

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**HEMOLÍZIS, HEMOGLOBIN-OXIDÁCIÓ ÉS HEM-MEDIÁLTA
LIPIDOXIDÁCIÓ AZ ÉRELMESZESEDÉSES LÉZIÓBAN**

Nagy Emőke

Témavezető: Prof. Dr. Balla József

Programvezető: Prof. Dr. Muszbek László



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

TROMBÓZIS, HEMOSZTÁZIS ÉS VASZKULÁRIS BIOLÓGIA PROGRAM

Debrecen, 2010

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK.....	4
1. BEVEZETÉS.....	5
1.1. A kissűrűségű lipoprotein (LDL) oxidatív modifikációja.....	5
1.2. Az érlemeszesedés és kapcsolata a lipidperoxidációval.....	8
1.3. Hemoxigenáz-1: védelem az oxidatív stresszel szemben.....	11
1.4. A HO-1 és az ateroszklerózis.....	13
1.5. A kén-hidrogén élettani szerepe.....	14
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	16
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	25
4.1. Az LDL hem-katalizálta oxidációja.....	25
4.1.1. Az LDL oxidációja hemmel és hidrogén-peroxiddal.....	25
4.1.2. Az LDL oxidációja hemmel.....	29
4.1.3. A kén-hidrogén és az LDL- oxidáció.....	30
4.2. A hemoglobin oxidációja.....	36
4.3. Hem- és hemoglobin-indukálta lipidperoxidáció az ateroszklerotikus plakkokban.....	39
4.3.1. A vizsgálatba bevont érminták lipidtartalmának karakterizálása.....	39
4.3.2. A lipid és a vörösvértestek reakciója.....	42
4.3.3. A lipid és hemoglobin reakciója.....	44

4.3.4. <i>A lipid és hem reakciója</i>	48
4.3.5. <i>Az oxidált lipid hatása endotheliális sejtekre</i>	50
4.4. <i>HO-1 deficiens sejtek és az oxidatív stressz</i>	57
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	61
SUMMARY.....	64
6. IRODALOMJEGYZÉK.....	66
7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	81
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	85
FÜGGELÉK (KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI).....	86

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein

oxLDL: oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein

HUVEC: humán umbilikális véna endotheliális sejt

LCL: immortalizált limfocita sejtvonal

HO-1: hemoxigenáz-1

FCS: fetal calf serum

HBSS: Hank's balanced salt solution

EDTA: etilén-diamin-tetraacetát

PMN: polimorfonukleáris sejtek

PMA: phorbol myristate acetate

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid

TBARS: tiobarbitursav-reaktív anyagok

LOOH: lipid-hidroperoxid

COOH: kumin-hidroperoxid

Hb: hemoglobin

Hpg: haptoglobin

Hpx: hemopexin

BHT: butilált hidroxil-toluol

DFO: dezferroxamin

α -toc: α -tokoferol

cGMP: ciklikus guanilát-monofoszfát

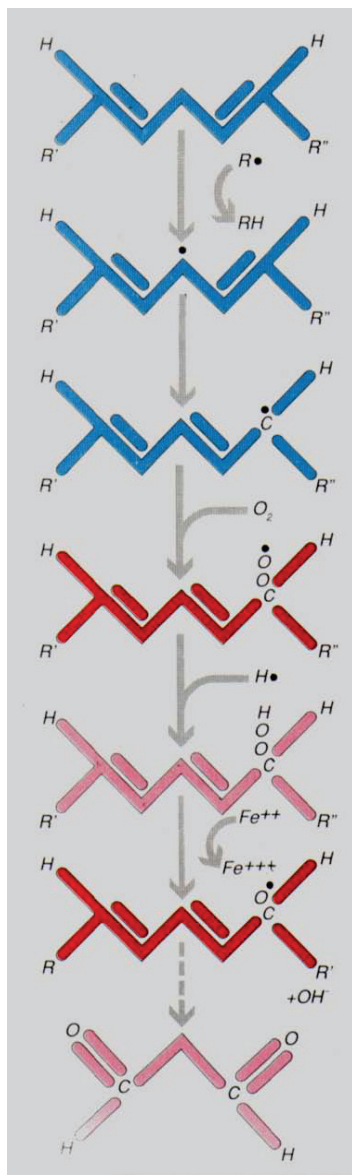
GSH: glutation

GSH-Px: glutation-peroxidáz

BCA: bicinchoninic acid

1. BEVEZETÉS

1.1. A kissűrűségű lipoprotein (LDL) oxidatív modifikációja



A kissűrűségű lipoprotein szubendotheliális térben történő oxidatív modifikációja az egyik első lépés az ateroszklerózis kialakulásában.¹⁻³ Az oxidált LDL nem egy jól definiált molekula, hanem szerkezetében, fizikai és biológiai tulajdonságait illetően változatos lehet.^{4,5} Az LDL *in vivo* oxidációjának pontos mechanizmusa nem ismert. *In vitro* többféle módszert alkalmaznak oxidált LDL előállítására; átmenetifémeket (vas és réz),⁶ hemproteineket (hemoglobin⁷, cöruoplazmin⁸, mioglobin⁹), enzimeket (lipoxigenáz¹⁰, mieloperoxidáz¹¹, tormaperoxidáz¹²), reaktív nitrogénrészecskéket¹³ és számos vaszkuláris sejtet.^{14,15} Kutatócsoportunk korábban megállapította, hogy a hem, egy egyedülálló vastartalmú vegyület is előidézhetheti az LDL oxidatív módosulását.¹⁶ Ez a folyamat LDL, hem, oxidánsok és antioxidánsok kölcsönhatásaiból épül fel¹⁷⁻¹⁹

1. ábra: A lipidperoxidáció mechanizmusa.

