

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A FERRITIN/FERROXIDÁZ ÉS A KÉNHYDROGÉN GÁTOLJA A VALVULÁRIS MINERALIZÁCIÓT: LEHETSÉGES TERÁPIA A SZÍV-ÉRRENDSZERT ÉRINTŐ MESZESEDÉSES MEGBETEGEDÉSEKBEN

Sikura Katalin Éva

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

A FERRITIN/FERROXIDÁZ ÉS A KÉNHYDROGÉN GÁTOLJA A VALVULÁRIS MINERALIZÁCIÓT: LEHETSÉGES TERÁPIA A SZÍV-ÉRRENDSZERT ÉRINTŐ MESZESEDÉSES MEGBETEGEDÉSEKBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Sikura Katalin Éva okleveles biológia-környezettan szakos hallgató (MSc)

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balla József, MTA doktora

A Doktori Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

Tagjai: Dr. Harangi Mariann, PhD
Dr. Mészáros Szilvia, PhD

A doktori szigorlathelye és ideje: Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék Könyvtára (8.
emelet)
2019. november 8. 11 óra

Az értekezés bírálói: Dr. BhattoaHarjit Pál, PhD
Prof. Dr. Horváth Csaba, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

tagok: Dr. BhattoaHarjit Pál, PhD
Prof. Dr. Horváth Csaba, MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet 'A'
épület
2019. november 8. 13 óra

BEVEZETÉS

A szív- és érrendszeri meszesedés egy komplex betegség, amely magába foglalja a nagyerek, aorták, valamint a szívbillentyűk meszesedését, és amelyet a legtöbb esetben krónikus veseelégtelenség (CKD) kísér. Rudolf Ludwig Karl Virchow, a „sejtpatológia atyja” volt az első, aki 1858-ban az érrendszeri meszesedés jelenségét, mint merev, „csontszerű” degeneratív folyamatot írta le. Ma már nyilvánvaló, hogy a kardiovaszkuláris meszesedés egy jól szabályozott és dinamikus folyamat, amely a szív- és érrendszeri megbetegedésekből adódó halálozások fokozott kockázatát idézi elő. Ismeretes továbbá, hogy a kardiovaszkuláris mineralizáció patológiás progressziója sokkal kifejezettebb cukorbeteg és krónikus vesebeteg esetében (Davignon et al., (2004); Libby et al., (2002); NM Rajamannan et al., (2011); Stocker et al. al., (2004)).

A meszesedéssel járó aorta billentyűk betegsége (CAVD: Calcified aortic valve disease-meszes aorta billentyű betegség) a fejlett országok egyik leggyakoribb szívbetegsége, szintén egy aktívan regulált folyamat révén alakul ki (Yutzey et al., (2014)). Számos munkacsoport leírta, hogy a CAVD-ben minden esetben, a mineralizáción kívül, megfigyelhetők lipidakkumulált és gyulladásos területek is, melyek a szívbillentyű szövetén belül a kialakult léziók heterogenitását eredményezik. A gyulladás az aorta billentyűk betegségében egy kritikus pontot képez a folyamat iniciálódásában, ahogyan azt a National Heart Lung and Blood Institute (Rajamannan; (2011)) és más kutatócsoportok (Mohler ER, (2001); Mazzone A, (2004); Freeman RV, (2005); Dweck MR, (2012)) is összefoglalták munkájukban (Yutzey KE; (2014)). A meszes és nem meszes régiók aránya meghatározó lehet a meszesedés stádiumának meghatározásához (Chester, (2011); Lusic et al., (2004); Mohler, (2004); Mohler et al., (2001); Speer et al., (2004)). A stenotikus aorta billentyűk mineralizációja során a szívbillentyűt alkotó VIC sejtek (Valvuláris Interstitialis sejtek) myofibroblast-szerű sejtekké transzdifferentiálódhatnak, amelyek kontraktilitási markerekkel jellemezhetők, mint például alfa-simaizom -aktin (α -SMA); vagy osteoblast-szerű sejtekké alakulhatnak: ALP-aktivitás megjelenésével a kalcifikáció korai szakaszaiban, majd megemelkedett osteocalcin expresszióval és RUNX2 transzkripciós factor nukleáris transzlokációjával a sejtmagba, a későbbi mineralizációs fázisokban (Nalini M. Rajamannan et al., (2003)).

A CKD-s betegekben a plazma megemelkedett foszfát-szintje a szív-érrendszer meszesedésének egyik legpotensebb/legfontosabb indukálója (Hruska KA, (2008); Giachelli CM, (2009); Adeney KL, (2009)). A magas foszfát egy nátrium-függő foszfát-kotranszporter (Pit csatornák (Crouthamel et al., (2013); X. Li et al., (2006)) által közvetített folyamatban indukálja az érrendszeri kalcifikációt, azáltal hogy elősegíti a foszfát fokozott felvételét a sejtekbe (Ducy et al., (1997)).

Ferritin / ferroxidáz

A vas az élő szervezetben esszenciális, elengedhetetlenül fontos számos sejtfunkcióban. A vas potenciális toxicitással rendelkezik, amelyet főként a ferritin molekulák modulálnak. A ferritin egy antioxidáns tulajdonságú vastároló protein, amelyről kimutatták, hogy megvédi az endotéliumot / simaizomsejteket / a szívbillentyű intersticiális sejtjeit a gyulladás káros hatásaival, valamint a meszesedéssel szemben is (Balla G, (1992); Sikura KÉ, (2019)); Zarjou A, (2009)). A ferritin nagyméretű molekula (450 kDa), funkciója, hogy akár 4500 Fe atomot

tároljon egy biztonságos, gömb szerkezetű struktúrában, nem mérgező formában. A ferritinnek két alegysége van, nehéz [H] és könnyű [L] lánc, amelyek aránya a sejt, a szövet és a szerv vas-ellátottságától függ (Theil EC, (1990)). A ferritin H-lánca ferroxidáz aktivitással rendelkezik, amely elengedhetetlenül fontos ahhoz, hogy a potenciálisan mérgező Fe (II) ionok Fe (III) –ként raktározódjanak, ezáltal csökkentve az oxidatív károsodások kialakulásának lehetőségét (Arosio P, (2002)). A ferritinnek a vastároláson és vasháztartás szabályozásán túl immunmoduláló szerepe is van, melyet Wang és Knovich et al. (2010) írt le. A klinikumban a szérum ferritin szintje a szervezet vasháztartásának tükré, így azt vizsgálva különböző betegségekre (fertőzések, gyulladások, kardiovaszkuláris betegségek), rendellenességekre deríthető fény (Zarjou, Black et al. (2019)). A vas/ferritin pontos funkciója a gyulladásos megbetegedésekben, illetve a szív-érrendszer betegségeiben jelenleg még kevésbé ismert és vitatott, munkánkkal viszont megpróbálunk részletes betekintést nyújtani a vas/ferritin rendszer CAVD-ban és CKD-ben betöltött szerepére.

A H₂S szerepe

A hidrogén-szulfid a harmadik ismert endogén gázotranszmitter, a nitrogén-oxidon és a szén-monoxidon kívül (Wang, (2002)). Korábbi munkánkban összefoglaltuk, hogy a NaSH-nak jelentős funkciója van az érrendszer egészségének fenntartásában azáltal, hogy gátolja az erek vaszkuláris simaizomsejtjeinek mineralizációját (Zavaczki et al., (2011)). A cisztationin- γ -liáz (CSE), az endogén kénhidrogén termelésért felelős enzim fontos feladatot lát el a normál szív- és élettani funkciókban, amint Jiang és munkatársai, és más munkacsoportok összefoglalták (Chen et al., (2007)). A szívbetegségek kialakulása a H₂S termelés elégtelenségében nyilvánul meg, amelyet például a szívkoszorúér betegek plazmájában a H₂S alacsonyabb szintje jelez (Jiang et al., (2005); Shen et al., (2015)). Az agyszövet normál működéséhez szükséges endogén H₂S-termelést pedig a cisztationin- β -szintáz (CBS) biztosítja, ahogy K. Abe és H. Kimura is kimutatta (Abe et al., (1996)). A H₂S hiányának pótlása már megvalósítható: Kang et al. (2017) szerint, a Lawesson's reagens és a morfolin reagáltatása révén egy új generációs lassú H₂S felszabadulást biztosító molekula (GYY4137) hozható létre. A GYY4137 protonációs reakciója pedig még stabilabb kénhidrogént felszabadító vegyületet eredményez, mint például AP67 és AP72. Az AP72 kiválóan oldódik vízben és nagyon lassan generálja a H₂S-t, összehasonlítva a gyors kénhidrogén-felszabadító donorokkal, mint például NaSH és Na₂S (Chitnis et al., (2013); Kang et al., (2017); Nagy Péter et al., (2014)). Ezen túlmenően nemrégiben Rose, Moore et al., (2017) bizonyította, hogy a kénhidrogénnek a sejtek jelátviteli folyamataiban poszt-transzlációs módosításokban is funkcionális szerepe van. Állatmodellben és géncsendesített *in vitro* modellekben is megfigyelték a H₂S mineralizációban betöltött szerepét, melyet a CSE/CBS enzimrendszerek alulműködésével támasztottak alá (Rose, Moore et al. (2017)). Munkánk e fejezetében egy új, részletes betekintést szeretnénk bemutatni a kénhidrogén kardiovaszkuláris funkcióját illetően, *in vitro* és *in vivo* modellben is demonstrálva.

