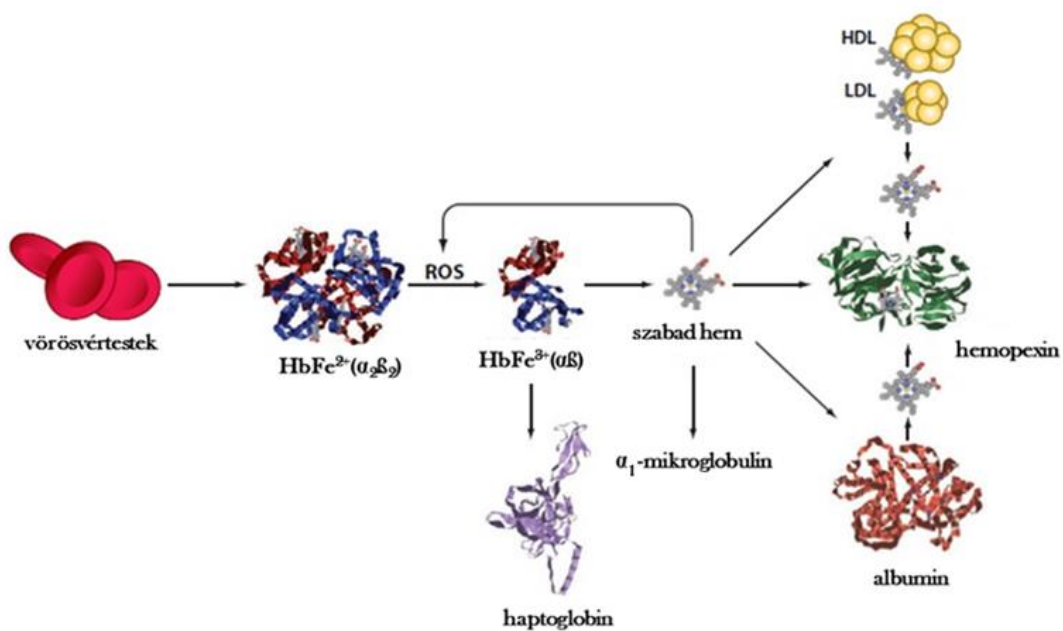
A 120 nap keringésben eltöltött idő során a VVT elöregszik. Ezeket a VVT-ket makrofágok fagocitálják, elsősorban a lépben [18]. Az elöregedett VVT-k csökkent metabolizmussal, kisebb mérettel és nagyobb sűrűséggel jellemezhetők [19]. Ezen kívül a sejtek öregedési szakaszának legvégén a sejt felszínén úgynevezett „egyél meg” szignálok jelennek meg, ugyanakkor az egészséges VVT-t jellemző markerek eltűnnek a sejt felszínéről [20]. Az egyél meg szignálok olyan molekulák, melyek a VVT-ben eredendően is megtalálhatók, de az öregedés során módosulnak [18]. Ilyen egyél meg szignál molekulák például a foszfatidil-szerin, illetve a foszfatidil-etanol-amin, melyek egészséges sejtekben a sejtmembrán belső felszínén találhatóak, ugyanakkor apoptotikus sejtek vagy elöregedett VVT-k külső felszínén jelennek meg [21]. A szialinsav, illetve a CD47 membrán-szintjének lecsökkenése a VVT membrán fluiditásának csökkenésével van összefüggésben, és szintén egyél meg szignálnak tekinthető [22-24].

#### 4.1.4 A haptoglobin, hemopexin, hem oxigenáz-1 alkotta védelmi rendszer

Fiziológiás körülmények között a VVT-k 1-2%-a az érrendszerben hemolizál. A keringésbe került Hb-t a haptoglobin (Hp), egy akut-fázis fehérje köti meg, mely 0,41-1,65 mg/mL koncentrációban van jelen a plazmában (**3. ábra**). A Hp-Hb komplexek a makrofágok CD163 receptorához kötődnek és receptor-mediált endocitózis által kerülnek felvételre [25, 26].

Korábbi tanulmányokban rámutattak a Hp alfa láncát kódoló gén polimorfizmusára, melynek kodomináns átíródása 3 különböző genotípust hoz létre: Hp1-1, Hp2-1 és Hp2-2. A 3 genotípus nem csak szerkezetében, de antioxidáns, Hb kötő és immunmoduláló hatásaiban is eltér egymástól [27]. A Hp2-2 genotípusról ismert, hogy 1-es és 2-es típusú diabéteszben növeli a kardiovaszkuláris szövödmények kialakulását, mely összefüggésben állhat azzal, hogy ezen diabéteszes betegek carotis-plakkjában a vas koncentrációja magasabb [28]. Szintén ennél a betegcsoportnál írták le, hogy az érlemezsedéses plakkokban kevesebb simaizomsejt található, ugyanakkor nagymértékű a makrofág-infiltráció, mely az instabil plakkok jellemzője [29].

A plazmában lévő Hp körülbelül 3g Hb megkötésére képes, ami a keringésben lévő Hb-nak kevesebb, mint 1%-a. Masszív hemolízis esetén tehát az extracelluláris Hb szintje meghaladja a Hp kapacitását, melynek következtében a Hp plazma szintje lecsökken, és a Hb akkumulálódik a plazmában (3. ábra). A plazmában bekövetkezik a Hb oxidációja és a hem proszтетikus csoport disszociációja [30, 31].



**3. ábra Extracelluláris Hb és heme-kötő fehérjék a plazmában .** A VVT-ből kiszabadulva a Hb-t a Hp köti meg és távolítja el a keringésből. A Hp kötéskapacitásának kimerülése után a Hb akkumulálódik a plazmában és oxidálódik. Az oxidált Hb-ból disszociálódó hem proszтетikus csoportot a Hx köti, emellett a hem más fehérjékhez (albumin, α<sub>1</sub>-mikroglobulin) és lipoproteinekhez (HDL, LDL) is tud kötödni. Rövidítések: ROS: reaktív oxigéngyök; HDL: nagy sűrűségű lipoprotein; LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein. Forrás: Gozzelino, R., Jeney, V., Soares, M.P., *Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2010. **50**: p 323-54.

Az extracelluláris hem megkötésére specializálódott plazma fehérje a hemopexin (Hx), mely az ismert fehérjék közül a legnagyobb affinitással köti meg a hemet ( $K_d < 10^{-12}$  M) [32]. A Hx blokkolja a hem prooxidáns és proinflammatorikus hatásait [33]. A hem-Hx komplexet a keringésből CD91 receptorokon keresztül veszik fel a sejtek receptor-mediált endocitózis révén. A CD91 receptor főként makrofágokban és hepatocitákban, a májban és a lépben expresszálódik [34]. A hem a hemopexin mellett albuminhoz,  $\alpha$ 1-mikroglobulinhoz és lipoproteinekhez is kötődhet masszív intravaszkuláris hemolízis esetén (**3. ábra**) [35-39].

Miután a hem a sejtek által felvételre kerül, a citoszólban degradálódik, mely folyamatot a HO-1 enzim katalizálja. A hem degradációja során ekvimoláris mennyiségű vas, szén-monoxid (CO) és biliverdin keletkezik [40]. A hem molekulából kiszabaduló vas fokozhatja a ROS termelést a Fenton reakció katalizálása révén. Ezt megelőzendő, a vas többnyire a ferritin molekula vasmagjában redox inaktív formában kerül tárolásra, vagy ferroportin exporteren keresztül az extracelluláris térbe ürül.

#### 4.1.5 Hemolízis, hemorrhagia, VVT eredetű veszély asszociált molekuláris mintázatok

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. Az öröklött hemolitikus betegségek háttérben többnyire a Hb, a VVT membrán, illetve egyéb a VVT működése szempontjából esszenciális fehérjéket kódoló gének mutációja áll. A Hb-t kódoló gén mutációja okozza például a sarlósejtes anémiát [41] és a thalasszémiákat [42]. A VVT membránját érintő betegségeként ismert a szintén örökletes, a szferocitózis és elliptocitózis [43]. A glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz deficiencia szintén örökletes betegség, mai ismeretek szerint az egyik leggyakoribb enzimhiányos állapot, melyben a VVT normális működése is gátolt, ezzel közvetve vérszegénységhez vezethet [44].

A hemolízissel járó szerzett betegségek csoportja szintén elég kiterjedt. Mechanikai trauma, vagy kémiai behatás is előidézhethet hemolízist. E mellett nagyon fontos megemlíteni a különféle infekciókkal összefüggésbe hozható hemolízist, melynek háttérben állhat parazita (pl. malária), vírus (pl. Dengue láz) vagy bakteriális fertőzés is [45-48]. Ugyancsak intravaszkuláris hemolízis alakul ki disszeminált intravaszkuláris koaguláció során, illetve a szívsebészeti és egyéb műtéteknél, ahol extracorporális keringés fenntartása szükséges [48, 49].

A hemolízises megbetegedések mellett szintén említésre méltóak a hemorrhagiás megbetegedések. Közöttük is megkülönböztetünk örökletes és szerzett (másodlagos)

hemorrhágiákat. Örökletes betegségek közé tartoznak a különféle hemofiliák, míg másodlagosan kialakuló például az atheroszklerotikus plakkban történő vérzés, illetve a különböző központi idegrendszeri vérzések. A leggyakoribb agyat érintő vérzés az intracerebrális hemorrhágia (ICH), melynek során az agy belsejében lévő véredény sérül és a vér az agyszövetbe szivárog. A subarachnoidális hemorrhágia (SAH), a pókhálóhártya alatti vérzés. Ehhez az esetek többségében repedés általi aneurysma vezet, de akár fejet ért sérülés következtében is kialakulhat. Intraventriculáris vérzés (IVH) esetén pedig a vérzés a kamrai rendszer irányába terjed. A szöveti állomány, az érlelmeszesedéses plakk, illetve a cerebrospinális folyadék (CSF) Hb-, illetve hem-kötő kapacitása, valamint a Hb és hem eltávolításának mechanizmusa a plazmához képest kevésbé ismert.

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 [46, 50]. Számos, a VVT-ből hemolízis során kiszabaduló anyagról bizonyosodott be, hogy veszély asszociált molekuláris mintázatként (DAMP) viselkedve steril gyulladást okoz [51]. 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 [52].

Az extracelluláris ATP a P2X purinoreceptor 7 aktivációján keresztül proinflammatorikus IL-1 $\beta$  és IL-18 citokin szekréciót indukál LPS-sel előkezelt makrofágokban [53-55]. Az IL-33 az IL-1 szupercsaládba tartozik, hatását az ST2 receptorokon keresztül fejt ki. Leírták, hogy IL-4, IL-5 és IL-13 szekréciójához vezet veleszületett limfoid sejtekben és hízósejtekben [56, 57]. A Hsp 70-ről ismert, hogy agyi sérülések esetén stimulálni képes a monocitákat/makrofágokat, mikroglia, illetve a dendritikus sejteket is TLR2 illetve TLR4, CD14 útvonalon, mely proinflammatorikus citokinek szekréciójához vezet (pl. IL-1 $\beta$ , IL-6) [58]. A mitokondriális DNS-ről feltételezik, hogy steril gyulladásban részt vesz a TLR9 útvonal aktivációján keresztül [59]. Továbbá az is ismert, hogy a mitokondriális DNS direkt módon aktiválni képes az NLRP3 inflammaszóma kialakulását, ez által IL-1 $\beta$  szekréciót indukál makrofágokban [60]. A ciklofilin A szintén egy ismert DAMP, mely makrofágokon proinflammatorikus citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) szekrécióját idézi elő, melynek számos megbetegedésben lehet szerepe (pl. rheumatoid arthritis, májgyulladás, szepszis) [61-63].

A dolgozat témáját adó Hb-eredetű DAMP-ek képződése, illetve proinflammatorikus tulajdonságai a következő fejezetben kerülnek bemutatásra.

## 4.2 A Hb oxidációja, a hem és oxidált hemoglobin formák proinflammatorikus tulajdonságai

### 4.2.1 A hemoglobin oxidációja

A vörösvérsejt antioxidáns rendszere segítségével képes a Hb-ban található hem vasat a ferro oxidációs állapotban tartani, illetve, ha már kialakult a ferri forma, azt visszaredukálni. A védelmi mechanizmus a vörösvérsejten kívül nincs jelen, így az extracelluláris térben a Hb oxidációja bekövetkezik [64]. A Hb oxidációja egy komplex folyamat, melyet több, fiziológiás körülmények között a vaszkulátúrában jelenlévő oxidáló ágens indukálhat, mint például a hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vagy a nitrogén-oxid.

#### 1. táblázat A hemoglobin oxidációjának lépései és a reakciókban képződő Hb

	<b>Képződő forma</b>
(1) $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2 \rightarrow \text{Hb}(\text{Fe}^{3+}) + \text{O}_2^{\cdot-}$	Methemoglobin
(2) $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Hb}(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}) + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Ferrylhemoglobin
(3) $\text{Hb}(\text{Fe}^{3+}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Hb}^+(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}) + \text{H}_2\text{O}$	Ferrylhemoglobin globin gyök
(4) $\text{Hb}(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}) + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Hb}^+(\text{Fe}^{3+}) + \text{H}_2\text{O}$	Methemoglobin globin gyök
(5) $\text{Hb}^+(\text{Fe}^{3+}) + \text{Hb}^+(\text{Fe}^{3+}) \rightarrow (\text{Fe}^{3+})^+\text{Hb} - \text{Hb}^+(\text{Fe}^{3+})$	Kovalensen kereszt kötött methemoglobin multimer

A folyamat első lépésében az oxihb autooxidációja történik meg, melynek során metHb képződik (1. reakció). Ez a Hb-tól a hem proszterikus csoportban lévő vas oxidációs állapotában tér el (Hb: ferro, Fe<sup>2+</sup>, metHb: ferri, Fe<sup>3+</sup>). Az oxihb 2 elektronos oxidációja során ferrylHb keletkezik, melyben a hem-vas oxyferryl formában (Fe<sup>4+</sup>=O) van jelen (2. reakció). A metHb további oxidációja során ferrylHb globin gyök jön létre (3. reakció). 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 (4. reakció). A globin láncokon visszamaradt párosítatlan elektronok a Hb alegységek között stabil kovalens kötések alakítanak ki, ez által kovalens módon kereszt kötött Hb multimerok képződnek (5. reakció). A hem vas oxidációs állapota befolyásolja a Hb alegységek szerkezetét. A vas oxidációja olyan torzulást idéz elő a molekulában, mely csökkenti a hem-globin kötés stabilitását, és a hem disszociációjához vezet. A különböző Hb formákból kiszabaduló hem mennyiségét vizsgálva megállapították, hogy a metHb-ban lévő hem csoport 3,4-szer, a ferrylHb-ban lévő hem pedig 5-ször akkora mértékben hajlamos a disszociációra mint a ferro

vasat tartalmazó Hb [65]. Az extracelluláris Hb oxidációja tehát számos potenciális DAMP – úgymint metHb, ferrylHb, kovalens módon keresztkötött Hb multimerek és hem – képződéséhez vezet, melyek közül korábbi tanulmányokban leginkább a hem proinflammatorikus hatásait vizsgálták.

## 4.2.2 A hem veleszületett immun receptorokon kifejtett proinflammatorikus hatásai

### 4.2.2.1 A hem mediálta TLR4 aktiváció

A TLR4 a Toll-like receptorok családjába tartozó innate immun receptor. Legismertebb ligandja az LPS, mely a Gram-negatív baktériumok külső membránjának alkotóeleme. A TLR4 aktiváció következtében a nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) transzkripciós faktor transzlokálódik a sejtmagba, és fokozza számos proinflammatorikus gén expresszióját, valamint proinflammatorikus citokinek (pl. tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ )) szekrécióját [66].

A hem TLR4 aktivációt előidéző hatását elsőként Figueiredo és munkatársai figyelték meg. Kimutatták, hogy a hem az LPS-hez hasonló módon és mértékben TNF- $\alpha$  szekréciót indukál makrofágokban [67]. A hem-indukált TNF- $\alpha$  szekréció TLR4 deficiens egerekből származó makrofágokban nem következik be. Szintén kulcsszerepet játszik a folyamatban a TLR4 adaptor fehérje, a myeloid differenciáló 88 faktor (MyD88) és a TLR4 koreceptora, a CD14 is [67]. Továbbá azt is kimutatták, hogy a proinflammatorikus hatás kiváltásához szükséges a hem gyűrű integritása, ugyanis a vas ion önmagában, illetve a vasat nem tartalmazó protoporfirin IX egyike sem indukál TNF- $\alpha$  szekréciót [67]. A hem magasabb dózisban TLR4/MyD88-függő módon programozott nekrozist indukál makrofágokban, ugyanakkor TLR4-független útvonalon ROS képződést generál [68].

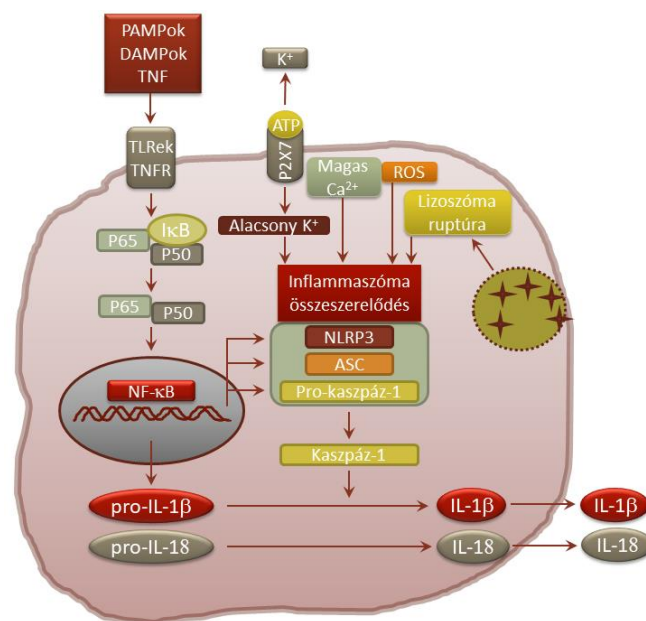
A hem mediálta TLR4 aktiváció jelentős szerepet játszik az intracerebrális vérzés által keltett neuroinflammáció kialakulásában. Lin és munkatársai TLR4 deficiens és vad típusú egerekben intracerebrális vérzést indukáltak, és TLR4 hiányában kisebb mértékű gyulladást és csökkent mértékű ödémát találtak [69].

A makrofágok mellett a hem endotélsejtek aktivációjában is részt vesz. Az endotélsejtek egyik fő funkciója, hogy barriert képeznek a vér és a szövetek között. A gyulladást keltő stimulus az endotélsejtek aktivációját okozza, amelynek legmarkánsabb jele az adhézións molekulák fokozott expressziója [70, 71]. Wagener és munkatársai írták le, hogy a hem fokozza az intercelluláris adhézións molekula-1 (ICAM-1), a vaszkuláris sejtadhézións molekula 1 (VCAM-1) és az E-szelektin expresszióját humán umbilikális véna endotél sejtekben (HUVEC)

[72]. Belcher és munkatársai kimutatták, hogy a hem általi endotél aktiváció TLR4-függő útvonalon történik, és bizonyították, hogy a hem-mediálta TLR4 aktivációnak kóroki szerepe van sarlósejtes anémiában. Hem hatására az endotélsejtekben található Weibel-Palade testek degranulációja, a von Willebrand faktor (vWF) aktivációja, és NF- $\kappa$ B aktiváció következik be, mely hatások TLR4 inhibitorral blokkolhatók, illetve TLR4 deficiens egérben nem következnek be [73].

#### 4.2.2.2 A hem-mediálta NLRP3 aktiváció

A NOD-like receptorok az intracelluláris mintázatfelismerő receptorok családjába tartoznak. Szerkezetileg három fő doménjük van: a C-terminális leucinban gazdag ismétlődő (LRR) domén, a nukleotid oligomerizációs domén (NOD vagy NACHT) és az N-terminális kaszpáz recruitment (CARD) vagy pyrin (PYD) domén [74, 75]. A NOD-like receptorok a DAMP-ok és PAMP-ok felismerését követően az inflammaszóma komplex összeszerelődik [76, 77]. Az NLRP3 inflammaszóma a szenzor molekulán kívül egy adaptor fehérjéből (ASC (apoptózis-asszociált „speck-like” fehérje)) és egy pro-kaspáz -1 enzimből épül fel.



**4. ábra Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjának útvonala.** Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjához 2 szignál szükséges. Az egyik szignál eredményeképpen NF- $\kappa$ B aktiváció, pro-IL-1 $\beta$  és pro-IL-18, valamint NLRP3, ASC és pro-kaspáz-1 képződik. A másik szignál, - mely lehet alacsony intracelluláris K<sup>+</sup>, magas Ca<sup>2+</sup>, fokozott ROS termelés, illetve lizoszóma ruptúra - következtében aktiválódik az NLRP3, ASC és pro-kaspáz-1-et tartalmazó platform, a kaszpáz-1 aktiválódik, és hasítja a pro-citokineket, aminek következtében aktív IL-1 $\beta$  és IL-18 képződik és szekretálódik.

Az NLRP3 inflammaszóma aktiválásához jellemzően két stimulus szükséges (**4. ábra**). Az első stimulus az NF- $\kappa$ B útvonal aktivációjához, az inflammaszóma komplex összetevőinek és a pro-IL-1 $\beta$ , illetve pro-IL-18 mRNS, majd fehérje expressziójához vezet.

A második stimulus, DAMP-ok és PAMP-ok hatása által az inflammaszóma komplex összeszereléséhez és végeredményben a kaszpáz-1 enzim aktivációjához vezet. Az aktív kaszpáz-1 hasítja a pro-IL-1 $\beta$ -t, illetve pro-IL-18-t. A folyamat utolsó lépéseként a hasított aktív citokinek szekretálódnak a sejtől [78, 79].