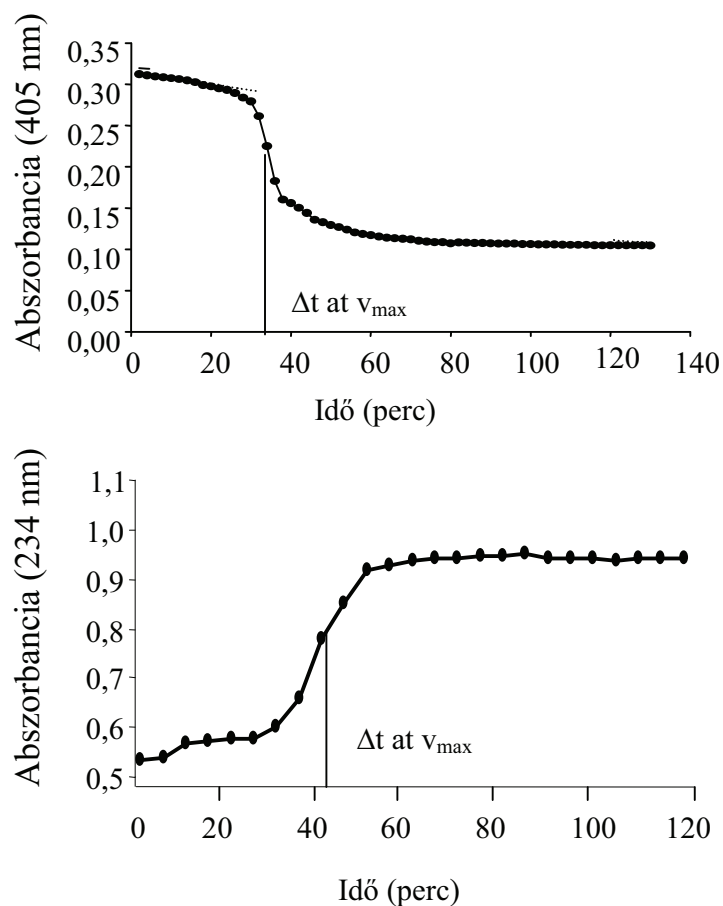
Az iniciációs szakaszban hidrogén-elvonás nyomán alkil-gyök képződik, mely átrendeződik mezoméria-stabilizált konjugált diénné. Oxigén jelenlétében peroxilgyökök, majd lipid-hidroperoxid képződik, abból vas(II) hatására alkoxil-gyök jön létre. A gyökök H-elvonással stabilizálódnak, ezáltal propagálják a láncreakciót. A végső szakaszban a zsírsav fragmentálódik, dialdehidek keletkeznek

Az LDL-be beépült hem közvetlenül oxidálja azt, mely folyamat felgyorsul nyomnyi mennyiségű hidrogén-peroxid vagy polimorfonukleáris sejtekből származó oxidánsok jelenlétében.^{15,16} Az LDL α -tokoferol-tartalmának eltávolítása után a zsírsavakból konjugált diének, lipid-hidroperoxidok és tiobarbitursav-reaktív anyagok képződnek. (1. ábra). A hem az LDL fehérjerészét is módosítja, mely során csökken a szabad aminocsoportok száma az apolipoprotein B-100-ban.^{20,21} A reakció során a hem-gyűrű (protoporfirin IX) felnyílik és vas szabadul fel, mely katalizálja a zsírsavak, koleszterin és apolipoprotein B-100 további oxidációját az LDL részecskében.

Az LDL hem/hidrogén-peroxiddal történő oxidációjának kinetikája látható a 2. ábrán.²² A reakció kezdetben lassú, majd az LDL antioxidáns tartalmának elfogyása után felgyorsul. Az LDL oxidálhatósága, oxidatív rezisztenciája antioxidáns-kapacitásától függ, mely jól jellemezhető a reakció sebességmaximumáig eltelt idővel (ΔT at v_{max}).

A hem szervezetünkben fehérjékhez kötötten fordul elő, legnagyobb mennyiségben a hemoglobinban található. A hemproteinek okozta LDL-oxidáció mechanizmusa még nem tisztázott. Ismert, hogy a ferrohemoglobinhoz (FeII) képest a ferrihemoglobinban (FeIII) gyengébb a hem-globin kölcsönhatás, így az oxidált hemoglobinból hem szabadulhat fel.²³ A ferrohemoglobin oxidációja bekövetkezhet hidrogén-peroxid, vagy gyulladáscsökkentő folyamatokban termelődő oxidánsok hatására.²⁴ Az LDL sikeresen kompetál a plazma hemkötő fehérjeivel (hemopexin, haptoglobin és albumin) a hemproteinekből felszabaduló hemért.²⁵⁻²⁷ Más feltételezések szerint a ferrohemoglobin hidrogén-peroxid mediálta oxidációja során átmenetileg négyvegyértékű vasat tartalmazó, ferrihemoglobin (FeIII/FeIV=O) képződik,^{28,29} mely a hemoglobin fehérjerészének felszínén tirozil-gyököket generálva, ferrihemoglobinként stabilizálódik.^{30,31} Ferrihemoglobin képződését fiziológias állapotban³² és különböző betegségekben³³ egyaránt megfigyelték embereknél. Ha a tirozil-gyökök molekulán belül képeznek kovalens kötést, ditirozil oldalláncok jönnek létre. A

gyökök intermolekuláris kovalens kötések is létrehozhatnak, melyek során hemoglobin-multimerek vagy hemoglobin-LDL komplexek jöhetnek létre, illetve a gyökök az LDL apolipoprotein B-100-ban keresztkötések létrejöttét iniciálhatják.³⁴ E mechanizmusban nincs, vagy csekély a szerepe az LDL hemfelvételének.



2. ábra: Az LDL hem/H₂O₂-dal történő oxidációjának kinetikai görbéje.

A hem és a konjugált dién (lipidperoxidációs termék) koncentrációjának időbeni változása spektrofotometriásan követve.²²

1.2. Az érlemeszesedés és kapcsolata a lipidperoxidációval

Az érlemeszesedés a nagyobb artériák intimájának elváltozása; lipidek, kötőszöveti elemek és véralkotórészek göccs lerakódásával jár, amelyhez rostos szövetképződés, meszesedés és a media károsodása társul, az érfal gyengülését, az érlumen beszűkülését okozva. Az előrehaladott ateroszklerózis súlyos klinikai következményei az elégtelen vérellátás okozta angina, az érfal meggyengüléséből eredő aneurizma illetve a trombózis következtében kialakult myocardialis infarctus vagy stroke, melyek a nyugati világban a mortalitás vezető okai.³⁵ Ateroszklerotikus elváltozás minden emberben, minden életkorban előfordul,³⁶ de az akut tünetek kialakulása az életkorral nő, illetve férfiakban sokkal gyakoribb, mint nőkben, ami az ösztrogén védőhatásának köszönhető és a menopauza után fokozatosan eltűnik. Az érlemeszesedés kialakulását több kockázati tényező befolyásolja, melyek közül a fontosabbakat az 1. táblázat sorolja fel.^{37,38}

1. táblázat: Az érlemeszesedés kialakulásának főbb kockázati tényezői

Örökletes tényezők	Tangier-betegség ³⁹ Familiáris hiperkoleszterinémia
Életmód	Elhízás Magas zsírtartalmú étrend Mozgásszegény életmód Dohányzás
Más betegségek	Hipertónia Diabetes mellitus Emelkedett vérzsírszint
Fertőzések ⁴⁰	Chlamydia pneumoniae Helicobacter pylori Cytomegalovirus