CÉLKITŰZÉSEK

A tanulmány célja

1. rész

A CAVD folyamata összetett betegség, elsősorban az időskorúakat érinti. A CAVD az egyik vezető halálozási és morbiditási ok, különösen a fejlett országokban és a CKD-ben szenvedő betegek esetében. A CAVD progressziója magában foglalja a szívbillentyűt alkotó intersticiális sejtek (VIC) osteoblasztos transzdifferentiációját, amelyet csont specifikus génexpresszió kísér, progresszióját pedig hidroxipapatit lerakódása kíséri a szívbillentyű érintett szövetrészeiben. Habár több ismerettel rendelkezünk a CAVD kialakulásához vezető patomechanizmusokról, az egyetlen terápiás módszer a betegség orvoslásában mindmáig a szívbillentyű transzplantáció. Laboratóriumunk korábbi munkáiban kimutatta, hogy a ferritin / ferroxidáz fontos szerepet játszik az érrendszer mineralizációjában. A ferritin / ferroxidáz szerepéről a kardiovaszkuláris kalcifikációban azonban rendkívül kevés információ áll rendelkezésünkre.

- Szeretnénk feltárni a ferritin / ferroxidáz szerepét a magas foszfát által indukált CAVD progressziójában *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt.
- Célunk a vas / ferritin lehetséges hatásmechanizmusának részletes felderítése a CAVD kialakulásának gátlásában.

2. rész

A H₂S szintje döntő szerepet játszik a CAVD progressziójában/előrehaladásában. Mindezek ellenére, azonban nincs bizonyíték, arra, hogy mi / miért okozta CAVD esetén a H₂S deficitet. Ebben a tanulmányban, amely az első rész (a ferritin/ferroxidáz rendszer) megfigyelésén alapul, célul tűztük ki, hogy új, kiemelt figyelmet fordítsunk a H₂S szerepére CAVD és a szív-érrendszeri betegségek mineralizációs folyamataiban.

- Elsődleges célunk megvizsgálni a H₂S pontos szerepét CAVD progressziójában.
- A rendelkezésre álló, kénhidrogén donormolekulák által tesztelni szeretnénk a H₂S exogen pótlásának lehetőségeit *in vivo* és *in vitro* körülmények között a CAVD kialakulásának gátlására irányulóan.

MÓDSZEREK

A tanulmányban felhasznált összes vegyszer analitikai tisztaságú reagens volt, a Sigma-Aldrich cég (St Louis, MO, USA) forgalmazásában. A szulfid donor molekulák, amelyeket ebben a munkában használtunk - GYY4137 (P- (4-metoxi-fenil) -P-4-morfolinil-foszfinoditionsav-morfolinsó), AP67 (4-metoxi-fenil) (pirrolidin-1-il) -foszfinoditionsav) és AP72 (4-metoxi-fenil) (piperidin-1-il) -foszfinoditionsav) – M. Whiteman által szintetizálták (Kulkarni-Chitnis et al., (2015); L. Li et al., (2008); Whiteman et al., (2015)). A szulfid törzsoldatokat minden esetben frissen készítettük, vízben oldva.

Humán szövetminták és sejtek izolálása

A humán szívbillentyűket szívbillentyű transzplantált betegektől gyűjtöttük; és két csoportra osztva osztályoztuk: meszet és lipidakkumulációt tartalmazó szövetminták (AS; N = 52), valamint meszesedés nélküli, súlyos szívbillentyű elégtelenségben szenvedő betegek mintái (AI; N = 28). A tanulmányban felhasznált szívbillentyűket 2015. január és 2017. december között gyűjtöttük (80 beteg) (Regionális Kutatási Etikai Bizottság, Projektszám: 61538-2 / 2017 / EKV és 4699-2016). A szívbillentyűk nagy hányadát alkotó VIC sejteket kollagenáz (600 U / ml) (Worthington Biochemical Corp.) felhasználásával izoláltuk. Az izolált sejteket a 2–4. passzázsban alkalmaztuk. Az összes kísérletet 5 különböző donorból származó sejttel végeztük.

Áramlási citometria

A sejteket fixáltuk és FITC-vel konjugált egér, anti-humán CD31 antitesttel (Abcam; ab27333) jelöltük, FACSscan áramlási citométeren futtattuk. A sejtpopulációt méret (FSC) és komplexitás (SSC) alapján azonosítottuk. Kontrollként izotípus mintát használtunk.

Állatok

Az összes *in vivo* kísérletet a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63 / EU európai parlamenti irányelv és az ARRIVE iránymutatások alapján végeztük: British Journal of Pharmacology, 160: 1577–1579. Az ebben a vizsgálatban elvégzett állatkísérleteket a Magyar Kormány Egészségügyi Tudományos Tanácsa Tudományos és Kutatási Etikai Bizottsága hagyta jóvá a DE MÁB / 157-5 / 2010 nyilvántartási szám alatt, szintén az ARRIVE iránymutatásoknak megfelelően. A C57BL / 6 ApoE^{-/-} egereket a Debreceni Egyetem állatházában tartottuk speciális, kórokozótól mentes körülmények között, az intézményi etikai bizottság iránymutatásaival összhangban. Az egereket random módon négy csoportra osztottuk. A nem magas zsírtartalmú diétacsoport (N = 5) standard (chow) diétát kapott. Az aortabillentyűk meszesedését, az egereket atherogén étrenden tartásával indukáltuk (15% zsír, 1,25% koleszterin, ssniffSpezialdiäten GmbH, Soest, Németország) 8 hetes kortól kezdődően, 8 héten át. Atherogén étrenddel párhuzamosan az egereket intraperitoneálisan AP72 injekcióval (266 umol / testtömeg kg; N = 5) vagy vivőanyaggal (sóoldat; N = 9) oltottuk, minden második nap, az előzőekben leírtak szerint. Az egerek aortáját 8 hetes kezelés után gyűjtöttük. Valamennyi egeret szén-dioxiddal túlaltattunk, ügyelve, hogy az eljárás lassú, kíméletes, minél kevesebb szenvedéssel járó legyen. Atherogén táp-összetétele (magas zsírtartalmú étrend): Nyers tápanyagok (%): Nyersfehérje

19%; nyers zsír 15,2%; nyersrost 3,4%; nyers hamu 6,3%; keményítő 25,6%; cukor 11,2%; Adalékanyagok (kg): A-vitamin 15 000 NE; D3-vitamin 1000 NE; 110 mg E-vitamin; 5 mg K3-vitamin; 0 mg C-vitamin; réz 13 mg.

Kalcifikáció; kalcium mérés, Alizarin Red S festés

VIC sejteket kalcifikációs közegben (2,5 mmol/L szervetlen foszfát és 1,8 mmol/L kalcium-klorid) tenyésztettük fenolred tartalmú vagy fenolred mentes tápfolyadékban 5 napig. A felülúszók kalciumtartalmát a QuantiChrome Calcium Assay Kit (Gentaur) segítségével határoztuk meg, a minták kalcium tartalmát azok fehérjetartalmára normalizálva µg/mg dimenzióban adtuk meg. Az extracelluláris kalcium lerakódások megjelenítésére Alizarin Red S festést használtuk. A sejteket 3,7% formaldehiddel 10 percig fixáltuk, 2% -os Alizarin Red S oldattal festettük, majd a festett sejtekről fénymikroszkóppal képeket készítettük (10x nagyítás; Leica DMIL LED mikroszkóp).

Osteocalcin mennyiségi meghatározása

Az osteocalcint EDTA-val szolubilizáltuk a sejtek extracelluláris mátrixából majd ELISA módszer (Bender MedSystem) segítségével határoztuk meg annak szintjét a különböző kezeléseket követően.

Alkalikus foszfatáz festés

Az alkalikus foszfatáz megjelenítéséhez a sejteket 24 lyukú tenyésztőedényekben növesztettük/kezeltük, majd citrát-aceton oldatban (2: 3) fixáltuk, Naftanol AS-MX –Fast Violet B oldattal (Sigma) festettük. Fénymikroszkóppal a kezelésekről képeket készítettünk (Leica DMIL LED mikroszkóp, Leica DMC4500 kamera, LAS Software 4.9.0).

A sejtek életképességének vizsgálata

A sejteket 0,2% kollagénnel bevont fedőlemezen tenyésztettük. NUCLEAR-ID® kék / vörös, a sejtek életképességét detektáló reagenst adtunk a sejtekhez 1: 1000 hígításban, majd 30 percig 37 ° C-on inkubáltuk. Ezután a sejteket fluoreszcens festéshez használható ragasztóval (Dako) rögzítettük Superfrost Ultra Plus tárgylemezen (Thermo Scientific). A képeket immunofluoreszcens mikroszkóppal (Leica DM2500 mikroszkóp, Leica DFC480 kamera) készítettük.

Immunofluoreszcens festés

Egér monoklonális anti-humán a-SMA (Santa Cruz; sc-3225; 400 ng/ml); nyúl, poliklonális anti-humán von Willebrand faktor antitestet (Abcam; ab6994; 100 ng / ml) használtunk elsődleges antitestekként a VIC és az endotél sejtek azonosítására. A mintákat CY3-konjugált Streptavidin-szekunder antitestekkel inkubáltuk (Jackson ImmunoResearch; 016-160-084; 1000 ng / ml); Biotin (Jackson ImmunoResearch; 715-065-150; 1000 ng / ml). Az LAMP1 és H-ferritin kettős festést nyúl, anti-humán LAMP1 (Abcam; ab24170; 1000 ng / ml) és egér, anti-humán H-ferritin (Santa Cruz; sc-376594; 400 ng / ml) antitestekkel készítettük; másodlagos antitestek a következők voltak: nyúllelles Alexa Fluor 488 LAMP-1- hez konjugálva (Thermo Fisher Scientific; A11070; 2000 ng / ml); anti-egér Alexa 647 (Thermo

Fisher Scientific; A21244; 4000 ng/ml) H-ferritinhez konjugálva. A Sox9 festést nyúl, anti-humán Sox9 (Abcam; ab26414; 2000 ng / ml) antitesttel, majd a nyúlelles Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific; A11070; 2000 ng / ml) másodlagos antitesttel végeztük. A magok megfestésére Hoechst-öt (0,5 ng/ml) használtunk. VIC sejtekben a RUNX2 transzkripció faktor lokalizációjának bemutatására nyúl, poliklonális anti-humán RUNX2-t (Proteintech, 20700-I-AP) használtunk (hígítás 1: 600) elsődleges antitestként, kecske, anti-nyúl Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, A11070) fluorofórral jelölve, 1: 500 hígítás mellett, 1 órán át, sötétben, szobahőmérsékleten inkubálva. A Hoechst-öt használtuk a magok megjelenítésére. A multicolor STED képalkotás segítségével, STED (Stimulated Emission Depletion) nanoszóppal készítettünk fotókat (Leica TCS SP8 STED-CW nanoszóppia; Leica Microsystem Mannheim, Németország). A kapott STED képeket a Huygens Professional (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Hollandia) szoftver alkalmazásával dekonvolváltuk, kiértékeljük.