A hem proinflammatorikus hatásait vizsgálva Dutra és munkatársai kimutatták, hogy a hem IL-1 $\beta$  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 $\beta$  szekréciót. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjához a hem molekulának intakt módon, szerkezetét megőrizve kell jelen lennie, hiszen sem a vas önmagában, sem pedig a protoporfirin IX nem okozta IL-1 $\beta$  szekrécióját az LPS-el előkezelt makrofágokban [80]. Ennek ellentmondóan Li és munkatársai a protoporfirin IX molekulával is tudtak IL-1 $\beta$  szekréciót indukálni LPS-el előkezelt makrofágokon [81].

A Dutra és munkatársai által publikált tanulmányból látható, hogy a hem mediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációjához két szignálra van szükség. Az első szignál például LPS vagy TNF- $\alpha$ , melynek hatására az NF- $\kappa$ B transzlokálódik a sejtmagba, és pro-IL-1 $\beta$ , pro-kaspáz-1, és NLRP3 transzkripciójához vezet. Megfigyelték azt is, hogy a hem a lép tirozin kináz (Syk) foszforilációját indukálja, mely közvetlenül mitokondriális ROS (mtROS) képződését indukálja. Emellett a hem indukálja a NADPH oxidáz 2-t, mely szintén mtROS termeléséhez vezet, illetve szintén hatással van a hem a K<sup>+</sup>-ionok kiáramlására. Ezen hatások összességének köszönhető az NLRP3 inflammaszóma komplex összeszerelődése [80].

#### 4.2.3 Az oxidált Hb-formák proinflammatorikus tulajdonságai

A hemhez viszonyítva sokkal kevesebb információ áll rendelkezésre az oxidált Hb formák proinflammatorikus hatásairól. Az oxidált Hb formákról a hem disszociációja bekövetkezik, mely megnehezíti annak a megítélését, hogy az adott hatás a szabaddá vált hem, vagy az oxidált Hb forma unikális hatása. A hem disszociációja révén például a metHb és a ferrylHb is előidézi lipidperoxidációt, és főként a metHb fokozza a ROS termelést számos sejtípusban [82-84].

Silva és munkatársai vizsgálták a különböző Hb redox formák proinflammatorikus hatását endotélsejteken. Kimutatták, hogy a ferrylHb indukálja az adhézións molekulák (ICAM-1, VCAM-1, E-szelektin) expresszióját HUVEC sejteken, ugyanakkor a Hb és metHb nem okoz

endotélsejt aktivációt. A ferrylHb az aktin citoskeleton átrendeződését is indukálja, melynek következtében sérült az endotél réteg integritása. Továbbá azt is megállapították, hogy a ferrylHb által indukált gyulladási válasz az aktin polimerizációjától függ, és a c-Jun N-terminális kináz (JNK) és a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) szignál útvonalak aktiválódásával jár együtt [85]. A ferrylHb endotélsejtekre kifejtett proinflammatorikus hatása független a hem disszociációjától, melyet az bizonyít, hogy a metHb, melyből ugyanakkora mértékben szabadul fel a hem, nem indukálja a sejteket. További bizonyítéka a ferrylHb közvetlen proinflammatorikus hatásának az, hogy hatását TLR4 független módon fejt ki, ugyanakkor a hem hatása TLR4 dependens [85].

A különféle Hb redox formák proinflammatorikus hatását intraventrikuláris vérzéssel összefüggésében is vizsgálták. Intraventrikuláris vérzés modellben koraszülött nyulak cerebrospinális folyadékában kimutatták a metHb jelenlétét, melynek koncentrációja a vérzést követő 24-72 órában folyamatosan emelkedett, és korrelációt mutatott a proinflammatorikus TNF- $\alpha$  szintjével [86].

## 4.3 Az endotélsejtek szerepe gyulladási folyamatokban

### 4.3.1 Az endotélsejtek jellemzői, funkciója

Az endotélsejtek barriert alkotnak a vér és a szövetek között, emellett pedig számos más folyamatban kulcsszerepet töltenek be. Az erek falát beborító endotél réteg teljes felülete 100-350 m<sup>2</sup>-re becsülhető, az emberi testtömeg körülbelül 1%-át alkotja. Tömegénél fogva egyes kutatók önálló metabolikus és endokrin szervként tekintenek az endotélsejtekre [87]. Az endotélsejtek élettartama nagyjából egy év [88]. A legtöbb szövetben egyrétegű laphámot alkotnak, ennek vastagsága kb. 0,5-2  $\mu$ m. Funkciójuk sokrétű, részt vesznek az érfal tónusának szabályozásában, a hemosztázis fenntartásában, biztosítják az oldott tápanyagok felvételét a vérből a szövetek számára, antikoaguláns és tromboerezisztens felszint biztosítanak. Vazoaktív hormonokat képesek aktiválni és inaktiválni, a fehérvérsejtekkel pedig dinamikus kapcsolatban állnak, gyulladás esetén segítik azok eljutását a szövetekbe.

### 4.3.2 Az endotélsejtek barrier funkciója

A vér és szövetek között lévő barrier szempontjából az endotélium folytonos és egyrétegű laphám szerkezete rendkívül meghatározó. A barrier kialakításában adhézions molekulák vesznek részt, melyek fontos szerepet töltenek be a vaszkuláris permeabilitás szabályozásában is. Az endotélrétegen a sejtek között található réseken keresztül paracelluláris módon, vagy a sejten keresztül transzcelluláris módon jöhet létre transzport. A transzcelluláris transzport

szelektív csatornákon keresztül, vagy kaveolák segítségével megy végbe. Ezen barrierről ismert, hogy sejteket nem enged át, azonban tápanyagok, a szöveti anyagcsere termékek, illetve az oxigén transzportja megvalósulhat.

A barrier funkció fenntartásában szerepet játszó adhéziós molekulák transzmembrán glikoproteinek, ezekhez intracellulárisan kapcsolómolekulákon keresztül citoskeletális elemek rögzülnek. Ezen kötőerők segítségével valósul meg a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok fenntartása. Az adhéziós molekuláknak a barrier kialakítása mellett egyéb funkciójuk is van. Szerepet játszanak a háromdimenziós struktúrák kialakításában, a sejtek közötti kommunikációban, sejtnövekedésben, differenciálódásban, illetve a migrációban is.

Funkciójukat tekintve az adhéziós molekulák részt vehetnek (i) endotélsejtek közötti, (ii) endotélsejt-extracelluláris mátrix közötti, illetve (iii) egyéb sejt típusokkal, mint például endotélsejt-leukocita közötti kapcsolat kialakításában. A szomszédos endotélsejtek között létrejövő kapcsolat homotipikus, melynek a barrier funkció szabályozásában és az összefüggő endotélréteg kialakításában játszik szerepet. A szomszédos endotélsejtek között adherens, szoros (tight) és rés (gap) sejtkapcsoló struktúrák alakulnak ki. Ezen kapcsolatok közül az adherens kapcsolatok vannak túlsúlyban az endotélsejtek esetében. Az adherens sejtkapcsolat főként a sejtek egymáshoz kapcsolódásának kialakulásáért felelős, míg a szoros kapcsolatok a makromolekulák és fehérjék szabad átjutását gátolják az endotéliumon. Az utóbbi struktúrák kialakításában a nektinek, az okkludin és a klauudinok, illetve a junkciós adhéziós molekulák (JAM) vesznek részt. Az adherens sejtkapcsolatok kialakításában a vérlemezke endotélsejt adhéziós molekula (PECAM-1), a CD99 és a VE-kadherin – mely intracellulárisan kötődik az aktin filamentumokhoz – játszik szerepet. A VE-kadherin egy olyan transzmembrán fehérje, mely a vaszkuláris endotéliumra jellemző, és feladata a sejtek egymáshoz rögzítése dinamikus módon. A VE-kadherin szerepe esszenciális a normális adherens kapcsolatok kialakításában és ezáltal a barrier funkció fenntartásában.

Az endotélsejtek az extracelluláris mátrixszal is kapcsolatot alakítanak ki, melyben a heterodimer integrinek szerepe a legjelentősebb. Legfontosabb ligandumaik mátrixfehérjék (fibronektin, vitronektin, kollagén, laminin), ezek tartják fenn a sejt közötti állomány rostrendszerét a sejt felszínen lévő fehérjékkel és így a sejt vázzal is. Ezen kapcsolat által válik stabilá a szöveti szerkezet, illetve a sejt migrációban is szerepet játszik, segítve a sejtek vándorlását.

Az endotélsejtek emellett egy specifikus kapcsolatot is kialakítanak, ez az endotél-leukocita kapcsolat, melynek a gyulladásos reakcióban van szerepe. Az endotél-leukocita kapcsolat kulcsszerepet játszik a leukociták lelassításában és a sejtek endotél felszínhez való

rögzítésében, valamint a leukociták szöveti transzmigrációjában. Ezen sejtkapcsolatot részleteiben a 4.3.4 fejezetben mutatom be.

### 4.3.3 A vaszkuláris tónus és a hemosztázis szabályozása

A vaszkuláris tónus szabályozásában több, endotélsejtek által termelt szabályozó molekula vesz részt. Vazodilatátorok csoportjába tartozik például a nitrogén-oxid (NO), illetve a prosztaciklin (PGI<sub>2</sub>) [89], vazokonstriktorok közzé tartozik az endotelin-1 (ET-1) és a tromboxán (TxA<sub>2</sub>), melyek az endotél réteg alatt nyugvó simaizomsejtek tónusának szabályozásában vesznek részt [90]. Az ér tónusát a vazokonstriktorok, és a vazodilatátoroknak egyensúlya határozza meg, normál körülmények esetében a vazodilatátorok hatása a domináns [89-91].

A hemosztázis kialakítását tekintve az endotélsejtek által termelt faktorokat két csoportra lehet osztani. Véralvadásgátló (antikoaguláns, illetve antitrombotikus) és véralvadást fokozó (prokoaguláns és protrombotikus) szabályozók, ezek a sejtfelszínhez kötötten, szolubilis formában vannak jelen. A véralvadásgátló faktorok megakadályozzák a vérlemezék egymáshoz és az endotélsejtekhez való adhézióját [92, 93]. A véralvadást fokozó faktorok a véralvadási folyamat lépését segítik elő és a vérlemezék aktivációjában, illetve aggregációjában játszanak szerepet [94]. A vérlemezke aktivációban és aggregációban legfőbb szerepe a nitrogén-oxidnak és prosztaciklinnek van [93, 95]. Az endotélsejtek felszínén termelődő trombomodulin a trombin megkötése által és protein-C aktiválásával együtt az endotélsejteket antitrombotikus állapotban tartja. A véralvadási kaszkád elindításában szöveti faktor és a von Willebrand faktor (vWF) játszanak szerepet. A vWF endotélsejtekben termelődik és az úgynevezett Weibel-Palade testekben van tárolva [93]. Innen valamilyen hatás, aktiváció például sérülés útján képes kiürülni és az ér sérült részéhez tapad, stabilizálva a véralvadási VIII-as faktort és elindítva a kaszkádot. A vWF-al együtt tud a felszínre jutni a P-szelektin, mely a vérlemezék és endotélsejtek adhéziójában játszik szerepet [93].

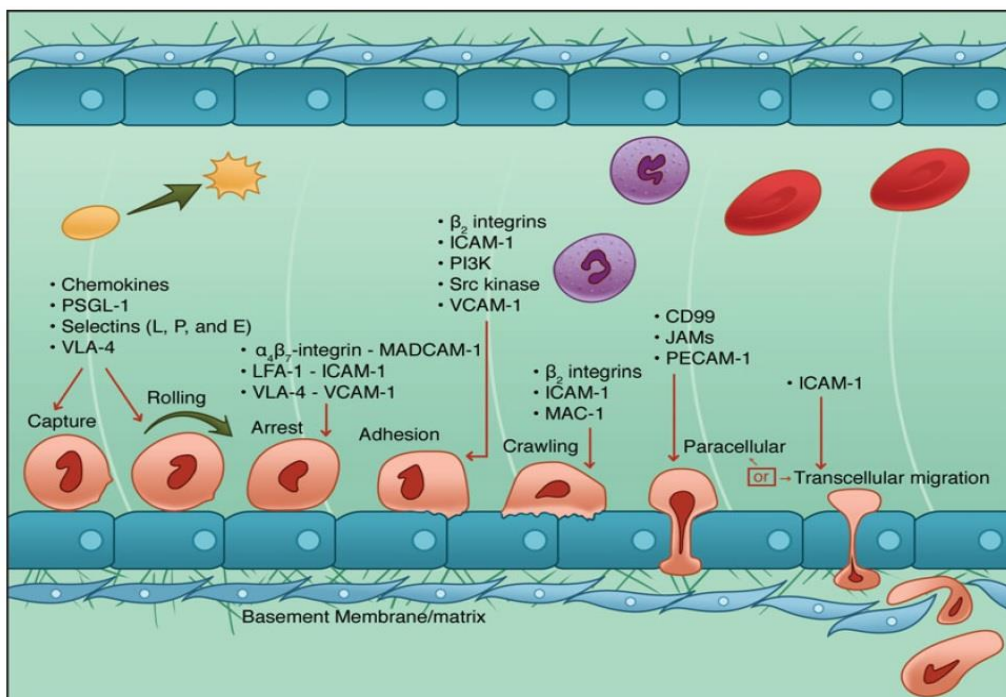
### 4.3.4 Az endotélsejtek aktivációja, adhéziós molekulák szerepe a gyulladásban

Az endotélsejtek anti- és proinflammatorikus mediátorokat termelnek, melyek szerepet játszanak a gyulladási folyamatok szabályozásában. Az endotélsejtekben mikrobiális stimulus (pl. LPS) hatására vagy gyulladást kiváltó citokinek (pl. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) jelenlétére reagálva megváltozik az adhéziós molekulák expressziója és megnő az endotélréteg permeabilitása.

Emellett a proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelődése fokozottá válik. Ezen folyamatok teszik lehetővé a leukociták beáramlását a sérült vagy gyulladt szöveti területre.

A leukociták endotél rétegen való átjutásának első lépésében a vérben áramló leukociták kemokin grádiens hatására a sérülés közelébe kerülnek (5. ábra). A leukociták felszínén található szíalsav és fukóz tartalmú glikoproteinek tranziens módon összekapcsolódnak az endotélsejtek felszínén expresszálódó E-szelektinnel, ami a leukocita lelassulását, a leukocita endotél felszínén való gördülését eredményezi [96]. A gördülésben és lassításban további szelektinek, a leukocitán expresszálódó L-szelektin, valamint a P-szelektin is szerepet játszik [96]. A P-szelektin az endotélsejtek Weibel-Palade testjeiben és a vérlemezkék alfa-granulumaiban inaktív állapotban található, ahonnan stimulus hatására szabadul fel és aktiválódik [97].

A szelektinek sejt felszíni expressziójának fokozódása a leukociták gördülésének lassulásához vezet, melyet citokinek (pl. IL-8, IL-6) és kemokinek felszabadulása követ (5. ábra).



**5. ábra A transzmigráció szabályozása endotélsejteken.** Az endotélium aktivációja során az adhéziós molekulák megnövekedett expressziójának hatására az erekben keringő sejtek lassulnak, majd gördülni kezdenek az endotélrétegen. A proinflammatorikus citokinek aktiválják a leukocitákat, az adhézió stabilizálódik. A transzmigráció folyamatában az endotélsejtek közötti kapcsolat részlegesen felbomlik, míg a leukocitákkal szoros kapcsolat alakul ki. *Forrás: Sutton N.R., Baek A., Pinsky D.J. (2014) Endothelial Cells and Inflammation. In: Mackay I.R., Rose N.R., Diamond B., Davidson A. (eds) Encyclopedia of Medical Immunology. Springer, New York, NY*

A pro-inflammatórikus citokinek aktiválják a lelassult leukocitákat, és az adhézió stabilizálódik. Ez által a fehérvérsejtek leukocita funkcionális antigén (LFA-1) integrin az intracelluláris adhéziós (ICAM-1/2) molekulákkal és a nagyon késői antigén (VLA-4) integrinjei az endotélsejtek VCAM-1 molekuláival hoznak létre szoros kapcsolatot [96]. Ezt követi az utolsó lépés, melyben a transzmigráció történik meg a CD99 és a PECAM-1 adhéziós molekulák által (5. ábra). A transzmigráció során az endotélsejtek között lévő kapcsolat részleges felbomlása figyelhető meg, míg a leukocitákkal a szoros kapcsolat megmarad [98]. Ezután az endotélsejtek közötti rések záródnak az egysejtréteg sérülése, illetve a permeabilitás jelentősebb változása nélkül (5. ábra).

A leukocitákról az is ismert, hogy képesek alternatív módon, transzcellulárisan is átjutni az endotél rétegen, a sejtek közötti kapcsolat megzavarása nélkül [99].

#### 4.3.5 NLRP3 inflammaszóma aktiváció endotélsejteken

Az endotélsejtek expresszálják a veleszületett immunrendszer számos receptorát, melyek segítségével érzékelik és reagálnak a keringésbe jutott PAMP és DAMP molekulákra [100]. 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 $\beta$  szekréciót indukálnak [101]. Az NLRP3 inflammaszóma aktiváció egyik legjelentősebb induktora endotélsejtekben a magas glükóz szint és az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE). A magas glükóz és AGE által indukált NLRP3 aktiváció szerepet játszik a diabéteszhez társuló endotéliális diszfunkció kialakulásában [102]. 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 [103-105]. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjával összefüggő endotél diszfunkciót a diabétesz mellett számos más betegségben is megfigyelték [102, 106-110].

### 4.4 A koraszülötteleket érintő intraventriculáris vérzés (IVH), a hem és oxidált Hb formák szerepe

#### 4.4.1 A központi idegrendszer felépítése, a vér-agy gát szerepe

A központi idegrendszer, melyet az agy és a gerincvelő alkot egy rendkívül komplex hálózat, mely különböző elektromos vagy kémiai ingerek hatására precízen és összehangoltan működik. Ennek a környezetnek a létrehozásához és fenntartásához speciális barrierek

alakultak ki a központi idegrendszerben. Ezek a cellulárisan kialakuló rendszerek egyes esetekben elkülönítik, máskor összekapcsolják az idegi szöveteket vagy a cerebrospinális folyadékot (liquor) és a vért, ezzel irányítva az agyba és az agyból történő áramlást. Kontrollálni tudják a nélkülözhetetlen tápanyagok felvételét, illetve eltávolítják a felesleges vagy ártalmas anyagokat a központi idegrendszerből. Elmondhatjuk tehát, hogy fizikai, metabolikus és immunológiai szempontból fontos barriert képeznek, amelynek kritikus szerepe van a transzport funkciókban [111]. Ezen barriert alkotja a vér-liquor barrier a choroid plexusban, az arachnoid barrier, illetve a vér-agy-gát is (blood-brain barrier; BBB) [112]. Ezek közül is a legkiterjedtebb a vér-agy gát, becslések szerint ezerszer nagyobb, mint a vér-liquor alkotta barrier [113]. A vér-agy gát egy rendkívül szelektíven működő rendszer, melyet a cerebrális endotélsejtek alkotnak az agy kapillárisaiban, arteriolákban és kis vénákban, melynek nélkülözhetetlen szerepe van a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában [111].

Az agyi kapillárisokat bélelő endotélsejtek lapos sejtek, amelyekre jellemző a folytonos, szoros (intercelluláris) kapcsolatok [114] a nagyszámú mitokondrium [115] és a kaveolák alacsony száma a luminális membránban [116]. A szoros kapcsolatok, amelyek a szomszédos sejtek membránjai között alakulnak ki, folyamatos, övszerű struktúrát hoznak létre a sejtek apikális részén. Az agyi endotélsejtek a többi endotélsejtre jellemző tulajdonságok mellett még epitélsejtekre jellemző tulajdonságokat is magukban hordoznak: folyamatos szoros kapcsolatokat alakítanak ki, alacsony a pinocitózis és magas elektromos ellenállás jellemzi őket. Mindezen tulajdonságok elengedhetetlenek a barrier funkció ellátásához az agyban [111]. Az endotél által létrehozott barrier permeabilitását befolyásolják a sejtek között kialakuló tight (szoros illeszkedés) és adherens junkciók. Előbbi kapcsolódás létrehozásában számos transzmembrán protein, így okkludinok és klaudinok vesznek részt. Ezek mellett a zonula occludens (ZO-1, ZO-2) fehérjék és az adherens junkció kialakításában részt vevő adhéziós molekulák is jelentős szerepet töltenek be.

#### 4.4.2 Az intraventriculáris vérzés előfordulása koraszülöttekben

Az intraventriculáris vérzés (IVH) egy gyakorta előforduló komplikáció koraszülötteknél. Nemrég megjelent tanulmányok szerint az 1500 g alatti súlyú koraszülöttek mintegy 15-20 %-át érinti, míg 500-750 g súlyú koraszülöttek esetén az előfordulása jóval gyakoribb, közel felük érintett lehet [117-119]. Az IVH-t követő halandósági ráta igen magas, nagyjából az IVH-n átesett koraszülöttek 20-50 %-a veszti életét, illetve túlélés esetén is magas az esélye az idegrendszeri fejlődés visszamaradásának [120].

A magzati agyfejlődés során a neuronok és gliasejtek az úgynevezett germinális mátrixból (GM) vándorolnak ki, mely egy erősen vaszkularizált, vékony réteg. Ez a terület a terhesség 8-28. hete között a legaktívabb, majd felszívódik, és egészséges újszülöttekben a GM már nem található meg [121]. 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. Mivel ez az IVH a GM-ból indul ki, számos irodalmi előzményben GM-IVH-ként hivatkoznak erre a típusú vérzésre [122].

A GM-IVH-nak súlyosságát tekintve négy stádiumát különböztetjük meg. Az első stádiumban a vérzés körülhatárolt. A második stádiumban a vérzés betör az agykamrákba, míg a harmadik stádiumban a vérzés olyan nagyfokú, hogy az agykamrák tágulását okozza. A legsúlyosabb negyedik stádiumban a vér az agyállományba is betör. Az IVH következtében fokozódik a liquor termelődés, ugyanakkor a liquor elfolyását akadályozhatja a vérzés, így súlyos IVH-ban fokozódik az agykamrai nyomás. Ilyen esetekben szükségessé válhat shunt beültetés a liquor mesterséges elvezetése céljából [123, 124].