Szövettani, morfológiai vizsgálat alapján Stary 8 csoportba osztotta az érlemeszesedés fázisait (2. táblázat).⁴¹ Az ateroszklerózisból eredő morbiditás és mortalitás főként a IV-es és

V-ös típusú ateroszklerotikus lézióknak tulajdonítható, melyek felszínének sérülése nyomán vérömleny, bevérzés és trombotikus lerakódások jönnek létre, érelzáródást okozva.⁴⁵⁻⁴⁵ A hematóma az intimán belül is létrejöhethet, az újonnan képződött hajszerelerekből származó bevérzésből.^{46,47} Klinikai tüneteket a VI típusú léziók (komplikált plakkok) okoznak, melyeket felszíni hibák, hematómák és trombotikus lerakódások jellemeznek. A IV-es és V-ös típusú plakkok jellemzője, hogy az intima alatt nagymennyiségű extracelluláris lipid halmozódik fel (lipid mag), mely a plazma lipoproteinjeiből és korábban internalizált sejtekből származik.⁴⁸⁻⁵⁰ Koleszterin és koleszterin észterek képezik a plakklipid fő frakcióit (50 illetve 25%), kisebb arányban található meg foszfolipidek és trigliceridek (15 és 10 %).⁵¹ A lipidlerakódás körül kötőszövetes sapka képződik, melynek vastagsága fordítottan arányos a plakk ruptúrára való hajlamával.

2. táblázat: Az érlemezésedés léziók csoportosítása (Stary HC et al. Circulation 1995; 92:1355-1374.

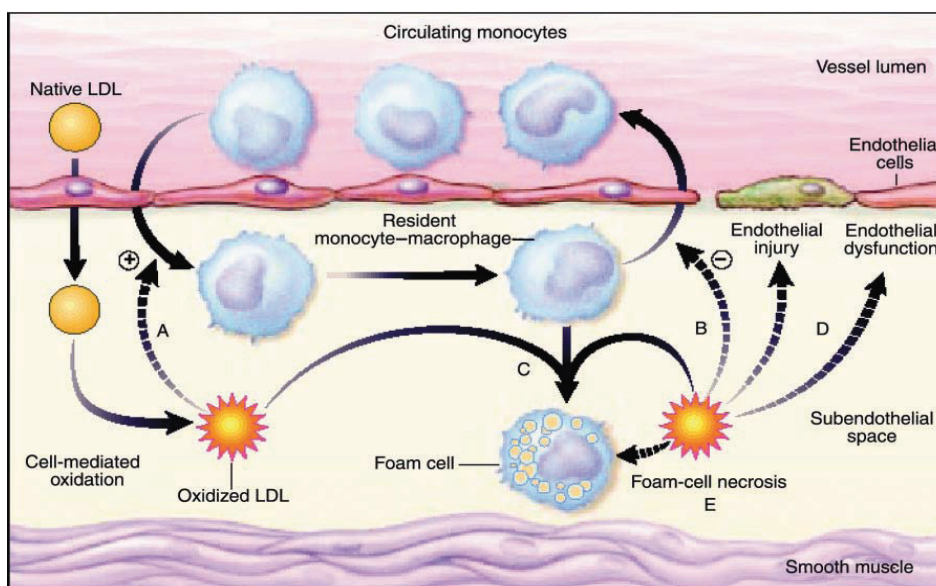
alapján

Nómenklatúra	Progresszió	A plakk-növekedés oka	A megjelenés időpontja	Klinikai vonatkozás	
I. típus (kezdeti lézió)	<pre> graph TD I[I] --> II[II] II --> III[III] III --> IV[IV] IV --> V[V] V --> VI[VI] V --> IV VI --> V </pre>	Lipid-akkumuláció	Az első évtizedben	Nincs klinikai következménye	
II. típus (fatty streak)			A harmadik évtizedben		
III. típus (köztes lézió /preateróma)					
IV. típus (ateróma)			Simaizom-proliferáció, fokozódott kollagén-szintézis	A negyedik évtizedben	Gyakran nincsenek tünetek, azonban gyorsan kialakulhatnak
Va típus (fibroateróma)					
Vb típus (VII. típus / kalcifikált plakk)					
Vc típus (VIII. típus / fibrózus plakk)					
VI. típus (komplikált lézió)		Trombózis, hematóma			

Az atheroszklerózis patogenezisét többféle elmélettel magyarázzák.⁵²⁻⁵⁶ Az érlemezés kialakulásának főbb lépései:

- endothelsérülés, melyet hemodinamikai nyíróerők okozhatnak⁵⁷
- a sérült helyen fokozódik a monociták kitapadása és a plazmalipidek (LDL) infiltrációja a szubendotheliumba, habos sejt képződik
- a media simaizomsejtjeinek vándorlása és osztódása, kötőszövet-képződés
- érlemezés és/vagy plakk ruptúra

Az érlemezés patomechanizmusában szerepet játszó lipidperoxidációs folyamatokat a 3. ábra foglalja össze.⁵⁶



3. ábra: Az oxidált LDL szerepe az atheroszklerotikus elváltozás kialakulásában

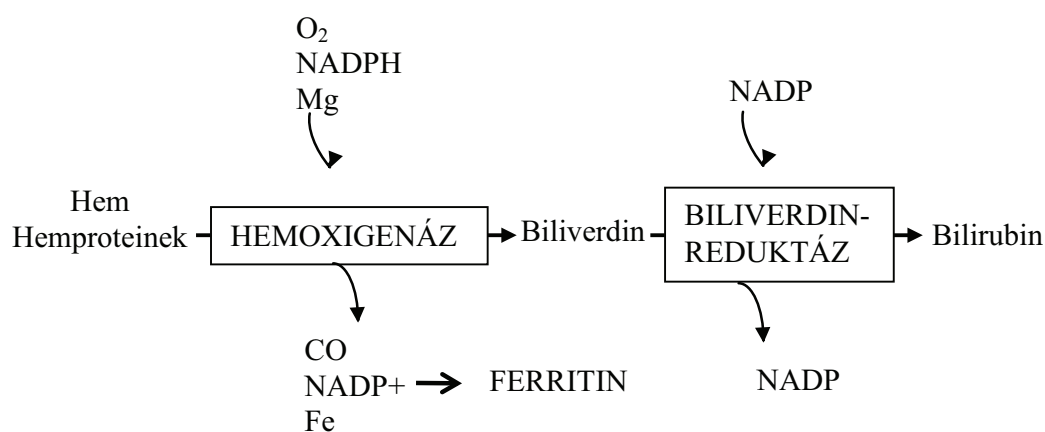
(Steinberg et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase atherogenicity. N. Eng. J. Med. 1989;320:915-924. alapján)