Nukleusz és citoplazma sejtfrakciók protein extrakciója

A sejteket növekedési tápközegben tenyésztettük, és kalcifikációs tápközeggel vagy anélkül kezeltük 20 $\mu\text{mol/L}$ AP72-vel kiegészítve. A kezelés után a sejteket sejtkaparóval összegyűjtöttük centrifugacsőbe. A pelletet kétszer mostuk PBS-sel, majd jég hideg 1x citoplazmatikus lízispuffert (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 100 mmol/L NaCl, 300 mmol/L szacharóz, 3 mmol/L MgCl_2 , proteáz inhibitor koktél) adtuk a pellettez. A sejtuszpenziókat jégen inkubáltuk 15 percig. Centrifugálás után a felülúszókat összegyűjtöttük, a pelletet PBS-sel mostuk és jég hideg nukleáris extrakciós pufferben szuszpendáltuk (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA), pH 8,0, proteáz inhibitor koktél). Ezután a mintákat 27 gúzsos tűvel extraháltuk, hogy a nukleáris fehérjéket kinyerhessük, majd 8000 x g-nél 4 ° C-on 20 percig centrifugáltuk. A felülúszó tartalmazta a nukleáris frakciót. A minták fehérjekoncentrációját a BCA Protein Detection Kit (Amersham) segítségével határoztuk meg.

Western blot analízis

H-ferritin Western blot-ot nyúl, anti-humán H-ferritin ellenes antitesttel (Santa Cruz; sc-376594; 400 ng/ml) végeztünk, majd HRP-vel jelölt nyúl ellenes IgG antitesttel konjugáltuk. A Pit-1, Pit2 és LAMP1 kimutatására nyúl, anti-humán Pit1 antitestet (Abcam; ab177147; 2000 ng/mL), nyúl, anti-humán Pit2 antitestet (Proteintech; 12820-I-AP; 60 ng/mL), nyúl, anti-humán-LAMP1 antitestet (Abcam; ab24170; 1000 ng/mL) használtunk. Az ENPP2 Western blotot anti-humán ENPP2 antitesttel végeztük (Thermo Fisher Scientific; PA5-12478; 4000 ng/mL). A Sox9 Western blothoz nyúl, anti-humán Sox9 antitestet (Abcam; ab26414; 2000 ng/mL) használtunk. További Western blotok: nyúl, anti-humán RUNX2 (Proteintech; 20700-I-AP; 400 ng/mL); nyúl, anti-humán TNF-a (Thermo Fisher Scientific; PA5-19810; 400 ng/mL); nyúl, anti-humán IL1- β (Invitrogen; 17h18116; 400 ng/mL); nyúl, anti-humán CSE 1: 600 hígításban (Proteintech, 12217-I-AP); nyúl anti-humán CBS 1: 600 hígításban (Proteintech, 14787-I-AP); eger, anti-humán Ankyrin G1 antitest 1: 500 hígításban (Life Technologies, 338800). Az antigén-antitest komplexeit torma-peroxidáz kemilumineszcencia detektáló rendszerrel (Amersham Biosciences; RPN2109) vizualizáltuk.

A fehérjeanalízisek normalizálást gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázzal (GAPDH) végeztük.

PCR (qRT-PCR)

VIC sejteket növekedési mediában vagy meszesedést előidéző tápközegben tenyésztettük 20 $\mu\text{mol/L}$ AP72-vel kiegészítve. 5 nap elteltével a sejteket összegyűjtöttük. RNS-t az RNAzol STAT-60 alkalmazásával izoláltuk a gyártó utasításai szerint eljárva (TEL-TEST Inc., Friendswood, TX, USA). Az RNS-koncentrációját NanoDropTM 2000c spektrofotométerrel határoztuk meg (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Ezt követően a cDNS szintézist cDNS kittel hajtottuk végre (Applied Biosystems, Foster City, CA). Az ENPP2 és ANK1 (Thermo Fisher Scientific Inc.) és a GAPDH (Thermo Fisher Scientific Inc.) mRNS szintjének meghatározására valós idejű PCR technikát használtunk. A TaqMan Universal PCR Master Mix-et az Applied Biosystems-től (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia) vásároltuk. Végül TaqMan kvantitatív PCR-t (40 ciklust 95 ° C-on 15 másodpercig és 60 ° C-on 1 percig) végeztünk 96 lyukú plateken Bio-Rad CFX96-val (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornia, USA). Az eredményeket GAPDH-ra normalizáltuk és az mRNS relatív expressziójában fejeztük ki.

Intracelluláris foszfátfelvétel

Valvuláris interstitiális sejteket 12 lyukú tenyésztőedényben növesztettük, növekedési vagy kalcifikációs tápközegben (D-MEM) fenolred jelenlétében vagy hiányában, kiegészítve AP72-vel vagy anélkül (20 $\mu\text{mol/L}$), 5 napon keresztül. A sejteket 0,5% NP40 és 1% Triton-X100 oldattal lizáltuk. A teljes sejtlizátumot 12 000 x g, 15 percig, 4 ° C-on centrifugáltuk. A felülúszót QuanthiChrom kvantitatív kolorimetrikus foszfát kittel vizsgáltuk (BioAssays System) 650 nm-en. A foszfátfelvétel mértékét a sejtek fehérjetartalmára normalizáltuk.

Pirofoszfát meghatározása

VIC sejteket fenolred-mentes tápközegben (D-MEM; Sigma) vagy kalcifikációs tápközegben tenyésztettük, vagy AP72-vel (20 $\mu\text{mol/L}$) egészítettük ki. A szívbillentyű szöveteket (AS N = 3; AI N = 3) és a sejteket EDTA mentes detergensekkel lizáltuk. VIC sejtek extracelluláris folyadékából szerves pirofoszfátot (PPi) határoztunk meg, PPLightTM szerves pirofoszfát kit segítségével (Lonza; LT-07-610). A folyamatos kinetikai vizsgálatot a gyártó utasításai szerint végeztük. A lumineszcenciát 2 órán át figyeltük a SynergyTMMHTX multi-mode mikroplate-leolvasóval (BioTek Instruments, USA), 0,1 s integrált olvasási idővel. A relatív lumineszcenciát (RLU) a sejtek fehérjetartalmához viszonyítottuk.

Lizoszómák izolálása

A szöveti és tenyésztett sejtekhez lizoszómáinak elkülönítéséhez Lysosome Enrichment Kit-t használtuk (Thermo Fisher Scientific; 89839), a frakciót gradiens ultracentrifugálással különítettük el. Fehérje analízis céljából a lizoszómákat 2% CHAPS-sel (Sigma Aldrich; C2632-25G) lizáltuk Tris-pufferolt sóoldatban (TBS; 25 mmol/L Tris, 0,15 mol/L NaCl; pH 7,2).

A szulfidszint meghatározása AS és AI szívbillentyű szövetekből cinkprecipitációs vizsgálattal

A szulfidszinteket cink precipitációs módszerrel határoztuk meg, amelyet Gil-boa-Garber (Gilboa-Garber, (1971)), és A. D. Ang et al. (Ang és mtsai., (2012)) fejlesztett ki. Az emberi szívbillentyűket folyékony nitrogén alatt porítottuk, majd PBS-ben (7,4 pH), szonikálással homogenizáltuk. Ezután a mintát 12 000 x g sebességgel, 15 percig centrifugáltuk, a lipidmentes tiszta felülúszót összegyűjtöttük. 200 µL mintát elegyítettünk 350 µL 1% cink-acetáttal és 50 µL 1,5 mol/L nátrium-hidroxiddal, 60 percig rázógépen inkubáltuk. Az inkubálási lépést centrifugálás követi, 2000 x g, 5 percig a keletkezett cink-szulfid precipitátum elkülönítése céljából. A felülúszót ezután eltávolítottuk, és a csapadékot 1 ml desztillált vízzel mostuk intenzív vortexeléssel, majd 2000 x g, 5 percig újra centrifugáltuk. A felülúszót ezután leszívtuk, és a pelletet 160 µl desztillált vízzel feloldottuk, majd 40 µl előkészített festékkel (20 µL 20 mmol/L dimetil-p-fenilén-diamin-dihidrokloriddal (NNDP) beoldva 7,2 mol/L sósavban (HCl) és 20 µl 30 mmol/L vas (III) -kloridot (FeCl₃) 1,2 mol/L sósavban) megfestettük. 10 perc elteltével a képződött metilénkék (MB) abszorbanciáját spektrofotométerrel mértük 667 nm-en. Mivel a reakció során 1 mol/L MB képződött 1 mol/L szulfidból, a koncentrációt az MB extinkciós együtthatójával (30 200 M⁻¹cm⁻¹) határoztuk meg. A mintákat azok fehérjekoncentrációira normalizáltuk. Az eredményeket az µmol/ L képződött H₂S / mg fehérje/ 60 percben adtuk meg.