#### 4.4.3 A hem és oxidált Hb formák szerepe a koponyaűri vérzéseknél

A koponyaűri vérzéseket követően a VVT lízise és a Hb akkumulációja figyelhető meg a liquorban [86, 125, 126]. 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 megállapították, hogy az oxidált Hb formák a vérzést követő 3-14. nap között nyert mintákban vannak jelen legnagyobb mennyiségben [125]. Egy másik tanulmányban SAH és ICH után vizsgálták a betegek plazma és liquor mintáit. A vérzés utáni első három napon gyűjtött mintákból hem jelenlétét mutatták ki, melynek szintje korrelált az inflammatórikus citokinek szintjével [126].

Svistunenko és munkatársai ferrylHb-t detektáltak humán plazmában, mely Hb forma a szerzők feltételezése szerint a Hb és a szervezetben állandóan jelenlévő hidrogén-peroxid közötti reakcióban képződik *in vivo* körülmények között [127]. Egy másik tanulmányban SAH után vizsgálták a betegek liquor mintáit és kovalensen keresztkötött Hb jelenlétét mutatták ki [128].

Számos tanulmányban vizsgálták a koponyaűri vérzések során szabaddá váló Hb, hem és vas kóroki szerepét a vérzést követő vér-agy gát diszfunkció, illetve a neuroinflammáció kialakulásában [129, 130]. 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 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-8 és IL-6) expresszióját choroid plexus epitél sejtekben [86, 131]. Lin et al. kimutatta, hogy a hem TLR4-függő módon

mikroglia aktivációt indukál, mely pro-inflammatórikus IL-6 és IL-8 citokinek szekréciójához vezet [69]. Intracerebrális vérzés esetén a Hb-ból szabaddá váló vasról kimutatták, hogy lipidperoxidációt indukál agyhomogenizátumban [132].

## 5. Célkitűzések

---

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

1. **Hipotézis:** A hem proinflammatorikus molekula, mely *in vivo* körülmények között és *in vitro* endotélsejtekben IL-1 $\beta$  szekréciót indukál.

Célkitűzés: A hem IL-1 $\beta$  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 $\beta$  termelését.

Célkitűzés: Vizsgáljuk a hem hatását HUVEC NLRP3 expressziójára, valamint az NLRP3 szerepét egerek hemmel indukált kaszpáz-1 aktivációjában és IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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 gyulladási 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.

## 6. Anyagok és módszerek

---

### 6.1 Anyagok

A kísérleteinkhez, amennyiben másként nem jelöltük, a Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) termékeit használtuk.

### 6.2 Állatkísérletek

A kísérleteinkhez használt C57BL/6 és NLRP3<sup>-/-</sup> egereket a Debreceni Egyetem Természettudományi Kar konvencionális állatházában tartottuk. A kísérletekben 6-8 hetes egereket használtunk fel. Kísérleteink során mind az intézeti és a nemzetközi etikai szabályokat betartottuk és etikai engedéllyel rendelkezünk (2/2016/DEMÁB). Az NLRP3<sup>-/-</sup> egerek eredetileg a J. Tschopp által vezetett laboratóriumban lettek karakterizálva.

A hem gyulladáskeltő tulajdonságát vizsgálva húsz C57BL/6 egeret vizsgáltunk (nőstény, 6-8 hetes), melyeket véletlenszerűen osztottunk négy csoportra (n=5/csoport) és intraperitoneálisan hemet injektáltunk 75, 150 és 300 nmol koncentrációban, melyet 200 µL PBS-ben oldottunk. A kontroll egerek csak PBS-t kaptak. Egy kísérletünk során a C57BL/6 egerekbe (n=4) hem-albumin komplexét injektáltuk, melyet úgy készítettünk, hogy a hemhez ekvimoláris mennyiségű humán albumint adtunk és 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. 16 óra elteltével az egerek életét CO<sub>2</sub> lélegeztetésével oltottuk ki. A peritoneális leukocitákat peritoneális lavage segítségével mostuk ki jéghideg PBS-el, mely 2% FCS-t (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) tartalmazott és a mosófolyadékban található sejteket áramlási citometria segítségével analizáltuk. A sejtek összmennyiségének meghatározásához fix számú latex gyöngyöt (Beckman Coulter, Paris, France) használtunk. A peritoneális neutrofilek számát R-phycoerythrin- (R-PE) konjugált anti-egér Ly6G (Gr1; CD11b, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) és biotin anti-egér neutrofil monoklonális antitest (CL8993B, Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) használatával határoztuk meg. A fluoreszcenciát áramlási citometriával (FACS Calibur, BD Biosciences) mértük, és az adatokat FlowJo szoftver (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) segítségével elemeztük. A Ly6G és 7/4 dupla pozitív sejteket neutrofilként azonosítottunk, míg a Ly-6G negatív és 7/4 pozitív sejteket inflammatorikus monocita/makrofágként azonosítottuk.

A másik kísérletünk során, húsz C57BL/6 egeret (nőstény, 6-8 hetes) véletlenszerűen osztottunk négy csoportba (n=5/csoport), majd intraperitoneálisan LPS-sel (100 µg/egér),

hemmel (300 nmol/egér) vagy LPS+hem elegyével injektáltuk 200 µl PBS-ben oldva. A kontroll egerek csak PBS injekciót kaptak a kísérlet során. A leukociták számát a peritoneális folyadékban Bürker kamrákban határoztuk meg Türk oldatban való hígítás után. Az IL-1β szintek meghatározásához a peritoneális folyadékot lecentrifugáltuk és a felülúszóból határoztuk meg az IL-1β szintjét ELISA módszerrel (DuoSet ELISA, R&D, Minneapolis, MN, USA). Az NLRP3 szerepének vizsgálatához a hem mediálta gyulladási válasz során, hat C57BL/6 és hat NLRP3<sup>-/-</sup> egeret használtunk (nőstény, 6-8 hetes), melyeket véletlenszerűen osztottunk két csoportra (n=3/csoport) és intraperitoneálisan injektáltunk hemet, illetve a kontroll egerekbe PBS-t. A májmintákat 16 óra elteltével gyűjtöttük, nitrogénben porítottuk és -70°C-on tároltuk az analízisig.

### 6.3 Humán umbilikális véna endotélsejtek (HUVEC) izolálása és tenyésztése

A HUVEC sejteket 10% FBS, 5 U/L heparin, 1 mM Na-piruvát, 5mM L-glutamin, 0,5% EndoGrow növekedési hormon, illetve 10000 unit/mL penicillin G, 10 mg/mL streptomycin és 25 µg/mL amphotericin B tartalmú Medium 199-ben tenyésztettük.

A HUVEC sejteket egészséges érett újszülöttek frissen gyűjtött köldökzsinór vénájából izoláltuk. A köldökzsinórban futó vénát kanuláltuk, vértelenítettük, majd sterilre szűrt 0,2%-os diszpáz oldattal töltöttük fel. A köldökzsinórt lezártuk, majd Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) pufferoldatba merítve 4°C-on inkubáltuk 6 órán át. A sejteket ezután Medium 199-cel kimostuk a vénából, centrifugáltuk (2000 g, 4°C, 10 min), tenyésztő médiumban szuszpendáltuk, és egy előzetesen 0,2% zselatin oldattal bevont felszínű T75-ös tenyésztő flaskába helyeztük. Az így nyert sejtek átlagosan 3-4 nap alatt váltak konfluenssé. Konfluenssé válásuk után a sejteket 1:4 arányban passzáltuk. A kísérleteinkhez felhasznált sejtek passzázs száma 2-3 volt.

### 6.4 Humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejtek (HBEC) tenyésztése

A HBEC sejt vonalat az ATCC-től (CRL-3245, Manassas, VA, USA) vásároltuk meg. A sejteket Media 199-ben tenyésztettük, melyet 10% FBS-el, 40 µg/mL EndoGrow növekedési hormonnal és 10 mg/ml streptomycinnal, illetve, 25 µg/ml amphotericin B-vel egészítettünk ki. A sejteket előzetesen 0,1%-os zselatinnal bevont felszínű tenyésztő edényben tenyésztettük. A kísérletben felhasznált sejtek passzázs száma 5-8 volt.

## 6.5 Humán Hb preparálása

A Hb-t önkéntesektől vett heparinnal alvadásgátolt vérből tisztítottuk. A VVT-ket háromszor mostuk 4°C-os fiziológias sóoldattal (2000 g, 10 perc, 4°C) minden alkalommal a fehérvérsejt és plazma réteget eltávolítva. A mosott VVT-ket nátrium-foszfát pufferrel (5 mM, pH=7,4) lizáltuk és egy órán át jégen állni hagytuk. A lizálási lépés után a VVT membránt távolítottuk el centrifugálással (16800 g, 1 óra, 4°C). A felülúszót leszívtuk, és a térfogat 1/20-ad részének megfelelő Tris bázist (1M, nem titrált) pipettáztunk a csövekbe és alaposan összeforgattuk. A Hb preparálását 4 °C-on ioncserés kromatográfiával végeztük, DEAE Sepharose CL-6B töltetű oszlopon, melyet előző nap Tris oldattal (50 mM, pH=8,2) ekvilibráltunk. A hemolizátumot óvatosan rétegeztük az oszlopra, 3-szoros térfogatú Tris oldattal (50 mM, pH=8,2) mostuk, majd Tris oldattal (50 mM, pH=7,4) eluáltuk. Az eluálódó frakciókat steril centrifugacsövekbe gyűjtöttük, és koncentrációjukat fotometriás módszerrel határoztuk meg.

A tisztított Hb-ból kiindulva metHb-t illetve ferrylHb-t állítottunk elő. MetHb előállításánál a Hb-t 1,5-szeres moláris mennyiségű  $K_3[Fe(CN)_6]$ -al reagáltattuk kevertetés mellett 30 percen keresztül 25°C-on. FerrylHb előállításához a Hb-t a hemcsoporthoz viszonyított 10-szeres mennyiségű  $H_2O_2$ -dal inkubáltuk 1 órán át 37°C-on. Az oxidáció végeztével a metHb és ferrylHb oldatokat, illetve a Hb-t is dializáltuk 100-szoros térfogatú fiziológias sóoldat ellenében (3 alkalommal, 3 óra, 4°C). A tisztított Hb oldatokat töményítettük, Amicon Ultra centrifugacsövek segítségével (10000 MWCO, Millipore Corp., Billerica, MA, USA). A Hb oldatok tisztaságát gélelektroforézist követő ezüstfestéssel (ProteoSilver Plus Silver Staining Kit) ellenőriztük. A Hb oldatok koncentrációját az 2. táblázatban leírt egyenletek segítségével számítottuk ki [133, 134]. A tisztított és betöményített oldatokat porcióztuk, majd folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, és felhasználásig -70°C-on tároltuk.

### 2. táblázat A Hb oldatok koncentrációjának számításához használt összefüggések

$[Hb] = 119 \times OD_{576} - 39 \times OD_{630} - 89 \times OD_{560}$ $[MHb] = 28 \times OD_{576} + 307 \times OD_{630} - 55 \times OD_{560}$ $[hemikróm] = -133 \times OD_{576} - 114 \times OD_{630} + 233 \times OD_{560}$	Winterbourn-féle összefüggések
$[Hb] = -350,52 \times OD_{541} + 388,95 \times OD_{576} + 150,02 \times OD_{630}$ $[MHb] = -185,77 \times OD_{541} + 171,88 \times OD_{576} + 387,58 \times OD_{630}$ $[FHb] = 702,23 \times OD_{541} - 657,43 \times OD_{576} - 455,64 \times OD_{630}$	Meng és Alayash által meghatározott összefüggések

## 6.6 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A HUVEC és HBEC sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben kezeltük. Az RNS izolálásához a kezelés végén a sejteket Trizol (RNA-STAT60, Tel-Test B Labs, Alvin, TX, USA) reagenssel szolubilizáltuk. A minták RNS tartalmát a gyártói protokollt követve nyertük ki. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát a 260 és 280 nm-en meghatározott abszorbanciájuk aránya alapján határoztuk meg. Az abszorbanciákat a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) fotométer segítségével határoztuk meg. A koncentráció meghatározása után a mintákból 2 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé. Ehhez High Capacity cDNA RT kitet (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk. A PCR reakciót valós idejű qPCR készülék (CFX96 Real-Time System, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) segítségével végeztük. A target gének amplifikációja során iTaq™ Universal Probes Supermix master mixet (Bio-Rad, Inc.) és validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát és a hozzá megtervezett primereket használtuk. Vizsgálataink során IL-1β (Hs.00174097), NLRP3 (Hs.00918082), ASC (Hs.01547324), HO-1 (Hs.01110250), VCAM-1 (Hs.01003372), ICAM-1 (Hs.00164932), IL-8 (Hs.00174103) és GAPDH (Hs.0278624) gének expresszióját vizsgáltuk.

## 6.7 Western blot analízis

A HUVEC és HBEC sejteket hat lyukú sejttenyésztő lemezen tenyésztettük, illetve kezeltük. A kísérletek végén PBS pufferrel mostuk a sejteket és lyukanként 100 µL szolubilizáló oldatban (150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 1% Triton-X 100, 0,5 % Igepal CA-630, 1% Complete Mini proteáz inhibitor (Roche, Basel, Svájc) lizáltuk a mintákat. A kapott lizátumot lecentrifugáltuk (12000 rpm, 10 perc), a felülúszót összegyűjtöttük és meghatároztuk a fehérjekoncentrációját BCA módszerrel (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A mintát (20 µg) β-merkaptóetanolt tartalmazó SDS mintapufferben denaturáltuk 95°C-on, 15 percig. A fehérjéket 10%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el Bio-Rad Mini Proten készülékkel 100 V feszültség mellett. A mintákat nitrocellulóz membránra blottoltuk (GE Healthcare, Amersham, Germany) 12 V feszültségen, 45 percen át félszáraz blottolóval (Bio Rad Inc., Hercules, CA, USA). A membránt 6%-os tejpör oldattal blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten és a membránhoz adtuk az elsődleges antitest oldatot 1%-os tejpör oldatban. Az általunk használt elsődleges antitesteket - NLRP3 antitest (768319, R&D Systems, Minneapolis, USA), anti-kaspáz-1 p20 antitest (sc-398715, Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, USA), monoklonális anti-IL-1β antitest (12242, Cell Signaling Technology, Leiden, Hollandia) monoklonális anti-humán HO-1 antitest (sc-136960,

Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) - 1:1000 arányú hígításban alkalmaztuk, míg az anti-VCAM-1 antitestet (sc-8304, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) 1:200 arányú hígításban használtuk. A membránt az elsődleges antitesttel 12 órán keresztül 4°C-on billegtettük, majd a membránt TBS-T pufferrel alaposan átmostuk (Tris-buffered saline mely 0,1% Tween 20-at tartalmaz). Ezt követően 1 órán keresztül torma peroxidázzal konjugált anti-nyúl (NA934) és anti-egér (NA931) másodlagos antitesttel (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) inkubáltuk. Az inkubálás végén a membránt újból TBS-T-vel mostuk 3-szor 10 percen át, majd Western ECL reagenssel (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) hívtuk elő. Az eredményt röntgen filmen tettük láthatóvá. A sávok intenzitását Image Studio Digit Ver 5.2 szoftver segítségével kvantifikáltuk.

## 6.8 ROS képződés vizsgálata

A HUVEC és HBEC sejteket 96 lyukú sejttenyésztő lemezen tenyésztettük. A kezelés után a sejteket PBS pufferrel mostuk és 5-(és-6)-klorometil-2',7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát, acetil észtert (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) adtuk (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a médiumhoz (10 µmol/L, 30 perc, 37°C-on sötétben). A sejteket az inkubáció után PBS-el mostuk és a fluoreszencia intenzitást mértük (488 nm gerjesztés/533 nm emisszió) 30 percenként 3 órán keresztül. Emellett néhány kísérletünkben a ROS képződést gátoltuk N-acetil-cisztein (NAC) előkezeléssel (5 mmol/L).

## 6.9 IL-1β szekréció vizsgálata HUVEC-en

A HUVEC sejteket 96 lyukú sejttenyésztő edényben tenyésztettük. A sejtkezelés után a felülúszókat leszívtuk és az IL-1β tartalmat 100 µL hígítatlan felülúszóból ELISA módszerrel (DuoSet ELISA, R&D, Minneapolis, MN, USA) határoztuk meg, a gyártó által biztosított protokoll szerint.

## 6.10 A betegektől származó CSF minták gyűjtése

A vizsgálatainkhoz használt liquor minták minden esetben diagnosztikából visszamaradt minták voltak, melyeket a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján gyűjtöttek. A koraszülött betegeket (n=20) III. sátidumú IVH-val diagnosztizáltak átlagban a 27,9 ± 2,2 gesztációs héten. A liquor minták az IVH-t követő átlag 26,6 ± 16,4 napon lettek levéve. Egyetlen liquor minta sem került levételre kifejezetten a tanulmányban történő részvétel céljából. A mintavétel után a mintákat centrifugáltuk (2000g, 4°C, 15 perc) a felülúszókat szétporcióztuk, és az analízisig -70 °C-on tároltuk. Az eljárásokat és módszereket a Debreceni

Egyetem Kutatásetikai Bizottsága és az Emberi Erőforrások Minisztériuma engedélyezte 1770-5/2018/EÜIG szám alatt.

## 6.11 Hb, metHb, ferrylHb, totál hem, szabad hem és bilirubin szintek meghatározása CSF-ből

A CSF minták Hb, metHb és ferrylHb szintjének meghatározásához felvettük a CSF minták abszorpciós spektrumát (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, MA, United States) és az 541, 576 és 630 nm-en mért abszorbancia értékekből számítottuk ki az egyes Hb oxidációs termékek koncentrációját. A CSF minták totál hem koncentrációját QuantiChrom Heme Assay Kit-tel (Gentaur Molecular Products BV Kampenhout, Belgium) határoztuk meg a gyártói protokoll szerint eljárva. A nem-Hb kötött hem koncentrációját a következő képlettel adtuk meg: [szabad hem]= [totál hem]- [Hb-hem]-[metHb-hem]-[ferrylHb-hem]. A bilirubin szinteket kolometriásan határoztuk meg Cobas 6000 automata analizátoron (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország).

## 6.12 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 (8W 10 E, Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA). Miután a sejtek konfluenssé váltak a különböző Hb formákkal (50  $\mu\text{mol/L}$ ) kezeltük és a teljes impedancia spektrumot vizsgáltuk ECIS Z $\Theta$  készülékkel (Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA) 4 órán keresztül.

## 6.13 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 mintákat az analízis előtt minden egyes esetben 20-szorosára hígítottuk a gyártó által meghatározott protokoll szerint.

## 6.14 A sejtek életképességének vizsgálata

A sejtek életképességének vizsgálatát 96 lyukú sejtenyésző lemezen végeztük. A kezelés végén a sejteket 100  $\mu\text{l}$  PBS-el mostuk és 100  $\mu\text{l}$  MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) reagenst adtunk hozzájuk. Ezután a lemezt 4 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk a sejtenyésző inkubátorban. Az inkubáció végeztével az MTT-oldatot leszívtuk és a kialakult formazán kristályokat 100  $\mu\text{L}$  dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel és

meghatároztuk az egyes minták abszorbanációját 570 nm-en. A kezelt sejtek életképességét a nem kezelt (kontroll) sejtek életképességének %-ában adtuk meg.

## 6.15 Statisztikai analízis

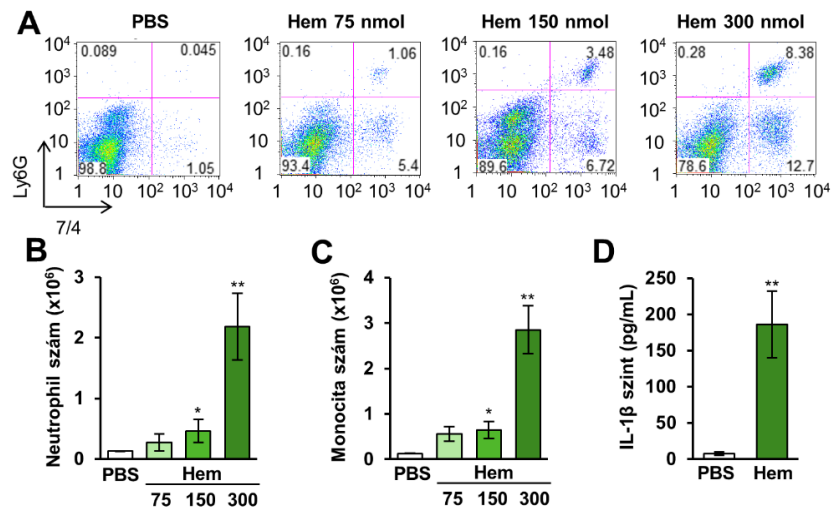
Az eredményeket átlagérték  $\pm$  standard deviáció (SD) értékben adtuk meg. Az eredmények statisztikai analízisét GraphPad Prism 8.01 szoftver (GraphPad Software, San Diego, California, USA) végeztük. Az eredményeket többszörös összehasonlítás esetén egytényezős ANOVA-t követő post hoc Tukey-féle többszörös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

## 7. Eredmények

### 7.1 A hem és oxidált Hb formák hatása HUVEC sejtre

#### 7.1.1 A hem proinflammatorikus jellege és hatása az IL-1 $\beta$ szekrécijára *in vivo*

Korábban megfigyelték, hogy a C57BL/6 egerek peritoneumába injektált hem gyulladáskeltő hatású, monocita és neutrofil granulocita infiltrációt idéz elő a hasüregbe. Első kísérletünk célja annak a vizsgálata volt, hogy az inflammatorikus hatás együtt jár-e az IL-1 $\beta$  proinflammatorikus citokin hasüregbeli szintjének emelkedésével. Ezért C57BL/6 egerek hasüregébe hemet injektáltunk 75, 150, illetve 300 nmol hem/hasüreg dózisban. A hasüreget 16 óra elteltével kimostuk, és meghatároztuk a hasüregbe infiltrálódott monociták és neutrofil granulociták számát, valamint a mosófolyadék IL-1 $\beta$  szintjét. Megállapítottuk, hogy a hem dózisfüggő módon indukálja a monociták és a neutrofil granulociták peritonális infiltrációját (6. ábra A-C). A legmagasabb dózisban (300 nmol/hasüreg) alkalmazott hem hatására a peritoneális mosófolyadék IL-1 $\beta$  szintje mintegy 25-szörösére emelkedett (6. ábra D).