Az oxLDL-t a monocitákból létrejövő makrofágok szabályozatlan módon, nem telítődő scavenger (CD 36) receptoraikon keresztül veszik fel, habos sejt képződik, mely prekursora a lézió lipidmagnának.^{58,59} Az oxidált LDL kemotaktikus hatással van a keringő monocitákra,⁶⁰

és fokozza adhéziós molekulák szintézisét, melyekkel még több monocita tapad ki az érfalra majd penetrál az endotheliumon.⁶¹ Az oxidált LDL toxikus a legtöbb vaszkuláris sejtre, így fokozza az endothelium-károsodását is.⁶² A lipid oxidációja maga után vonja a kötőszöveti állomány degradációját,⁶³ fokozza a trombocita-adhéziót,⁶⁴ valamint gátolja az endotheliális sejtek relaxációs képességét.⁶⁵ Az emberi érfalban megtalálták mind a koleszterin, mind a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációs termékeit, melyek a legtöbb vaszkuláris sejtre toxikusak.⁶⁶⁻⁶⁸ A toxikus hatásért főleg a lipid hidroperoxidok, az aldehidek és karbonilok a felelősek.⁶⁹⁻⁷¹

1.3. Hemoxigenáz-1: védelem az oxidatív stresszel szemben

Kutatócsoportunk korábban feltárta, hogy a hem mediálta lipid-peroxidációval szemben a sejtes rendszerek indukálható védelemmel rendelkeznek, melynek központi fehérjéi a hemoxigenáz (HO)⁷²⁻⁷⁸ és a ferritin.⁷⁹⁻⁸³ A hemoxigenáz a hemdegradáció első, sebességmeghatározó lépését katalizálja: felnyitja a porfirin gyűrűt, melyből biliverdin majd bilirubin és szén-monoxid (CO) képződik, valamint vas szabadul fel⁸⁴ (4. ábra).



4. ábra: A hem enzimatis leontása

A hemoxigenáz gyakorlatilag minden szövetben megtalálható, nagy mennyiségben a májban, lépben, vesében, szívben. Három gén kódolja a hemoxigenáz három izoenzimét. A HO-1 indukálható, a HO-2 és a HO-3 konstitutív módon expresszálódik.^{85,86} A HO-1 egy 32.8 kDa tömegű stresszfehérje, melynek a hemen kívül számos induktora van; nehézfémek, citokinek, hormonok, endotoxinok.⁸⁷ A HO-2 aktivitása kiemelkedő a testisben és az agyban. A HO-3 katalitikusan nem aktív, valószínűleg hem-kötő funkciója révén a sejt hemet igénylő folyamataiban van szerepe.⁸⁶ A hemoxigenáz által katalizált hemdegradáció egyik terméke a biliverdinből képződő bilirubin, mely egy fiziológiásan is jelentős antioxidáns.⁸⁸ A másik termék a CO,⁸⁹ melynek élettani tulajdonságai sokban hasonlítanak a nitrogén-monoxidéra (NO). Stimulálja a cGMP képződését,⁹⁰ elősegíti az érfal relaxációját,^{91,92} és gátolja a trombocita aktivációt.⁹³

A HO-1 induktorainak kémiai sokfélesége vezetett arra a hipotézisre, hogy a hem degradációjában betöltött funkcióján kívül a HO-1-nek a sejt homeosztázisának fenntartásában is szerepe lehet. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a HO-1 különböző módokon létrehozott oxidatív stresszre - hidrogén-peroxid kezelés, glutationszint csökkentés, UV sugárzás, vagy hiperoxiás állapot létrehozása - is indukálódik,^{85,94} az emelkedett HO-1 szint pedig sokféle oxidatív károsító hatással szemben nyújt védelmet. Patkányokat rhabdomyolízis előtt intravénás hemoglobinnal kezeltek, a HO-1 szintje megemelkedett, és ez megakadályozta a rhabdomyolízist követő vesekárosodást, valamint csökkentette a mortalitást.⁹⁵ A HO-1 szintjének géntranszferrel, vagy intravénás hemoglobinnal történő emelése védelmet nyújt a hiperoxia vagy endotoxinok által előidézett tüdőkárosodás ellen.⁹⁶⁻⁹⁸ Humán fibroblasztokon bizonyították a HO-1-nek UV sugárzással szembeni protektív hatását.⁹⁹ A HO-1 alapvető fontosságát jelzi a fehérje nagymértékű konzervativitása is.

1.4. A hemoxigenáz-1 és az ateroszklerózis

A HO-1 és ferritin fokozott expressziója az endotheliumban megfigyelhető az ateroszklerózis korai szakaszában;^{100,101} valószínűleg ez a sejtszintű válasz a hem-stresszre és a hem-vas által oxidált lipidperoxidációs termékek megjelenésre.¹⁰¹ Több állatkísérletes modell igazolja, hogy a HO-1 és a ferritin védelmet nyújtanak az érlemezés kialakulása ellen.¹⁰³ A HO-1 és ferritin fokozott expressziója meggátolja az oxidált LDL okozta citotoxicitást endotheliális sejtekben és érlemezés lézió kialakulását LDL-receptor knockout egerekben.¹⁰⁴ A HO-1 enzim ón-protoporfirinrel történő gátlása viszont gyorsítja az ateroszklerózis kifejlődését ugyanezen egerekben.¹⁰⁵ A HO-1 vektoriális overexpressziója meggátolja az érlemezés kialakulását apolipoprotein E-hiányos egerekben.¹⁰⁶

A HO-1-nek a vaszkuláris működésben betöltött központi szerepére világított rá egy japán kutatócsoport által publikált közlemény az első diagnosztizált HO-1 deficiens betegről.^{107,108} A páciens állandó láz, ízületi fájdalmak, retardált növekedés és súlyos vérképzavar miatt került két évesen kórházba, ahol a továbbiakban anémiát, fokozott véralvadást, proteinuriát és hematuriát, valamint májmegnagyobbodást állapítottak meg. A vérvizsgálat megállapította, hogy az anémiát intravaszkuláris hemolízis okozta, amivel meglepő módon nem járt együtt a bilirubin szint emelkedése. Ez az eredmény a hem-metabolizmus zavarára utalt. A beteg májszövetének immunhisztokémiai, és immortalizált limfocita sejtjeinek stresszindukció utáni immunoblot vizsgálata a hemoxigenáz aktivitás teljes hiányát mutatta ki. A beteg HO-1 génjének mutációs analízise megállapította, hogy az anyai allélen a teljes 2. exon hiányzott, míg az apai allél 3. exonján egy két-nukleotidos deléció volt megfigyelhető.¹⁰⁹ A humán betegség tünetei részben hasonlítottak a HO-1 hiányos egéknél megfigyelhető tünetekre,¹¹⁰ de összességében súlyosabbak annál (3.táblázat).