H-ferritin, cisztationin-γ-láz és cisztationin-β-szintáz kettős silencing

H-ferritint, cisztationin-γ-liáz (CSE) és cisztationin-β-szintáz (CBS) géneket siRNS-sel (Ambion, s225998; 4392420; s3710) csendesítettük. A szívbillentyűt alkotó interstitiális sejteket 12 lyukú tenyésztőedényekben növesztettük antibiotikumok nélküli tápközegben (D-MEM, Sigma). A konfluencia körülbelül 70% -nál a sejteket siRNS-sel transzfektáltuk H-ferritin, CSE és CBS ellen (Ambion, s225998; 4390824; s289). A transzfekciót 4 órán keresztül minimális szérumtartalmú tápközegben (Opti-MEM; Gibco) végeztük. A transzfekció végén 30% FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes D-MEM-et adtunk a sejteknek. Másnap a sejteket mostuk és AP72-vel kezeltük minden második napon, 5 napon keresztül.

A CSE és CBS farmakológiai gátlása

VIC sejteket 12 lyukú tenyésztőedényekben növekedési vagy meszesedési tápközegben tenyésztettük. A CSE, CBS és 3-MST gátlását farmakológiai vegyületek felhasználásával hajtottuk végre: PPG; AOAA; KGA; AOAA + PPG; AOAA + KGA; PPG + KGA (mindegyik inhibitor 20 µmol/L koncentrációban).

Immunohisztokémia

A szívbillentyű szöveteket formaldehiddel fixáltuk egy napon keresztül, majd TRIS pufferrel, majd paraffinba ágyaztuk. Ezt követően a tárgylemezre készített metszeteket paraffin-mentesítettük xilolban 5 percig, majd újrահidratáltuk. Az optimális immunohisztokémiai eredmény eléréséhez a metszeteket peroxidáz-blokkoló reagenssel kezeltük további 5 percig (3% hidrogén-peroxidot használtunk az endogén peroxidáz aktivitás blokkolására). Az antigén visszanyerését, egy epitóp-visszanyerő oldatban (Leica RE-7113) végeztük, pH = 6,

nagy nyomás alatt (IDA Avair 6 L magasnyomású főző). Az ALP-H-ferritin kettős immunfestést; az ALP-CSE vagy az α -SMA-CSE duplafestést EnVision FLEX / HRP rendszerrel végeztük. Az első IHC-festést követően, amely az EnVision FLEX / HRP detektálási lépéssel lezárult, inkubálást végeztünk a másodlagos monoklonális antitesttel. A DAB (barna szín) mellett VIP kromogént használtuk a második IHC reakció más színnel történő (sötét ibolya) kiemelésére. A kettős festéssel jelölt kísérletekhez metil-zöld ellenfestést végeztünk. A mintákat a következő primer antitestekkel inkubáltuk: nyúl, anti-humán ALP antitesttel (Abcam; ab65834; 1000 ng/mL); egér, anti-humán H-ferritin antitest (Santa Cruz; sc376594; 400 ng/ml). Egyéb IHC-festéseket a következő antitestekkel végeztünk: nyúl, anti-humán TNF- α (Thermo Fisher Scientific; PA5-19810; 400 ng/mL); nyúl, anti-humán IL1- β (Invitrogen; 17h18116; 400 ng/mL); nyúl, anti-humán CSE 1: 600 hígításban (Proteintech, 12217-I-AP); nyúl, anti-humán CBS 1: 600 hígításban (Proteintech, 14787-I-AP). Az antitest kötődést a Super Sensitive TM One Step Polymer-HRP IHC detektáló rendszer segítségével jelenítettük meg. Az antitestek expressziójának intenzitását és eloszlását fénymikroszkóp alatt (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420 kamera és Leica Application Suite V3 szoftver, Wetzlar, Németország) detektáltuk. Az IHC minták ALP és H-ferritin kolokalizációját Image J szoftverrel határoztuk meg.

Immunohisztokémia egér szívbillentyűkből

A szöveteket egy napig formaldehidben fixáltuk, majd TRIS pufferrel rögzítettük és paraffin viaszba ágyaztuk. Ezt követően a metszeteket xilolban paraffin-mentesítettük, majd újr hidratáltuk. A mintákat a következő primer antitestekkel inkubáltuk: anti-CSE antitest 1: 1000 hígításban (Proteintech, 12217-I-AP), anti-SMA antitest 1: 1000 hígításban (Santa Cruz; sc-32251). Az antitest kötődést a Super Sensitive TM One Step Polymer-HRP IHC detektáló rendszer jelenítette meg. Kromogénként folyékony DAB (BG-QD630-XAKm BioGenex) reagenst adtunk a mintákhoz. Az antitestek expressziójának intenzitását és eloszlását fénymikroszkóppal (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420 kamera és Leica Application Suite V3 szoftver, Wetzlar, Németország) határoztuk meg.

LDH citotoxicitás vizsgálat

A tanulmányban végzett kezelőközegek lehetséges citotoxicitását Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific) segítségével vizsgáltuk a gyártó utasításainak megfelelően.

Statisztikai analízis

Az adatokat a GraphPad Prism 5.02 szoftver (GraphPad Software Inc., 7825 Fay Avenue, Suite 230 La Jolla, CA 92037) segítségével elemeztük. Az összes statisztikai adatot középérték \pm SEM-ben fejeztük ki. Normalitási tesztet és/vagy variancia-tesztet, Student-féle t-tesztet, illetve Bonferroni post hoc teszteket végeztünk One Way ANOVA rendszerben. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. rész

Vas, D3T és apo-ferritin (AF) szerepe az intersticiális sejtek mineralizációjában

Korábbi kutatásaink alapján, ahol a H-ferritin indukciója gátolta az érrendszeret alkotó simaizom sejtek osteoblasztos transzformációját (Zarjou A; (2009)), megvizsgáltuk, hogy a H-ferritin intracelluláris szintjének emelkedése hasonló hatással van-e a szívbillentyűket alkotó VIC sejtek mineralizációjára. H-ferritin expressziójának indukálására vasat és D3T-t használtunk VIC sejteken. A kalcifikációs tápközeg önmagában szignifikánsan növelte a VIC sejtek extracelluláris kalciumtartalmát. A vas és a D3T dózisfüggő módon szignifikánsan csökkentette az extracellulárisan megjelenő kalcium mennyiségét, valamint az osteokalcin expresszióját. Az apo-ferritin (vas nélkül) szintén gátolta az extracelluláris kalcium lerakódást és a VIC sejtek osteokalcin szintjének emelkedését. Ezeket a megfigyeléseket Alizarin Red S festés is alátámasztotta. Méréseink igazolták korábbi megfigyeléseink eredményeit, miszerint a kalcifikációs tápközeg H-ferritin, vas, D3T vagy apo-ferritinnel történő kiegészítése megakadályozza a kalcium lerakódását és az osteokalcin expresszióját, azaz a VIC sejtek mineralizációjának kialakulását, ahogyan a vas, apo-ferritin vagy D3T expozíció után a megemelkedett H-ferritin- expresszió is mutatja. A H-ferritin gátló szerepének további megerősítésére a VIC sejteket H-ferritin ellenes siRNS-sel transzfektáltuk. H-ferritin siRNS jelenlétében a vas vagy a D3T nem gátolta a kalcifikációt, amint azt a kalcium és az osteokalcin felhalmozódása tükrözi. Annak igazolására, hogy a ferritin/ferroxidáz aktivitás kiemelkedő szerepet játszik a mineralizáció gátlásában, egy másik fehérjét használtunk, amely szintén rendelkezik ferroxidáz aktivitással, nevezetesen a ceruloplazmin. A ceruloplazmin vagy a H-ferritinnel történő expozíció gátolta a VIC sejtek kalcifikációját, ezt tükrözi az extracelluláris mátrix csökkent kalciumtartalma, és az Alizarin Red S festés is igazolja. A H-ferritin, vas vagy D3T általi indukciója egészséges alanyokból származó VIC sejtekben, valamint rekombináns H-ferritin adására, de nem mutáns H-ferritin²²²-re (amely nem rendelkezik ferroxidáz aktivitással), megakadályozta a VIC sejtek mineralizációját.

Insufficiens és stenotikus aorta billentyűkből származó VIC sejtek kalcifikációs potenciálja

Ezután megvizsgáltuk, hogy a VIC eredete (insufficiens (AI) vagy a stenotikus aortabillentyűkből származó (AS)) befolyásolhatja-e ezen sejtek kalcifikációs potenciálját. A stenotikus aorta billentyű szövetből (AS) származó VIC sejteknek nagyobb az osteoblaszt-szerű sejtekké történő transzdifferentiálódási képessége, amelyet az extracellulárisan lerakódó kalcium magasabb szintje és az osteokalcin megemelkedett expressziója jelez. Ezen felül azt találtuk, hogy a vas és az apo-ferritin gátló hatása a mineralizáció során jobban kifejeződött az AI eredetű szívbillentyű sejtekben, mint az AS eredetű VIC-ben. Érdekes, hogy a vas expozíció gátló hatása elenyésző a mineralizációt illetően AS VIC sejtekben, az AI VIC-hez képest, azonban az apo-ferritin-kezelés gátolhatja a meszesedést, függetlenül a szívbillentyű

kalcifikációjának mértékétől. Ennek magyarázata az apo-ferritin magas koncentrációja lehet, és arra utalhat, hogy a jelentősen magasabb vasszint hasonló hatást fejthet ki AS eredetű VIC sejtek osteoblasztos transzformációjában. Az osteokalcin, az osteoblasztos aktivitás fontos markere, mely szintén megerősítette a fenti megállapításokat, és szintjei azt sugallták, hogy az apo-ferritinnek kifejezettebb gátló hatása van az osteoblasztos transzformációra, mint vas esetén.