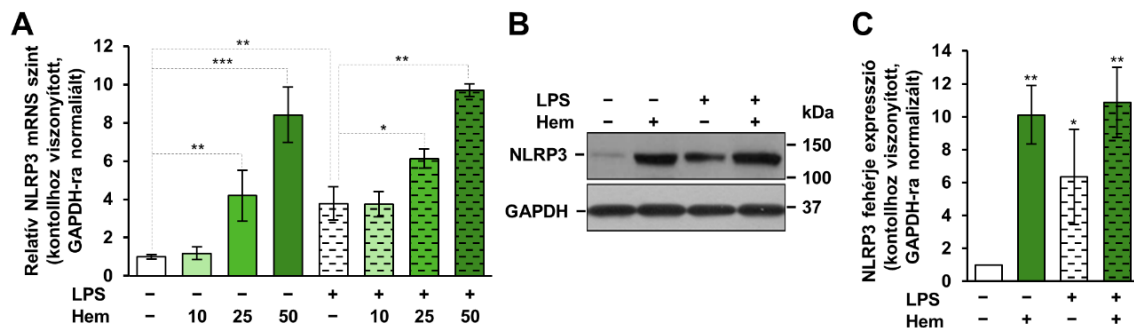
**6. ábra A hem neutrofil granulocita és monocita infiltrációt és IL-1 $\beta$  szekréciónak indukál *in vivo*.**

C57BL/6 egerek hasüregébe hemet (75, 150, 300 nmol/egér) vagy PBS-t injektáltunk (n=5/csoport), 16 órával később a hasüregét átöblítettük és meghatároztuk a neutrofil granulociták és a monociták számát, valamint az IL-1 $\beta$  szintjét. (A) A peritoneális mosófolyadék reprezentatív áramlási citometriás dot plot képei. (B) Az Ly-6G és 7/4 dupla pozitív neutrofil granulociták számának átlaga. (C) A Ly-6G negatív és 7/4 pozitív monociták átlagos száma. (D) A 300 nmol/hasüreg hemmel, illetve PBS-sel kezelt egér hasüregi mosófolyadék felüliszójának IL-1 $\beta$  szintjei ELISA módszerrel meghatározva (n=5). Az ábrákon az 5 egerből származó adatok átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. \*p<0,05, \*\*p<0,01 és \*\*\*p<0,005

### 7.1.2 A hem fokozza a HUVEC NLRP3 expresszióját és az IL-1 $\beta$ szekrécióját.

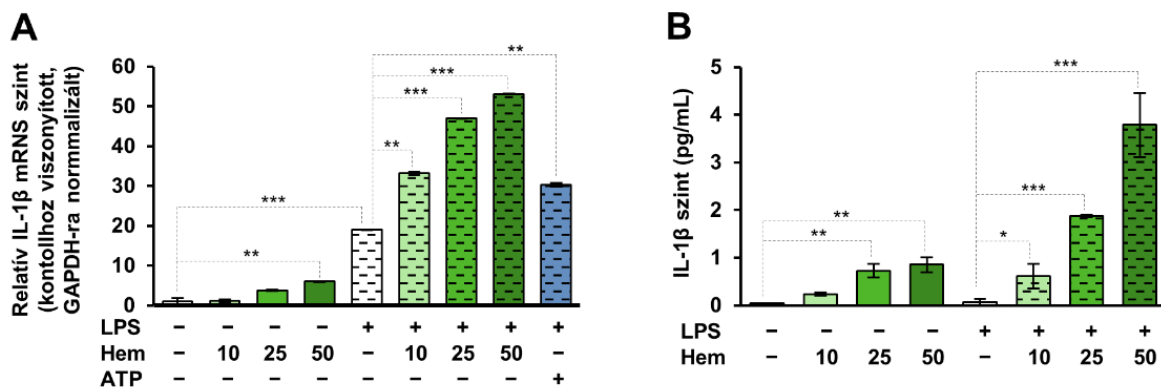
Egy korábbi publikációban Dutra és munkatársai kimutatták, hogy a hem aktiválja az NLRP3/ASC/kaspáz-1-et tartalmazó inflammaszóma komplexet és aktív IL-1 $\beta$  képződést indukál LPS-sel előkezelt makrofágokban [80]. Ismert, hogy az endotélsejtek aktívan részt vesznek a gyulladáshoz vezető válaszreakcióban, és képesek az NLRP3 inflammaszóma aktivációjára, így következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a hem-indukálta NLRP3 inflammaszóma aktiváció és IL-1 $\beta$  szekréció a makrofágok mellett megfigyelhető-e endotélsejtekben is.

Kísérletünket humán köldökzsinórból izolált konfluens HUVEC sejteken végeztük el. A sejteket LPS-sel előkezeltünk (10  $\mu$ g/mL, 24 óra) vagy kezeletlenül hagytuk, és különböző koncentrációjú hem (10, 25, 50  $\mu$ mol/L) hatásának tettük ki. Az NLRP3 inflammaszóma aktiváció szerepének tisztázásához elsőként az NLRP3 mRNA és fehérje szintjeit vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a hem dóziszfüggő módon fokozta az NLRP3 mRNA szintjét (7. ábra A). Az LPS kezelés önmagában szintén fokozta az NLRP3 mRNA expresszióját, ugyanakkor az LPS előkezelés nem befolyásolta a hem által indukált NLRP3 mRNA szintemelkedést (7. ábra A). Ezzel párhuzamosan a hem és az LPS is erőteljesen, de nem szinergista módon fokozta a HUVEC NLRP3 expresszióját (7. ábra B-C).



**7. ábra A hem fokozza az NLRP3 mRNA és fehérje expresszióját.** (A) LPS-el előkezelt (10  $\mu$ g/mL, 24 óra) és nem előkezelt HUVEC-et hemmel kezeltünk (10, 25, 50  $\mu$ mol/L; 1% FBS; 4 óra). Az NLRP3 mRNA szinteket qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (B-C) LPS-el előkezelt (10  $\mu$ g/mL, 24 óra) és nem előkezelt HUVEC-et hemmel (25  $\mu$ mol/L; 1% FBS; 6 óra) kezeltünk. Az NLRP3 expresszióját Western blot analízissel vizsgáltuk teljes sejtlizátumból. Az NLRP3 után a membránt újból jelöltük GAPDH antitesttel. Az ábrán reprezentatív Western blottok és az NLRP3 GAPDH-ra normalizált expressziójának 3 kísérletből nyert átlaga  $\pm$  SD látható. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  és \*\*\* $p < 0,005$

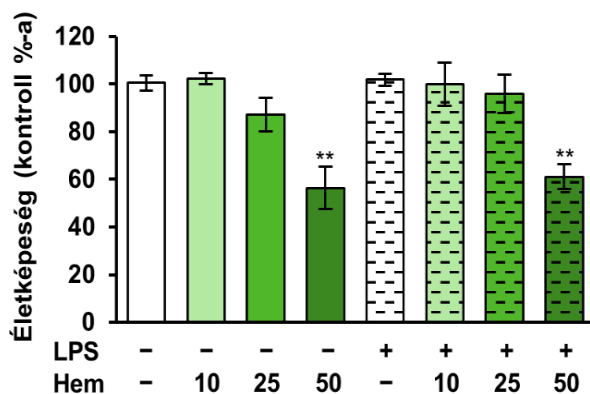
Ezt követően a hem hatását vizsgáltuk IL-1 $\beta$  mRNS és fehérje expressziójára. Kísérletünkben pozitív kontrollként ATP-t használtunk, melyről korábban kimutatták, hogy LPS-sel előkezelt endotélsejtekben IL-1 $\beta$  szekréciónak indukál. Kimutattuk, hogy a hem magas koncentrációban (50  $\mu$ mol/L) kismértékben emeli a HUVEC IL-1 $\beta$  mRNS és szekretált IL-1 $\beta$  szintjét (8. ábra A-B). A hem hatása LPS-sel előkezelt HUVEC sejtekben sokkal kifejezettebb volt, és már 10  $\mu$ mol/L hem hatására fokozott IL-1 $\beta$  mRNS és szekretált IL-1 $\beta$  szinteket mértünk (8. ábra A-B). A hem (10  $\mu$ mol/L) az ATP-hez hasonló mértékű emelkedést indukált az LPS-sel előkezelt sejtek IL-1 $\beta$  mRNS szintjében (8. ábra A).



**8. ábra A hem fokozza endotélsejtek IL-1 $\beta$  mRNS szintjét és IL-1 $\beta$  szekréciónak.** LPS-el előkezelt (10  $\mu$ g/mL, 24 óra) és nem előkezelt HUVEC-et hemmel (10, 25, 50  $\mu$ mol/L; 1% FBS; 4 óra) vagy ATP-vel (5mmol/L) kezeltünk. (A) Az IL-1 $\beta$  mRNS szinteket qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (B) A szekretált IL-1 $\beta$  mennyiségét a sejt felülűszóból ELISA módszerrel határoztuk meg. A diagrammokon 3, triplikátumban végzett kísérlet átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  és \*\*\* $p < 0,005$

### 7.1.3 A hem magas koncentrációban csökkenti a HUVEC viabilitását.

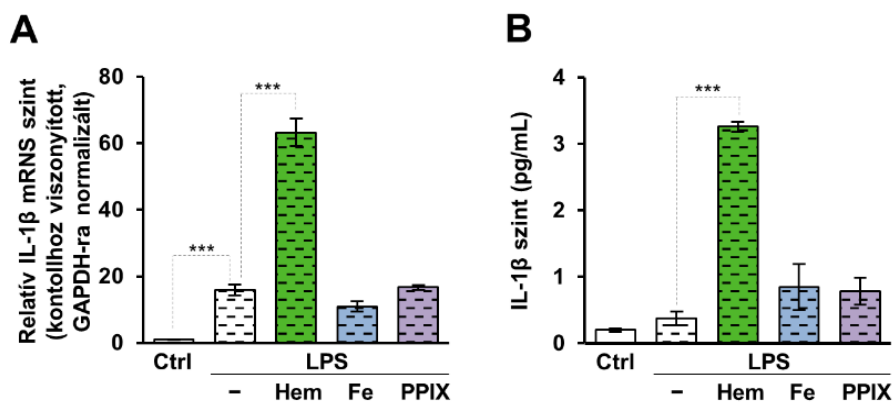
A hem pro-oxidáns jellegéből adódóan sejthalált indukálhat, illetve számos sejtben fokozza az oxidáló ágensek, illetve inflammatórikus citokinek toxikus hatását. Ezért következő kísérletünkben a hem HUVEC-re kifejtett toxikus hatását vizsgáltuk meg LPS-sel előkezelt, illetve kezeletlen sejteken. Megállapítottuk, hogy a hem alacsonyabb koncentrációban (10, 25  $\mu$ mol/L) nem befolyásolta számottevően az endotélsejtek viabilitását, még LPS-sel előkezelés esetén sem (9. ábra). Ugyanakkor a hem 50  $\mu$ mol/L koncentrációban alkalmazva jelentősen, mintegy 40%-kal csökkentette a HUVEC viabilitását, mely független volt az LPS előkezeléstől (9. ábra).



**9. ábra A hem csökkenti a HUVEC-ek életképességét.** LPS-el előkezelt (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 24 óra) és nem előkezelt HUVEC-et hemmel (10, 25, 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; 1% FBS) kezeltünk. A sejtek viabilitását 4 óra elteltével, MTT módszerrel határoztuk meg. A diagrammon 3, triplikátumban végzett kísérlet átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. \*\* $p < 0,01$

### 7.1.4 A hem integritása kulcsfontosságú a HUVEC hem-által indukált IL-1 $\beta$ termelésében

A hem egy protoporfirin IX (PPIX)-ből és a porfirinyűrű 4 pirroljának nitrogén atomjai által koordinált vas ionból áll. A következő kísérletünkben a hem szerkezeti sajátosságainak és komponenseinek szerepét vizsgáltuk az inflammaszóma aktivációban. PPIX-et és vas-szulfátot ( $\text{FeSO}_4$ ) használtunk, és azt teszteltük, hogy képesek-e indukálni az IL-1 $\beta$  mRNS és fehérje expresszióját LPS-sel előkezelt HUVEC-en. Kimutattuk, hogy sem a PPIX sem és a szabad vas ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nem indukálta az IL-1 $\beta$  mRNS szintjének emelkedését LPS-el előkezelt HUVEC sejteken (**10. ábra A**). Ezzel összhangban, sem a PPIX sem a  $\text{FeSO}_4$  hatására nem tapasztaltunk emelkedést az LPS-sel előkezelt HUVEC sejtek felülcszójának IL-1 $\beta$  szintjében (**10. ábra B**).

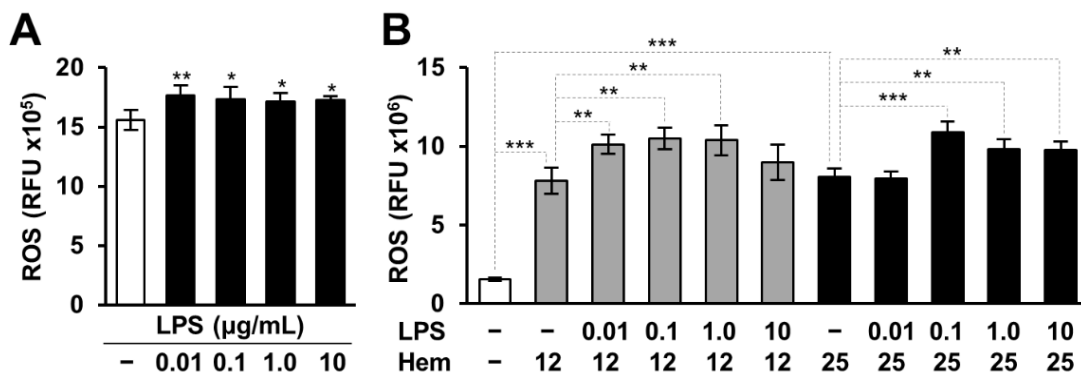


**10. ábra A hem strukturális integritásának kritikus szerepe a hem-mediálta IL-1 $\beta$  indukcióban.** A HUVEC-et LPS-el (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 24 óra) kezeltük elő és hemmel, PPIX-cel illetve  $\text{FeSO}_4$ -al (25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) kezeltük. (A) Az IL-1  $\beta$  mRNS szinteket 4 óra elteltével qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (B) A sejtek felülcszójából az aktív IL-1  $\beta$  szinteket ELISA módszerrel határoztuk meg 24 órát követően. A digrammokon 3, triplikátumban elvégzett kísérlet átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. \*\*\* $p < 0,005$

### 7.1.5 A fokozott ROS képződés szerepet játszik a HUVEC sejtek hem-mediálta IL-1 $\beta$ termelésében

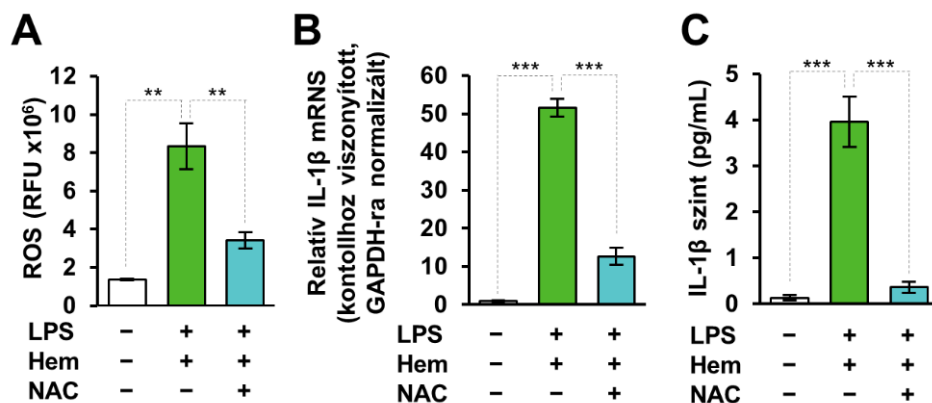
Korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy a hem és az LPS is fokozza a ROS képződését endotélsejtekben. Másrészt a fokozott ROS termelés szerepet játszik az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában. Ezért a következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy vajon a hem és az LPS által indukált fokozott ROS termelés szerepet játszik-e a hem-mediálta IL-1 $\beta$  termelésben HUVEC-ben.

Elsőként az LPS hatását vizsgáltuk HUVEC ROS termelésére. Az LPS-t 100 ng/mL és 10  $\mu$ g/mL közötti koncentrációtartományban alkalmaztuk, és a ROS termelés kismértékű fokozódását tapasztaltuk már a legalacsonyabb LPS koncentráció esetén (**11. ábra A**). A hemet 12,5 és 25  $\mu$ mol/L koncentrációban alkalmaztuk. A hem mindkét vizsgált koncentrációban a HUVEC ROS termelésének nagyfokú, mintegy ötszörös emelkedését váltotta ki, melyet az LPS előkezelés enyhén, de szignifikáns módon még tovább fokozott (**11. ábra B**).



**11. ábra** Az LPS és a hem hatása HUVEC ROS termelésére (A) HUVEC-et LPS-el kezeltük (0,01-10  $\mu$ g/mL, 24 óra). (B) A sejteket LPS-el előkezeljük (0,01-10  $\mu$ g/mL, 24 óra), majd hemmel (12,5 vagy 25  $\mu$ mol/L; 4 óra) kezeltük. (A-B) A kezeléseket követően a ROS képződését DCFDA módszerrel követtük nyomon. A diagrammokon 3 kísérlet átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. \*\*\* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,01$  és \* $p < 0,05$

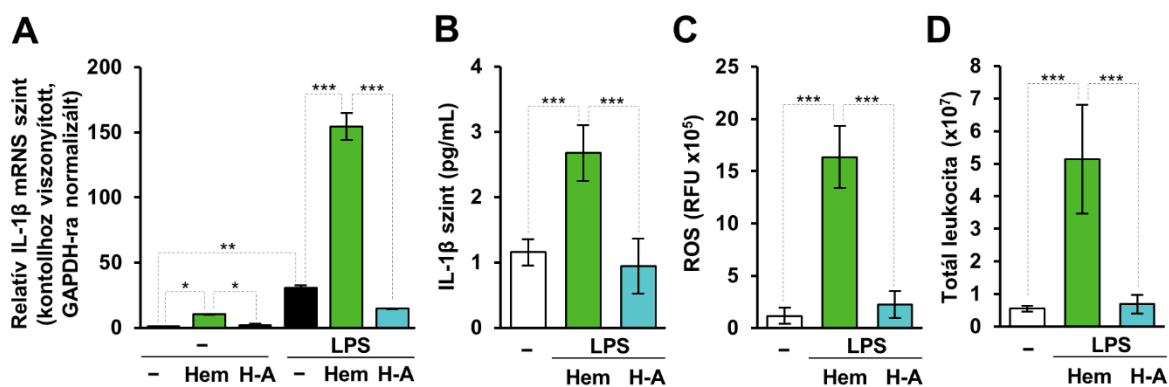
Annak a kérdésnek a megválaszolása céljából, hogy a fokozott ROS termelés szerepet játszik-e a hem által indukált IL-1 $\beta$  termelésben, a sejteket az ismert gyökfogóval, N-acetil-ciszteinnel (NAC) kezeltük. A NAC jelentős mértékben gátolta az LPS-sel és hemmel kezelt endotélsejtek ROS termelését (**12. ábra A**). A NAC a ROS termelés csökkentéséhez hasonló mértékben gátolta az LPS-sel és hemmel kiváltott IL-1 $\beta$  mRNS és fehérje expressziót (**12. ábra B-C**).



**12. ábra** A NAC gátolja a hem-mediált ROS- és IL-1β-termelés fokozódását LPS-sel előkezelt HUVEC-ben (A-C) Kontroll, illetve LPS-el előkezelt (10 µg/mL, 24 óra) HUVEC-et hemmel kezeltünk (25 µmol/L) NAC (5 mmol/L) jelenlétében, illetve NAC nélkül. (A) A ROS képződését DCFDA módszerrel mértük (B) A kezeléseket követően az IL-1β mRNS szinteket qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (E) Az aktív IL-1β szinteket a sejtek felülűszójából határoztuk meg 24 órás kezelés után ELISA módszerrel. A diagrammokon 3 kísérlet átlaga ± SD van feltüntetve. \*\*\*p<0,005, \*\*p<0,01

### 7.1.6 A hem komplexálása a proinflammatorikus hatás csökkenésével jár

Ismert, hogy a hemet kötő fehérjék, mint például a Hx vagy az albumin a hem prooxidáns hatásának nagy részét blokkolni képesek. Így következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az albumin gátolja-e a hem által indukált pro-inflammatorikus válaszokat. Elsőként a hem-albumin komplex (H-A) IL-1β expresszióra kifejtett hatását vizsgáltuk LPS-sel előkezelt, illetve kontroll HUVEC-en (**13. ábra A-B**). A H-A a hemmel ellentétben nem váltotta ki sem az IL-1β mRNS szint emelkedését sem az IL-1β szekrécióját LPS-sel előkezelt HUVEC-ben (**13. ábra A-B**). 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 (**13. ábra C**). 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. A hasüreget 16 óra elteltével kiöblítettük, és a mosófolyadékban meghatároztuk a leukociták számát. Megállapítottuk, hogy a hemmel ellentétben a H-A nem idézte elő a leukociták peritoneális infiltrációját (**13. ábra D**).