3. táblázat: A humán és egér HO-1 deficiencia tüneteinek összefoglalása

Humán	Jelenség	Egér
+	Méhen belüli magzatelhalás	+
+	Növekedési retardáció	+
+	Anémia	+
+	Gyulladás	+
+	Glomerulonefritis	+
+	Májmegnagyobbodás	+
+	Emelkedett ferritin-szint	+
+	Vaslerakódás a szövetekben	+
+	<i>Hiperlipidémia</i>	-
+	<i>Zsírlerekódás, fibrózus plakk az aortában</i>	-
+	<i>Fokozott intravaszkuláris koaguláció</i>	-

A beteg véralvadási zavara és glomerulonefritise a vaszkuláris illetve glomeruláris endothelium súlyos károsodásával magyarázható, mivel HO-1 hiányában az endotheliális sejtek sokkal érzékenyebbek oxidatív stresszre. A beteg aortájában előrehaladott érlemezésedés jeleit fedezték fel. Kutatócsoportunk munkája nyomán kiderült, hogy a beteg plazmájában a hemoglobin oxidálódott és *in vivo* hem-katalizált LDL-oxidáció történt.¹¹¹ A HO-1 deficiens beteg LDL-je tenyésztett endotheliális sejteken citotoxicitást okozott, szubletális dózisban viszont stresszadaptációs fehérjéket, HO-1-et és ferritint indukált.¹¹¹

1.5. A kén-hidrogén (H_2S) élettani szerepe

A kén-hidrogént sokáig csupán egy toxikus gázként tartották számon, újabban azonban kiderült, hogy a CO-hoz és NO-hoz hasonló gáztranszmitter.¹¹² A kén-hidrogént például vaszkuláris simaizomsejtek termelik, L-ciszteinből enzimatikusan.¹¹³ Fiziológias koncentrációja körülbelül 50 $\mu\text{mol/L}$ a szérumban és a szövetekben.¹¹⁴ A kén-hidrogén vazodilatátor,¹¹⁵ emellett protektív hatást fejt ki a kardiovaszkuláris rendszerben iszkémiás és gulladós állapot esetén.^{116,117} A kén-hidrogén lassítja az érlemezésedés progresszióját, mivel apoptózist indukál vaszkuláris simaizomsejtekben,¹¹⁸ illetve gátolja azok

kalcifikációját.¹¹⁹ Megállapították, hogy a Down-szindrómásokban ismert lassabb érlelmeszesedés-progrediáció a betegek fokozott H₂S-termelésével magyarázható.¹²⁰ A kén-hidrogén erős redukáló ágens. Ismert, hogy a plazmában előforduló tiolok (például glutation) gátolják az LDL hem-mediálta oxidációját.¹²¹ Exogén H₂S-donorok pedig csökkentették lipidperoxidációs termékek mennyiségét egy miokardium-károsodott modelben.¹²²

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célul tűztük ki, hogy tisztázzuk, milyen hatással vannak a hem-mediálta oxidáció körülményei és a kén-hidrogén –mely erős redukáló ágens és jelentős koncentrációban van jelen a szervezetben– a termék LDL kémiai és biológiai tulajdonságaira.
2. Az LDL oxidációjához szükséges hem leggyakoribb forrása az oxidált hemoglobin, mely gyulladásoos sejtekből származó oxidánsok hatására képződhet, hidrogén-peroxid-mediálta folyamat során. Ez alapján feltételeztük, hogy a hidrogén-peroxidhoz kémiailag hasonló, oxidált LDL-hez asszociált lipid hidroperoxidok is képesek a hemoglobin oxidálására.
3. Ismert, hogy az érlelmeszesedésoos plakkbán vasakkumuláció és a hemoxigenáz-1 fokozott expressziója figyelhető meg. Feltételeztük, hogy a lézió olyan pro-oxidáns környezet, melyben az eritrociták oxidatíván károsodhatnak, hemoglobin és hem szabadul fel, hem/vas-mediálta lipidoxidáció történik. Humán érminták lipidfrakcióját reagáltattuk vörösvértestekekkel, hemoglobinnal és hemmel, megvizsgáltuk a reakcióelegyek toxicitását és a HO-1 indukciós hatását tenyésztett endotheliális sejteken.
4. A HO-1 deficiens sejtek hemmel szembeni toleranciája csökkent az egészséges sejtekekhez képest. Megvizsgáltuk, hogyan reagálnak a HO-1 deficiens sejtek oxidált LDL-re és érlelmeszesedésoos plakkból származó lipidre.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Sejtenyésztés*

3.1.1. *Endotheliális sejt izolálás és tenyésztés*

Humán umbilikális véna endotheliális sejtek tenyésztéséhez a sejteket friss köldökzsinórból nyertük. A vénát kanuláltuk, kimostuk, majd feltöltöttük 0.2% diszpáz enzimet tartalmazó medium 199-sel. 6 óra elteltével (4°C) a sejteket kimostuk a vénából, centrifugáltuk (2000g, 4°C, 10 perc), és medium 199-ben tenyésztettük, mely tartalmazott még 15% FCS-t, penicillint (100 U/ml), streptomycint (100 U/ml), heparint (5 U/ml), L-glutamint, nátrium-piruvátot és endotheliális sejt növekedési faktort.^{16,79}

3.1.2. *Immortalizált limfocita sejtek tenyésztése*

Az immortalizált humán limfocita (HO-1+/+, HO-1-/-) sejtvonalakat Akihiro Yachie professzor (Kanazawa University, Japán) bocsátotta a rendelkezésünkre. A sejteket 15% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük.

3.2. *LDL szeparálás*

Az LDL szeparáláshoz Na₂EDTA-val (1 mg/ml végkoncentráció) alvadásgátolt vénás vért használtunk, melyet önkéntes donoroktól vettünk le, 12 órás éhezés után. A plazma sűrűségét 1.3 g/ml-re állítottuk be KBr-dal, és egy 39 ml térfogatú Quick-Seal csőben kétrétegű gradienst készítettünk úgy, hogy 10 ml beállított sűrűségű plazmára fiziológiás sóoldatot rétegeztünk. Az LDL-t egylépéses gradiens ultracentrifugálással izoláltuk (302000g, 4°C, 2 óra, VTi 50.2 rotor, Beckman Instruments). Kisebb plazmatérfogat esetén (1,5 ml) a plazma sűrűségét 1.21 g/ml-re állítottuk be, majd egy 5.1 ml térfogatú Quick-Seal csőben készítettük el a gradienst, és egy lépésben ultracentrifugáltuk (228000g, 90 perc, 4°C, VTi 65.2 rotor, Beckman Instruments). Az LDL frakciók agaróz gélelektroforézissel homogén béta-lipoproteinnek bizonyultak. Az LDL mintákat -70°C-on tároltuk, rázástól és fénytől óvtuk,

fehérjetartalmukat BCA protein módszerrel (Pierce) határoztuk meg. Az LDL koncentrációját mg fehérje/ml-ben fejeztük ki.