A vas, az apo-ferritin és a D3T hatása a RUNX2 transzkripció faktor lokalizációjára

A runt-realted transzkripció faktor 2 (RUNX2) az osteoblaszt aktivitás kulcsfontosságú meghatározója (Komori T, (1997)), és szerepet játszik a vaszkuláris mineralizáció patogenezisében (Steitz SA, (2001)). Ezért megvizsgáltuk, hogy a VIC osteoblasztos differenciálódásának ferritin általi szabályozása a RUNX2 modulálásán keresztül történik-e. A tenyésztett VIC sejteket immunocitokémiai és Western blot analízissel vizsgáltuk, melynek során a kalcifikációs közegben tartott sejtekben RUNX2 nukleáris transzlokációját figyeltük meg. Vassal, apo-ferritinnel vagy D3T-vel történő kezelés esetén viszont a RUNX2 transzlokációja a magba nem történt meg. Ezen kívül a RUNX2 lokalizációját AS billentyűből származó VIC sejtekben immunfestéssel, és az AS szívbillentyűkből származó teljes proteinnal is vizsgáltuk az AI szívbillentyűkkel összehasonlítva. Megállapítottuk, hogy a RUNX2 az AS szövetekben a sejtek nukleáris régiójában található. Ezzel szemben az AI-ből származó VIC-ben a RUNX2 nucleuson kívül helyezkedik el. A H-ferritin géncsendesítés a RUNX2 fokozott transzlokációját eredményezte a sejtmagba, igazolva ezzel a ferritin/ferroxidáz rendszer fontosságát a valvuláris mineralizációban.

Sox9 a valvuláris mineralizációban

Korábbi kutatás a RUNX2 transzkripció faktor úgy mutatja be, mint a Sox9 antagonistája VIC sejtekben (Cheng A, (2010)). A Sox9 lokalizációját immunocitokémiai és Western blot analízissel vizsgáltuk VIC sejtekben. A növekedési mediában tenyésztett sejtekben a Sox9 a sejtmagban volt megfigyelhető, míg a kalcifikációs körülmények között tenyésztett VIC sejtek sejtmagjában a Sox9 alig volt kimutatható (3A és 3B ábra). Ezzel szemben a Sox9 nukleáris lokalizációját fenntartottuk olyan sejtekben, amelyeket vas, apo-ferritinnel és D3T-vel kiegészített meszesedési tápközegben tenyésztettünk. Ezenkívül AS szívbillentyűket is gyűjtöttük, amelyekben makroszkóposan is megfigyelhető volt a mineralizáció az AI eredetű szívbillentyű szövetekkel ellentétben. A Western blot analízis a Sox9 nukleáris lokalizációját mutatta az AI-ből származó billentyűkben. Ezzel szemben, az AS szívbillentyűkben a Sox9 sejtmagi lokációja elenyésző mértékben volt detektálható.

Vas, apo-ferritin, D3T és H-ferritin szerepe a VIC sejtek foszfát felvételére

Jono és Fukita et al., munkájukban kimutatták, hogy a RUNX2 nukleáris transzlokációját az intracelluláris foszfát szint szabályozza (Jono S, (2000); Fujita T, (2001)). Annak vizsgálatához, hogy a H-ferritin valóban befolyásolja-e az intracelluláris foszfát szintet, VIC

sejteket növekedési vagy kalcifikációs, vagy vassal, apo-ferritinnel vagy D3T-vel kiegészített tápközegben tartottuk. Azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan alacsonyabb az intracelluláris foszfát szint a vassal, apo-ferritinnel vagy D3T-val kezelt sejtekben, mint a csak mineralizációs körülmények között tartott VIC sejtekben. Fontos megjegyezni, hogy a lizoszómális foszfát szintjét vas expozíció hatására szintén csökkenteni tudtuk a kontroll szintjére, a kalcifikációs közegben tenyésztett VIC sejtekhez képest. Ennek megfelelően a Pit1 (a foszfát-transzportért felelős membránhoz kapcsolódó csatornák) expressziója a VIC vassal, apo-ferritinnel vagy D3T-vel történő kezelése után csökkent. Ezenkívül a Pit2 expressziója is csökkent H-ferritin indukció hatására. Az exogén H-ferritin adására szintén csökkent a Pit1 fehérje expressziója AS szövetekből származó VIC sejtekben.

H-ferritin asszociált foszfát lizoszómális lokalizációja

Az apo-ferritin is képes vas tárolására, vas-oxi-hidrofoszfát-komplex formájában akár 2250 és 3800 atomot is (de Silva D, (1993)). A vas és a foszfát mennyisége a ferritin magjában nem függ össze annak alegység-összetételével. Megfigyeltük, hogy LAMP1 (lizoszóma marker) és H-ferritin kettős immunfestés esetén a két marker lizoszómálisan maximális kolokalizációt mutatott. Ezen kívül a fuzionált lizoszómákban a ferritin jelentős felhalmozódása figyelhető meg. A fenti megállapítás megerősítésére lizoszómákat izoláltunk tenyésztett és kezelt VIC sejtekből, és H-ferritin / LAMP1 kettős festéssel vizsgáltunk különböző körülmények között: a tápközegben; önmagában kalcifikációs tápközegben, vagy vassal kiegészítve. A vassal kezelt sejtek lizoszómáiban markáns H-ferritin-szint emelkedést mutattunk ki, amelyre a H-ferritin és a LAMP1 együttes lokalizációja mutatott rá.

Az extracelluláris pirofoszfát szerepe a szívbillentyűk meszesedésének gátlásában

A pirofoszfát (PPi) szintén kulcsfontosságú inhibitora a mineralizációnak azáltal, hogy kötődik a kialakuló hidroxipatit-kristályokhoz (Fleisch H, (1962); Terkeltaub RA, (2001)). Ezért megvizsgáltuk a pirofoszfát szintjének változásait kalcifikációs közegben. A vas / apo-ferritin / D3T kezelés szignifikánsan növelte a pirofoszfát szintjét, szemben a mineralizációs tápfolyadékban tartott VIC sejtekhez képest. Az ENPP2 a pirofoszfát fő termelő ektoenzime; kíváncsiak voltunk, hogy vajon az ENPP2 expressziója korrelál-e a PPi-szinttel. A PPi-hez hasonlóan, az ENPP2 expressziójának csökkenését figyeltük meg kalcifikációs körülmények között. Az ENPP2 emelkedett expressziója és a magasabb PPi-szint a vas, apo-ferritin és D3T-val kezelt VIC sejtekben megfigyelhető volt, ellentétben a kalcifikációs tápfolyadékban tenyésztett sejtekkel. VIC sejtek H-ferritinnel történő kezelése szintén növelte az AS szövetekből származó sejtek ENPP2 fehérje expresszióját. Hogy megerősítsük a H-ferritin fontosságát a pirofoszfát képződés szabályozásában, VIC sejteket transzfektáltuk a H-ferritin siRNS-sel. H-ferritin siRNS jelenlétében a hozzáadott vas és a H-ferritin sem tudták megemelni a PPi szintjét. Az Ankyrin G1 fehérje expresszióját a ferritin nem változtatta meg.

H-ferritin és ALP expresszió AS szívbillentyűkben

A fenti eredmények alapján, kíváncsiak voltunk, hogyan alakul a H-ferritin expressziója VIC sejtekben, CAVD állapotban. H-ferritin Western blot analízist végeztünk AS és AI szívbillentyűk szöveti lizátumaiból. Az AS billentyűkből származó mintákban szignifikánsan magasabb H-ferritin szintet detektáltunk, az AI mintákhoz képest. CAVD mintákban a kettős, ALP-H-ferritin immunohisztokémiai vizsgálatok is látványosan igazolták hipotézisünket: az ALP + és H-ferritin + sejteket figyelhettünk meg a szívbillentyű endotél rétegei felől indulva egészen a teljesen meszes, kalcifikációs gócgig. A mineralizált területtől távolabb eső részeken több H-ferritin +, és kevesebb ALP+ festődést figyeltünk meg a sejtekben, az arány 2,3: $1 \pm 0,41$. Az ALP és a H-ferritin expressziója fokozatos növekedést mutatott a kalcifikációs góc irányába, a H-ferritin és az ALP aránya az AS szövet meszes zónájában $0,6 \pm 0,15$ -re csökkent. Az AI szövetekből származó szívbillentyűkben az ALP és a H-ferritin pozitívan festődő sejtek aránya mérsékelt és egyenletesen eloszló volt. H-ferritin és az ALP aránya 2,2: $1 \pm 0,65$.

Az AS billentyűkben a megemelkedett H-ferritin szerepe, vas felhalmozódása nélküli gyulladáshoz vezető folyamatokban

Korábbi eredményeink felvetették a kérdést, hogy vajon a megnövekedett H-ferritin expressziót vas expozíció okozza-e. A kérdés megválaszolásához az AS billentyűket Prussian Blue (vasfestés)-val festettük, és azt találtuk, hogy az erősen mineralizált területek körül elenyésző a vas mennyisége. Torti et al. korábban kimutatták, hogy a gyulladáshoz vezető citokinek magas expressziója vas jelenléte nélkül képes megemelni a H-ferritin expresszióját (Torti SV, (1988); Tsuji Y, (1991)). Mindemellett, a gyulladás is fontos szerepet játszik a CAVD progressziójában (Rajamannan, (2011)). Mindezek okán immunohisztokémiai vizsgálatokat és Western blot analízist végeztünk gyulladáshoz vezető markerek, TNF- α és IL1- β tekintetében, egészséges emberi szívbillentyűkből és AS szöveteken. Fontos megfigyelésünk, hogy a megemelkedett H-ferritin expresszió valóban alátámasztja a gyulladáshoz vezető citokinek, TNF- α és IL1- β megnövekedett fehérje szintjét az AS szövetekben, az egészséges aorta billentyűkhöz képest.

H-ferritin funkciója az AS szövetekből származó VIC sejtek gyulladáshoz vezető folyamataiban

Annak tesztelésére, hogy a ferritin / ferroxidáz rendszer képes-e gátolni a gyulladás kialakulását CAVD-ben, AS-szövetekből származó VIC-sejteket kezeltünk H-ferritinnel. Megállapítottuk, hogy H-ferritin expozícióval gátolható a TNF- α és IL1- β gyulladáshoz vezető markerek expressziója.

