

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Combi Zsolt

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2024

**A KÉNHYDROGÉN HOMEOSZTÁZIS SZABÁLYOZÁSA HUMÁN KALCIFIKÁLT
SZÍVBILLENTYŰBEN: MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSOK, FARMAKOLÓGIAI
VONATKOZÁSOK**

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

Írta: **Combi Zsolt** okleveles biotechnológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Balla József, akadémikus

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sótonyi Péter, PhD

Dr. Bhattoa Harjit Pal, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Sótonyi Péter, PhD

Dr. Bhattoa Harjit Pal, az MTA doktora

Prof. Dr. Reusz György, az MTA doktora

Prof. Dr. Tislér András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2024. november 12. 13.00
DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. BEVEZETÉS

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

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

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

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

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

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

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

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A valvuláris kalcifikáció

2.1.1 A valvuláris kalcifikáció epidemiológiája és legfőbb rizikó faktorai

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

2.1.2 A szívbillentyű kalcifikáció patobiológiája

A kardiovaszkuláris kalcifikáció az egyik leggyakoribb, komplex szívbetegség a fejlett országokban, amely egyaránt jellemző a nagy- és közepes artériákra, az aortákra, a kisebb arteriolákra és a szívbillentyűkre. Korábban egy passzív, degeneratív, az öregedéssel együtt járó folyamatként írták le, napjainkra azonban kiderült, hogy egy dinamikus, sejt és molekuláris szinten egyaránt pontosan szabályozott mechanizmusról van szó. Számos, súlyos klinikai szövődménye lehet pl. bal kamrai hipertrófia, szívelégtelenség, szívinfarktus.

Továbbá jellemző az endotél sejtréteg integritásának felszakadása, plazma lipoproteinek akkumulációja, proinflammatorikus sejtek infiltrációja a szövetbe, gyulladást kiváltó citokinek megnövekedett szintje, az oszteogén transzkripciós faktorok aktiválódása, majd ennek következtében a szívbillentyű szövetre nem jellemző, csontspecifikus proteinek megjelenése, hidroxipatit kristályok képződése az extracelluláris mátrixban, melyek heterogén elváltozásokat eredményeznek a szívbillentyűk szövetében.

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

A CKD-s betegekben a szív- és érrendszeri kalcifikáció egyik legpotensebb és legfontosabb iniciátora a szérumban emelkedett foszfát szintje. Régóta ismert tény, hogy a hiperfoszfatémia, mint független kardiovaszkuláris rizikófaktor kapcsolódik a CKD-hez.

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

A mineralizáció későbbi fázisában fokozódik a csontmátrixra jellemző gének aktivitása, melynek következtében a szívbillentyű szöveti struktúrájára nem jellemző, csontspecifikus fehérjék pl. oszteokalcin jelennek meg. Az CAVD-ben szenvedő betegek sebészileg eltávolított aorta billentyűiben, gyakran figyelhető meg disztrófiás mineralizáció, rendezetlen meszesedési góccal. Az explantált minták 15%-ában azonban jól szervezett

csontmátrix található, oszteogén metapláziával, amely magában foglalja a lamináris csontot, oszteocitákkal, oszteoblaszt-szerű sejtekkel, csontvelővel és zsírsejtekkel.

2.2 A kénhidrogén donor molekulák jellemzői

Az elmúlt évtizedekben a vegyész-mérnökök, jelentős erőfeszítéseket tettek a H₂S-t tartalmazó donorok szintetizálására, kutatási és terápiás felhasználás céljából. A molekulákat úgy tervezték, hogy hidrolízissel vagy más kémiai mechanizmussal szulfidot szabadítsanak fel. Kísérleti körülmények között, a kénhidrogén biológiai rendszerekbe történő bejuttatására, számos szerves szulfidot alkalmaztak, beleértve a nátrium szulfidot (Na₂S-t) és a nátrium-hidrogén-szulfidot (NaSH). Vizes közegben, feloldódáskor, nagyon gyorsan szabadítják fel a szulfidot, amely másodpercek alatt eloszlik. A szerves szulfidok állatkísérletekben történő felhasználása, gyakran félrevezető eredményekhez vezethet. Az intravénás vagy intraperitoneális injekciók rendkívül magas, helyi H₂S-koncentrációt eredményezhetnek a beadás helyén, ami toxikus hatásokat válthat ki. Azt is meg kell jegyezni, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható szulfidok általában különböző arányú szennyeződésekkel tartalmazhatnak, ami befolyásolhatja a kísérleti eredményeket. Ezért a szerves szulfidok - bár alkalmasak *in vitro* kísérletekre - kevésbé előnyösek *in vivo* vizsgálatokhoz.

Ebből következően, a figyelem, a szintetikus, szerves, a kénhidrogént lassan kibocsátó donor molekulák (például GYY4137) tervezése felé fordult, melyek tartós, akár több órán át tartó H₂S kiáramlást biztosítanak.

Li és munkatársainak sikerült a Lawesson-féle kéntartalmú reagensből (2,4-bis(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetane-2,4-disulfide) és morfolinból egy új generációs, a szulfidot lassan generáló készítményt (GYY4137) előállítani. GYY4137-ből protonálódási reakcióval, további analógokat, például AP67-et [(4-methoxyphenyl) pyrrolidin-1-ylphosphinodithioc acid] és AP72-t [(4-methoxyphenyl) (piperidin-1-yl) phosphinodithioc acid] lehet előállítani. Ezek a termékek valószínűleg ionizáción mennek keresztül, és fiziológiás pH mellett szolubilis sókat képeznek. A biológiai rendszerekben, a stabilabb H₂S-kibocsátó vegyületek, mint például az AP72, rendkívül vízdékonyak, ugyanakkor, a szulfidokhoz képest, sokkal lassabban engedik ki a hatóanyagot. Ezeket a kén tartalmú molekulákat, *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban is használták már, utóbbi esetben intraperitoneálisan juttatták be a szervezetbe. A szív- és érrendszeri megbetegedésekben a kén-tartalmú vegyületek, terápiás gyógyszereként való, klinikai alkalmazhatósága, nagymértékben függ a léziók közelében lévő helyspecifikus aktivitásuktól.

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

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

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

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

2.3 A kénhidrogén terápiás alkalmazásának lehetőségei a szív- és érrendszeri megbetegedésekben

A H_2S magas szintje toxikus a biológiai rendszerekben, ugyanakkor az alacsony koncentrációjáról bebizonyosodott, hogy fontos sejtvédő folyamatokat közvetít.

A kénhidrogénnek számos lehetséges funkciója van a fiziológiás és a kóros állapotokban, beleértve a CAVD-t is. Nagyon sok élettani folyamatot szabályoz, melyek fontosak az érrendszer homeosztázisának fenntartásában, például, az oxigénérzékelést, a gyulladást, az immunmodulációt és az oxidatív stressz elleni védelmet. Ugyanakkor, a legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a csökkent H_2S termelés és szöveti koncentrációja, elősegíti az érrendszeri rendellenességek kialakulását, például az érlemezésedést, az oxidatív stresszt és a krónikus gyulladásokat.

Korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a H₂S gátolja a vaszkuláris simaizomsejtek és a szívbillentyű intersticiális sejtek oszteoblaszt irányú transzdifferentiálódását, és ApoE^{-/-} hiányos egerekben is megszünteti az aorta billentyűk meszesedését. Továbbá megfigyeltük, hogy a H₂S koncentrációja csökkent a CAVD-ben szenvedő betegek billentyűszövetében. Azonosítottunk három különböző, meszesedést gátló útvonalat, melyeken keresztül a kénhidrogén kifejti hatását: a, korlátozza a szerves foszfát felvételét a sejtekbe, b, megakadályozza a RUNX2 sejtmagba történő transzlokációját, c, növeli a mineralizációt gátló pirofoszfát szintjét.

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

CSE-deficiens egerekben, az endogén H₂S képződés csökkenése elősegíti az atheróma képződést, amit az exogén NaSH kezelés kompenzál. Ezen kívül, a CSE szabályozza az áramlástól függő, vaszkuláris remodellinget, az érrendszer predilekciós régióiban. Humán vizsgálatok során azt találták, hogy az érrendszeri betegségben szenvedők vérmintáiban, szignifikánsan alacsonyabb volt a keringő szulfid koncentrációja, az egészséges kontrollokhoz képest. Továbbá, az is bizonyított, hogy az alacsonyabb H₂S-szintekkel rendelkező betegeknél, a revaszkularizációs műtétet követő 36 hónapon belül, a halálozás valószínűsége jelentősen megnőtt.