3.3. Hemoglobin preparálás

A hemoglobin preparálását önkéntesektől levett, heparinnal alvadásgátolt vérből végeztük. A vörösvértesteket centrifugálással (2000g, 5 perc, 4°C) választottuk el a plazmától és a vér többi alakos elemétől, majd fiziológiás sóoldattal háromszor mostuk. 5 ml mosott vörösvértesthez 30 ml 5 mmol/l-os nátrium-foszfát puffert adtunk (pH 7.4), és 1 óráig jégen állni hagytuk. A lizátumot centrifugálással (16800g, 4°C, 1 óra) elválasztottuk a sejtmembrántól, majd ioncserés kromatográfiával tisztítottuk tovább DEAE-Sepharose CL-6B oszlopon. A hemoglobint 50 mmol/l-es Tris bázissal eluáltuk (pH 7.4), majd ultrafiltrálással betöményítettük. Oxidált hemoglobin előállításához a hemoglobint 1,5-szörös moláris mennyiségű kálium-ferricianiddal inkubáltuk 30 percig, majd dializáltuk. A hemoglobin-koncentrációkat fotometriás módszerrel határoztuk meg.¹²³

3.4. Az LDL oxidatív rezisztenciájának meghatározása

Az LDL oxidatív rezisztenciájának mérésére munkacsoportunk kidolgozott egy módszert, melynek alapja az LDL hem mediálta lipid-peroxidációja.^{16,22} A kinetikai mérés során a hem degradációját követjük 405 nm-en LDL-t (200 µg/ml), HEPES puffert (10 mmol/l), hemet (5 µmol/l) és hidrogén-peroxidot (75 µmol/l) tartalmazó 200 µl végtérfogatú reakcióelegyben, automata Microplate Reader Model EL340-nel (Bio-Tek Instruments), 96-well plate-en 37°C-on, 4 órán keresztül. Az LDL oxidatív rezisztenciáját a ΔT at V_{max} értékkel jellemeztük, mely a hem degradáció sebességmaximumáig eltelt időt jelenti.

3.5. Az LDL oxidatív módosulásának detektálása

Az LDL konjugált dién tartalmát 234 nm-en fotometrállással határoztuk meg, az 50 µg/ml fehérjetartalmúra hígított LDL mintákból.

A tiobarbitursav reaktív anyagok meghatározásához 300 µl 200 µg/ml koncentrációjú LDL-hez 600 µl tiobarbitursav reagenst adtunk (0.375 g 2-tiobarbitursav, 2,08 ml 12 mol/l-es HCl, 15 ml 10%-os triklór-ecetsav 100 ml-ben), majd 15 percig forraltuk 100°C-on. Szobahőmérsékletűre hűtöttük, n-butanollal extraháltuk, centrifugáztuk, és tiszta felülúszót fotometrálunk 532 nm-en. A koncentrációsámításhoz használt extinciókoefficiens $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ volt, és az eredményeket nmol TBARS/mg LDL protein egységben adtuk meg. Az LDL lipid-hidroperoxid tartalmát a Ferrous Oxidation in Xilenol orange (FOX) módszerrel határoztuk meg, az eredményeket nmol LOOH/mg LDL protein egységben adtuk meg.¹²⁴

3.6. Endotheliális citotoxicitás vizsgálata

Az endotheliális sejteket 24 lyukú sejtenyésző edényben tenyésztettük. Az összefüggő sejtréteget háromszor mostuk Ca^{2+} és Mg^{2+} ionokat tartalmazó HBSS pufferrel, majd a sejtekre tettük a vizsgálandó reakcióelegyet. 4-8 órás inkubálás után a reakcióelegyet 500 µl 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatra ((3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-tetrazolium-bromid)) cseréltük, és további 6-12 órán keresztül inkubáltuk, hogy az MTT-t az élő sejtek metabolizálják. Az élő sejtek által termelt formazánt feloldottuk 200 µl dimetil-szulfoxidban, majd 570 nm-en fotometrálunk.

3.7. Immortalizált limfocita sejtek citotoxicitás-vizsgálata

A sejteket 16 óráig kezeltük a tesztoldatokkal, majd a sejtuszpenziót óvatosan centrifugáztuk (400 g, 10 perc), a tesztoldatokat MTT-oldatra cseréltük és a fent leírt módon vitalitás-tesztet végeztünk.

3.8. HO-1 mRNS mérése polimeráz lánreakcióval

A tesztoldatokkal kezelt sejteket mostuk, majd teljes RNS-t izoláltunk RNazol STAT-60-nal (TEL-TEST Inc., Friendswood, TX). Az RNS-ből cDNS-t készítettünk Superscript II reverz tanszkriptázzal, (Invitrogen, Carlsbad, CA), majd a hemoxigenáz-1, és kontrollként a ciklofilin

háztartási gének mennyiségét mértük real-time PCR-ral (iCycler iQ Real Time PCR System, Bio-Rad). A PCR reakcióelegy tartalmazott 3 mmol/l MgCl₂-ot, 0.2 mmol/l dNTP-t and 0.05 U/ml Taq DNA polimerázt (Invitrogen), 0.3 μmol/l primereket és 0.13 μmol/l fluoreszcens (TaqMan) próbát (fluorofór: FAM, quencher: TAMRA). Az eredményeket a kezeletlen sejtekben mért HO-1/ciklofilin darabszámhoz viszonyítva adtuk meg. A mérésekhez használt nukleotid-szekvenciák:

	HO-1	Ciklofilin
+ primer	+GGT-GAT-AGA-AGA-GGC-CAA-GAC-TG	+ ACG-GCG-AGC-CCT-TGG
- primer	-GGT-GTC-ATG-GGT-CAG-CAG-CT	-TTT-CTG-CTG-TCT-TTG-GGA-CCT
próba	<i>FAM-CTC-AAC-ATC-CAG-CTC-TTT-GAG-GAG-TTG-CAG-TAMRA</i>	<i>FAM-CGC-GTC-TCC-TTT-GAG-CTG-TTT-GCA-TAMRA</i>