2. rész

A H₂S szerepe a szívbillentyűket alkotó intersticiális sejtek mineralizációjában, *in vitro*

Különböző H₂S donorok hatásait vizsgáltuk humán aorta billentyűkből izolált intersticiális sejtek mineralizációs folyamataiban. A sejteket kalcifikációs közegben tenyésztettük, amely tápfolyadék (D-MEM) 2,5 mmol/L szervetlen foszfátot és 1,8 mmol/L kalcium-kloridot tartalmazott. A VIC sejteket H₂S-sel kezeltük: egyszerű NaSH és Na₂S szulfid-sókkal, amelyek a pH-függvényében instant módon kénhidrogént szabadítanak fel; valamint új, kénhidrogént lassan felszabaduló szulfid-donorokkal (AP67 és AP72, GYY4137). Ahogyan vártuk, a VIC sejtek osteoblasztos transzformációja kalcifikációs környezetben bekövetkezett, amelyet extracelluláris kalcium felhalmozódása, valamint osteokalcin és fokozott ALP expresszió jelez. A kísérletben használt kénhidrogén donorok dóziszfüggő módon csökkentették az extracellulárisan lerakódó kalcium mennyiségét. A NaSH maximális, kalcifikációt gátló hatása 150 µmol/L, Na₂S és GYY4137 100 µmol/L koncentrációban volt a leghatékonyabb, míg az AP67 már 50 µmol/L koncentrációnál gátolta a kalcifikációt. A H₂S donorok közül az AP72 bizonyult a leghatékonyabb kalcifikációs gátlószernek, már 20 µmol/L koncentráció mellett szignifikáns ALP és osteokalcin szint csökkenés volt detektálható. Mindemellett az AP72, kísérleteinkben használt dózisa nem fejtett ki citotoxikus hatást VIC sejteken. A mineralizációs folyamatok gátlásában mindegyik donormolekulánál jellegzetes „U” alakú görbét figyeltünk meg. Az összes H₂S donor a fentiekben megadottnál magasabb koncentrációkban történő alkalmazása a kalcifikáció gátló hatás koncentrációfüggő csökkenését eredményezte. Ezekből a mérésekből kiválasztottuk a leghatékonyabb H₂S donort (AP72) további vizsgálatok céljából, hogy feltárjuk azt a mechanizmust, amellyel a H₂S szabályozza/szabályozhatja a szívbillentyűk meszesedési folyamatait.

Korábbi munkacsoportok már kimutatták, hogy a fenolnak H₂S kötő hatása van (Huang et al., (2017)), ezért a fenol kénhidrogén kötő képességének vizsgálatára az AP72 donormolekulát fenolred-mentes közegben alacsonyabb koncentrációban alkalmaztuk VIC sejteken mineralizációs közegben. Fenolred mentes mediában alkalmazott AP72 donormolekula jóval kisebb koncentrációban is (2 nmol/L- 5 µmol/L) szignifikánsan gátolta a VIC sejtek mineralizációját; ezzel párhuzamosan az osteokalcin felhalmozódását és a foszfát felvételét. Az alkalikus foszfátáz és az Alizarin Red S festés az AP72 kalcifikáció gátló hatását szintén igazolta 2 nmol/L koncentrációnál. A kénhidrogén donormolekulák leghatékonyabb osteoblasztos transzformációt gátló koncentrációja nem okozott citotoxicitást VIC sejteken.

Az AP72 expozíció hatása VIC sejteken a RUNX2 foszfát által kiváltott nukleáris transzlokációjára

A RUNX2 az érrendszer simaizomsejtjeinek és a VIC korai osteoblasztos differenciálódásának kulcsfontosságú transzkripciós faktora. Kíváncsi voltunk, hogy az AP72 kezelés a mineralizációt előidéző tápközegben tenyésztett VIC sejteken befolyásolja-e a RUNX2 lokalizációját. Immunofluoreszcens festés alapján azt találtuk, hogy a RUNX2 a VIC sejtek citoplazmájában lokalizálódik. VIC magas foszfáttal történő expozíciója a RUNX2 transzlokációját eredményezte a sejt citoplazmájából a sejtmagba. Immunofluoreszcens

megfigyelésünk alátámasztására a RUNX2 transzlokációját Western blot analízissel is megvizsgáltuk izolált citoplazma és magfrakciók felhasználásával. Megállapítottuk, hogy kalcifikációs közegben a RUNX2 a sejtmagba transzlokálódott, miközben a citoplazmában lévő mennyisége csökkent. AP72 kezelés hatására kalcifikációs közegben a RUNX2 magi transzlokációja nem következett be.

A RUNX2 lokalizációját human, kalcifikált (AS) és meszesedés nélküli szívbillentyűkben is megvizsgáltuk. Konfokális mikroszkópia és a Western blot analízis is azt az eredményt adta, hogy humán AS eredetű billentyűkben a RUNX2 egyöntetűen a sejtmagban található. AI szívbillentyűkben ennek ellenkezőjét tapasztalattuk, a RUNX2 citoplazmatikus lokalizációjú volt. Fontos megjegyezni, hogy a túl magas koncentrációban alkalmazott kénhidrogén donorok, és az AP72 200 $\mu\text{mol/L}$ -es expozíciója ugyanúgy a RUNX2 nukleáris transzlokációját segíti elő a citoplazmából.

A PPI-termelés változása endogén H_2S hiányában és jelenlétében

A PPI ismert, anti-kalcifikációs molekula, amelynek expresszióját az ENPP2 és az ANK1 szabályozzák. Ennek értelmében megvizsgáltuk, hogy a H_2S hatással van-e a PPI-termelésre, valamint az ENPP2 és ANK1 expressziójára VIC sejtekben. Az ENPP2 expressziójának csökkenését tapasztaltuk kalcifikációs közegben tenyésztett VIC-ben a kontrollhoz képest. A sejtek AP72-vel történő expozíciója megszüntette ezt a hatást; az ENPP expresszió szignifikánsan megemelkedett a kontroll sejtekben megfigyelt szinthez képest is. A mineralizációs körülmények között növesztett VIC sejtekben az ANK1 fehérje szintje nem változott a kontrollhoz képest. Ezzel szemben az AP72 kezelés ANK1 expressziót indukált, mind mRNS, mind pedig fehérje szinten. Következésképpen a generált PPI mennyisége csökkent kalcifikációs körülmények között VIC sejtekben, míg az AP72 kezelést követően a PPI-termelés szignifikáns növekedését detektáltuk. A GYY4137 és az AP67 donormolekulákat szintén teszteltük VIC sejteken PPI vonatkozásában. Ezek a H_2S donorok kevésbé emelték meg a PPI-szintet az AP72-höz képest. A gyors H_2S -felszabadító molekulák (NaSH és Na_2S) csak a kontroll értékhez közelítő mértékig voltak képesek növelni a PPI expresszióját. Humán szívbillentyűk teljes fehérjelizátumából is elvégeztük az ENPP2 és PPI szintek vizsgálatát; eredményeink alapján pedig az AS szövetekből származó mintákban szignifikánsan alacsonyabb ENPP2 expressziót és alacsonyabb PPI szintet detektáltunk az AI mintákhoz képest.

A CSE és CBS fehérjeszintű változásai VIC sejtek mineralizációjában

Az endogén H_2S anti-kalcifikációs hatásainak vizsgálatához az endogén kénhidrogén termelésért felelős enzimet: CSE silencingeltük siRNS-sel. Eredményeink alapján a CSE silencingje nem okozott szignifikáns kalcium felhalmozódást VIC sejtekben. Azonban a CSE géncsendesítése CBS expressziójának növekedését eredményezte, amely egy másik, piridoxál-5'-foszfát (PLP vagy B6 vitamin) függő transzulfurációs enzim, és ugyancsak részt vesz az endogén H_2S termelésében. Ennek okán mind a CSE és CBS géneket is silencingeltük, hogy megvizsgáljuk, hogy az extracelluláris mátrixban a kalcium lerakódást befolyásolja-e. Eredményeink alapján a CSE és a CBS együttes silencingjével a mineralizáció

szignifikáns növekedését eredményezte VIC sejtekben. Ami arra utal, hogy a transzszulfurációs utak valószínűleg szabályozzák a mineralizációs mechanizmusokat. Ezután farmakológiai inhibitorokkal is végeztünk kísérleteket: CSE (PPG), CBS-sel (AOAA) együttes expozíciójával vizsgáltuk VIC sejtek osteoblasztos transzformációját. Megállapíthatjuk, hogy a CSE és CBS együttes farmakológiai gátlása szintén növeli az extracelluláris kalcium felhalmozódását VIC-ben. Ezen felül mindhárom szintetikus inhibitor CSE (PPG), CBS (AOAA) és 3-MST (KGA) külön-külön és egymással kombinálva is megvizsgáltuk kalcifikációs közegben. Az AOAA + PPG; AOAA + LKGS és PPG + LKGS farmakológiai inhibitorok szintén szignifikánsan csökkentették a H₂S termelést VIC sejtekben. Érdekes módon a CSE és CBS együttes silencingje, a RUNX2 nukleáris transzlokációját nem befolyásolta a kalcifikációs közegben. Ezenkívül megfigyeltük, hogy az első és a harmadik napon hogyan alakul a VIC sejtek mineralizációja. Az első napon nem találtunk szignifikáns változást a kalcium mennyiségében, viszont a harmadik napra a kontroll mintához képest szignifikáns kalcium tartalom emelkedés volt megfigyelhető a kalcifikációs kontroll közeghez képest. Ezzel szemben a CSE / CBS siRNS-sel silencingelt VIC sejtekben szignifikánsan megnövekedett extracelluláris kalciumtartalmat detektáltunk már az első napon. Az mineralizáció harmadik napjára dupla silencingelt mintákban még robosztusabb kalcium akkumuláció volt megfigyelhető. A VIC sejtek H₂S termelése mineralizációs közegben lecsökkent, a CSE/CBS kettős silencingje azonban tovább csökkentette az endogén kénhidrogén szintjét. Végül megvizsgáltuk a 3-MST expressziót CSE/CBS siRNS-sel kezelt VIC sejtekben. Eredményeink alapján a CSE/CBS dupla silencing csökkentette a 3-MST fehérje expresszióját.