Számos betegség társul a mitokondriális funkciók károsodásával. A mitokondriumot célzó H₂S donor, az AP39 egy olyan farmakológiai készítmény, melyet elsősorban a mitokondrium fiziológiájának tanulmányozására fejlesztettek ki, és a különböző sejttípusokban javította a mitokondriális bioenergetikát. Ugyanakkor, képes megakadályozni a reaktív oxigéngyökök képződését, és megőrzi a mitokondriális membránok integritását. Szívtranszplantáció során, igazolták, hogy az AP39 megvédte a szívizomsejteket az ischaemiás-reperfúziós sérüléstől, és hasonló hatással volt a vesegraftokra is. Így ez a készítmény, nagyon ígéretesnek tűnik, a mitokondriális funkció zavarával járó betegségek kezelésében.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a kénhidrogén gátolja a szívbillentyűk meszesedését, ezért megvizsgáltuk, hogy a gyulladásban is van-e hasonló hatása.
2. Vizsgálatainknak egy másik célja volt, hogy feltárjuk a kalcifikáció és a gyulladás közötti összefüggéseket.
3. Megfigyeltük, hogy a H₂S gyulladáscsökkentő hatáson keresztül, lassítja-e az aorta billentyűk meszesedésének progresszióját.
4. Hipotéziseink igazolására *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* kísérleteket terveztünk, szulfidot felszabadító donor molekulák alkalmazásával.
5. Szakirodalmi adatok hiányában, diagnosztikát terveztünk a biológiailag hozzáférhető kénhidrogén, fiziológiás koncentrációjának vizálatára egészséges és kalcifikált szívbillentyűkben.
6. Tanulmányunk célja volt, hogy felmérje a humán egészséges és meszes aortabillentyűkből származó intersticiális sejtek választ meszesedő környezetben, proinflammatorikus citokinek jelenlétében.
7. Célunk volt bemutatni, a H₂S-szint szabályozását egészséges és CAVD-betegek aortabillentyűiben.
8. Vizsgáltuk az egészséges és meszes szívbillentyűkben végbemenő metabolikus változásokat.
9. Feltételeztük, hogy a kontrol és a kalcifikált szívbillentyűkben, a kénhidrogén szint változása összefügg a mitokondriumban lezajló katabolizmusával, ezért elemeztük az oxidációjában kulcsszerepet játszó enzimek expresszióját.
10. Az AP39 egy specifikus, a mitokondriumot célzó szulfid donor, amely javítja a beteg sejtekben a mitokondrium bioenergetikáját. Megnéztük, hogy a korábban vizsgált kénhidrogén vegyületekhez hasonlóan van-e antiinflammatorikus és anti-kalcifikációs hatása.
11. Az AP39 egy lassú felezési idejű molekula, ezért célunk volt összehasonlítani a hatását, a H₂S-t gyorsan kibocsátó donorral.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A kísérletek során használt vegyszerek és reagensek

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

4.2 Humán szövetminták feldolgozása, sejtek izolálása, tenyésztése

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

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

4.3 Az állatkísérletek kivitelezése

Az állatokon elvégzett módszerek összhangban voltak az emberi kísérletekkel foglalkozó felelős bizottságok (intézményi és nemzeti) etikai normáival és a 2008-ban felülvizsgált 1975-ös Helsink Nyilatkozattal. A jelen tanulmányban elvégzett állatkísérleteket az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága a DE MÁB/157-5/2010 nyilvántartási számon hagyta jóvá, követve az állatok gondozására és felhasználására (beleértve a halászatot is) vonatkozó Intézményi és Országos Irányelveket. A C57BL/6 ApoE^{-/-} egereket a Charles River Laboratories International Inc. cégtől vásároltuk, és a Debreceni Egyetemen speciális, szabályozott hőmérsékletű (24 °C), kórokozómentes körülmények között tartottuk, az Intézményi Etikai Bizottság irányelveinek megfelelően. Az egereket véletlenszerűen négy csoportra osztottuk. Az első csoport (N=7) nem zsírdús eledelt kapott. A második csoportba tartozó egerek (N=7) standard diétáját, 8 hetes koruktól lecseréltük atherogén diétára (15% zsír, 1,25% koleszterin, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország), ezáltal indukáltuk az aortabillentyű gyulladást és/vagy a meszesedést. Az atherogén diétával párhuzamosan a harmadik csoport állatait intraperitoneálisan AP72-vel (266 mmol/testtömeg kilogramm (ttkg); N=7), míg a negyedik csoportba került kísérleti állatokat foszfáttal puffereelt sóoldattal oltottuk, minden második napon. 8 héten keresztül, minden második héten, az összes csoportból néhány egyedet felhasználtunk, a gyulladási folyamatok *in vivo* időbeni modellezése céljából. A mintákat -70 °C-on tároltuk. A szívbillentyűket és más létfontosságú szerveket (szív, máj, vese, lép, tüdő, aorta), a 8 hetes kezelés után kipreparáltuk és fagyasztás után, -70 °C-on tároltuk. Minden állatot lassan emelkedő, szabályozható, tömörített CO₂ inhalációs módszerrel altattunk el. A beavatkozások alkalmával, fájdalmat, stresszt nem okoztunk az állatoknak. Az általunk használt dózisosok, nem eredményeztek pusztulást a kísérleti egyedek között. Az atherogén táplálék összetétele: nyers tápanyagok (%): nyersfehérje 19%; nyers zsír 15,2%; nyersrost 3,4%; nyersshamu 6,3%;

keményítő 25,6%; cukor 11,2%; adalékanyagok (kilogrammonként): A-vitamin 15 000 NE; D3-vitamin 1000 NE; E-vitamin 110 mg; K3-vitamin 5 mg; C-vitamin 0 mg; réz 13 mg.

4.4 A kalcifikáció indukálása, kalciummérés, Alizarin Red S festés

A VIC-ket 80%-os konfluencia elérésekor, 12 lyukú tenyésztőedényben növesztettük és kezeltük 5 napig, fenolvörös indikátort nem tartalmazó, magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban kiegészítve 2,5 mmol/L szervetlen foszfáttal ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ oldat) és 1,8 mmol/L kalcium-kloriddal (CaCl_2). Egyes kísérletekben a kezelések során a kalcifikáló tápközeget kiegészítettük 10 $\mu\text{mol/L}$ AP72-vel vagy 5 nmol/L AP39-el, gyulladást kiváltó 10 nmol/L TNF- α vagy IL-1 β citokinekkal. Az általunk alkalmazott foszfát- és kalcium koncentrációk megfelelően modellezik a CAVD betegek vérmintáiban mérhető szinteket. Az időfüggő kísérleteknél a tenyésztés első napját a 0. napnak tekintettük. Az 5. nap után a sejteket kétszer mostuk foszfát tartalmú sóoldattal (PBS, pH 7.4), majd 0,6 mol/L sósav oldattal dekalcifikáltuk. Ezt követően a sejteket 10 mmol/L-es koncentrációjú Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (Tris-HCl), 5 mmol/L-es koncentrációjú EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 150 mmol/L-es koncentrációjú nátrium-klorid (NaCl; pH 7,2), 1 % Triton X-100, 0,5 % Nonidet P-40 és proteáz gátló (Complete Mini, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) tartalmú lízispufferrel szolubilizáltuk, majd a minták fehérjetartalmát, BCA (Bicinchoninic Acid: bicinkoninsav) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, United States) használatával, spektrofotometriás módszerrel mértük meg. A módszer lényege, hogy a fehérjék lúgos közegben redukálják a Cu^{2+} ionokat Cu^+ ionokká. A bicinkoninsav egy nagyon specifikus kromogén reagens, mely a Cu^+ ionokkal lila színű komplexet képez és abszorpciós maximuma 562 nm-en van. A vizsgált fehérje koncentrációja arányos az abszorbanciával. Az összegyűjtött felülúszók kalciumtartalmát kvantitatív, kolorimetriás módszerrel (QuantiChrom Calcium Assay Kit, Gentaur; 65-DICA-500); Brussels, Belgium) határoztuk meg, és a minták fehérjetartalmára normalizáltuk. A kit-ben található egy fenolszulfonftalein festék, amely nagyon stabil kék színű komplexet képez, elsősorban a szabad kalciummal. A komplex jellegzetes elnyelési maximummal rendelkezik 612 nm-en, melynek intenzitása egyenesen arányos a mintában lévő kalcium koncentrációval. A kit használata minimálisra csökkenti az olyan anyagok által okozott interferenciát, mint a lipidek, fehérjék és egyéb ásványi elemek. Az eredményeket μg kalcium/mg fehérje formában ábrázoltuk.

Az extracelluláris kalcium depozitumok kvalitatív meghatározására, az Alizarin Red S festés az egyik legelterjedtebb metodika. A kísérletek lejárta után, a PBS-el történt mosást követően,

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

4.5 Alkalikus foszfatáz enzim kimutatása

Az alkalikus foszfatáz enzim láthatóvá tételére, 12 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük és kezeltük a sejteket 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve gyulladást kiváltó, 10 nmol/L TNF- α vagy IL-1 β citokinekkal, majd a kísérlet lejárta után, kétszer PBS-el mostuk őket. A festéshez szükséges citrát törzsoldat desztillált vízzel történt 1:50 arányú hígításával citrát oldatot készítettünk, amelyet acetonnal 2:3 arányban elegyítettünk. A citrát-acetonos eleggyel 1 percig fixáltuk a sejteket, majd gyorsan, legalább 3 alkalommal mostuk őket desztillált vízzel. A festőoldatot Naphtanol AS-MX – Fast Violet B 1:24 arányú hígításával készítettük. A keverék halványsárga színű, és fényérzékeny. A festés során a sejteket szobahőmérsékleten, sötétben, 30 percig inkubáltuk a festőoldattal, majd kétszer alaposan mostuk őket. Az eredmény vizualizálására Leica DMIL LED mikroszkópot, Leica DMC4500 kamerát és a Leica LAS Software 4.9.0 verzióját használtuk. A meszesedett régiókban a fokozott enzim expresszió lilás színű festődést mutatott, amit 10x nagyítású fényképek készítésével dokumentáltunk. A fotókat ImageJ szoftverrel elemeztük ki a fentebb leírt módon, és a lila színre vonatkozó pixel denzitás értékeket ábrázoltuk.