3.9. Hemoxigenáz enzimaktivitás mérése

A hemoxigenáz enzimaktivitás meghatározásának során az endotheliális sejtekből szeparált mikroszóma bilirubin-generáló képességét mérjük.⁷⁹ A sejtszuszpenziót centrifugáltuk (1000g, 10 perc, 4°C), a sejteket MgCl₂-ot (2 mmol/l) tartalmazó foszfát pufferben (100 mmol/l, pH 7.4) felfuszpendáltuk, háromszor lefagyasztottuk (-70 °C) és felolvasztottuk, szonikáltuk és centrifugáltuk (18800g, 4°C, 10 perc). A felülúszóhoz patkánymáj citoszolt (2 mg), hemet (20 μmol/l), glükóz-6-foszfátot (2 mmol/l), glükóz-6-foszfát dehidrogenázt (0,2 U), és NADPH-t (0,8 mmol/l) adtunk, és 1 órán keresztül, 37°C-on sötétben inkubáltuk. A képződött bilirubint kloroformmal extraháltuk, és fotometráltuk 464 és 530 nm-en. A képződött bilirubin koncentrációját az A₄₆₄-A₅₃₀ abszorbancia-különbségre vonatkozó extinciókoefficiens (40 mM⁻¹cm⁻¹) használva számítottuk ki. A hemoxigenáz enzimaktivitást pmol bilirubin /mg endotheliális sejtfehérje/60 perc egységben adtuk meg.

3.10. Proteinanalízis Western blottal

3.10.1. HO-1

A vizsálandó sejteket szolubilizáltuk 10 mmol/l TrisHCl-dal (pH=7.2), mely tartalmazott még 5 mmol/l EDTA-t, 150 mmol/l NaCl-ot, 1 % Triton X 100-at, 0.5 % Nonidet P-40-et és proteáz-inhibítort (Complete Mini). 20 µg fehérjét vittünk fel 12,5 % SDS-polakrilamid géltre. Elektroforézis után nitrocellulóz membránra (Amersham Biosciences) transzferáltuk a fehérjéket, a HO-1-t poliklonális antitesttel (Calbiochem) jelöltük. Az antitest-antigén komplexet tormaperoxidázos kemilumineszcenciás reakcióval detektáltuk (Amersham Biosciences). A mennyiségi értékeléshez denzitometráltuk a fotólemezt (AlphaDigiDoc RT). A HO-1 indukcióját a kezeletlen sejtekben mért HO-1/GAPDH háztartási fehérje arányhoz viszonyítva adtuk meg. Ehhez a nitrocellulóz membránról eltávolítottuk az antitesteket: 2% SDS-t és 100 mmol/l merkaptó-etanol tartalmazó 62,5 mmol/l TrisHCl-dal (pH=6.7) mostuk a membránt 30 percig, 50°C-on, és GAPDH antitesttel újra blottoltunk.

3.10.2. Hemoglobin-oligomerek

150 nmol hemoglobint 12,5%-os SDS-polakrilamid gélen futtattunk. A hemoglobin oligomereket csirke anti-humán poliklonális hemoglobin antitesttel (ab17542, Abcam, Cambridge, UK) detektáltuk.

3.11. Érminták szövettani vizsgálata

Az ateroszklerotikus érdarabokat endarterektómiából, illetve szervdonor páciensekből nyertük. A szövettani vizsgálatot a DE-OEC Patológiai Intézetében végezték. A szövetet 10 %-os formalinban fixálták, majd paraffinba ágyazták. 5 µm-es szeleteket xilollal 8 percig paraffin-mentesítettek, majd csökkenő koncentrációjú izopropanol oldatokban rehidratálták. Hematoxilin-eozin festést végeztek: 6 perc hematoxilines kezelés után a metszetet 8 percig mosták desztillált vízzel, 2 percig eozinnal festették, szárították majd egy fedőlemezre vitték. A lemezeket Miramax Midi szkennelvel (3D Histech, Budapest) vizsgálták.

3.12. Az érminták feldolgozása

A szöveteket hideg fiziológiás sóoldatban mosva vértelenítettük, szűrőpapíron szárítottuk, és tömegmérés után folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A mintákat $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 12 hónapig tároltuk. A szövetmintákat fagyott állapotban elporítottuk, lipidtartalmukat kloroform-metanol (2:1) elegyével három lépésben extraháltuk, a szerves fázist nitrogén alatt bepároltuk.¹²⁵ Az extraktum tömegét lemértük, majd kevés kloroformmal visszaoldottuk és HBSS oldatban diszpergáltuk úgy, hogy koncentrációja 2 mg extraktum/ml legyen. A kloroformos oldat diszpergálását vortexeléssel segítettük. A biokémiai mérésekhez és a sejtes munkához ezt a szuszpenziót használtuk.

3.12. Az érminták oxidációs állapotának mérése

A konjugált dién méréshez 200 μl lipidsuszpenziót 400 μl ciklohexánnal extraháltunk, és a szerves fázist fotometrálunk 234 nm-en. A lipid-hidroperoxid-tartalom méréséhez jodometriás módszert használtunk. 100 μl lipidsuszpenziót 110 μl kloroformmal extraháltunk. 80 μl kloroformos oldathoz 120 μl ecetsavat és 40 μl 1,2 mg/ml-es kálium-jodid oldatot adtunk. Az elegyet 5 percig fénytől elzárva inkubáltuk majd 600 μl 40 mmol/l kadmium-acetát ($\text{Cd}(\text{OAc})_2$) hozzáadásával állítottuk le a reakciót. A szuszpenziót centrifugáltuk (10 perc, 10000g), majd 353 nm-en fotometrálunk. A lipid-hidroperoxid-tartalom kiszámításához a trijodid ionra (I_3^-) megadott moláris extinkciós koefficiens ($2,19 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) használtuk és nmol LOOH/ mg szövet módon fejeztük ki.¹⁶ A tiobarbitursav anyagok szintjének méréséhez a lipidsuszpenzióhoz kétszeres térfogatú TBAR-reagenst adtunk, 15 percig $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on melegítettük, majd lehülés után n-butanollal extraháltuk. A butanos fázist fotometrálunk 532 nm-en, a TBAR-tartalom kiszámításához az $1,56 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens használtuk és nmol/mg szövet egységben adtuk meg.

3.13. Az érminták neutrális lipid- és zsírsavtartalmának vizsgálata

A neutrális lipideket vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáltuk. A lipidet szilikagél lemezre (Silicagel G, Merck) vittük fel és n-hexán-éter-ecetsav (80:40:1 v/v) eleggyel futtattuk. A foszfolipidek a startpontotn maradtak, ezeket metanollal extraháltuk és egy másik lemezen, kloroform:metanol:petroléter:ecetsav:bórsav (40:20:30:10:1.8 v/v) eleggyel futtattuk. A lemezeket 5%-os foszfo-molibdénsavval (50 % etanol, 10 % perklórsav) hívtuk elő (100 °C, 10 perc). A lipidek azonosítását standardokkal való összevetéssel végeztük; a mennyiségi elemzéshez a lemezeket denzitometráltuk (QuantiScan, Biosoft) és az eredményeket mol%-ban fejeztük ki.