A kénhidrogén és a foszfátfelvétel kapcsolata VIC sejtek mineralizációjában

A sejt foszfátfelvétele kulcsfontosságú a mineralizáció folyamatában, ezért az intracelluláris foszfátszint alakulását vizsgáltuk VIC sejteken, ahol megfigyeltük, hogy a kalcifikációs tápközegben tenyésztett sejtek foszfátfelvétele szignifikánsan megemelkedett a növekedési mediában tartott sejtekhez képest. A VIC AP72-vel való kezelése csökkentette a sejtek foszfátfelvételét. A foszfátfelvétel AP72 általi gátlásának magyarázata érdekében megmértük a foszfátszintet (Pit1; Pit2) fehérje expresszióját kalcifikációs közegben és/vagy AP72 jelenlétében. Méréseink alapján az AP72 nem befolyásolta a Pit1 és Pit2 csatornák expresszióját. Feltételezzük, hogy ezeknek a csatornáknak a szulfid által indukált transzlációs módosítása befolyásolhatja a foszfát felvételét. A hipotézis alátámasztására vagy cáfolására irányuló mérések folyamatban vannak.

H₂S generáció és CSE expresszió humán aorta billentyűkben

Az emberi szervezetben a CSE az egyik fő endogén kénhidrogén termelő enzim. CSE expresszióját Western blot analízissel vizsgáltuk humán AS és AI szívbillentyű szöveti lizátumaiból. AS szívbillentyűkben, ahol masszív meszesedés volt megfigyelhető, magasabb CSE expressziót találtunk, az AI eredetű, meszesedés nélküli mintákhoz képest. Ezzel szemben a szulfidszintek (amely Zn²⁺ által lúgos körülmények között kicsapható a szívbillentyűk szöveti lizátumaiból), szignifikánsan alacsonyabbak voltak a meszes AS

billentyűmintákban, mint a meszesedés nélküli AI billentyűkben. CSE lokalizációja céljából kettős immunohisztokémiai festést (CSE-SMA és CSE-ALP) végeztünk, szintén AI és AS billentyűkben. AS szövetben kevesebb SMA + és több CSE + sejt volt detektálható, mint AI szövetekben. Az ALP-CSE kettős festés esetében az AS billentyű metszetekben magas CSE expresszió mellett ALP + sejtek is megfigyelhetők voltak, míg az ALP + sejteket az AI billentyűkben nem találtunk. Összességében megállapíthatjuk, hogy a VIC sejtek osteoblasztos transzformáció irányába mutatott potenciálja függ a VIC eredetétől. Ugyanazon kísérleti körülmények között az AS billentyűkből származó VIC sejtek korábban kalcifikálódtak, mint az AI VIC sejtjei. Az AI billentyűkben detektált magasabb CSE-szintet későbbi kalcifikáció kísérte.

A H₂S szerepe apolipoprotein E deficiens egerekben szívbillentyűinek meszesedésében

A Von Kossa festés alapján a magas zsírtartalmú étrenden tartott ApoE^{-/-} egerek aorta billentyűiben meszes gócok jelentek meg, szemben a normál diétán tartott ApoE^{-/-} egerekkel, ahol a szívbillentyűk meszesedése nem volt megfigyelhető. A H₂S mineralizáció gátló hatásának *in vivo* igazolására intraperitoneálisan AP72-t (266 umol / testtömeg kg) adtunk és vizsgáltuk a szívbillentyűk meszesedését, magas zsírtartalmú étrend mellett. Eredményeink alapján az AP72 szignifikánsan gátolta a szívbillentyűk meszesedését, illetve annak kialakulását, valamint az extracelluláris mátrix expanszióját. Hasonlóan, a humán aorta stenozishoz, a magas zsírtartalmú étrenddel táplált egerek meszes aortabillentyűiben a CSE + sejtek mennyisége megnövekedett, a normál étrendű egerek szívbillentyűihez képest. Következésképpen, a magas zsírtartalmú étrenden tartott egerek aorta billentyűiben mérhető teljes CSE expresszió csökkenthető a H₂S exogén pótlása által. Az alfa-SMA festés pedig igazolta, hogy az AP72 kezelés fenntartja az egerek aortabillentyűit alkotó intersticiális sejtek fenotípusát.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban bemutatott tanulmányok két különféle, a CAVD progressziója szempontjából rendkívül fontos molekulákat mutatnak be. Az 1. részben laboratóriumunk korábbi eredményeire összpontosítottuk, melynek célja, hogy megértsük a ferritin / ferroxidáz gátló szerepének molekuláris mechanizmusát a magas foszfáttal indukált CAVD-ben. Eredményeink arra utaltak, hogy a ferritin / ferroxidáz nem csupán a kardiovaszkuláris mineralizáció hatékony gátlója, hanem különféle gyógyszerek, például a D3T által exogén módon indukálható. A 2. részben szintén egy, laborunk korábbi munkájának megállapítása található: az endogén H₂S szint mineralizációs körülmények között csökken. Az endogén H₂S szint és a meszesedés közötti kapcsolat kevésbé ismert, viszont az utóbbi években kutatott terület. Munkánkban célunk volt részletesebben megvizsgálni a H₂S szerepét magas foszfát által kiváltott szívbillentyű mineralizációban. Eddigi eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a H₂S endogén szintje a CAVD előrehaladtával csökken, mely feltehetőleg a H₂S-t termelő CSE enzim strukturális módosulásával magyarázható (Bibli, Hu et al. (2019)). A szervezetben kialakuló kénhidrogén-deficiencia pótolható kénhidrogént felszabadító donor molekulákkal, amelyek a jövőben mint lehetséges terápiás gyógyszerek válhatnak elérhetővé (Sikura, Potor et al. (2019)). A dolgozat témájául szolgáló két közlemény az első olyan munkák, amelyek két különböző molekula mechanizmusába nyújtanak betekintést ugyanabban a klinikai állapotban (CAVD), valamint elsőként kínálnak új gyógyszerészeti lehetőségeket, innovatív terápiás módszereket a CAVD és a kardiovaszkuláris megbetegedések gyógyításában.

A vas homeosztázis / H₂S egyensúly és a szívbillentyűk meszesedése közötti kapcsolatot még nagyon kevesen vizsgálták, és a szívbillentyű mineralizáció patomechanizmusának ismerete még gyerekcipőben jár. Noha a legtöbb kardiovaszkuláris megbetegedés, jelen esetekben a kardiovaszkuláris rendszer mineralizációja a szervezet vasháztartásának felborulása és/vagy H₂S hiány következtében alakul ki, a terápiás kezelés hiányában a CKD-ben vagy CAVD-ben szenvedő betegeknél a vese vagy a szívbillentyűk (vagy mindkettő) transzplantációja a legtöbb esetben elkerülhetetlen. Vas esetében a CKD-s betegekben a retikuloendoteliális sejtekben vas felhalmozódása figyelhető meg, amelyet magasabb ferritin szint kísér a plazmában. Ez a növekedés a retikuloendoteliális sejtek vas szekréciójának következménye, mely által a vas hozzáférhetősége a többi sejt számára szignifikánsan alacsonyabb. Ez a mechanizmus az intracelluláris ferritin kimerülését és krónikus, gyulladással járó betegség kialakulását és az ezt követő vérszegénységet eredményezi. Megfigyeléseink első részében összefoglaltuk, hogy a vas metabolizmusának rendellenessége nagymértékben hozzájárul a magas foszfát indukált szívbillentyű-kalcifikáció kialakulásához. A D3T orálisan adagolt terápiájával azonban (ferroxidáz rendszer indukciója) a szívbillentyűk/szív-érrendszer meszesedése megelőzhető.

A tanulmány második részében demonstráltuk, hogy a CAVD kialakulása során a szervezet endogén kénhidrogén ellátása szenved zavart. Meszes humán szívbillentyűkben a H₂S képződésében tapasztalt deficienciát a CSE enzim magas szintű expressziója kísérte. Számos tanulmány kimutatta, hogy a H₂S termelés hiánya szívbetegségek kialakulásához vezet, ahogy azt, a szívkoszorúér betegségben szenvedő betegek plazmájában mérhető alacsonyabb H₂S

szintje is jelzi (Jiang, Wu et al. (2005);(Shen, Shen et al. 2015)). A H₂S hiánya exogén módon pótolható egy, a Lawesson reagensből és morfolin reakciójából származtatható, új generációs, lassú kénhidrogén felszabadulást biztosító vegyületek által (GY4137). A GY4137 protonációs reakciója pedig még stabilabb H₂S-felszabadító vegyületeket eredményez, mint például AP67 és AP72. Habár a valvuláris kalcifikáció és az endogén H₂S homeosztázis közötti kapcsolat kevésbé ismert, bemutatott eredményeink egy másik szempontból megközelíthető stabil terápiás eljárást kínálnak CAVD gyógyításában. Nem utolsósorban eredményeink azáltal hogy részletes betekintést nyújtanak a CAVD patogenezisébe, új lehetőségeket kínálnak a vas- és/vagy az endogén kénhidrogén hiány okozta klinikai kardiovaszkuláris állapotok kialakulásának megelőzéséhez vagy csökkentésére irányuló jobb tervezési stratégiák kifejlesztéséhez.