4.6 Fehérjék analízise Western blot technikával

A VIC-et 6 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük és kezeltük, 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 10 μ mol/L AP72-vel vagy 5 nmol/L AP39-el vagy gyulladást kiváltó, 10 nmol/L TNF- α vagy IL-1 β citokinekkal. A kísérletek lejárta után PBS-ben történt mosást követően, szolubilizáltuk és meghatároztuk a minták fehérjetartalmát a fentebb leírt módon. A kísérletek

végén citoplazma és sejtmag frakciót, vagy teljes sejtlizátumot használtunk a vizsgálatokhoz. A lizátumokat centrifugáltuk 10 percig, 12000 rpm-el, majd β -merkaptoetanolt tartalmazó nátrium dodecil szulfát (SDS) oldatban, 95 °C-on, 10 percig denaturáltuk. Mindegyik mintából legalább 10 vagy 20 μ g proteint vittünk fel 10%-os nátrium dodecil szulfát-poliakrilamid gélre (SDS-PAGE). A humán egészséges és kalcifikált szövetekből közelítőleg 10-15 mm nagyságú darabokat metszettünk le, majd folyékony nitrogén alatt, dörzsmozsárban elporítottuk. A gélelektroforézishez ebben az esetben 40 μ g fehérjemintát használtunk. A futtatás 100 V feszültséggel történt. Ezt követően a gélbe került fehérjét, 0,45 μ m pórus méretű nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A blottolást 100 V feszültséggel, 75 percig végeztük. A következő lépésben, legalább kétszer, óvatosan mostuk a membránokat TBS-T (0,1% Tween-20-al kiegészített Tris pufferelt sóoldat) mosópufferben. A blokkolás során a nem specifikus antitest kötőhelyek elfedéséhez, 6%-os tejporban, 4°C-on, 1 órán át, egy billegtetőn inkubáltuk a membránokat. Az blokkolás után ismét TBS-T-vel történt mosás következett. A mosás után a membránokat, 16 órán át, 4 °C-on, billegtetőn az alábbi elsődleges antitestekkel inkubáltuk: anti-humán TNF- α (Thermo Fisher Scientific; PA5-19810; 400 ng/mL), anti-humán IL-1 β (Invitrogen; 17 h18116; 400 ng/mL), anti-humán ALP (Abcam; ab65834; 1000 ng/mL), anti-humán CSE (Proteintech Group; 12217-1-AP; 1000 ng/mL), anti-humán SO (Thermo Fisher Scientific; PA5-21705; 1 mg/mL), anti-humán ETHE1 Thermo Fisher Scientific; PA5-56040; 0,30 mg/mL), anti-humán SQR (Proteintech Group; 17256-1-AP; 550 μ g/mL), anti-humán TST (Abcam; ab166625; 0,08 mg/mL), anti-humán CBS (Proteintech Group; 14787-1-AP; 700 μ g/mL), anti-humán RUNX2 (Proteintech; 20700-1-AP; 60 ng/mL) nyúlban termeltetett anti-humán NF- κ B (Cell Signaling Technology; D14E12; 400 ng/mL). Az antitesteket 1%-os tejporban, 1:500 arányban hígítottuk. A 16 óra eltelte után a membránokat alaposan átmostuk TBS-T oldattal. Ezt követően 1 órán keresztül, billegtetőn, 4 °C-on, torma peroxidázzal (HRP: Horseradish peroxidase) konjugált anti-nyúl (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA, NA934, 1:15000 hígításban) vagy anti-egér (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA, NA931, 1:15000 hígításban) IgG másodlagos antitesteket használtunk a membránok inkubálására. Az 1 óra lejárta után, a membránokat 3-szor 10 percen át mostuk TBS-T-vel. A kialakult antigén-antitest komplexeket torma-peroxidáz kemilumineszcenciás detektáló rendszerrel (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA; RPN2109) sötét szobában, röntgen filmen tettük láthatóvá. A jelek előhívása után a membránokról eltávolítottuk a korábban bekötődött antitesteket és ismét 6%-os tejpor oldatban blokkoltuk, majd anti-humán glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz antitesttel (GAPDH) (Cat no. N13300-221, Novus Biologicals, LLC,

Littleton, CO, USA) 1:1000 hígításban inkubáltuk. A másodlagos antitestet ebben az esetben is 1:15000 hígításban használtuk. Az eredmények láthatóvá tétele a fentebb említett módon történt. A GAPDH, mint háztartási fehérje előhívásával, igazoltuk, hogy minden egyes mintából, egységes fehérjemennyiséget vittünk fel az SDS-PAGE gélekre a futtatás során. Az előhívott röntgen filmeket a szkennelés után ImageJ Fiji szoftver alkalmazásával, minden esetben denzitometráltuk és a kapott értékeket a GAPDH denzitási értékeire normalizáltuk. A sejtmagi frakciók vizsgálatánál, háztartási fehérjeként a Lamin B1 (Proteintech, 12987-I-AP; 55µg/150µL) antitestet használtuk és a normalizálásokat is erre végeztük. A kapott relatív denzitási eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

4.7 Immunfluoreszcens festés

A VIC-et 24 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, 12 mm átmérőjű fedőlemezekre tenyésztettük, 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 20 µmol/L AP72-vel vagy 5 nmol/L AP39-el. A kénhidrogént kibocsátó donor molekulákkal történő kezeléseknél, minden esetben fenolvörös indikátortól mentes tápfolyadékot használtunk. A festési protokoll minden egyes lépése között, legalább háromszor PBS-el mostuk a korongokat. A kezelési idő letelte után a sejteket, a háromszori mosást követően 3,7%-os formalinnal, szobahőmérsékleten, 15 percig fixáltuk. A következő lépésben 0,3%-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk a sejteket, így fokoztuk a membránok átjárhatóságát az antitestek számára. Az aspecifikus kötőhelyek lefedése miatt, a permeabilizálás után szobahőmérsékleten, 1 órán át, 10%-os kecskeszérummal blokkoltuk a korongokat. A blokkolást követően, elsődleges antitestként, 1:500 hígításban, egérben termeltetett anti-humán TNF- α -t (Santa Cruz; sc-52746; 100 µg/mL) és nyúlban termeltetett anti-humán IL-1 β -t (Invitrogen; 17h18116; 400 ng/mL) használtuk a VIC-ben expresszálandó TNF- α és az IL-1 β kimutatására. A TNF- α antitestet kecskében termeltetett anti-egér Alexa Fluor 488 fluoroforral jelölt IgG antitesttel (Thermo Fisher Scientific; A11004), az IL-1 β -t pedig kecskében termeltetett anti-nyúl Alexa Fluor 488 fluoroforral kojugált IgG antitesttel (Thermo Fisher Scientific; A11070 sötétben) tettük láthatóvá. Minden másodlagos antitestet 1:500 hígításban használtunk, és a fedőlemezeket szobahőmérsékleten, 1 órán át, sötétben, billegtetően inkubáltuk. A hidroxipatit kristályokat IVISense Osteo 680 fluoreszcens próbával (OsteoSense; PerkinElmer; NEV10020EX) festettük. A sejtmagok megfestését Hoechst 33258-al végeztük. Az NF- κ B transzkripció faktor nukleáris transzlokációjának feltérképezésére, elsődleges antitestként nyúlban termeltetett anti-humán NF- κ B-t (Cell Signalling Technology; D14E12; 400 ng/mL) használtunk, szintén 1:500 hígításban. A

jelölésre másodlagos antitestként, 1:500 hígításban, kecskében termeltetett, anti-nyúl Alexa Fluor 488 fluorofórt választottunk. A festéseket Leica TCS SP8 STED-CW (Stimulated Emission Depletion-Continuous Wave: stimulált emisszió kioltás) szuperfelbontású fluoreszcens nanoszkópiával (Leica Microsystem Mannheim, Németország) fotóztuk. A rendszer 3 db folyamatos hullámú gerjesztő lézerrel (CW: folyamatos hullámú) (488, 532, 638 nm), továbbá egy szintén folyamatos hullámú 660 nm-es kioltó lézerrel rendelkezik. A képeket Leica Application Software X programmal készítettük, a Huygens Professional (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Hollandia) szoftverrel pedig dekonvolváltuk. A kiértékeléseket, ImageJ Fuji szoftverrel végeztük. Meghatároztuk az egyes fehérjék színintenzitását, továbbá a sejtmag frakciók esetében a transzkripciós faktorok kolokalizációját. A színárnyalatok százalékos területi arányát grafikonon ábráztuk. Az immunfluoreszcens festések (nukleusz, osteosense, IL-1 β és TNF- α) különálló képeit az antitest kontrollokkal együtt a 3. kiegészítő ábrán mutatjuk.

4.8 Nukleáris és citoplazmatikus fehérje extrakció

A VIC-eket 6 lyukú tenyésztőedényben kezeltük 5 napig magas glükózkoncentrációjú növekedési médiumban, kalcifikáló médiumban önmagában, vagy kiegészítve 10 μ mol/L AP72-vel. A kénhidrogént kibocsátó donor molekulával történő kezeléseknél, minden esetben fenolvörös indikátortól mentes tápfolyadékot használtunk. A kísérletek lejárta után a tápfolyadékot eltávolítottuk és a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd sejtkaparóval 2 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük. A pelletekhez jéghideg, hipotóniás, citoplazmatikus lízispuffert (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 100 mmol/L NaCl, 300 mmol/L szacharóz, 3 mmol/L MgCl₂, és proteáz inhibitor oldata) adtunk hozzá. A sejtszuspenziókat 15 percig, jégen inkubáltuk. Centrifugálás (8000 x g, 4 °C-on 15 percig) után a felülúszót, ami a citoplazmatikus fehérjefrakciót tartalmazta, 1,5 mL-es centrifugacsövekbe összegyűjtöttük. A megmaradt pelleteket kétszer mostuk PBS-sel, és jéghideg nukleáris extrakciós pufferben (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA pH 8,0 és proteáz inhibitor oldata) újra szuszpendáltuk, amit egy 27-es tűvel ellátott fecskendővel végeztünk. Végül a lizátumot 8000 x g-vel, 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk. A kapott felülúszó tartalmazta a nukleáris frakciót. A frakciók fehérjekoncentrációját a fentebb leírt módon határoztuk meg.