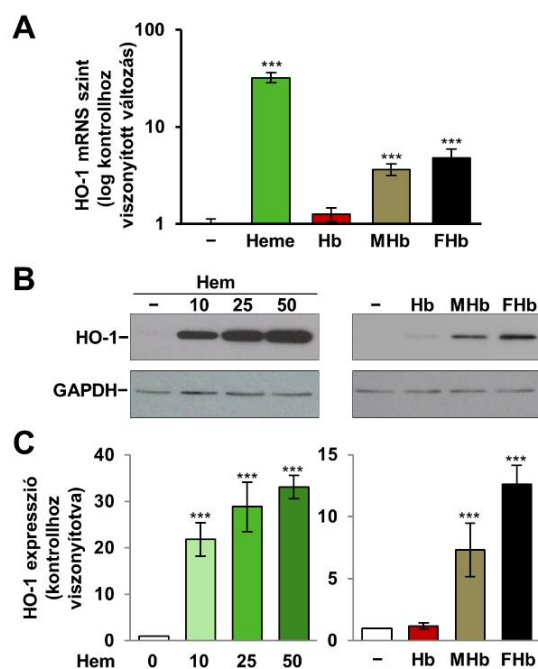


**13. ábra Az albumin gátolja a hem proinflammatorikus hatásait.** (A-C) Kontroll vagy LPS-sel (10 µg/mL, 24 óra) előkezelt HUVEC-et hemmel, illetve hem-albuminnal kezeltünk (H-A, 25 µmol/L). (A) A kezelést követően (4 óra) az IL-1β mRNS szinteket qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (B) Az aktív IL-1β szintjét felülúszóból (24 óra) határoztuk meg ELISA módszerrel. (C) A ROS képződésének mértékét (4 óra) DCFDA assay módszerrel mértük. A diagrammokon 4 kísérlet átlaga ± SD van feltüntetve. \*\*\*p<0,005; \*\*p<0,01 és \*p<0,05. (D) C57BL/6 egerekbe intraperitoneálisan hemet (300 nmol/egér), hem-albumint (H-A, 300 nmol/egér) vagy PBS-t injektáltunk (n=5 /csoport), majd 16 óra elteltével a hasüreget PBS-el átmostuk és meghatároztuk a leukocita számot. Az ábrán a kísérletek átlaga ± SD látható, \*\*\*p<0,005

### 7.1.7 Az oxidált Hb formák nem váltják ki inflammaszóma aktivációját endotélsejteken

Hemolízist követően a szabad hem képződését megelőzően az extracelluláris Hb oxidációja révén különböző oxidáltsági állapotú Hb formák képződnek, melyek közös jellemzője az, hogy a hemet kevésbé stabilan koordinálják, mint a Hb. Ennek következtében az oxidált Hb formákból a hem disszociációja kisebb-nagyobb mértékben bekövetkezhet. Ennek ismeretében a következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy vajon a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák indukálnak-e IL-1β képződést.

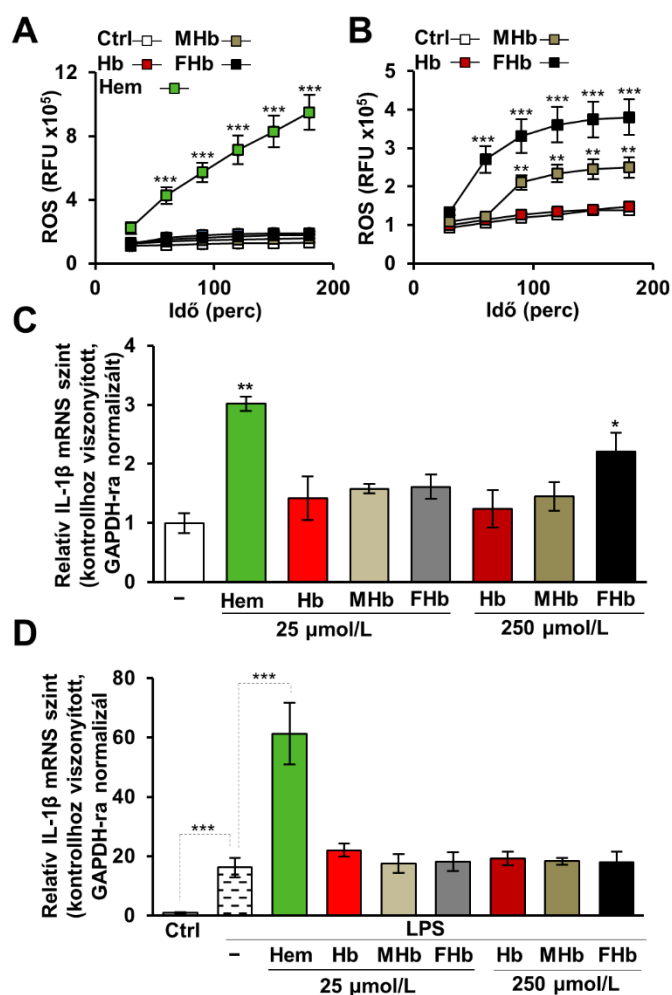
Elsőként a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák hem oxigenáz-1 (HO-1) indukáló képességét vizsgáltuk. A HUVEC-et Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal és hemmel kezeltük 25 µmol/L hem koncentrációban. Várakozásainknak megfelelően, a hem idézett elő legmarkánsabb emelkedést a HO-1 mRNS expressziójában, ugyanakkor a metHb és a ferrylHb is szignifikáns mértékben megemelte a HO-1 mRNS szintjét (**14. ábra A**). Hasonló eredményre jutottunk a HO-1 fehérje expresszióját vizsgálva. A hem volt a leghatékonyabb induktor, melyet a ferrylHb, majd a metHb követett (**14. ábra B-C**).



**14. ábra** Az oxidált Hb formák HO-1-et indukálnak HUVEC-ben. (A-C) HUVEC-et kezeltünk hemmel, Hb-nal, metHb (MHb)-nal és ferrylHb (FHb)-nal (25 μmol/L). (A) A HO-1 mRNA szintjét 4 órás kezelést követően qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (B) A HO-1 fehérje expresszióját 8 óra után Western blot analízissel vizsgáltuk. A membránokat újra jelöltük GAPDH antitesttel. Reprezentatív (n=3) Western blot a HO-1 expresszióját mutatja be. (C) A HO-1 fehérje expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. A diagrammokon 3 kísérlet átlaga ± SD látható. \*\*\*p<0,005

Mivel a hem-mediálta ROS képződés kritikus szerepet tölt be az IL-1β képződésében HUVEC-en, a következő kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák hogyan befolyásolják az intracelluláris ROS képződését. Alacsony koncentrációban (25 μmol/L) a hemmel ellentétben egyik Hb forma sem fokozta a ROS képződést HUVEC-ben (**15. ábra A**). Ugyanakkor a különböző Hb formákat magas, 250 μmol/L koncentrációban alkalmazva, a ROS képződés fokozódását tapasztaltuk metHb-nal, illetve ferrylHb-nal kezelt HUVEC-ben (**15. ábra B**).

Ezek után azt vizsgáltuk, hogy a különböző Hb formák képesek-e IL-1β képződést indukálni HUVEC-en. Elsőként az IL-1β mRNA szinteket vizsgáltuk. Kontroll, illetve LPS-sel előkezelt HUVEC sejteket a különböző oxidáltsági fokú Hb formákkal kezeltünk alacsony (25 μmol/L) és magas (250 μmol/L) koncentrációban. A magas koncentrációjú ferrylHb hatására az IL-1β mRNA szint 2,2-szeres emelkedését figyeltük meg, ugyanakkor a Hb, illetve a metHb nem fokozta az IL-1β mRNA expresszióját (**15. ábra C**). Kísérletünket LPS-sel előkezelt sejteken megismételtük, és azt tapasztaltuk, hogy a Hb formák nem fokozták az LPS által indukált IL-1β választ (**15. ábra D**).

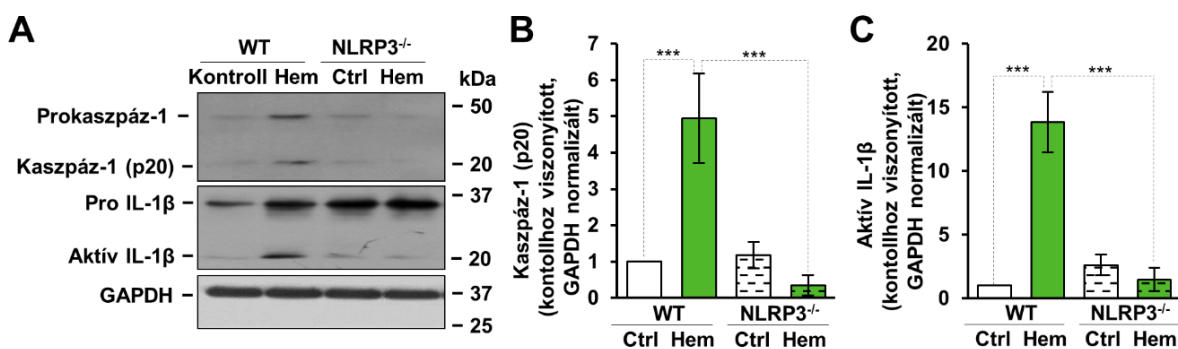


**15. ábra** Az oxidált Hb formák hatása HUVEC ROS termelésére és IL-1β mRNA szintjére. (A-C) Nem előkezelt (A-C) és LPS-el előkezelt (D) HUVEC sejteket hemmel (25 μmol/L), Hb-nal, metHb (MHb)-nal, ferrylHb (FHb)-nal (25 vagy 250 μmol/L) kezeltünk. (A és B) 4 órás kezelést követően (A: 25 μmol/L, B: 250 μmol/L) a ROS képződését detektáltuk DCFDA módszerrel. (C és D) Az IL-1β mRNA szinteket (4 óra) qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. A diagrammokon 3 kísérlet átlaga ± SD van feltüntetve. \*\*\*p<0,005, \*\*p<0,01 és \*p<0,05

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

Ezt követően az NLRP3 szerepét vizsgáltuk a hem által indukált IL-1β képződésben *in vivo* kísérleti rendszerben NLRP3 deficiens egereken. Az NLRP3 fehérje integráns része az NLRP3 inflammaszóma komplexnek, melyen a kaszpáz-1 enzim aktivációja bekövetkezik. Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a hem előidéz-e kaszpáz-1 aktivációt vad típusú (WT) C57BL/6 egerek májában, és hogy vajon van-e kaszpáz-1 aktiváció NLRP3 deficiens egerekben. Ehhez WT és NLRP3<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> egerek májában kaszpáz aktivációt nem tapasztaltunk (**16. ábra A-B**). Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a májminták IL-1 $\beta$  expresszióját is. Az NLRP3 inflammaszóma komplex aktivációjának következtében az aktiválódott kaszpáz-1 hasítja a pro-IL-1 $\beta$ -t, melynek következtében kialakul a 20 kDa méretű aktív IL-1 $\beta$ , mely formát detektáltunk a hemmel kezelt WT egerek májmintáiban (**16. ábra A, C**). Ezzel ellentétben, a hemmel kezelt NLRP3<sup>-/-</sup> egerek májában aktív IL-1 $\beta$ -t nem detektáltunk (**16. ábra A, C**).



**16. ábra Az NLRP3 szerepe az IL-1 $\beta$  hem-mediálta indukciójában.** (A) C57BL/6 és NLRP3<sup>-/-</sup> egerek hasüregébe hemet (300 nmol) illetve PBS-t (Ctrl) injektáltunk. A kaszpáz és az IL-1 $\beta$  expresszióját májmintákban vizsgáltuk Western blot analízissel (16 óra). A membránt újra jelöltük GAPDH antitesttel. Az ábrán reprezentatív Western blottok láthatók. (B-C) A kaszpáz-1 és IL-1 $\beta$  GAPDH-ra normalizált expressziója. Az ábrán 3 kísérlet átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  és \*\*\* $p < 0,005$

## 7.2 Az oxidált Hb formák és a hem szerepe IVH-t követően

### 7.2.1 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, olyan IVH-ben szenvedő koraszülöttektől, akiknél shunt beültetés vált

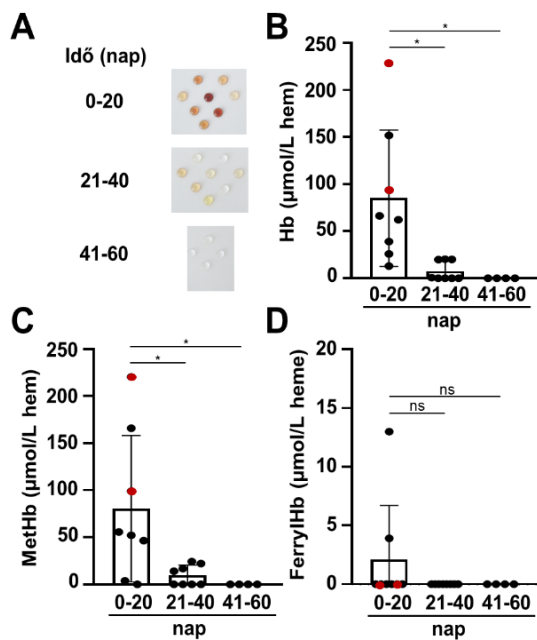
szükségessé, és a CSF levétele diagnosztikai céllal történt. A tanulmány során húsz III. stádiumú IVH-ban szenvedő betegek CSF mintáját analizáltuk. A koraszülöttek terhességi kora a születés időpontjában 28 hét volt, születési súlyuk 1 kg körüli (**3. táblázat**). Apgar értékük mediánja 5 perccel a születés után 5, 10 perccel a születés után 8 volt (**3. táblázat**). Vízfejűség 18 koraszülöttben alakult ki, és az IVH-t követő fél évben 2 koraszülött halt meg (**3. táblázat**)

**3. táblázat A vizsgálat résztvevőinek jellemzői**

<b>Férfi - szám/összes</b>	11/20
<b>Terhességi kor a születés időpontjában Medián (hét)</b>	<b>28</b>
Megoszlás:	
23 hét 0 naptól 25 hét 6 napig	4
26 hét 0 naptól 27 hét 6 napig	4
28 hét 0 naptól 29 hét 6 napig	6
30 hét 0 naptól 31 hét 6 napig	6
<b>Születési súly Átlag ± s.d. (g)</b>	<b>1094 ± 282</b>
Megoszlás:	
≥500 to <750g	3
≥750 to <1000g	6
≥1000 to <1250g	4
≥1250 to <1500g	7
<b>Apgar 5 perc (10 perc) Medián</b>	<b>5 (8)</b>
Megoszlás:	
0-3	4 (0)
4-6	13 (7)
7-8	3 (9)
9-10	0 (4)
<b>Szteroid prophylaxis - igen/részleges/nem</b>	<b>2/8/10</b>
<b>Többes terhesség - szám/összes</b>	<b>5/20</b>
<b>Császármetszéses szülés- szám/összes</b>	<b>14/20</b>
<b>Hydrocephalus - szám/összes</b>	<b>18/20</b>
<b>Halálozás - szám/összes eset</b>	<b>2/20</b>

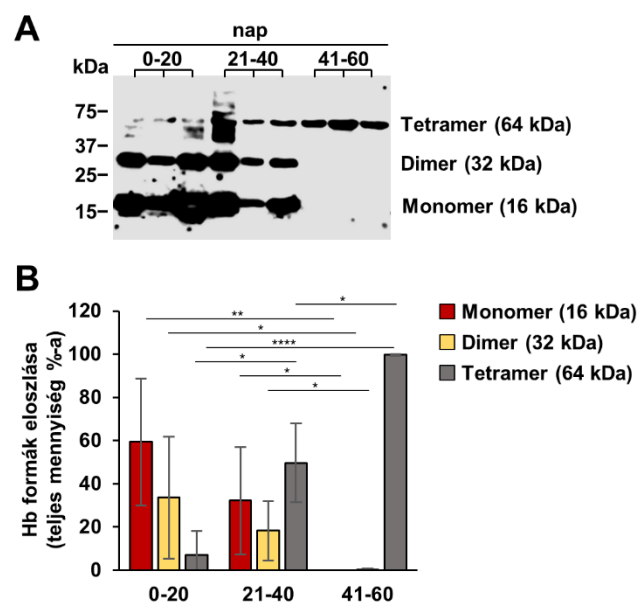
Az általunk vizsgált CSF minták mindegyikét diagnosztikai céllal vették le, így mintáink nagyfokú heterogenitást mutattak (14-60. nap, átlag: 27,6 ±15,6 nap, medián: 21 nap) a születés ideje (melyet az IVH feltételezett idejének tekintünk) és a mintavétel között eltelt idő szempontjából. Ezért a mintáinkat 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.

Megfigyeltük, hogy a különböző időpontokban érkezett CSF minták színe különböző, a 0-20. nap között érkezett minták barnás elszíneződést mutattak, a 21-40. nap között levett minták sárgás színűek voltak, míg a 41-60. nap érkezett minták színtelenek voltak (**17. ábra A**). 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 (**17. ábra B**). A Hb koncentrációkhoz hasonlóan a metHb koncentrációja magas volt az első csoport (0-20. nap) esetében ( $80,51 \pm 77,65 \mu\text{mol/L}$ ), mely fokozatosan csökkent vizsgálataink ideje alatt (**17. ábra C**). A metHb koncentrációja átlagban  $9,65 \pm 10,77 \mu\text{mol/L}$  volt a 21-40. nap között érkezett CSF minták esetében és kimutatási határ alatt volt a 41-60. nap között érkezett mintáknál (**17. ábra C**). A Hb kételektronos oxidációja során, például különböző peroxidokkal reagálva ferrylHb keletkezik. FerrylHb-t mindössze két, az IVH-t követő 20 napon belül levett CSF mintából tudtunk kimutatni (**17. ábra D**).



**17. ábra Hb formák koncentrációja IVH-t követően nyert CSF mintákban.** (A) Az IVH után levett CSF minták fizikai megjelenése, az IVH és a mintavétel időpontja között eltelt idő alapján csoportosítva. (B-D) A CSF minták Hb, metHb (MHb) és ferrylHb (FHb) koncentrációja. A pöttyök egy-egy mintát reprezentálnak, a piros pöttyök a két 6 hónapos koruk előtt elhunyt koraszülöttektől származó CSF mintákat jelölik. A diagrammokon a mérések átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. A  $p$  értékeket egytényezős ANOVA-val számoltuk, melyet Tukey-féle többtényezős összehasonlító analízis követett.  $*p < 0,05$

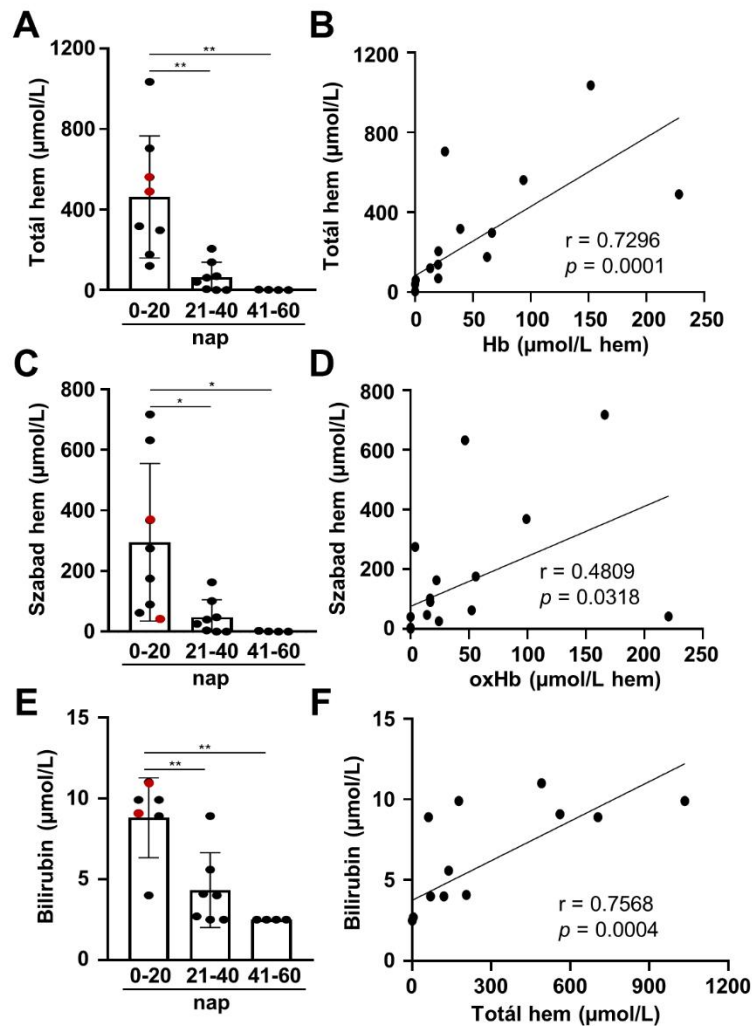
A ferrylHb-ról ismert, hogy egy olyan reaktív intermedier, mely intramolekuláris elektrontranszfer által stabilizálódik, melynek következtében globin gyökök, majd kovalensen keresztkötött Hb formák képződnek. Ennek megfelelően a következő kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy ezen folyamatok lejátszódnak-e az IVH-t követően a CSF mintákban. 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 ( $59,3 \pm 29,3$  % a teljes Hb mennyiségnek), ugyanakkor kisebb mértékben dimereket ( $33,6 \pm 28,2$  % a teljes Hb mennyiségének) és nagyon kis mennyiségben tetramereket ( $7,03 \pm 11,1$  % összes Hb mennyiségének) is tartalmazott (**18. ábra A-B**). A Hb tetramerek aránya emelkedett a 21-40. nap között nyert CSF mintákban a 0-20 nap között levett mintákhoz hasonlítva (**18. ábra A-B**). A 41-60 nap között nyert CSF mintákban már csak tetramereket tudtunk kimutatni (**18. ábra A-B**).



**18. ábra A kovalensen keresztkötött Hb multimerek jelenléte IVH-t követően CSF mintákban.** A CSF minták Hb tartalmát Western blot analízissel vizsgáltuk. (A) Reprezentatív Western blot (B) A Hb monomerek, dimerek és tetramerek össz Hb-ra vonatkoztatott %-os aránya (átlag ± SD) a különböző időpontokban nyert CSF mintákban (n=20). A *p* értékét egytényezős ANOVA és azt követő Tukey-fél többtényezős összehasonlító analízissel adtuk meg. \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 és \*\*\*\**p*<0,001

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 mértünk mely 120,02 és 1035,25  $\mu\text{mol/L}$  tartományba esett (**19. ábra A**). A második csoport (21-40. nap) CSF mintáiban szignifikánsan alacsonyabb hem koncentrációt mértünk ( $64,98 \pm 73,50 \mu\text{mol/L}$ ), míg a 41-60. nap között gyűjtött mintákban 1  $\mu\text{mol/L}$  alatti hem szintet mértünk (**19. ábra A**). 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 (**19. ábra B**).