Új eredmények

1. A H-ferritin/ferroxidáz vas vagy 3H-1,2-ditioil-3-tion (D3T) által indukálva gátolja a human szívbillentyűk intersticiális sejtjeinek mineralizációját, osteoblasztos differenciációját.
2. A H-ferritin elősegíti a Sox9 transzkripció faktor nukleáris transzlokációját, azáltal, hogy csökkenti a RUNX2 nukleáris felhalmozódását.
3. A H-ferritin gátolja a szívbillentyű sejtek foszfátfelvételt és a lizoszómális foszfát-felhalmozódást azáltal, hogy csökkenti a foszfát csatornák expresszióját; a H-ferritin foszfátkötő képessége által a ferritin-foszfát komplexet lizoszómálisan lokalizálja, valamint fokozza a pirofoszfát képződést az ENPP2 indukciójával.
4. A stenotikus aorta billentyűk szövettani elemzése igazolta a H-ferritin magas expresszióját és relatív dominanciáját az ALP felett, azokban a régiókban, ahol mineralizáció nem volt detektálható.
5. A H-ferritin csökkenti a gyulladási markerek (TNF- α és IL1- β) expresszióját a humán AS szívbillentyűkből származó VIC sejtekben.
6. CSE és CBS eredetű H₂S és a kénhidrogént felszabadító donormolekulák gátolják az aorta billentyűk mineralizációját.
7. Az anti-kalcifikációs hatások a foszfátfelvétel gátlásával, a RUNX2 nukleáris transzlokációjának megakadályozásával, a pirofoszfát szintjének megemlése által valósulnak meg.
8. H₂S felszabadító donorok és a CSE / CBS eredetű H₂S terápiás potenciállal rendelkeznek

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Örökké hálás leszek Mentoromnak, Balla József Professzor Úrnak. Képzésem során nyújtott támogatása, ismereteinek gazdagsága és mentorálása felbecsülhetetlen értékű mind a mai napig, emberileg és fiatal kutatóként is. Amellett, hogy páratlan lehetőségeket biztosít számomra a tudomány élvezetére, emberséges és alázatos mentorálásával nap, mint nap példaképként szolgál, hogy még jobb kutató válhasson belőlem.

Sok éves köszönetemet szeretném kifejezni Szerafin Tamás Professzor Úrnak, aki életmentő munkája mellett alázattal és készségesen segít vizsgálati anyagom gyűjtésében.

Szeretnék köszönetet mondani Potor Lászlónak, kollégámnak és nagyon jó barátomnak. Tudása, munka etikája, készségei és ösztönző természete segített hozzá a tudóssá válás alapjainak elsajátításához.

Hálás köszönetemet fejezem ki kollégámnak és barátomnak Dr. Hendrik Zoltánnak, hogy minden helyzetben önzetlenül sietett segítségemre, hogy új ismeretek és tapasztalatok gyűjtését biztosította számomra intézetünkben.

Külön köszönettel tartozom Fürtös Ibolyának és Beke Líviának szakmai, és minden alkalommal önzetlenül, nyújtott segítőkész munkájukért.

Köszönet illeti Balla György Professzort is támogatásáért, mentorálásáért.

Végül pedig szeretnék köszönetet mondani drága férjemnek, Sikura Dánielnek, aki munkám során mindig mellettem állt és hitével, szeretetével támogatott, lehetővé téve nagy álmom megvalósulását.

Munkámat férjemnek és családnak ajánlom.

Ezt a munkát a Richter Gedeon Talentum Alapítványának Sikura Katalin Évának adományozott díja és a Magyar Tudományos Akadémia (11003); az OTKA-K112333 (JB) állami támogatása és a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (IRONHEART), valamint az EFOP-3.6.2-16-16-2017-00006, 1K08HL140294-01 (AZ); RT Brian Ridge Ösztöndíj projektek támogatták. A projektet az Európai Unió, az Európai Regionális Fejlesztési Alap és az Egyesült Királyság Egészségügyi Kutatási Tanácsa társfinanszírozta (JB, GyB, MW és RT).

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA



Nyilvántartási szám: DEENK/177/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sikura Katalin Éva
Neptun kód: U71BBT
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10055770

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sikura, K. É.**, Potor, L., Szerafin, T., Oros, M., Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Zarjou, A., Agarwal, A., Posta, N., Torregrossa, R., Whiteman, M., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide abrogates heart valve calcification: implications for calcific aortic valve disease.
Br. J. Pharmacol. [Epub ahead of print], 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14691>
IF: 6.81 (2017)
2. **Sikura, K. É.**, Potor, L., Szerafin, T., Zarjou, A., Agarwal, A., Arosio, P., Poli, M., Hendrik, Z., Méhes, G., Oros, M., Posta, N., Beke, L., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J.: Potential Role of H-Ferritin in Mitigating Valvular Mineralization.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 39 (3), 413-431, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312191>
IF: 6.086 (2017)





További közlemények

3. Becs, G., Zarjou, A., Agarwal, A., **Sikura, K. É.**, Becs, Á., Nyitrai, M., Balogh, E., Bányai, E., Eaton, J. W., Arosio, P., Poli, M., Jeney, V., Balla, J., Balla, G.: Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 20 (2), 217-230, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12682>
IF: 4.499
4. Szemán-Nagy, G., Turáni, M., **Sikura, K. É.**, Bánfalvi, G.: Chromatin Changes upon Silver Nitrate Treatment in Human Keratinocyte HaCaT and K562 Erythroleukemia Cells.
In: Cellular effects of heavy metals. Ed.: Gáspár Bánfalvi, Springer, Milton Keynes, 195-217, 2011.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,395

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
12,896**

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, 2019.05.07.



KONFERENCIA RÉSZVÉTEL, ELŐADÁS ÉS POSZTER PREZENTÁCIÓK

1. Magyar Szabadgyök-KutatóTársaság VII. Kongresszusa, 2013; Debrecen, Hungary. *Kovács Katalin Éva, Jeney Viktória, Szerafin Tamás, Balla József, Humán szívbíllentyűk kalcifikációjának gátlása a ferritin rendszeren keresztül.*

előadás

2. Magyar Szívsebészeti Társaság XXII. Kongresszusa; 2015.; Szeged, Hungary. *Kovács Katalin Éva, Szerafin Tamás, Hendrik Zoltán, Balla György, Balla József, Humán valvuláris interstitialis sejtek mineralizációs folyamatai.*

előadás

3. Scientific Congress of the Society of Hungarian Cardiologists; May, 2015; Balatonfüred, Hungary. *Katalin Éva Sikura, Tamás Szerafin, Zoltán Hendrik, György Balla, József Balla, Mineralization process of human heart valve interstitial cells.*

előadás

4. 9th International Conference on Heme Oxygenase. November, 2016; Prague, Czech Republic. *Katalin Éva Sikura, Tamás Szerafin, Abolfazl Zarjou, Anupam Agarwal, Gerardo Alvarado, Zoltán Hendrik, György Balla, József Balla, Targeting H-ferritin to mitigate valvular mineralization.*

poszter

5. Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság Kongresszusa, 2017. Gödöllő, Hungary. *Sikura Katalin Éva, Potor László, Hendrik Zoltán, Posta Niké, Oros Melinda, Balla György, Balla József, A ferritin -rendszer és a szabadgyökök.*

előadás

6. Cardiovascular Research Days, 2018. Debrecen, Hungary. *Katalin Éva Sikura, Tamás Szerafin, Abolfazl Zarjou, Anupam Agarwal, Gerardo Alvarado, Gábor Méhes, Zoltán Hendrik, László Potor, Melinda Oros, György Balla, József Balla, Targeting H-ferritin to mitigate valvular mineralization.*

poszter

7. Magyar Szívsebészeti Társaság XXV. Kongresszusa. 2018. Budapest, Hungary. *Katalin Éva Sikura, László Potor, Tamás Szerafin, Abolfazl Zarjou, Anupam Agarwal, Paolo Arosio, Maura Poli, Zoltán Hendrik, Gábor Méhes, Melinda Oros, Niké Posta, Livia Beke, Ibolya Fürtös, György Balla, József Balla, HYDROGEN SULFIDE ABROGATES HEART VALVE CALCIFICATION: IMPLICATIONS FOR CALCIFIC AORTIC VALVE DISEASE.*

előadás

8. IRONHEART - GINOP 2.3.2-15-2016-00043 projekt tudományos ülés. 2018. Debrecen, Hungary. *Katalin Éva Sikura, László Potor, Tamás Szerafin, Abolfazl Zarjou, Anupam Agarwal, Paolo Arosio, Maura Poli, Zoltán Hendrik, Gábor Méhes, Melinda Oros, Niké Posta, Livia Beke, Ibolya Fürtös, György Balla, József Balla, HYDROGEN SULFIDE ABROGATES HEART VALVE CALCIFICATION: IMPLICATIONS FOR CALCIFIC AORTIC VALVE DISEASE.*

poszter

9. Magyar Osteológiai és Osteoarthrológiai Társaság Osteológiai Kongresszusa, 2019. Balatonfüred, Hungary. *Katalin Éva Sikura, László Potor, Tamás Szerafin, Abolfazl Zarjou, Anupam Agarwal, Paolo Arosio, Maura Poli, Zoltán Hendrik, Gábor Méhes, Melinda Oros, Niké Posta, Livia Beke, Ibolya Fürtös, György Balla, József Balla, POTENTIAL ROLE OF H-FERRITIN IN MITIGATING VALVULAR MINERALIZATION.*

előadás

10. Magyar Szabadgyök-KutatóTársaság X. Kongresszusa, 2019. Szeged, Hungary. *Katalin Éva Sikura, László Potor, Tamás Szerafin, Abolfazl Zarjou, Anupam Agarwal, Paolo Arosio, Maura Poli, Zoltán Hendrik, Gábor Méhes, Melinda Oros, Niké Posta, Livia Beke, Ibolya Fürtös, György Balla, József Balla, HYDROGEN SULFIDE ABROGATES HEART VALVE CALCIFICATION: IMPLICATIONS FOR CALCIFIC AORTIC VALVE DISEASE.*

előadás

HAZAI ÉS NEMZETKÖZI TUDOMÁNYOS TÁRSASÁGI AKTÍV TAGSÁG

- Magyar Kardiológusok Társasága (MKT)
- Magyar Szívsebészeti Társaság
- Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság (MSZKT)
- European Society of Cardiology