4.9 A kénhidrogén szintek meghatározása sejtlizátumokból módosított metilénkék módszerrel

A szulfidszinteket cink precipitációs módszerrel mértük meg, melyet először Gilboa és Garber dolgoztak ki, majd A. D. Ang és munkatársai módosítottak. A sejtlizátumokhoz (50 µl) hozzáadtunk 350 µl 1%-os cink-acetátot és 50 µl 1,5 mol/L koncentrációjú nátrium-hidroxidot, és szobahőmérsékleten, 60 percig, asztali kevertetőn inkubáltuk, hogy csapadékképzéssel a mintákban lévő szulfidot elválasszuk az egyéb kromofóroktól. Az inkubációs idő letelte után a képződött cink-szulfid csapadékot, 2000 x g-vel, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót ezután eltávolítottuk, és a visszamaradt pelletet, intenzív vortexelés közben, 1 ml desztillált vízzel mostuk. A következő lépésben ismét 2000 x g-vel, szobahőmérsékleten, 5 percig centrifugáltuk a mintákat. A felülúszót óvatosan leöntöttük, és a pelletet 160 µl desztillált vízzel feloldottuk, majd 40 µL előre összekevert festék oldattal (20 µl 20 mmol/L dimetil-p-fenilén-diamin-dihidroklorid (NNDP) feloldva 7,2 mol/L-es koncentrációjú sósavban) és 20 µl 30 mmol/L koncentrációjú vas(III)-klorid (FeCl₃ feloldva 1,2 mol/L HCl-ban) inkubáltuk. A folyamat során, a szulfid reagál az NNDP-al, mely reakciót az FeCl₃ katalizálja és metilénkék keletkezik. Az inkubáció sötétben történt, melynek során 1 mol/L szulfidból, 1 mol/L metilénkék képződött. 10 perc elteltével a keletkezett metilénkék karakterisztikus elnyelési hullámhosszát 667 nm-en, spektrofotométerrel (Beckman DU-800) határoztuk meg. A pontos szulfid koncentrációkat előzetesen felvett kalibrációs egyenes és a metilénkék extinkciós koefficiensének (30 200 M⁻¹cm⁻¹) segítségével számítottuk ki. Az eredményeket a minták fehérjetartalmára normalizáltuk, és µmol/L összes kénhidrogén/mg fehérje értékben ábrázoltuk.

4.10 A biológiailag hozzáférhető H₂S detektálása LC-MS/MS technikával

A mérések az Országos Onkológiai Intézetben Budapesten történtek és az Akaike és munkatársai által kidolgozott módszeren alapul az alábbiak szerint: a kriogén módon porított egészséges és kalcifikált humán szívbillentyű szövetet 5 mmol/L β-(4-hidroxi-fenil)-etil-jód-acetamidot (HPE-IAM) tartalmazó jéghideg metanolban szuszpendálták és alkilálták. Az egyes előkészítési lépések között a mintákat folyamatosan jégen tartották. A szonikálás után a derivatizálást 37 °C-on, 20 percig végezték, majd a mintákat 14 000 x g-vel 4 °C-on, 10 percig centrifugálták. 100 µl felülúszókat megsavanyították 5 µl 10%-os hangyasavval, és az injekció beadása előtt 0,1%-os FA/H₂O-val a kétszeresére hígították. A szöveti pelleteket 1%-os SDS/PBS-ben feloldották, ultrahanggal kezelték, és a fehérjetartalmat BCA vizsgálattal

meghatározták. A folyadékkromatográfiás-tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) méréseket Thermo Q-Exactive Focus Orbitrap tömegspektrométerrel végezték, amely egy Thermo Vanquish UHPLC-hez (ultra-nagy teljesítményű folyadékkromatográf) volt kapcsolva. A derivatizált analitokat Phenomenex Kinetex C18 (50 × 2,1 mm, 2,6 μm belső átmérőjű) oszlopon, 0,1% FA/H₂O (A) és 0,1% FA/MeOH (B) eluensekkel választották el. A lineáris gradiens elúció alkalmazásával, a B eluens arányát 15 perc alatt a kezdeti 5%-ról 95%-ra növelték, majd 2 perc alatt fokozatosan csökkentették 5%-ra, és ott tartották 3 percig a következő injekció beadásáig. A kolonna hőmérséklete 30 °C, az áramlási sebesség 0,3 ml/perc, az injektálási térfogat 5 μl volt. Az alkilezett szulfid termékek MS/MS detektálása pozitív ionizációs módban történt. Mennyiségüket egy kiválasztott molekulaion egy specifikus fragmensének vizsgálatával határozták meg. A 389 m/z értékű prekursor ion 252 m/z értékű fragmentumának kimutatására nagyobb energiájú ütközési disszociációt (HCD: Higher Energy Collision Dissociation) alkalmaztak.

4.11 Kísérleti egységek

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

4.12 Statisztikai elemzés

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

5. EREDMÉNYEK

5.1 A humán kalcifikált aortabillentyűkben a gyulladást kiváltó citokinek expressziója megemelkedik

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

5.2 Az exogén módon beadott H₂S gátolja a gyulladás kialakulását apolipoprotein E-hiányos egerek (ApoE^{-/-}) aortabillentyűiben

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a kénhidrogén, zsírdús diétával etetett, ApoE^{-/-} egerekben megakadályozta az aortabillentyűk meszesedését. Megvizsgáltuk, hogy a hasonló körülmények között, zsírban gazdag diétán tartott, ApoE^{-/-} egerek aortabillentyűiben a kialakult gyulladást is befolyásolja-e a H₂S. Kísérleteinkben az AP72-t, egy lassú felezési idejű, szulfidot kibocsátó donor vegyületet alkalmaztunk, amelyről kutatócsoportunk korábban bemutatta, hogy a humán szívbillentyűk mineralizációját erősen gátolja. Az AP72 szulfid tartalmú vegyületet a kísérletbe vont egerekbe, kétnaponta, intraperitoneális módszerrel, 266 mmol/ttkg dózisban juttattuk be. Az eredményeink alapján, a vizsgált kénhidrogén vegyület szignifikánsan gátolta az aortabillentyűk megvastagodását és az IL-1 β és TNF- α gyulladást okozó citokinek expresszióját. Hasonlóan a humán CAV-hoz, a magas zsírtartalmú étrenddel táplált ApoE^{-/-} egerek aortabillentyűiben, az IL-1 β -re és TNF- α -ra pozitív festődést mutató intersticiális sejtek száma jóval kifejezettebb volt a kontrol egerekhez képest. Azonban, az AP72-kezelés jelentősen csökkentette mind az IL-1 β , mind a TNF- α expresszióját magas zsírtartalmú étrenddel táplált ApoE^{-/-} egerek aortabillentyű szövetében.

Hasonló eredményeket figyeltünk meg *ex vivo* kísérleti körülmények között is. ApoE^{-/-} egerek billentyűiből 2 mm-es szövetdarabkákat metszettünk le, és tenyésztettünk, majd a meszesedés kiváltására nagy foszfát-expozíciót alkalmaztunk. Jól látható, hogy az Alizarin Red S festés az AP72-vel kezelt billentyű intersticiális sejtek meszesedését szignifikánsan csökkentette.

5.3 Az endogén H₂S termelés csökkenése fokozza a nagy koncentrációjú foszfát által kiváltott gyulladást a humán szívbillentyű intersticiális sejtekben

Ahogy az várható volt, a nagy koncentrációjú foszfát kezelés hatására a humán aortabillentyűből származó intersticiális sejtekben is jelentős meszesedés alakult ki. Továbbá megfigyeltük, hogy a magas foszfát expozíciónak kitett humán VIC-ben, az IL-1 β , és a TNF- α gyulladást elősegítő citokinek, mind transzlációs szinten és transzkripciós szinten egyaránt erősen indukálódtak. A sejtek AP72-vel történt kezelését követően, szignifikánsan csökkent az extracelluláris mátrixban a kalcium depozitumok felhalmozódása, ami együtt járt a gyulladást elősegítő citokinek indukációjának csökkenésével. Munkacsoportunk korábban megfigyelte, hogy a CSE és a CBS - a fiziológiás kénhidrogén képződéséért felelős legfőbb enzimek - expressziójának csökkenésével, az endogén H₂S termelődése is mérséklődik, amely elősegíti a VIC-ek meszesedését. Így az endogén H₂S gyulladásgátló hatásának tesztelésére, a CSE és a CBS gének működésének gátlásával kísérleteket végeztünk. Eredményeink az mutatták, hogy a magas foszfát expozíciónak kitett VIC-ben, a CSE és a CBS gének specifikus, kis interferáló RNS-vel történt kettős géncsendesítése, nagymértékben fokozta az IL-1 β és a TNF- α gyulladást kiváltó citokinek expresszióját. Kísérleteink alapján arra következtettünk, hogy kalcifikációs körülmények között, a kénhidrogén a gyulladás progresszióját szabályozza.

5.4 A H₂S akadályozza a gyulladással kapcsolatos folyamatok progresszióját az NF- κ B aktivitás gátlásán keresztül

Jól ismert, hogy az NF- κ B transzkripciós faktor szabályozza a gyulladást elindító jelátviteli útvonalat, és aktiválása a nukleáris transzlokációján alapul, amelyet gyulladást kiváltó citokinek, mint például az IL-1 β és a TNF- α expressziói követnek. Korábban más munkacsoportok bizonyították, hogy a H₂S képes az NF- κ B transzszulfurálására, ami a nukleáris transzlokációjának gátlását eredményezi. Így megvizsgáltuk, hogy az AP72 befolyásolja-e az NF- κ B aktiválódását meszesedést kiváltó tápközegben tartott sejtekben. Az immunfluoreszcens festések konfokális mikroszkópos kiértékelése azt mutatta, hogy az NF- κ B a növekedési médiumban tenyésztett szívbillentyű intersticiális sejtek citoplazmájában

található. A sejtek foszfátexpozíciója azonban kiváltotta az NF- κ B transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba. Az AP72-vel végzett kezelés azonban megakadályozta az NF- κ B megjelenését a meszesedést kiváltó médiumban tartott VIC-ek sejtmagjában. Az immunfluoreszcens festések eredményeinek megerősítésére a VIC-ek citoplazma és sejtmag frakcióit Western blot analízissel is megvizsgáltuk NF- κ B-ra. Eredményeink azt mutatták, hogy az NF- κ B a sejtmagban a foszfát expozíció hatására jelent meg, míg szintje csökkent a citoplazmatikus frakcióban. Fontos megfigyelés volt, hogy transzlációs szinten is igazolni tudtuk, hogy a nagy koncentrációjú foszfátnak kitett VIC-ben, az AP72 kezelés szignifikánsan gátolta az NF- κ B transzlokációját a nukleuszba.