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 41,99-717,39  $\mu\text{mol/L}$  tartományban (**19. ábra C**). Az IVH-t követő 21-40. nap közötti minták szabad hem tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt mint a 0-20. nap között nyert CSF mintáké ( $47,73 \pm 57,50 \mu\text{mol/L}$ ), míg a 41-60. nap között levett CSF mintákban 1  $\mu\text{mol/L}$  alatti szabad hem volt megtalálható. Az oxidált Hb formák (metHb + ferrylHb) és a szabad hem koncentrációja egymással korrelál ( $r = 0,4809$ ) (**19. ábra D**), mely alátámasztja azt a feltételezést, hogy a hem az oxidált Hb formákról disszociál le. 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 volt ( $8,8 \pm 2,47 \mu\text{mol/L}$ ), ami fokozatosan csökkent az idő elteltével (**19. ábra E**). A bilirubin szint korrelált a teljes hem koncentrációval ( $r = 0,7568$ ) (**19. ábra F**).



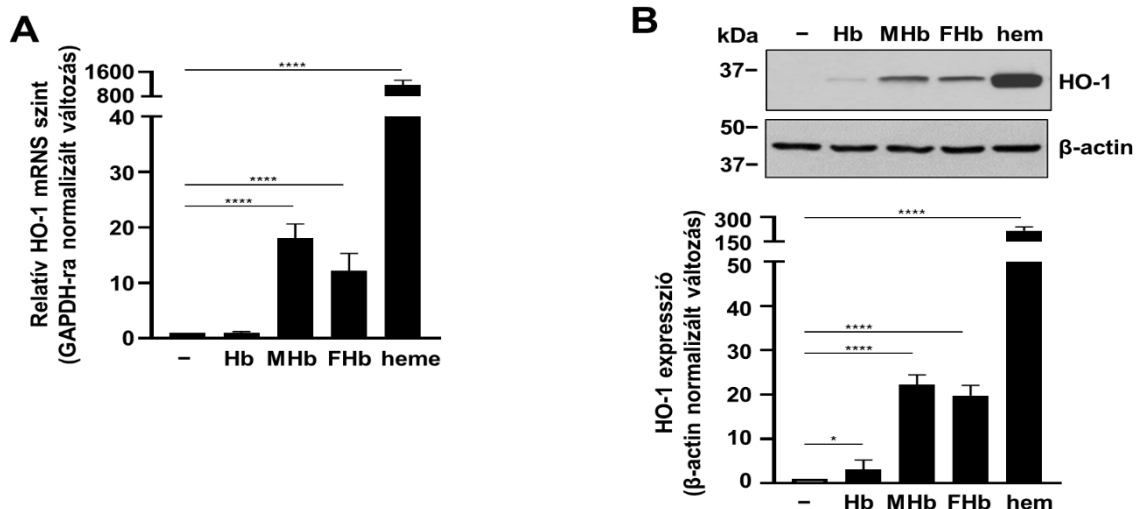
**19. ábra CSF minták hem, szabad hem és bilirubin koncentrációja és korrelációi.** (A, C, E) A CSF minták össz hem, szabad hem és bilirubin koncentrációja (átlag ± SD). A pöttyök egy-egy mintát reprezentálnak, a piros pöttyök a két 6 hónapos koruk előtt elhunyt koraszülöttől származó CSF mintákat jelölik. A *p* értékeket egytényezős ANOVA és azt követő Tukey-féle többtényezős összehasonlító analízissel számítottuk. \**p*<0,05, \*\**p*<0,01. (B) A Hb és az össz hem (D), az oxidált Hb formák és a szabad hem, (F) az össz hem és a bilirubin koncentrációk közötti korrelációs analízis. Az R a Pearson- féle korrelációs koefficiens jelzi.

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

Az IVH neuroinflammációhoz vezet, melyben jellemző a proinflammatorikus citokinek és az adhézións molekulák szintjének növekedése. Az endotélsejtek kritikus szerepet játszanak a proinflammatorikus válaszban és korábbi tanulmányokból ismert, hogy az oxidált Hb formák

szerepet játszhatnak a hemolitikus folyamatokkal összefüggő steril gyulladásban. Ezért a következőkben a különböző oxidáltsági állapotú Hb formák prooxidáns és proinflammatorikus szerepét vizsgáltuk meg humán agyi mikrovaskuláris endotélsejteken (HBEC).

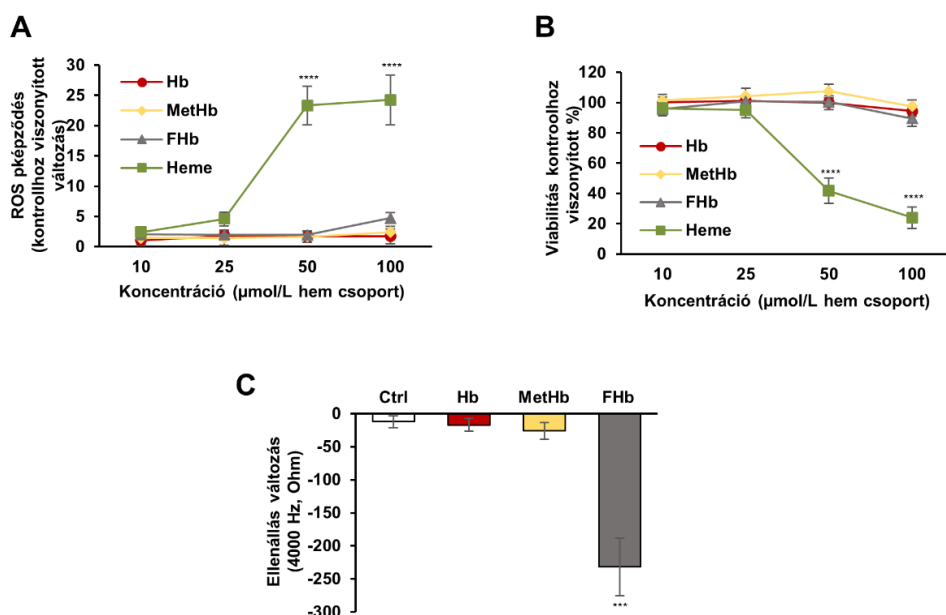
Első kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy a különböző Hb formák képesek-e HO-1-et indukálni HBEC-en. Ennek érdekében a HBEC-et különböző Hb formákkal és szabad hemmel kezeltük (25  $\mu\text{mol/L}$ ). Az oxidált Hb formák (metHb és ferrylHb)  $18,2 \pm 2,6$ -szoros indukciót, illetve  $12,1 \pm 3,1$ -szeres indukciót okoztak a HO-1 mRNS szintekben, míg a Hb nem indukálta a HO-1 mRNS expressziót (**20. ábra A**). 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 (**20. ábra A**). 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 (**20. ábra B**).



**20. ábra A hem és Hb formák hatása HO-1 mRNS és fehérje expressziójára HBEC-en.** (A-B) A konfluens HBEC-et (P5-8) Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal, illetve hemmel kezeltünk (25  $\mu\text{mol/L}$  hem) (A) A HO-1 mRNS szinteket 4 órás kezelést követően qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. A diagrammon 3 különböző kísérlet átlaga  $\pm$  SD van feltüntetve. (B) A HO-1 fehérje expresszióját 8 óra után Western blot analízissel vizsgáltuk. A membránokat újra jelöltük  $\beta$ -actin antitesttel. Reprezentatív (n=3) Western blot a HO-1 expresszióját mutatja be. (C) A HO-1 fehérje expresszióját  $\beta$ -actin -ra normalizáltuk. A  $p$  értékeket egytényezős ANOVA és azt követő Dunnett-féle *post hoc* analízissel számítottuk ki. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,001$

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 4 órán keresztül, majd megmértük a termelődött ROS mennyiségét **(21. ábra A)**. A hem dózisfüggő módon fokozta a ROS termelést HBEC-ben, ugyanakkor a Hb formák nem befolyásolták a ROS szintjét **(21. ábra A)**. Annak vizsgálatára, hogy a Hb formák okoznak-e sejthalált HBEC-en a sejteket Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal és hemmel kezeltük 10, 25, 50 és 100  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációban 24 órán át. A hem dózisfüggő módon csökkentette a HBEC viabilitását, a Hb formák azonban nem befolyásolták a sejtek életképességét **(21. ábra B)**.

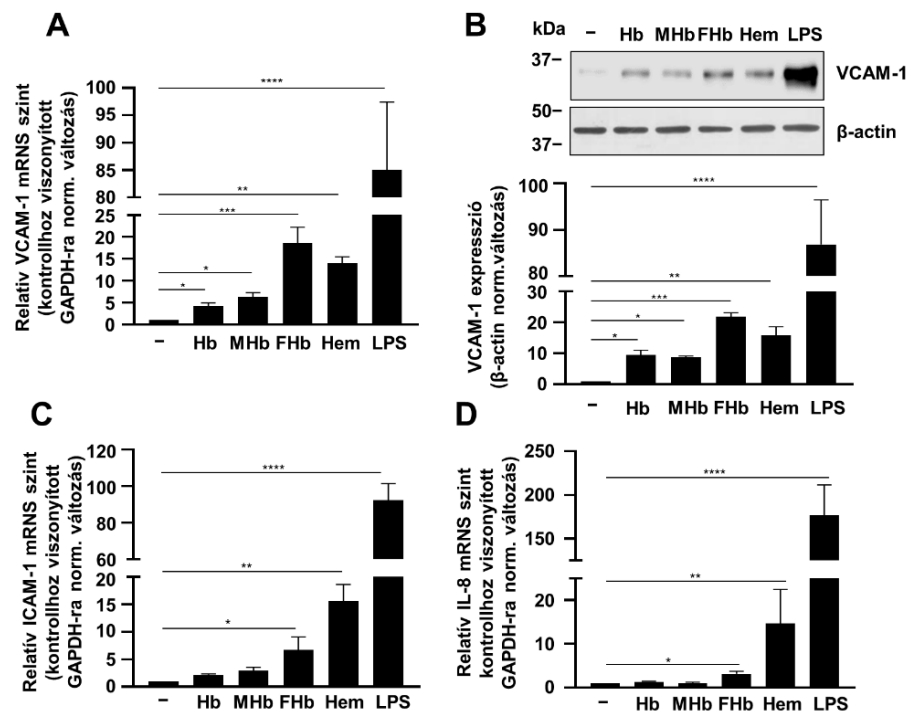
A HBEC egysejtréteg integritása fontos szerepet játszik az agyi barrierék kialakításában. Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a hem, illetve a különböző oxidáltsági fokú Hb formák befolyásolják-e a HBEC egysejtréteg integritását. A vizsgálathoz a sejteket speciális ECIS elektródokat tartalmazó 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 $\Theta$  készülékkel **(21. ábra C)**. A HBEC sejtek integritását a ferrylHb jelentős mértékben csökkentette, ugyanakkor a Hb és a metHb nem befolyásolta az endotélréteg átteresztőképességét **(21. ábra C)**.



**21. ábra Hb formák hatása HBEC ROS termelésére, viabilitására és a HBEC egysejtréteg integritására.** (A-B) HBEC sejteket (P 5-8) Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal és hemmel (10, 25, 50, 100 μmol/L) kezeltünk. A ROS képződését 4 óra elteltével DCFDA módszerrel határoztuk meg. Az ábrán a ROS képződését három független kísérlet átlag ± SD ábrázoltuk. (B) A HBEC életképességét MTT módszerrel határoztuk meg 12 órás kezelést követően. Az ábrán a kontrollhoz viszonyított életképség látható %-ban megadva (átlag ± SD) három független kísérletből. (C) A HBEC sejteket 8 lyukú ECIS sejtenyészítő lemezen kezeltük Hb-nal, metHb-nal, és ferrylHb-nal (50 μmol/L). A teljes impedancia spektrumot ECIS Z<sub>0</sub> készülékkel követtük 4 órán keresztül. Az endotélréteg ellenállás változását 4000 Hz-en detektáltuk a 0 perctől 4 óráig. A diagrammokon három független kísérlet átlaga ± SD van feltüntetve. A *p* értékeit egytényezős ANOVA-t követő Tukey-féle többtényezős összehasonlító analízissel számítottuk. \*\*\**p*<0,005; \*\*\*\**p*<0,001

Az endotélsejtek aktivációja során emelkedik a sejtfelszíni adhéziós molekulák, valamint a pro-inflammatorikus citokinek expressziója, ezért 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 μmol/L) kezeltünk, és 4 óra elteltével vizsgáltuk a VCAM-1, ICAM-1 és IL-18 mRNS szintjét (**22. ábra A-D**). Kísérleteink során az LPS-t 100 ng/ml koncentrációban pozitív kontrollként alkalmaztuk. A szabad hem és a ferrylHb jelentős VCAM-1 mRNS indukciót okozott (~15-20-szoros), míg a Hb és a metHb ennél kisebb mértékű, megközelítőleg 5-szörös emelkedést okozott (**22. ábra A**). 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 (22. ábra B). Továbbá, a hem és a ferrylHb fokozta az ICAM-1 mRNA expresszióját, és az IL-8 szekrécióját (22. ábra D).

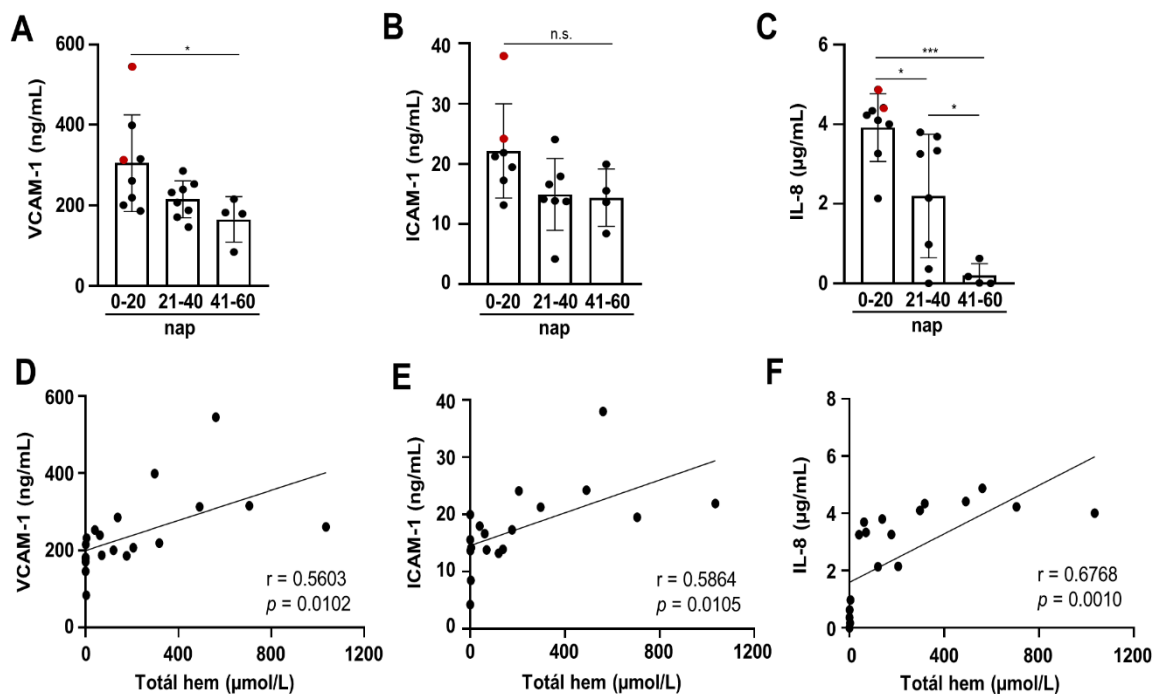


**22. ábra Hb formák hatása HBEC VCAM-1, ICAM-1 és IL-8 expressziójára.** (A-D) HBEC sejteket (P 5-8) Hb-nal, metHb-nal, ferrylHb-nal és hemmel (25  $\mu$ mol/L) illetve LPS-sel (100 ng/ml) kezeltünk. A VCAM-1, ICAM-1 és IL-8 GAPDH-ra normalizált relatív mRNA expresszióját (4 óra, átlag  $\pm$  SD) három független, kísérlet alapján határoztuk meg. (B) A VCAM-1 fehérje expresszióját teljes sejtlizátumból 16 óra után Western blot analízissel határoztuk meg. A kísérlet végeztével a membránt újra jelöltük  $\beta$ -actin elleni antitesttel. Az ábrán három független kísérlet reprezentatív Western blotja látható. (A-D) A  $p$  értékeket egytényezős ANOVA-t követő Dunnett-féle *post hoc* analízissel határoztuk meg. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 és \*\*\*\* $p$ <0,001

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

Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy IVH-t követően a CSF-ben megemelkedik a proinflammatorikus markerek, mint például a szolubilis adhézions molekulák és az inflammatorikus citokinek szintje. 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. A következő kísérletekben arra kerestük a választ, hogy az általunk gyűjtött CSF mintában vajon találunk-e korrelációt a gyulladásoz markerek

(sVCAM-1, sICAM-1, IL-8) és a CSF hem tartalma között. 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 (23. ábra A). Ezzel összehasonlítva, szignifikánsan alacsonyabb sVCAM-1 szinteket mértünk a 41-60. nap között nyert CSF mintákban (23. ábra A). A sICAM-1 szintek az IVH és a CSF vétel ideje között eltelt idő függvényében tendenciózusan, de nem szignifikánsan csökkentek (23. ábra B). Legmagasabb IL-8 szinteket az IVH-t követő 0-20 nap között nyert mintákban mértük ( $3,92 \pm 0,85 \mu\text{g/mL}$ ), majd fokozatos csökkenést tapasztaltunk a 21-40, illetve 41-60 nap között nyert mintákban ( $2,19 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$  és  $0,2 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ ) (23. ábra C). Mindhárom gyulladási marker szintje pozitív korrelációt mutatott a CSF össz hem szintjével (23. ábra D-F).



**23. ábra** Gyulladásos markerek szintje és hemmel való korrelációja IVH-t követően nyert CSF mintákban. (A-C) Az IVH-t követően nyert CSF minták sVCAM-1, sICAM-1 és IL-8 szintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. A fekete pöttyök egy-egy mintát reprezentálnak, a piros pöttyök a két 6 hónapos koruk előtt elhunyt koraszülöttektől származó CSF mintákat jelölik. A diagrammokon átlag  $\pm$  SD értékeket ábrázoltunk. A  $p$  értéket egytényezős ANOVA-t követő Tukey-féle többszörös összehasonlító analízissel számítottuk (D-F). A CSF minták össz hem és sVCAM-1, sICAM-1 és IL-8 tartalma közötti korrelációja Az R érték a Pearson-féle korrelációs koefficiens jelöli. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,005$

## 8. Diszkusszió

---

A dolgozatom első részében a hem mediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációt vizsgáltuk HUVEC sejteken. A hemről ismert, hogy rendkívül potens proinflammatorikus molekula *in vivo* körülmények között, melyet mi is megfigyeltünk vizsgálataink során, ugyanis a hemet intraperitoneálisan egerekbe injektálva neutrofil infiltrációt okozott. Ezen gyulladásos reakció pedig IL-1 $\beta$  képződésének emelkedéséhez vezetett a peritoneumban.

Normál körülmények között az endotélsejtek sokrétű funkciót látnak el szervezetünkben. Hozzájárulnak a normál véráramlás fenntartásához, az erek permeabilitását szabályozzák, anti-inflammatorikus és antitrombotikus felszint biztosítanak. Fertőzés vagy gyulladás esetén azonban az endotélsejtek az elsők között érintkeznek a mikrobiális vagy endogén molekulával és aktív résztvevői, illetve regulátorai a gyulladásos válasznak [135]. Az endotélsejtek a veleszületett immunrendszer olyan receptoraival vannak felszerelve, amelyekkel érzékelik és képesek választ adni különböző PAMP-ok vagy DAMP-ok hatására [100].

A különböző ismert DAMP-ok, mint például az ATP vagy HMGB-1 IL-1 $\beta$  képződését idézik elő endotélsejteken az NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül [103, 106, 107]. Szintén ismert az NLRP3 szerepe hiperglikémia- és hiperkoleszterinémia-asszociált endotél aktivációban [102, 108]. Az endotélsejtek NLRP3 inflammaszóma aktivációja szerepet játszik a hemorrhágiás sokk okozta tüdőgyulladás pathomechanizmusában [106].

A különböző immunreceptorok (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2) aktiválása az inflammaszóma komplex összeszereléséhez vezet, mely az inflammatorikus kaszpázok aktivációját és IL-1 $\beta$  képződését, illetve szekretálódását indukálja [136-139]. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a hem IL-1 $\beta$  képződését idézi elő makrofágokon NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül [80, 140]. 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 gyulladásos 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- $\kappa$ B mediálta NLRP3 expressziójához vezet [76, 141]. A második stimulus a PAMP-ok vagy DAMP-ok által lehetséges, melyek aktiválják az NLRP3-at. Ez az inflammaszóma platform összeszereléséhez, a kaszpáz-1 aktivációjához, illetve az ezt követő pro-IL-1 $\beta$  hasításához és az aktív citokin szekretálódásához vezet [141]. Ezt megerősíti Dutra és

munkatársainak publikációja, ahol kimutatták, hogy az LPS előkezelés nélkülözhetetlen a hemmediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációjához makrofágokon [80]. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az LPS előkezelés nagymértékben fokozza a HUVEC IL-1 $\beta$  szekréciónak. Az endotélsejtek hemmel indukált IL-1 $\beta$  termelése messze elmarad a makrofágok IL-1 $\beta$  termelésétől, ugyanakkor az endotélsejtek hemre adott válaszána mértéke összevethető a szakirodalomban korábban leírt induktorokra (ATP, HMGB1) adott válasszal [103-105]. A hem magas dózisban sejtthálalt 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 [103-105].