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

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

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

A nagy zsírtartalmú étrenden tartott ApoE^{-/-} egerekben kialakul a szívbillentyűk meszesedése. Munkacsoportunk korábban a CAVD-ben kimutatta, hogy a szívbillentyűk meszesedése, súlyos gyulladással jár együtt. Mivel *in vitro* kísérleteinkben a H₂S gátolta mind az NF-κB, mind a RUNX2 nukleáris transzlokációját, és a RUNX2 sejtmagi lokalizációja NF-κB-függőnek bizonyult, megvizsgáltuk a lokalizációjukat a zsírdús étrenden tartott ApoE^{-/-} egerek aortabillentyűiben. A kénhidrogén szabályozó hatását, intraperitoneálisan beadott AP72 donor molekulával modelleztük. Amint azt a kettős immunhisztokémiai festések mutatják, az atherogén étrenden tartott ApoE^{-/-} egerek aortabillentyűiben az NF-κB és a RUNX2 expressziója a 8. héten volt a legnagyobb. A kísérleti állatok AP72-vel való kezelése szignifikánsan gyengébb festődést eredményezett mind az NF-κB, mind a RUNX2 esetében az aortabillentyűk szövetében. Konfokális mikroszkópos vizsgálattal kimutattuk, hogy az NF-κB és RUNX2 transzkripciós faktorok, a 4. héten főleg a sejtek perinukleáris területén lokalizálódtak, majd 8. héten már transzlokálódtak a nukleuszba. A STED nanoszkópia alkalmazása a szívbillentyűmintákon azt mutatta, hogy az NF-κB és a RUNX2 kolokalizálódott a sejtek perinukleáris régióiban és a sejtmagokban (a kolokalizációs arány: 60,75% ± 7%). A zsírdús étrenden tartott ApoE^{-/-} egerek AP72-vel történt kezelése, jelentősen csökkentette az NF-κB és RUNX2 sejtmagban való megjelenését.

5.7 A CAVD-ben az emelkedett CSE szint és az alacsony biológiailag hozzáférhető H₂S szint együtt jár a proinflammatorikus citokinek fokozott expressziójával

Ismert tény, hogy a CAVD egy gyulladással járó betegség és a H₂S pedig szabályozza a vaszkuláris meszesedést, ezért megvizsgáltuk a proinflammatorikus citokinek és a CSE expresszióját a humán aortabillentyűkben. Az aortabillentyű cserén átesett, súlyos CAVD-el diagnosztizált betegek szívbillentyűit megfestettük IL-1β és TNF-α gyulladást elősegítő citokinekre, valamint CSE-ra. A kontroll mintákhoz egészséges aortabillentyűket kaptunk öngyilkossági vagy traumatikus eseményekben elhunytakból, és a rendelkezésünkre álló információk alapján, szív- és érrendszeri betegségekben nem szenvedtek. A kalcifikációt az IL-1β és a TNF-α proinflammatorikus citokinek fokozott expressziója kísérte a meszes aortabillentyűkben (CAV). Megfigyeltük, hogy a CAVD-el diagnosztizált betegek aortabillentyűiben a CSE-expresszió szignifikánsan megemelkedett az egészségesekhez

képest. Mivel a CAVD-betegek aortabillentyűiben emelkedett CSE-szintet találtunk, megmértük a biológiailag hozzáférhető H₂S-szinteket a CAVD-betegekből és az egészséges egyénekből származó szívbillentyű szövetekben. A vizsgálatok kivitelezéséhez folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS/MS) módszerét alkalmaztuk. Meglepő módon a CAVD-betegek aortabillentyű szövetében jelentősen alacsonyabb volt a biológiailag hozzáférhető H₂S-szint, mint a HAV-szövetekben.

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

5.8 A VIC sejtek mineralizációja és gyulladásoos válasza magas foszfátkoncentrációra

A VIC sejtek mineralizációs potenciáljának és a meszesedést kiváltó ingerekre adott gyulladásoos válaszánaak felmérésére a HAV és CAV szövetekből izolált intersticiális sejteket magas foszfátkoncentrációjú környezetnek tettünk ki, amely kiváltja a sejtek oszteoblaszt irányú fenotípus váltását. A CAVD-ben szenvedő betegekből származó VIC sejtekben a túlzott foszfát expozíció robusztus választ váltott ki, ami a kalcium extracelluláris mátrixban történő felhalmozódásában és a gyulladást kiváltó citokinek, az IL-1 β és a TNF- α emelkedett szintjében tükröződik. Az egészséges donoroktól származó VIC sejtekben szignifikánsan kevesebb kalciumlerakódást és alacsonyabb IL-1 β és TNF- α expressziót figyeltünk meg, mint a CAVD betegekből származó sejteknél. Megvizsgáltuk a sejtes válaszokat az egészséges emberekből származó VIC sejtekben, amelyeket kalcifikációt kiváltó tápközegben tenyésztettünk, összehasonlítva a növekedési médiumban tartott sejtekkel. Figyelembe kell venni, hogy a jobb oldali panelek y tengelyein lévő értékek lényegesen alacsonyabbak, mint a bal oldali paneleken lévőök. Amint a jobb oldali paneleken látható, a nagy foszfát koncentráció eredményeként fokozódott a meszesedés, valamint az IL-1 β és a TNF- α szintje is megemelkedett a HAV szövetekből származó VIC sejtekben, míg a növekedési médiumban tartott sejtekben a kalcifikációs és a gyulladásoos válasz nem aktiválódott.

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

A proinflammatorikus citokinek központi szerepet játszanak a CAVD kialakulásában és progressziójában, ezért megvizsgáltuk, hogy az IL-1 β és a TNF- α citokinek fokozzák-e az

emelkedett foszfáttartalom által kiváltott meszesedést a VIC sejtekben. A CAVD-betegekből származó VIC sejtek foszfáttal kezelése, kiváltotta a kalcium depozitumok lerakódását az extracelluláris mátrixban. Az IL-1 β vagy a TNF- α proinflammatorikus citokinekkal történt kezeléseket követően a kalcium fokozott felhalmozódását tapasztaltuk ezekben a sejtekben a csak foszfáttal kezelt sejtekhez képest. Ennek megfelelően a CAVD-s betegek VIC sejtjeiben, az IL-1 β vagy TNF- α kezelés a nagy foszfátkoncentrációjú tápközegben tovább növelte az alkalikus foszfatáz enzim expresszióját, amit a Western blot analízis is alátámasztott, és ezt a fokozott indukciót az ALP-festés is igazolta. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a hipotézisünkkel, hogy a VIC-ek oszteoblaszt fenotípussá történő transzdifferentiálódása összefügg a gyulladással.

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

Meglepetésünkre, amikor a HAV szövetekből származó VIC sejteket IL-1 β vagy TNF- α proinflammatorikus citokinekkal kezeltük, a nagy foszfát koncentráció által kiváltott meszesedés nem következett be. A magas foszfáttartalmú közegben tenyésztett egészséges aortabillentyűkből származó VIC sejtek extracelluláris mátrixában fokozódott a kalcium felhalmozódása. Fontos megfigyelés, hogy az 5 napig, az IL-1 β vagy TNF- α kezelésnek kitett sejtekben, szignifikánsan csökkent a kalcium lerakódása, ugyanakkor ez az anti-kalcifikációs hatás a 14. napon már nem volt kimutatható. Ennek megfelelően mindkét proinflammatorikus citokin gátolta az oszteoblaszt-specifikus gén, az ALP expresszióját, amit a Western blot analízis és az ALP-festések is igazoltak. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az egészséges aortabillentyűkből származó VIC sejtekben, az IL-1 β és a TNF- α kezelés, átmenetileg képes gátolni a magas foszfátszint által kiváltott oszteoblaszt irányú fenotípus váltást.

5.11 A CSE/H₂S szabályozza a humán egészséges aortabillentyűből származó VIC sejtek meszesedésének IL-1 β és TNF- α által kiváltott átmeneti gátlását

Az előző eredmények alapján, a HAV-VIC sejtekben a foszfát-indukálta meszesedés progresszióját, a proinflammatorikus citokinek átmenetileg képesek gátolni. Azonban a folyamat háttérében álló molekuláris mechanizmusok nem ismertek, ezért feltárásukra módosított metilénkék módszerrel megvizsgáltuk a sejtekben endogén úton képződött H₂S szinteket. A nagy foszfáttartalmú tápközegben tartott egészséges aortabillentyűkből izolált VIC sejtekben a teljes H₂S-szint fokozatos csökkenését figyeltük meg. Ezzel szemben a

proinflammatorikus IL-1 β vagy TNF- α citokinekkal kezelt sejtekben a kénhidrogén szint az 5. napig emelkedett, majd azt követően a 14. napra fokozatosan lecsökkent. Korábban számos aktivátort, köztük az IL-1 β -t vagy a TNF- α -t azonosítottunk, melyek képesek a CSE enzim expresszióját indukálni vaszkuláris sejtekben. Ezért megvizsgáltuk a CSE enzim expressziójának változását HAV-VIC sejtekben. Mind az IL-1 β , mind a TNF- α szignifikánsan növelte a CSE enzimfehérje szintjét a HAV-VIC sejtekben, ami a mineralizáció CSE által közvetített szabályozására utal az endogén H₂S termelésén keresztül.

Korábban megfigyeltük, hogy az endogén kénhidrogén termelés mérséklése a CSE és a CBS kénhidrogén termelő enzimek expressziójának csökkentésével elősegíti a VIC-ek kalcifikációját. Ezért megvizsgáltuk, hogy a proinflammatorikus citokinek átmeneti, meszesedést gátló hatása függ-e a CSE-szinttől. Azt az eredményt kaptuk, hogy a meszesedést kiváltó környezetben, amikor 5 napig a CSE és CBS génekre specifikus, kis interferáló RNS-ek használatával csökkentettük a kénhidrogén termelő enzimek expresszióját, mind az IL-1 β , mind a TNF- α proinflammatorikus citokinek elvesztették a kalcifikációt gátló hatásukat, amit a HAV sejtek extracelluláris mátrixában végbement kalcium lerakódás jelentős növekedése tükrözött.

Megvizsgáltuk, hogy a CAVD-betegek aortabillentyűiből izolált intersticiális sejtekben, a CSE-szintje emelkedett-e a proinflammatorikus citokin kezelés hatására. Míg az inorganikus foszfát önmagában adva, jelentősen megnövelte a CSE fehérje expresszióját, addig sem az IL-1 β , sem a TNF- α nem változtatta meg a szintjét. Ezzel szemben a nagy foszfáttartalmú médiumban tenyésztett intersticiális sejtekben a módosított metilénkék módszerrel mért teljes H₂S szint szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll médiumban tartott sejtekhez képest. Ezen túlmenően, amikor a kalcifikációs médiumot kiegészítettük IL-1 β -val vagy TNF- α -val, a citokin kezelés tovább csökkentette a teljes, endogén H₂S szintet.

5.12 A H₂S mitokondriális metabolizmusa megnövekedett a CAVD-betegek aortabillentyűiben

A CSE fokozott expresszióját, csökkent H₂S-szint kísért a CAVD-betegek aortabillentyűiben az egészséges kontrollokhoz képest. Ez az ellentmondásos megfigyelés arra utalhat, hogy a CSE aktivitása csökken a CAVD betegek aortabillentyű szöveteiben, ami csökkent H₂S-termeléshez vezet. Ezért, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a transzszulfurációs folyamat enzimaktivitásaiba, kén metabolom elemzéseket végeztünk. A cisztein, és a homocisztein szintje hasonló volt, míg a cisztationin szintje alacsonyabb volt a CAVD-betegek aortabillentyűiben, mint az egészséges aortabillentyűkben. Ezek az analitok nem csak

szubsztrátok, hanem különböző enzimátikus útvonalakon a CSE és más transzszulfurációs enzimek termékei is lehetnek, így egymással összekapcsolt enzimátikus útvonalakon keletkeznek és használják fel őket. A lantionin leginkább a CSE enzim H₂S-termelésének a mellékterméke, amely akkor keletkezik, amikor az enzim 2 cisztein molekulát használ fel a kénhidrogén szintézishez. Ezért megmértük a lantionin szintet az aortabillentyűk szöveteiben. Fontos, hogy a CAVD-betegek aortabillentyűiben a lantionin szint magasabb volt, mint az egészséges aortabillentyűkben.

Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a CSE enzim működőképes a CAVD-betegek aortabillentyűiben. Erre a megfigyelésre alapozva feltételezzük, hogy a kalcifikált aortabillentyűkben, a biológiailag hozzáférhető kénhidrogén alacsonyabb szintje, fokozott CSE-expresszió mellett, a H₂S megnövekedett metabolikus fluxusának a következménye. Ezért megvizsgáltuk az SQR, ETHE1, SO és TST fehérjék expresszióját, amelyek a H₂S mitokondriális katabolizmusában részt vevő kulcsfontosságú enzimek. Ezen enzimek expressziója szignifikánsan magasabb volt a CAVD-betegek meszesedett aortabillentyűiben, mint az egészséges aortabillentyűkben, ami valóban a kénhidrogén katabolizmus megnövekedett sebességére utal. Ez megmagyarázhatja a megemelkedett CSE expresszió mellett megfigyelt, alacsonyabb biológiailag hozzáférhető kénhidrogén szinteket.

Ezek az enzimek a cisztein-perszulfid metabolizmusában is részt vesznek, ezért a transzperszulfidációs reakciókat figyelembe véve megmértük a fehérje perszulfidáció (CysSH/Cys%) szintjét az egészséges és a kalcifikált aortabillentyűkben, azonban nem találtunk szignifikáns különbséget.

Mivel a vaszkuláris kalcifikáció egyik legerősebb ismert induktora a megemelkedett plazma foszfátszint, ezért megvizsgáltuk, hogy a VIC-ek túlzott foszfátexpozíciója megváltoztatja-e, a H₂S oxidációjában szerepet játszó mitokondriális enzimek expresszióját. Fontos, hogy a foszfátban gazdag médiumban tenyésztett egészséges VIC sejtek fokozott SQR, ETHE1, SO és TST expressziót mutattak. Ezek az eredmények, valamint az a megfigyelés, hogy a kontroll körülményekhez képest a 14 napig magas foszfát tartalmú tápfolyadékban tenyésztett HAV-VIC sejtek fokozott CSE-expressziót és alacsonyabb H₂S szintet mutattak, arra utal, hogy a nagy foszfát expozíció valóban magasabb szulfid-fluxust indukál.

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

A mitokondriumot célzó H₂S donorok egy új módszert kínálnak annak tesztelésére, hogy a mitokondriumokban helyreállított kénhidrogén szint megakadályozhatja-e a VIC sejtek oszteoblaszt fenotípusú történő transzdzifferenciálódását. A CAVD-betegekből származó aortabillentyű intersticiális sejteket, nagy foszfát koncentrációjú médiumban, AP39 vegyülettel kezeltük, ami egy specifikus, a mitokondriumot célzó, kénhidrogént felszabadító donor molekula, és vizsgáltuk a kalcifikációra gyakorolt hatását. Amint az várható volt, a nagy foszfátkoncentráció mellett, a VIC sejtek, oszteoblaszt fenotípus váltása beindult, amit a kalcium felhalmozódása is tükröz a sejtek extracelluláris mátrixában. A VIC sejtek mitokondriumait célzó kénhidrogén kezelés, AP39 donor alkalmazásával, jelentősen csökkentette az extracelluláris kalcium felhalmozódását, amit az Alizarin Red S festések és a közvetlen kalciummérések is mutattak, megerősítve ezzel a mitokondriális H₂S metabolizmus kulcsszerepét az aortabillentyű integritásának fenntartásában.

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

Mivel a kalcifikáció és a gyulladás folyamata összefügg a CAVD patogenezisében, ezért megvizsgáltuk, hogy az AP39 mitokondriális H₂S donor molekula befolyásolja-e a VIC sejtek gyulladását. Ahogy az várható volt, a gyulladáscitokinek, mint az IL-1 β és a TNF- α expressziója, transzkripció és transzláció szinten egyaránt, szignifikánsan megemelkedett, a kalcifikációs médiumban tartott humán intersticiális sejtekben. Azonban a sejtek AP39-el történt kezelése jelentősen csökkentette a magas foszfátszint miatt megemelkedett proinflammatorikus citokinek szintjét. A specifikus, mitokondriumot célzó H₂S donor gyulladásgátló hatásának további igazolására, immunfluoreszcens festéseket is végeztünk kalcifikációra (Osteosense), valamint IL-1 β és TNF- α gyulladáscitokinekre. Az immunfluoreszcens festések vizualizálása STED-CW nanoszkóp technológia alkalmazásával történt. A sejteket magas foszfát tartalmú médiumban tenyésztettük, és a kalcium felhalmozódása az extracelluláris mátrixban jelentősen megemelkedett, amit az IL-1 β és TNF- α erős festődése kísért. A kiértékelés során egyértelművé vált, hogy az AP39 kezelés szignifikánsan gátolta a kalcium felhalmozódását az extracelluláris mátrixban, és megakadályozta az IL-1 β és a TNF- α expresszióját.

6. MEGBESZÉLÉS

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

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

Megfigyeltük, hogy a kénhidrogén CSE és a CBS enzimek által történő endogén termelése, valamint a H₂S-t felszabadító donor molekulák, mint például az AP72 alkalmazása, gátolja az aortabillentyű meszesedés kialakulását ApoE^{-/-} egerekben, és a megakadályozza a humán szívbillentyű intersticiális sejtek oszteoblaszt-szerű sejtekké történő transzdifferentiálódását. Három különböző meszesedést gátló útvonalat figyeltük meg, melyek szabályozásán keresztül a kénhidrogén kifejtheti hatását: I. gátolja a RUNX2 nukleáris transzlokációját, II. csökkenti a szerves foszfátfelvételt a sejtekbe és III. elősegíti a pirofoszfát, mint anti-kalcifikációs vegyület képződését. Ezek a korábbi tanulmányok és eredményeink arra készítetnek bennünket, hogy megvizsgáljuk, a H₂S gyulladás csökkentő hatása hozzájárulhat-e az aortabillentyű mineralizációjának gátlásához, és ez a mechanizmus a RUNX2 szabályozásán keresztül történik-e az intersticiális sejtekben.