A hem fokozta a HUVEC NLRP3 mRNS és fehérje expresszióját LPS jelenlétében és hiányában is. Az NLRP3 inflammaszóma összeszerelődését követően a prokaspáz-1 aktiválódik és proteolitikus hasítással aktív kaszpáz-1 képződik, mely hasítja a pro-IL-1 $\beta$ -t, és aktív citokin képződik [141]. Az NLRP3 szerepét a hem-mediált IL-1 $\beta$  termelésben NLRP3 deficiens egérmódelben vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a hem kaszpáz-1 aktivációt és pro-IL-1 $\beta$  hasítást idéz elő vad típusú egerekben, ugyanakkor NLRP3 deficiens egerekben nem következik be a kaszpáz-1 aktiváció, és a pro-IL-1 $\beta$  hasítása. Ez arra utal, hogy az NLRP3 központi szerepet játszik a hem által indukált IL-1 $\beta$  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 enzimcsalád 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 [142]. Ezen előzmények alapján a következőkben a vas hatását is megvizsgáltuk NLRP3 inflammaszóma aktivációjára endotélsejteken. Kimutattuk, hogy a monocitákkal ellentétben a vas önmagában képtelen aktív IL-1 $\beta$  képződését indukálni HUVEC sejteken. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a PPIX nem indukálja NLRP3 inflammaszóma aktivációját és IL-1 $\beta$  képződését LPS-el előkezelt endotélsejteken. Ezen eredményeink teljes mértékben összhangban vannak Dutra és munkatársainak megfigyeléseivel, a PPIX az LPS-el előkezelt makrofágok esetében sem vezetett IL-1 $\beta$  képződéséhez és szekréciónak [80]. Eredményeink alapján tehát arra következtethetünk, hogy a hemben található koordinált vasnak kritikus szerepe van az NLRP3 inflammaszóma aktivációban és az azt követő IL-1 $\beta$  képződésében és szekretálódásban.

Ismert a fokozott ROS termelés szerepe az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában, és az is, hogy a hem prooxidáns hatásánál fogva nagymértékben fokozza endotélsejtek ROS termelését [143-146]. E mellett az LPS is fokozza a ROS termelést [147, 148]. Ezen tények

ismeretében vizsgáltuk a ROS szerepét a hem által indukált NLRP3 inflammaszóma aktivációban. Kimutattuk, hogy az LPS sokkal gyengébb induktora a ROS termelésének 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-mediált ROS képződést, és az IL-1 $\beta$  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. Így például korábban kimutatták, hogy a lizoszóma destabilizációja NLRP3 inflammaszóma aktivációt okoz HUVEC sejteken [149, 150]. Dutra és munkatársai kimutatták, hogy a hem mediálta inflammaszóma aktiváció makrofágokban a ROS képződéstől és a K<sup>+</sup> ionok kiáramlásától függ, azonban a lizoszóma destabilizációjától független [80]. További vizsgálatok szükségesek annak a megállapítására, hogy a fokozott ROS termelés mellett a fokozott K<sup>+</sup> ion kiáramlás és a lizoszómális destabilizáció szerepet játszik-e a hem mediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációjában HUVEC sejteken.

Az extracelluláris hem prooxidáns és proinflammatorikus hatását specifikus és nem specifikus hemkötő plazma fehérjék kontrollálják [147]. 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 [147]. Ezzel összhangban kimutatták, hogy a Hx hiánya a vesekárosodás fokozódását idézi elő akut hemolízises egérmodellben [151]. Ugyanakkor az exogén Hx képes megakadályozni a nagy koncentrációjú hem által okozott endotél sérülést és májkárosodást is, illetve egérmodellben megfigyelték, hogy a Hx a kardiovaszkuláris funkciók és a vérnyomás normalizálásában is jelentős szerepet tölt be [152, 153]. A Hx mellett számos egyéb plazmafehérje rendelkezik hemkötő kapacitással, melyek szerepe masszív intravaszkuláris hemolízis esetén jelentkezik [147]. Mennyiségét tekintve az albumin a plazma legjelentősebb nem specifikus hemkötő fehérjéje [154]. 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.

A Hb extracelluláris térben bekövetkező oxidációja a hemolitikus patológiákban kiemelt szerepet játszik, ugyanis az oxidált Hb formák molakulaszerkezete oly módon torzul, ami csökkenti a hem-globin közötti kapcsolat erősségét, aminek következtében a hem prosztetikus csoport disszociációjának valószínűsége fokozott.

Korábbi munkákban kimutatták, hogy a metHb és a ferrylHb hemforrásként működik az endotélsejtek számára, ugyanakkor a Hb nem [83, 155]. Emellett a ferrylHb az NF- $\kappa$ B útvonalat aktiválva fokozza az adhézións molekulák expresszióját endotélsejtekben, és növeli az egyséjtréteg átjárhatóságát [85]. 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 [64, 85]. 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. Korábbi publikációkban, ahol az LDL oxidatív módosításait vizsgálták, szintén arra mutattak rá, hogy a különböző oxidált Hb formák másképp voltak képesek részt venni a reakcióban. A hemmel összehasonlítva a metHb és a ferrylHb késleltetett és kevésbé jelentős oxidatív módosítást okozott az LDL-en, mely a kisebb számú LDL-asszociált hem csoporttal volt magyarázható. Ebből arra következtettek, hogy a hem prosztetikus csoport disszociációja nem történik meg teljes mértékben.

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 $\beta$  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 az oxidált Hb-ból disszociálódott hem felelős az NLRP3 inflammaszóma aktivációjáért.

Dolgozatom második részében az IVH-t követően koraszülöttektől gyűjtött liquor 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. A vérzést követően megnő az újszülöttkori mortalitás, illetve az IVH-t túlélő betegekben magas a központi idegrendszer érintő fejlődési rendellenességek kockázata [117-120]. Régóta ismert az orvostudomány számára, hogy a gyulladás rendkívül fontos szerepet tölt be az IVH-t követő agykárosodásban, azonban az e mögött húzódó molekuláris mechanizmus, mely a gyulladáshoz vezet még nem egyértelmű.

Elsődleges célunk a koraszülöttektől IVH-t követően gyűjtött liquor minták Hb tartalmának kvalitatív és kvantitív analízise volt, azzal a céllal, hogy jobban megismerjük a Hb akkumulációjának kinetikáját és a Hb oxidálódása során képződő termékeket. Fontos megemlítenünk, hogy a liquor 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 keresztkötött oxidált globin multimerek képződnek. Korábbi tanulmányokban szabad Hb jelenlétét mutatták ki liquorban intracraniális vérzés után, illetve IVH-ban is [86, 125, 126]. A metHb jelenlétét, mely a Hb egy elektronos oxidációja során keletkezik, kimutatták koraszülöttek liquorjában, illetve IVH nyúl modelljében is [86]. Az általunk vizsgált liquor 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 [86].

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 [127, 128, 156]. 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 [157-159]. Ily módon képződött kovalens módon keresztkötött oxidált Hb molekulákat korábban kimutatták plazmából, vizeletből, illetve bevérzett atheroszklerotikus plakokból [160-162]. Vizsgálataink során az IVH-t követő különböző időpontokban nyert liquor mintákban kovalensen keresztkötött oxidált Hb dimereket és tetramereket mutattunk ki. A mi munkánkkal párhuzamosan Posta és munkatársai szintén kimutatták a Hb multimerek jelenlétét IVH-t követően nyert liquor mintákban [163]. Kimutatták továbbá, hogy a ferrylHb akkumulációja együtt jár az oxidált Hb-ből származó kis peptid fragmentek megjelenésével, melyek az endogén Hb eltávolító mechanizmust elkerülve szerepet játszhatnak az IVH-t követő endotélsejt aktivációban és neuroinflammációban [163].

Intravaszkuláris hemolízist követően a plazmából az extracelluláris Hb eltávolítása a Hp-CD163 útvonalon történik [26]. A plazmához hasonlóan a Hp jelen van a liquorban is, azonban a plazmához viszonyítva jóval alacsonyabb koncentrációban. Felnőttekben a plazma Hp teljes Hb kötő kapacitása mintegy 5 g, szemben a liquoréval, ami körülbelül 100 µg-ra tehető [164]. 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 Hp nem csak a Hb eliminációjában játszik fontos szerepet, hanem a Hb-nal komplexet alkotva a Hb oxidációját is képes meggátolni. Az oxidált Hb formák megjelenése liquorban tovább erősíti azt a feltételezést, hogy masszív vérzés esetén a Hp kötőkapacitása kimerül. Emellett a kovalensen keresztkötött Hb multimerek alacsonyabb affinitással rendelkeznek a Hp irányába, így eltávolításuk a Hp-CD163 útvonalon gátolt [165].

A liquorokban a teljes és a szabad hem tartalmát 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 µmol/L) mozgott. A szabad hem forrása valószínűsíthetően a metHb és a ferrylHb, mely sokkal kevésbé szorosan köti a hem prosztetikus csoportot, mint a Hb [83, 84, 155]. A hem hidrofób tulajdonságú molekula, mely a sejtmembránon passzív diffúzió vagy transzporterek által képes átjutni [166]. A hem erőteljes prooxidáns és proinflammatórikus molekula [33, 80]. A központi idegrendszer sejtjeit tekintve a hemet (5-40 µmol/L) citotoxikusként írták le asztrociták [167] és neuronok [168] esetében is. Oligodendrocitákat vizsgálva pedig a hem nagymértékben felerősítette a TNF- $\alpha$  által indukált programozott sejthalált [147].

Az intravaszkuláris hemolízis során a plazmába került szabad hemet a Hx köti meg, és a CD91 receptoron keresztül távolítja el a keringésből [169]. A hem-Hx kötés nagyon erős, emellett a Hx gátolja a hem katalitikus aktivitását [32, 34]. 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 [170]. 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 liquorról ismert, hogy egy nap alatt 4-5 alkalommal cserélődik felnőtt, egészséges szervezetben és ez az újszülöttek esetében még gyakoribb. A liquor eltávolítása a liquor-vér barrieren keresztül történik specifikus fehérjék segítségével, melyeket a choroid plexus epithél sejtjei expresszálnak. Ezen sejtek biztosítják a tápanyagok és az ionok transzportját a központi idegrendszerbe, illetve az eltávolításban is szerepük van. További kísérleteket igényel annak a kérdésnek megválaszolása, hogy milyen mechanizmussal távolítódnak el a Hb és oxidációs termékei a liquorból IVH-t követően.

A kovalens módon keresztkötött Hb multimerek jelenlétét vizsgáltuk IVH-t követően a liquor mintákban és megfigyeltük, 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 [171]. Intracerebrális vérzést követően megfigyelték a vér-agy gát diszfunkcióját és számos publikációban kimutatták, hogy a vér egyes komponensei (pl. trombin, Hb, Fe) kritikus szerepet játszanak az ICH-indukálta vér-agy gát diszfunkció kialakulásában [129]. 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 mindenegyikében meghaladta

az 50  $\mu\text{mol/L}$ -t, néhány mintában pedig extrém magas 250  $\mu\text{mol/L}$  feletti szabad hem koncentrációt mértünk. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a polimerizált extracelluláris Hb gátolja a vér-agy gát normál működését [172]. 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 [173]. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a hem mellett az oxidált Hb formák (metHb, ferrylHb) is indukálják a HO-1 expresszióját HBEC sejteken. A HO-1 antioxidáns és anti-inflammatorikus tulajdonságainál fogva képes védelmet biztosítani a programozott sejthalál ellen és gátolja számos immun-mediált gyulladásos betegség kialakulását [147]. Korábban kimutatták, hogy a HO-1 felregulálódása cerebrális malária kialakulását előzi meg kísérleti állatmodellben és csökkenti a vér-agy gát sérülését, illetve a neuroinflammáció mértékét [46].

Az adhéziós molekulák központi szerepet töltenek be a gyulladásos reakcióban a leukociták endotélfelszínhez való kitapadásában és transzmigrációjában. Normál körülmények között a vaszkuláris endotéliumra jellemző az adhéziós molekulák alacsony expressziója. Agyvérzések esetén lokális gyulladásos válasz alakul ki és a szolubilis adhéziós molekulák (E-szelektin, ICAM-1, VCAM-1 és L-szelektin), illetve az inflammatorikus citokinek szintje megemelkedik a liquorban [174, 175]. A gyulladásos válasz feltételezhetően a fehér állomány sérülésével jár [176].

A hemről ismert, hogy endotélsejt aktivációt indukál, melyet az adhéziós molekulák fokozott expressziója és emelkedett proinflammatorikus citokin (IL-6, IL-8) termelés jellemez [72, 85, 177]. 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.

## 9. Konklúziók

---

**Dolgozatom első részében a hem mediálta NLRP3 inflammaszóma aktivációt vizsgáltuk HUVEC sejteken és *in vivo* körülmények között egerekben. Ezzel kapcsolatban az alábbi megállapításokat tettük:**

- A hem egy proinflammatorikus molekula, mely fokozza LPS-sel előkezelt endotélsejtek IL-1 $\beta$  expresszióját, és *in vivo* körülmények között IL-1 $\beta$  szekréciót indukál.
- A hem az NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül fokozza az IL-1 $\beta$  termelését.
- A hem által előidézett fokozott ROS termelésnek szerepe van az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában.
- A hem által előidézett IL-1 $\beta$  expresszió emelkedés gátolható az antioxidáns tulajdonságú N-acetyl ciszteinnel, illetve a hemkötő tulajdonságú albuminnal.

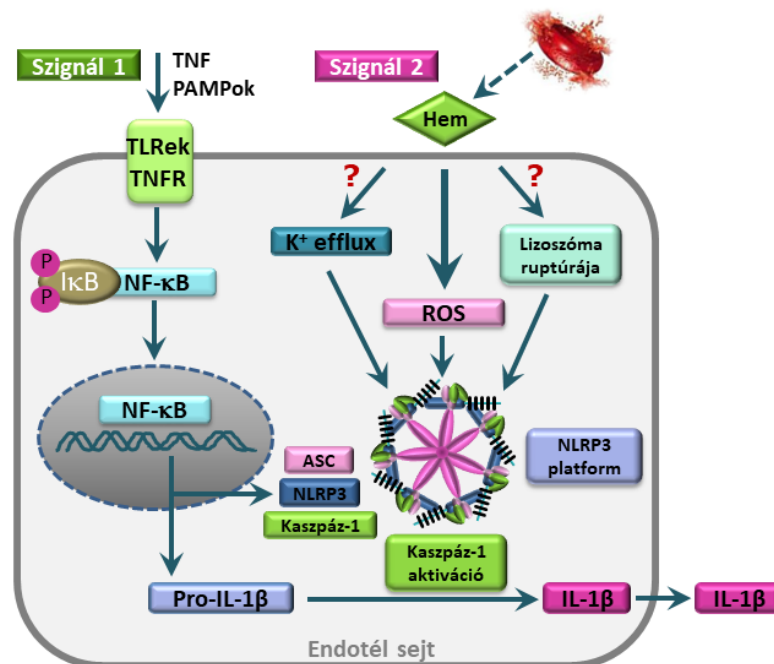
**Dolgozatom második részében az IVH-t követően koraszülöttektől gyűjtött liquor minták analízisével azt vizsgáltuk, hogy lehet-e szerepe a különféle oxidáltsági állapotú Hb formáknak az IVH-t követő neuroinflammáció kiváltásában. Ezzel kapcsolatban az alábbi megállapításokat tettük:**

- Az IVH-t követően Hb oxidációs termékek és szabad hem akkumulálódik 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.
- IVH-t követően a liquor minták VCAM-1, ICAM-1 és IL-8 szintje korrelál a liquor teljes hem koncentrációjával.

## 10. Összefoglalás

A hemolízissel járó betegségekben 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 proinflammatorikus jellegének egyik megnyilvánulása a makrofágokban megfigyelt NLRP3 inflammaszóma aktiváció és IL-1 $\beta$  szekréció.

Az endotélsejtek kitüntetett szerepet játszanak a gyulladásos 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 $\beta$  szekréciót indukál. *In vivo* körülmények között a hem kaspáz-1 aktivációt és aktív IL-1 $\beta$  képződést indukál, NLRP3-függő módon. Bizonyítottuk, hogy a hem által keltett proinflammatorikus válaszban fontos szerepe van a reaktív oxigéngyököknek, ugyanis a gyökfogó tulajdonságú NAC gátolta a hem által indukált IL-1 $\beta$  képződést.



**24. ábra** A hem-mediált NLRP3 inflammaszóma aktiváció endotélsejteken. A patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) mint például LPS, TNF- $\alpha$  (szignál 1) a toll-like receptorokhoz vagy a TNF receptorhoz kötődnek és ezáltal az NF- $\kappa$ B útvonalat aktiválják. Ez NLRP3, kaspáz-1 és IL-1 $\beta$  expressziójához vezet. A hem (szignál 2), mely a sérült VVT-ből kiszabadult Hb-ből származhat, ROS képződését, kaspáz-1 aktivációját és pro-IL-1 $\beta$  hasítását indukálja, majd az aktív IL-1 $\beta$  szekréciójához vezet. A K<sup>+</sup> efflux és a lizoszóma ruptúrájának szerepe azonban további vizsgálatokat igényel.

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

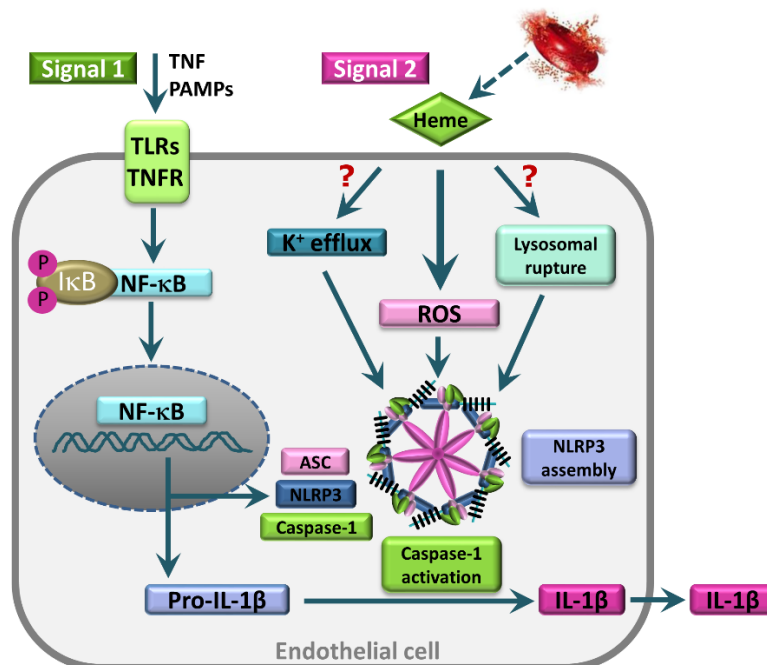
A hem és az oxidált Hb formák gyulladáskeltő szerepét vizsgáltuk IVH-val összefüggésben. Kimutattuk, hogy IVH-t követően hem, Hb, metHb, ferrylHb, illetve kovalensen keresztkötött oxidált globin multimerek akkumulálódnak a liquorban. A különböző oxidáltsági fokú Hb formák közül a ferrylHb a leginkább 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.

## 11. Summary

In the pathogenesis of hemolysis-associated diseases inflammation often occurs, even in the absence of pathogens. This is caused by DAMPs, which enter to the bloodstream. Upon RBC lysis Hb is prone to oxidation, resulting oxidized Hb species, metHb and ferrylHb. These Hb forms can easily release their heme prosthetic group. The proinflammatory nature of heme is already well-described and there is an evidence for heme-mediated NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  secretion in macrophages.

Endothelial cells play a crucial role in inflammatory response, thus we wanted to examine the effect of heme and the oxidized Hb forms in endothelial cell activation. Here we demonstrated, that heme induces IL-1 $\beta$  secretion in LPS-primed HUVECs. We showed, that heme triggers caspase-1 activation and active IL-1 $\beta$  secretion on an NLRP3-dependent manner *in vivo*. Furthermore, we proved that ROS have a key role in heme-induced proinflammatory response, as the ROS scavenger NAC inhibited IL-1 $\beta$  formation. Moreover, we showed that albumin prevents heme-mediated IL-1 $\beta$  secretion in HUVECs *in vivo*. In addition albumin blocked heme-induced peritoneal leukocyte infiltration in C57BL/6 mice.



**Figure 25. Heme-mediated NLRP3 inflammasome activation in endothelial cells.** Pathogen associated molecular patterns (PAMP), such as LPS, TNF- $\alpha$  (Signal 1) binds to toll-like receptors or TNF-receptor activating NF- $\kappa$ B pathway. This will cause the expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$ . Hem (Signal 2) derived from damaged RBC triggers ROS production, caspase-1 activation and cleavage of pro-IL-1  $\beta$ , resulting active IL-1 $\beta$  secretion. K<sup>+</sup> efflux lysosomal rupture still remained to be explored.

In our work, we also studied the inflammatory role of heme and oxidized Hb forms after onset of IVH. We presented that upon IVH heme, Hb, metHb, ferrylHb and the covalently cross-linked globin multimers accumulate in the liquor. However, ferrylHb revealed the strongest proinflammatory effect, therefore induced the expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines in human brain microvascular endothelial cells, as well as impaired the integrity of the monolayer.

Overall, our study may contribute to the understanding the role of RBC-derived DAMPs in NLRP3 inflammasome activation. In addition, it may provide a more clear explanation of oxidized Hb forms role in the pathogenesis of IVH.

## 12. 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.

## 13. Irodalomjegyzék

---

1. Higgins, J.M., *Red blood cell population dynamics*. Clin Lab Med, 2015. **35**(1): p. 43-57.
2. Manwani, D. and J.J. Bieker, *The erythroblastic island*. Curr Top Dev Biol, 2008. **82**: p. 23-53.
3. An, X. and N. Mohandas, *Erythroblastic islands, terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation*. Int J Hematol, 2011. **93**(2): p. 139-143.
4. Ji, P., M. Murata-Hori, and H.F. Lodish, *Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(7): p. 409-15.
5. Bessis, M., *[Erythroblastic island, functional unity of bone marrow]*. Rev Hematol, 1958. **13**(1): p. 8-11.
6. Bessis, M.C. and J. Breton-Gorius, *Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review*. Blood, 1962. **19**: p. 635-63.
7. Huisjes, R., et al., *Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 656.
8. Viallat, A. and M. Abkarian, *Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow*. Int J Lab Hematol, 2014. **36**(3): p. 237-43.
9. Perutz, M.F., et al., *Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis*. Nature, 1960. **185**(4711): p. 416-22.
10. Balagopalakrishna, C., et al., *Superoxide produced in the heme pocket of the beta-chain of hemoglobin reacts with the beta-93 cysteine to produce a thiyl radical*. Biochemistry, 1998. **37**(38): p. 13194-202.
11. Siems, W.G., O. Sommerburg, and T. Grune, *Erythrocyte free radical and energy metabolism*. Clin Nephrol, 2000. **53**(1 Suppl): p. S9-17.
12. Mohanty, J.G., E. Nagababu, and J.M. Rifkind, *Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 84.
13. Iuchi, Y., et al., *Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production*. Biochemical Journal, 2007. **402**: p. 219-227.
14. Neumann, C.A., et al., *Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 561-565.
15. Lee, T.H., et al., *Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice*. Blood, 2003. **101**(12): p. 5033-5038.
16. Ho, Y.S., et al., *Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16644-51.
17. Percy, M.J., N.V. McFerran, and T.R. Lappin, *Disorders of oxidised haemoglobin*. Blood Rev, 2005. **19**(2): p. 61-8.
18. de Back, D.Z., et al., *Of macrophages and red blood cells; a complex love story*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 9.
19. Piomelli, S. and C. Seaman, *Mechanism of Red-Blood-Cell Aging - Relationship of Cell-Density and Cell Age*. American Journal of Hematology, 1993. **42**(1): p. 46-52.
20. Franco, R.S., *The measurement and importance of red cell survival*. American Journal of Hematology, 2009. **84**(2): p. 109-114.
21. Fernandez-Boyanapalli, R.F., et al., *Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4*. Blood, 2009. **113**(9): p. 2047-55.
22. Burger, P., et al., *CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5512-21.
23. Bratosin, D., et al., *Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review*. Biochimie, 1998. **80**(2): p. 173-195.

24. Khandelwal, S., N. van Rooijen, and R.K. Saxena, *Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation*. *Transfusion*, 2007. **47**(9): p. 1725-1732.
25. Graversen, J.H., M. Madsen, and S.K. Moestrup, *CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(4): p. 309-14.
26. Thomsen, J.H., et al., *The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 523652.
27. Goldenstein, H., N.S. Levy, and A.P. Levy, *Haptoglobin genotype and its role in determining heme-iron mediated vascular disease*. *Pharmacol Res*, 2012. **66**(1): p. 1-6.
28. Lioupis, C., et al., *Association of haptoglobin genotype and common cardiovascular risk factors with the amount of iron in atherosclerotic carotid plaques*. *Atherosclerosis*, 2011. **216**(1): p. 131-8.
29. Lioupis, C., et al., *Macrophage infiltration and smooth muscle cells content associated with haptoglobin genotype in human atherosclerotic carotid plaques*. *Angiology*, 2012. **63**(3): p. 178-83.
30. Rother, R.P., et al., *The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease*. *Jama*, 2005. **293**(13): p. 1653-62.
31. Schaer, D.J., et al., *CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin*. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 373-80.
32. Hrkal, Z., Z. Vodrázka, and I. Kalousek, *Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated chains to hemopexin*. *Eur J Biochem*, 1974. **43**(1): p. 73-8.
33. Balla, G., et al., *Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species*. *Lab Invest*, 1991. **64**(5): p. 648-55.
34. Hvidberg, V., et al., *Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2572-9.
35. Bunn, H.F. and J.H. Jandl, *Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin*. *J Biol Chem*, 1968. **243**(3): p. 465-75.
36. Paoli, M., et al., *Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains*. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(10): p. 926-31.
37. Fasano, M., et al., *Heme binding to albuminoid proteins is the result of recent evolution*. *IUBMB Life*, 2007. **59**(7): p. 436-40.
38. Allhorn, M., et al., *Processing of the lipocalin alpha(1)-microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties*. *Blood*, 2002. **99**(6): p. 1894-901.
39. Miller, Y.I. and N. Shaklai, *Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1454**(2): p. 153-64.
40. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. **61**(2): p. 748-55.
41. Stuart, M.J. and R.L. Nagel, *Sickle-cell disease*. *Lancet*, 2004. **364**(9442): p. 1343-60.
42. Muncie, H.L., Jr. and J. Campbell, *Alpha and beta thalassemia*. *Am Fam Physician*, 2009. **80**(4): p. 339-44.
43. Da Costa, L., et al., *Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders*. *Blood Rev*, 2013. **27**(4): p. 167-78.
44. Luzzatto, L., C. Nannelli, and R. Notaro, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2016. **30**(2): p. 373-93.
45. Akinosoglou, K.S., E.E. Solomou, and C.A. Gogos, *Malaria: a haematological disease*. *Hematology*, 2012. **17**(2): p. 106-14.
46. Pamplona, A., et al., *Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria*. *Nat Med*, 2007. **13**(6): p. 703-10.
47. Lu, P.L., et al., *Dengue virus-associated hemophagocytic syndrome and dyserythropoiesis: a case report*. *Kaohsiung J Med Sci*, 2005. **21**(1): p. 34-9.

48. Daly, J.J., et al., *Massive intravascular haemolysis with T-activation and disseminated intravascular coagulation due to clostridial sepsis*. Br J Haematol, 2006. **134**(6): p. 553.
49. Vercaemst, L., *Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: a review in search of a treatment algorithm*. J Extra Corpor Technol, 2008. **40**(4): p. 257-67.
50. Larsen, R., et al., *A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis*. Sci Transl Med, 2010. **2**(51): p. 51ra71.
51. Arruda, M.A., A.V. Graça-Souza, and C. Barja-Fidalgo, *Heme and innate immunity: new insights for an old molecule*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100**(7): p. 799-803.
52. Mendonça, R., A.A. Silveira, and N. Conran, *Red cell DAMPs and inflammation*. Inflamm Res, 2016. **65**(9): p. 665-78.
53. Perregaux, D.G., et al., *ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4615-23.
54. Sikora, J., et al., *Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes*. 2014. **124**(13): p. 2150-7.
55. Dubyak, G.R., *Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **4**(4): p. 295-300.
56. Lott, J.M., T.L. Sumpter, and H.R. Turnquist, *New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity*. J Leukoc Biol, 2015. **97**(6): p. 1037-48.
57. Wei, J., et al., *Red Blood Cells Store and Release Interleukin-33*. J Investig Med, 2015. **63**(6): p. 806-10.
58. Kim, J.Y. and M.A. Yenari, *The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury*. Anat Cell Biol, 2013. **46**(1): p. 1-7.
59. Zhang, Q., et al., *Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 104-7.
60. Shimada, K., et al., *Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 401-14.
61. Dear, J.W., et al., *Cyclophilin A is a damage-associated molecular pattern molecule that mediates acetaminophen-induced liver injury*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3347-52.
62. Kim, H., et al., *Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages*. Clin Immunol, 2005. **116**(3): p. 217-24.
63. Tegeder, I., et al., *Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis*. J Clin Immunol, 1997. **17**(5): p. 380-6.
64. Jeney, V., G. Balla, and J. Balla, *Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 379.
65. Kassa, T., et al., *Differential heme release from various hemoglobin redox states and the upregulation of cellular heme oxygenase-1*. FEBS Open Bio, 2016. **6**(9): p. 876-84.
66. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
67. Figueiredo, R.T., et al., *Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20221-9.
68. Fortes, G.B., et al., *Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production*. Blood, 2012. **119**(10): p. 2368-75.
69. Lin, S., et al., *Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 46.
70. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 2003-11.
71. Pohlman, T.H., et al., *An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4548-53.
72. Wagener, F.A., et al., *Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells*. Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **216**(3): p. 456-63.

73. Belcher, J.D., et al., *Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease*. *Blood*, 2014. **123**(3): p. 377-90.
74. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 821-32.
75. Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting, *The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 707-35.
76. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression*. *J Immunol*, 2009. **183**(2): p. 787-91.
77. Barker, B.R., D.J. Taxman, and J.P. Ting, *Cross-regulation between the IL-1 $\beta$ /IL-18 processing inflammasome and other inflammatory cytokines*. *Curr Opin Immunol*, 2011. **23**(5): p. 591-7.
78. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 417-26.
79. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(1): p. 10-22.
80. Dutra, F.F., et al., *Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(39): p. E4110-8.
81. Li, Q., et al., *Heme induces IL-1 $\beta$  secretion through activating NLRP3 in kidney inflammation*. *Cell Biochem Biophys*, 2014. **69**(3): p. 495-502.
82. Balla, J., et al., *Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage*. *Trans Assoc Am Physicians*, 1992. **105**: p. 1-6.
83. Potor, L., et al., *Atherogenesis may involve the prooxidant and proinflammatory effects of ferryl hemoglobin*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 676425.
84. Jeney, V., et al., *Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme*. *Blood*, 2002. **100**(3): p. 879-87.
85. Silva, G., et al., *Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(43): p. 29582-95.
86. Gram, M., et al., *Hemoglobin induces inflammation after preterm intraventricular hemorrhage by methemoglobin formation*. *J Neuroinflammation*, 2013. **10**: p. 100.
87. Baumgartner-Parzer, S.M. and W.K. Waldhäusl, *The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001. **109 Suppl 2**: p. S166-79.
88. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 158-73.
89. Mitchell, J.A., et al., *Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(1): p. 141-7.
90. Vanhoutte, P.M., *Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly*. *Hypertension*, 2011. **57**(3): p. 526-31.
91. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 174-90.
92. Tanaka, K.A., N.S. Key, and J.H. Levy, *Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation*. *Anesth Analg*, 2009. **108**(5): p. 1433-46.
93. Wu, K.K. and P. Thiagarajan, *Role of endothelium in thrombosis and hemostasis*. *Annu Rev Med*, 1996. **47**: p. 315-31.
94. Pearson, J.D., *Endothelial cell function and thrombosis*. *Baillieres Clin Haematol*, 1994. **7**(3): p. 441-52.
95. Wu, K.K., *Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis*. *J Formos Med Assoc*, 1996. **95**(9): p. 661-6.
96. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(6): p. 327-34.
97. Rondaij, M.G., et al., *Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(5): p. 1002-7.

98. Muller, W.A., et al., *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 449-60.
99. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana, *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 467-77.
100. Opitz, B., et al., *Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 319-26.
101. Bai, B., et al., *NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction*. 2020. **11**(9): p. 776.
102. Chen, Y., et al., *Contribution of redox-dependent activation of endothelial Nlrp3 inflammasomes to hyperglycemia-induced endothelial dysfunction*. 2016. **94**(12): p. 1335-1347.
103. Li, Y., et al., *SIRT1 inhibits inflammatory response partly through regulation of NLRP3 inflammasome in vascular endothelial cells*. Mol Immunol, 2016. **77**: p. 148-56.
104. Chen, Y., et al., *Instigation of endothelial Nlrp3 inflammasome by adipokine visfatin promotes inter-endothelial junction disruption: role of HMGB1*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(12): p. 2715-27.
105. Autheman, D., et al., *Clostridium perfringens beta-toxin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64644.
106. Xiang, M., et al., *Hemorrhagic shock activation of NLRP3 inflammasome in lung endothelial cells*. J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4809-17.
107. Martin-Rodriguez, S., et al., *TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia*. Eur J Clin Invest, 2015. **45**(2): p. 160-9.
108. Zhang, Y., et al., *Coronary endothelial dysfunction induced by nucleotide oligomerization domain-like receptor protein with pyrin domain containing 3 inflammasome activation during hypercholesterolemia: beyond inflammation*. Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(13): p. 1084-96.
109. Kolly, L., et al., *Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium*. Immunology, 2010. **129**(2): p. 178-85.
110. Land, W.G., *Transfusion-Related Acute Lung Injury: The Work of DAMPs*. Transfus Med Hemother, 2013. **40**(1): p. 3-13.
111. Abbott, N.J. and A. Friedman, *Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease*. Epilepsia, 2012. **53 Suppl 6**(0 6): p. 1-6.
112. Begley, D.J. and M.W. Brightman, *Structural and functional aspects of the blood-brain barrier*. Prog Drug Res, 2003. **61**: p. 39-78.
113. de Boer, A.G. and P.J. Gaillard, *Blood-brain barrier dysfunction and recovery*. J Neural Transm (Vienna), 2006. **113**(4): p. 455-62.
114. Brightman, M.W. and T.S. Reese, *Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain*. J Cell Biol, 1969. **40**(3): p. 648-77.
115. Oldendorf, W.H., M.E. Cornford, and W.J. Brown, *The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat*. Ann Neurol, 1977. **1**(5): p. 409-17.
116. Nag, S., *Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels*. Methods Mol Med, 2003. **89**: p. 3-36.
117. Stoll, B.J., et al., *Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network*. Pediatrics, 2010. **126**(3): p. 443-56.
118. Sheth, R.D., *Trends in incidence and severity of intraventricular hemorrhage*. J Child Neurol, 1998. **13**(6): p. 261-4.
119. Wilson-Costello, D., et al., *Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s*. Pediatrics, 2005. **115**(4): p. 997-1003.
120. Mukerji, A., V. Shah, and P.S. Shah, *Periventricular/Intraventricular Hemorrhage and Neurodevelopmental Outcomes: A Meta-analysis*. Pediatrics, 2015. **136**(6): p. 1132-43.

121. Perlman, J.M., *The relationship between systemic hemodynamic perturbations and periventricular-intraventricular hemorrhage--a historical perspective*. Semin Pediatr Neurol, 2009. **16**(4): p. 191-9.
122. Milligan, D.W., *Failure of autoregulation and intraventricular haemorrhage in preterm infants*. Lancet, 1980. **1**(8174): p. 896-8.
123. Bowerman, R.A., et al., *Natural history of neonatal periventricular/intraventricular hemorrhage and its complications: sonographic observations*. AJR Am J Roentgenol, 1984. **143**(5): p. 1041-52.
124. Sarkar, S., et al., *Severe intraventricular hemorrhage in preterm infants: comparison of risk factors and short-term neonatal morbidities between grade 3 and grade 4 intraventricular hemorrhage*. Am J Perinatol, 2009. **26**(6): p. 419-24.
125. Hugelshofer, M., et al., *Cell-Free Oxyhemoglobin in Cerebrospinal Fluid After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Biomarker and Potential Therapeutic Target*. World Neurosurg, 2018. **120**: p. e660-e666.
126. Righy, C., et al., *Hemoglobin metabolism by-products are associated with an inflammatory response in patients with hemorrhagic stroke*. Rev Bras Ter Intensiva, 2018. **30**(1): p. 21-27.
127. Svistunenko, D.A., et al., *The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7114-21.
128. Reeder, B.J., et al., *Toxicity of myoglobin and haemoglobin: oxidative stress in patients with rhabdomyolysis and subarachnoid haemorrhage*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 745-8.
129. Keep, R.F., et al., *Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage*. Fluids Barriers CNS, 2014. **11**: p. 18.
130. Xi, G., R.F. Keep, and J.T. Hoff, *Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage*. Lancet Neurol, 2006. **5**(1): p. 53-63.
131. Gram, M., et al., *Extracellular hemoglobin - mediator of inflammation and cell death in the choroid plexus following preterm intraventricular hemorrhage*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 200.
132. Sadrzadeh, S.M., et al., *Hemoglobin potentiates central nervous system damage*. J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 662-4.
133. Winterbourn, C.C., *Oxidative reactions of hemoglobin*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 265-72.
134. Meng, F. and A.I. Alayash, *Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states*. Anal Biochem, 2017. **521**: p. 11-19.
135. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 803-15.
136. Chavarría-Smith, J. and R.E. Vance, *The NLRP1 inflammasomes*. Immunol Rev, 2015. **265**(1): p. 22-34.
137. Latz, E., T.S. Xiao, and A. Stutz, *Activation and regulation of the inflammasomes*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 397-411.
138. Duncan, J.A. and S.W. Canna, *The NLRC4 Inflammasome*. 2018. **281**(1): p. 115-123.
139. Lugrin, J. and F. Martinon, *The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations*. 2018. **281**(1): p. 99-114.
140. Li, Q., et al., *Heme induces IL-1beta secretion through activating NLRP3 in kidney inflammation*. Cell Biochem Biophys, 2014. **69**(3): p. 495-502.
141. Man, S.M. and T.D. Kanneganti, *Regulation of inflammasome activation*. Immunol Rev, 2015. **265**(1): p. 6-21.
142. Nakamura, K., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome by cellular labile iron*. Experimental Hematology, 2016. **44**(2): p. 116-124.
143. Abais, J.M., et al., *Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?* Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(13): p. 1111-29.
144. Muñoz-Planillo, R., et al., *K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1142-53.

145. Jin, C. and R.A. Flavell, *Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation*. J Clin Immunol, 2010. **30**(5): p. 628-31.
146. Hornung, V. and E. Latz, *Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 620-3.
147. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 323-54.
148. Chan, E.L. and J.T. Murphy, *Reactive oxygen species mediate endotoxin-induced human dermal endothelial NF- $\kappa$ B Activation1* This work was supported by NIH 3 P50 GM2 1681-36S2. Journal of Surgical Research, 2003. **111**(1): p. 120-126.
149. Kinnunen, K., et al., *Lysosomal destabilization activates the NLRP3 inflammasome in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)*. J Cell Commun Signal, 2017. **11**(3): p. 275-279.
150. Chen, Y., et al., *Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2015. **1853**(2): p. 396-408.
151. Tolosano, E., et al., *Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3906-14.
152. Vinchi, F., et al., *Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases*. Circulation, 2013. **127**(12): p. 1317-29.
153. Vinchi, F., et al., *Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload*. Am J Pathol, 2008. **173**(1): p. 289-99.
154. Zunszain, P.A., et al., *Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid*. BMC Struct Biol, 2003. **3**: p. 6.
155. Balla, J., et al., *Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9285-9.
156. Vollaard, N.B., et al., *A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(9): p. 1216-28.
157. Jeney, V., et al., *Natural history of the bruise: formation, elimination, and biological effects of oxidized hemoglobin*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 703571.
158. Ramirez, D.C., Y.R. Chen, and R.P. Mason, *Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(7): p. 830-9.
159. Deterding, L.J., et al., *Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidiny radical*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11600-7.
160. Nagy, E., et al., *Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(7): p. 1347-53.
161. Nyakundi, B.B., et al., *Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 $\beta$  production upon intravascular hemolysis*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(2): p. 464-475.
162. Deuel, J.W., et al., *Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response*. Cell Death Dis, 2016. **7**(1): p. e2064.
163. Posta, N., et al., *Hemoglobin oxidation generates globin-derived peptides in atherosclerotic lesions and intraventricular hemorrhage of the brain, provoking endothelial dysfunction*. 2020. **100**(7): p. 986-1002.
164. Galea, J., et al., *The intrathecal CD163-haptoglobin-hemoglobin scavenging system in subarachnoid hemorrhage*. J Neurochem, 2012. **121**(5): p. 785-92.
165. Vallelian, F., et al., *The reaction of hydrogen peroxide with hemoglobin induces extensive alpha-globin crosslinking and impairs the interaction of hemoglobin with endogenous scavenger pathways*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(8): p. 1150-8.
166. Gozzelino, R., *The Pathophysiology of Heme in the Brain*. Curr Alzheimer Res, 2016. **13**(2): p. 174-84.

167. Dang, T.N., et al., *The metabolism and toxicity of hemin in astrocytes*. *Glia*, 2011. **59**(10): p. 1540-50.
168. Dang, T.N., et al., *Uptake, metabolism and toxicity of hemin in cultured neurons*. *Neurochem Int*, 2011. **58**(7): p. 804-11.
169. Smith, A. and R.J. McCulloh, *Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders*. *Front Physiol*, 2015. **6**: p. 187.
170. Garland, P., et al., *Heme-Hemopexin Scavenging Is Active in the Brain and Associates With Outcome After Subarachnoid Hemorrhage*. *Stroke*, 2016. **47**(3): p. 872-6.
171. Sweeney, M.D., et al., *Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(1): p. 21-78.
172. Butt, O.I., P.W. Buehler, and F. D'Agnillo, *Blood-brain barrier disruption and oxidative stress in guinea pig after systemic exposure to modified cell-free hemoglobin*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(3): p. 1316-28.
173. Li, Q.Q., et al., *Research Progress in Understanding the Relationship Between Heme Oxygenase-1 and Intracerebral Hemorrhage*. *Front Neurol*, 2018. **9**: p. 682.
174. Polin, R.S., et al., *Detection of soluble E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in the cerebrospinal fluid of patients after subarachnoid hemorrhage*. *J Neurosurg*, 1998. **89**(4): p. 559-67.
175. Gaetani, P., et al., *Cisternal CSF levels of cytokines after subarachnoid hemorrhage*. *Neurol Res*, 1998. **20**(4): p. 337-42.
176. Leviton, A., et al., *Systemic inflammation, intraventricular hemorrhage, and white matter injury*. *J Child Neurol*, 2013. **28**(12): p. 1637-45.
177. Liu, X. and Z. Spolarics, *Methemoglobin is a potent activator of endothelial cells by stimulating IL-6 and IL-8 production and E-selectin membrane expression*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **285**(5): p. C1036-46.

## 14. Publikációs lista



**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 alapjául 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 Inflammasome Activation By Heme In Human Endothelial Cells.  
*Oxidative Med. Cell. Longev.* 2018, 1-14, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4310818>  
IF: 4.868

### 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.



## 15. Tárgyszavak

---

endotélsejtek, hem, oxidált hemoglobin formák, NLRP3 inflammaszóma aktiváció, veszély-asszociált molekuláris mintázat (DAMP), intraventrikuláris vérzés, cerebrospinális folyadék, koraszülöttek, kovalensen keresztkötött globin multimerek

endothelial cells, heme, oxidized hemoglobin forms, NLRP3 inflammasome activation, damage-associated molecular pattern (DAMP), intraventricular hemorrhage, cerebrospinal fluid, preterm infants, covalently cross-linked globin multimers

## 16. Függelék

---