Az AP72 kiváló vízdékonysággal és lassú H₂S-termeléssel rendelkező donor molekula, összehasonlítva a szulfidot gyorsan kibocsátó vegyületekkel, mint például a Na₂S és a NaSH. Egyre inkább felismerik a tényt, hogy a kénhidrogént lassan felszabadító donorok potenciálisan jobban utánozzák az endogén H₂S pufferrendszer hatásait, mivel alacsony szulfidszintjüket lassan generálják. Ezért kísérleteinkhez AP72 vegyületet használtuk. Fontos eredmény, hogy a H₂S exogén úton történő beadása megszüntette az ApoE^{-/-} egerek aortabillentyűiben, a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott gyulladást, amelyet a TNF- α és IL-1 β szintek csökkenése tükröz. Ennek megfelelően a magas foszfát expozíció által kiváltott TNF- α és IL-1 β szintek emelkedése csökkent a humán szívbillentyű intersticiális sejtekben AP72-vel történt kezelés után. Annak vizsgálatára, hogy az endogén kénhidrogén termelésnek van-e gyulladáscsökkentő hatása, géncsendesítéssel mérsékeljük a CSE és a CBS gének aktivitását. Mivel a CSE/CBS expresszió közötti kölcsönhatást Nandi és Mishra tárta fel, bizonyítva, hogy a CBS hiánya felszabályozza a CSE fehérjeszinteket, kettős géncsendesítést alkalmaztunk. Az endogén H₂S termelés csökkentése fokozta a TNF- α és az IL-1 β szintjének foszfát által kiváltott emelkedését a szívbillentyű intersticiális sejtjeiben. Ez az eredmény egyértelműen jelzi az endogén kénhidrogén termelés által a gyulladás szabályozását.

A proinflammatorikus citokinek, az IL-1 β és a TNF- α expresszióját az NF- κ B nukleáris transzlokációja szabályozza. Nemrég kiderült, hogy az NF- κ B aktiválódását a kénhidrogén gátolja. Ez a tanulmány arra készítetett bennünket, hogy megvizsgáljuk, hogy a gyulladás és a meszesedés összefügg-e a fő szabályozó transzkripciós faktorok, az NF- κ B és a RUNX2 szintjén. A fenti megállapításokat megerősítve, az AP72 megakadályozta az NF- κ B transzlokációját a sejtmagba a nagy foszfát koncentrációnak kitett szívbillentyű intersticiális sejtekben. Azt is megfigyeltük, hogy a RUNX2 aktiválódását gátolja a H₂S. Ezért az NF- κ B aktivitását géncsendesítéssel, valamint farmakológiai inhibitor alkalmazásával korlátoztuk, majd a RUNX2 aktiválódását nyomon követtük a foszfát kezelésnek kitett szívbillentyű intersticiális sejtekben. Fontos eredmény, hogy a foszfát nem indukálta a RUNX2 transzlokációját a sejtmagokba az NF- κ B-t nem expresszáló sejtekben, ami kapcsolatot jelez a gyulladást elősegítő és az oszteogén jelátviteli útvonalak között. Az eredményeink megerősítésére *in vivo* kísérleteket végeztünk és kimutattuk, hogy az NF- κ B és a RUNX2 expressziója az aortabillentyű meszesedése során az ApoE^{-/-} egerekben megnőtt, azonban a kénhidrogén terápia mindkét transzkripciós faktor szintjét jelentősen csökkentette. Az aortabillentyű meszesedésének progressziója során, erős kolokalizációt figyeltünk meg az NF- κ B és a RUNX2 között a perinukleáris régióban és a sejtmagokban az intersticiális sejtekben. Vizsgálatunk tehát azt sugallja, hogy a RUNX2, kénhidrogén (CSE/CBS) általi szabályozása

az NF- κ B-n keresztül történik, ami anti-kalcifikációt eredményez, és ezáltal kapcsolatot teremt a gyulladás és a mineralizáció között a CAVD-ben.

Elsőként mutattuk be a CAVD-betegek aortabillentyűiből izolált intersticiális sejtek kénhidrogén szintjének metabolikus szabályozása és a mineralizáció folyamata közötti kapcsolatot. Hipotézisünket arra alapoztuk, hogy az egészséges aortabillentyűkhöz képest, a CAVD-betegek aortabillentyűiben szignifikánsan alacsonyabb kénhidrogén szinteket mutattunk ki, melyhez a H₂S-t generáló CSE enzim, valamint az oxidációjában részt vevő mitokondriális enzimek magasabb expressziója társult. Ennek megfelelően az egészséges humán aortabillentyűkből izolált VIC sejtek, a kalcifikációs milióban utánozzák a patológiás állapotra jellemző transzszulfurációs enzimek expressziós profilját, azaz a CSE megnövekedett expresszióját, valamint a mitokondriális kénhidrogén oxidáció kulcsenzimeinek, az SQR, az ETHE1, az SO és a TST emelkedett szintjeit. Feltételezzük, hogy a CAVD aortabillentyűkben, és a belőlük izolált VIC sejtekben megfigyelt, alacsonyabb biológiailag hozzáférhető H₂S szintek, a kalcifikációs környezet által kiváltott, és megnövekedett mitokondriális kénhidrogén fogyasztási rátának a következménye.

A H₂S megnövekedett mitokondriális katabolizmusa megmagyarázhatja az általunk megfigyelt alacsonyabb, biológiailag hozzáférhető H₂S-szinteket, azonban ismert, hogy ezt a jelenséget más mechanizmusok is okozhatják. A CSE megnövekedett expressziója nem feltétlenül jár együtt a H₂S-termelés sebességének az emelkedésével a kalcifikált aortabillentyűkben. Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CSE enzim képes foszforilálódni a Ser377 aminosavon, és ez az enzim aktivitásának csökkenéséhez vezethet. Mindazonáltal az egészséges szövetekhez képest, a CAVD-betegek aortabillentyűiben megfigyelt emelkedett lantionin szint arra utalt, hogy a CSE enzim aktív, és a H₂S-képződés mértéke akár meg is emelkedhet a CAVD-ben.

A másik fontos, endogén kénhidrogén termelő enzim, a CBS megváltozott expressziója újabb magyarázatot adna a CAVD-ben tapasztalható alacsony biológiailag hozzáférhető H₂S szintekre. Azonban immunhisztokémiai és Western blot analízisekkel kimutattuk, hogy a CBS expressziója a kalcifikált aortabillentyűkben hasonló volt az egészséges aortabillentyűben megfigyelthez. Ez az eredmény arra utal, hogy a CAVD-ben kimutatott alacsonyabb biológiailag hozzáférhető H₂S szintek nincsenek összefüggésben a CBS működésével.

A H₂S egy fontos jelátviteli molekula, amely az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kapott a szív- és érrendszerben betöltött sokoldalú funkciói miatt. Laboratóriumunk korábban a kénhidrogénről kimutatta, hogy a CSE általi endogén termelésén és az exogén

módon beadott kénhidrogént felszabadító donor molekulákon keresztül, egyrészt gátolja az aortabillentyű meszesedését ApoE^{-/-} egerekben, másrészt gátolja a humán valvuláris intersticiális sejtek és a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblaszt irányú transzdifferentiálódását.

A cisztein perszulfidáció és a mitokondriális elektrontranszport lánc feltételezett kölcsönhatásai miatt, a kénhidrogén katabolizmusa során aktiválódó enzimek, köztük az SQR, ETHE1, SO és TST expressziói fokozódhatnak a perszulfidok/poliszulfidok metabolizmusa során is. Ugyanakkor a H₂S képződése indukálhatja is a perszulfidok/poliszulfidok megemelkedett szintjét vagy metabolizmusát. Azt is meg kell jegyezni, hogy a reaktív kénformák (beleértve a H₂S-t is) mérésére jelenleg rendelkezésre álló legkorszerűbb detektálási módszerek, mesterségesen módosíthatják azok fajlagosságát. Ezért nagyon nehéz megkülönböztetni, hogy a megfigyelt biológiai hatást a kénhidrogén vagy a perszulfidok/poliszulfidok közvetítik. Ennek ellenére megmértük a teljes fehérje perszulfidációs szintjét az egészséges és a kalcifikált aortabillentyűkben. A vizsgálat során változatlan fehérje CysSH/Cys% perszulfid szinteket figyeltünk meg, amelyek a fent említett detektálási problémák miatt, nem zárják ki a perszulfidok szerepét, ugyanakkor nem támasztják alá a kénhidrogén közvetlen szerepét sem a vizsgálati rendszereinkben.

A proinflammatorikus citokinek, mint az IL-1 β és a TNF- α fokozott expressziója összefüggésben áll a CAVD-el, ezért a gyulladás a betegség egyik legfőbb ismertetőjele. A CAVD egy aktív, komplex, oszteogén folyamat, melynek kialakulásában és progressziójában a gyulladás központi szerepet játszik. Ezek az ismeretek arra készítettek bennünket, hogy tanulmányozzuk az IL-1 β és a TNF- α humán VIC sejtekre kifejtett hatását, kalcifikációs körülmények között. Amint azt korábban feltártuk, mind az IL-1 β , mind a TNF- α elősegítette a humán VIC sejtek meszesedését, függetlenül a sejtek eredetétől, pontosabban attól, hogy egészséges személyek vagy CAVD-betegek aortabillentyűiből származnak. Ugyan a sejtek eredetétől függően, jelentős különbségek vannak a sejtés válaszok mértékét és időtartamát illetően, amit a kalcifikáció erőssége és a gyulladáshoz citokinek termelése is tükröz, ezeknek a válaszoknak a végső iránya ugyanaz volt mindkét állapotban. A kalcifikáció progressziója gyorsabb volt, az IL-1 β és a TNF- α szintézise pedig kifejezettebb a CAVD-betegek intersticiális sejteiben, ami a beteg aortabillentyűk kalcifikációs környezetének, és ezáltal öröklött oszteoblaszt fenotípusú elkötelezettségüknek tulajdonítható.

Lagoutte és munkatársai bizonyították, hogy a kénhidrogén jelentős szerepet játszik az emlőssejtek bioenergetikájában a mitokondriális elektrontranszport lánc stimulálásával. A mitokondriumot célzó H₂S donorral, az AP39-el végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy

jótevény hatást gyakorol a sejtek bioenergetikai paramétereire. Ezért megvizsgáltuk, hogy a kénhidrogén szintek mitokondriumokban történő helyreállítása, specifikus, mitokondriumot célzó szulfid donorral, szabályozza-e a VIC sejtek kalcifikációját. Az AP39 molekulának a VIC sejtekben megfigyelt kalcifikációt gátló hatása, alátámasztja a mitokondriális kénhidrogén metabolizmus alapvető szerepét az aortabillentyű integritásának megőrzésében.

Vizsgálataink során a kénhidrogén mérések nem voltak specifikusak a mitokondriumokra, ezért kísérleteket végeztünk NaSH-al (általános H₂S donor) és összehasonlítottuk az AP39-el, hogy kizárjuk a citoplazmatikus kénhidrogén hatását a VIC sejtek kalcifikációjának gátlásában. A NaSH nem befolyásolta a VIC sejtek mineralizációját 5 nmol/l dózisonál, ami az AP39 optimális koncentrációja volt. Ha összehasonlítottuk az AP39 és a NaSH hatékonyságát, azt találtuk, hogy a mitokondriumot célzó AP39 kénhidrogén donor, hatékonyabb volt 5000-szer alacsonyabb koncentrációban. Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy a mitokondriális kénhidrogén kritikus szerepet játszik a VIC sejtek kalcifikációjának gátlásában. A mineralizáció progressziójának mérséklése és a proinflammatorikus citokinek expressziójának csökkenése az alacsony koncentrációjú AP39 kezelés hatására, összhangban van a korábbi megfigyelésekkel, amelyek a kalcifikáció és a gyulladás közötti patofiziológiai összefüggést mutatják a CAVD-ben.

Fontos eredményünk, hogy az egészséges aortabillentyűkből származó intersticiális sejtek kalcifikációjának és oszteoblaszt fenotípus-váltásának átmeneti gátlását figyeltük meg az IL-1 β és TNF- α kezelés hatására, szemben a CAVD-betegekből izolált sejtekkel. A proinflammatorikus citokineknek ez az előnyös tulajdonsága a H₂S biogenezisével is összefüggésbe hozható, mivel mind az IL-1 β , mind a TNF- α fokozta a CSE expresszióját, aminek eredményeként a kénhidrogén szintek növekedését figyeltük meg. Annak tesztelésére, hogy a CSE enzim által termelt kénhidrogén felelős-e a VIC sejtek kalcifikációjának és oszteoblaszt irányú fenotípus váltásának gátlásáért, géncsendesítéssel csökkentettük a CSE és a CBS enzimek expresszióját. Számos különböző biológiai rendszerben végzett vizsgálat kimutatta, hogy a szulfid/perszulfid termelő aktivitást figyelembe véve a CSE és a CBS bizonyos mértékig kompenzálni tudják egymást, ezért ezen enzimek kettős géncsendesítését alkalmaztuk. Az endogén kénhidrogén termelés csökkenése a meszesedést gátló hatások elvesztéséhez vezetett kalcifikációs környezetben. Ez azt jelenti, hogy a CSE által termelt kénhidrogén részt vett a VIC sejtek kalcifikációjának átmeneti gátlásában, amelyet a TNF- α vagy az IL-1 β indukált.

A valvuláris intersticiális sejtekhez hasonlóan, a CSE expresszióját a TNF- α és az IL-1 β fokozhatja az érrendszer más sejtjeiben is, beleértve a simaizomsejteket, az endotéliumot

és a makrofágokat. A CSE a vaszkuláris patológiákban szerepet játszó, biológiailag aktív molekulákkal vagy kóros anyagcseretermékekkel is indukálható, mint például az oxidált LDL-hez kapcsolódó peroxidok, az ateroszklerotikus plakk lipidek, valamint a hem vagy az oxidált hemoglobin. Ezek az összetevők a CAVD kialakulásához is szorosan kapcsolódnak és hozzájárulhatnak a CSE fokozott expressziójához az aortabillentyűkben.

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

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Ismert tény, hogy a gyulladás kulcsszerepet játszik a CAVD patogenezisében és az NF- κ B transzkripciós faktor a gyulladás egyik központi szabályozója. A proinflammatorikus citokinek, mint az IL-1 β és a TNF- α expressziója szignifikánsan megemelkedett a CAVD-ben szenvedő betegek és zsírdús étrenden tartott ApoE^{-/-} egerek meszesedő aortabillentyűiben. Munkacsoportunk korábban bemutatta, hogy a kénhidrogén gátolja a humán aortabillentyűben a meszesedést. Ezt igazolták kísérleti eredményeink, ugyanis az endogén H₂S-termelő enzimek, a CSE és a CBS kettős géncsendesítése fokozta a mineralizációt és a gyulladást a humán kalcifikált aortabillentyűből izolált VIC sejtekben. Megvizsgáltuk, hogy a kénhidrogén az anti-kalcifikációs hatását, a gyulladás csökkentésén keresztül fejti-e ki. Eredményeink alapján, az NF- κ B transzkripciós faktor géncsendesítése vagy farmakológiai gátlása megakadályozta a RUNX2 – a csontképződést szabályozó transzkripciós faktor - nukleáris transzlokációját, ami gátolta a VIC sejtek meszesedését.

Megfigyeltük, hogy H₂S-t felszabadító AP72 donor molekulával történt kezelés, megakadályozta az ApoE^{-/-} egerek aortabillentyűiben és humán VIC sejtekben az NF- κ B és a RUNX2 nukleáris transzlokációját, amely csökkent citokinválaszt eredményezett.

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

Feltártuk a humán aortabillentyűk H₂S-szintjének metabolikus szabályozását. A CSE enzim magasabb expressziója ellenére, alacsonyabb biológiailag hozzáférhető H₂S és magasabb IL-1 β és TNF- α szinteket mutattunk ki CAVD betegek aortabillentyűiben az egészséges egyénekhez képest. Az eredmények tükrében, elsőként elemeztük a H₂S mitokondriális oxidációjában részt vevő enzimeket, köztük a SQR, az ETHE1, az SO és a TST szerepét a valvuláris mineralizációban.

Bemutattuk az AP39, egy specifikus, a mitokondriumot célzó H₂S-t kibocsájtó donor molekula, anti-kalcifikációs és anti-inflammatorikus hatását.

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

8. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

A CSE/CBS által termelt H₂S gátolja az aorta billentyűből izolált intersticiális sejtek gyulladását és meszesedését.

A H₂S-t felszabadító donor molekulák csökkentik az aorta billentyűből izolált intersticiális sejtek gyulladását és kalcifikációját.

A H₂S megakadályozza a gyulladás és a meszesedés kialakulását az apolipoprotein E hiányos egerek aortabillentyűjében.

A H₂S gátolja az NF- κ B nukleáris transzlokációját és az IL-1 β és TNF- α expresszióját.

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

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

A CSE enzim magasabb expressziója ellenére, alacsonyabb a biológiailag hozzáférhető H₂S és magasabb az IL-1 β és TNF- α szintje a CAVD-betegek aortabillentyű szövetében az egészséges egyénekéhez képest.

Az egészséges humán aorta billentyűből izolált VIC-ek utánozzák a humán patológiát, meszesedést kiváltó körülmények között, mivel az emelkedett CSE-expresszió itt is alacsony H₂S-szinttel jár.

A H₂S-katabolizmusban részt vevő mitokondriális enzimek, köztük a SQR, a ETHE1, a SO és a TST expressziója fokozottan szabályozott a meszes aortabillentyű szövetekben, amely az endogén H₂S szintek csökkenéséhez vezet.

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

Egy specifikus, a mitokondrium bioenergetikáját javító H₂S donor, csökkentette a gyulladást és a kalcifikációt a VIC-ben.

Mindkét proinflammatorikus citokin (IL-1 β és a TNF- α) fokozta a meszesedést a meszes aortabillentyűkből származó VIC-ben. Ezzel szemben az egészséges billentyűből izolált sejtekben a mechanizmus elején, átmenetileg gátolták a meszesedését, mely hatás a CSE-indukción és az endogén H₂S-generáláson keresztül közvetített.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A disszertációm támogató pályázatok: OTKA-K 132828, GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (IRONHEARTH), EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER), TKP2020-NKA-04, 2020-4.1.1-TKP2020, TKP2021-EGA-18, ED_18-1-2019-0028.



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

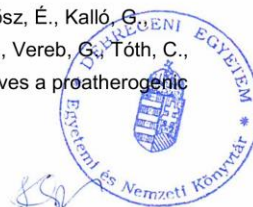
Jelölt: Combi Zsolt
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10073577

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Combi, Z.**, Potor, L., Nagy, P., Sikura, K. É., Ditrói, T., Jurányi, E. P., Galambos, K., Szerafin, T., Gergely, P., Whiteman, M., Torregrossa, R., Ding, Y., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide as an anti-calcification stratagem in human aortic valve: altered biogenesis and mitochondrial metabolism of H₂S lead to H₂S deficiency in calcific aortic valve disease.
Redox Biol. 60, 1-19, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2023.102629>
IF: 11.4 (2022)
2. Sikura, K. É., **Combi, Z.**, Potor, L., Szerafin, T., Hendrik, Z., Méhes, G., Gergely, P., Whiteman, M., Beke, L., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- κ B, a link between inflammation and mineralization.
J. Adv. Res. 27, 165-176, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.005>
IF: 12.822

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 40,997

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

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

Debrecen, 2024.05.21.