A zsírsavakat gázkromatográfiával vizsgáltuk. Az extrahált lipidet hidrolizáltuk és metiláltuk (methanol/sósav). A reakciót víz hozzáadásával leállítottuk, a metilált származékokat n-hexánnal extraháltuk. A szerves fázist injektáltuk Hewlett Packard 5890 gázkromatográfba (HP 5970 tömegspektrométer detektor). A zsírsavak azonosításához standardokat használtunk, a mennyiségeket mol%-ban fejeztük ki.

3.14. A hem és vas mérése

A hem mennyiségét fotometriásan (393 nm-en) mértük, (100 µl mintához 300 µl hangyasav hozzáadásával) és $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens alapján számítottuk. A minták vastartalmát közvetlenül az elporított szövetmintából végeztük, ferrozinos módszerrel.¹⁶

3.15. Ditirozin mérése hemoglobinban

1 ml 100 µmol/l hemoglobin oldat fehérjetartalmát egyenlő térfogatú 20 %-os triklórecetsavval kicsaptuk. 2 ml etanol hozzáadása után a pelletet centrifugáltuk (5 perc, 1500 g). A pelletet 1 mol/l-es sósavval mostuk, majd a hidrolízishez 0,5 ml 6 mol/l-es sósavat adtunk hozzá. 5 percig átbuborékkoltattuk nitrogénnel, majd 100°C-on forraltuk. A hidrolizátumot bepároltuk, metanollal oldottuk és HPLC-be (Merck) injektáltuk. Az

elválasztást izokratikusan, C18-as (fordított fázisú) kolonnán (4.6 x 150 mm, 5 µm töltet), a detektálást fluoreszcens detektorral (excitáció=280 nm, emisszió=410) végeztük. Az eluens 0,2 %-os trifluoecetsavat tartalmazó 20 %-os metanol volt. A ditirozin azonosítását standarddal végeztük, melyet magunk állítottunk elő. 10 mmol L-tirozint reagáltattunk 1 mmol H₂O₂-dal, 1 µmol/l tormapeoxidáz jelenlétében (pH 9.5, 16 óráig 37°C-on). Az enzimet ultrafiltrálással távolítottuk el majd bepárooltuk a reakcióelegyet. A maradékot etanollal oldottuk és preparatív szilikagél lemezre vittük fel. Butanol:ecetsav:víz (4:2:1 v/v) eleggyel futtattuk a lemezt, az R_f=0,25-ös fluoreszcens foltot lekapartuk, metanollal extraháltuk, és ezt használtuk standardként. Mennyiségileg görbe alatti területként adtuk meg az eredményeket.¹²⁶

3.15. Statisztikai elemzés

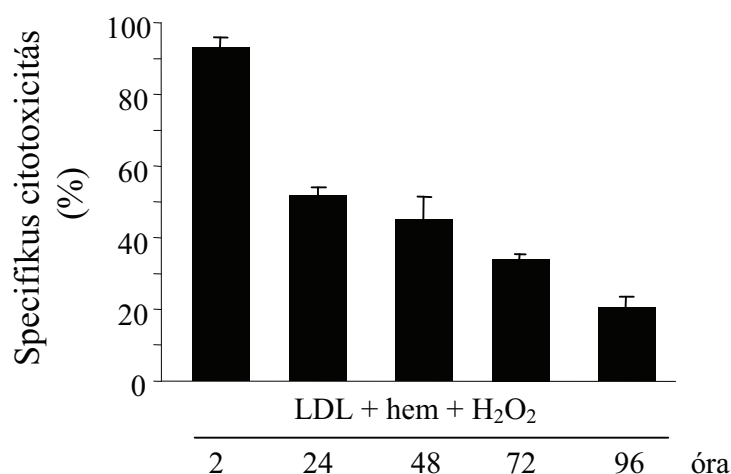
Az ábrákon és táblázatokban szereplő adatok legalább három független mérés átlagai, standard hibával. A szignifikanciát Student t-teszttel határoztuk meg, az ábrákon a szignifikáns különbségeket * (p<0,01) és ** (p<0,05) jelöli, a nem szignifikánsakat: n.s. Az ezektől való eltérést jelezzük.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. AZ LDL HEM-KATALIZÁLTA OXIDÁCIÓJA

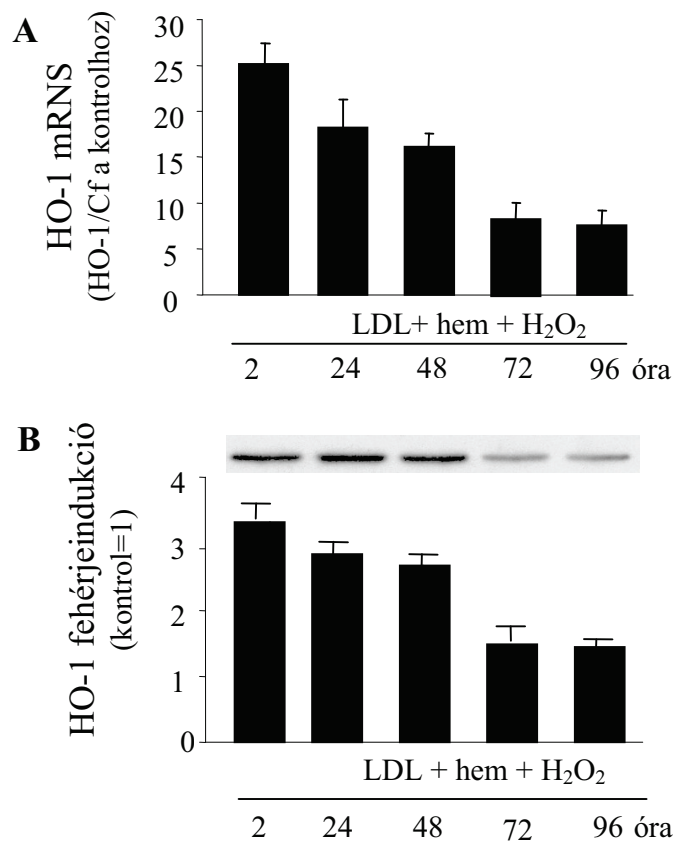
4.1.1 Az LDL oxidációja hemmel és hidrogén-peroxiddal

Az LDL-t (200 µg fehérje/ml) 5 µmol/l hemmel és 75 µmol/l H₂O₂-dal kezelve a hem 1-2 óra alatt gyakorlatilag eltűnik, ezzel párhuzamosan az LDL konjugált dién tartalma eléri a maximumot (2. ábra). Az így kapott modifikált LDL 200 µg/ml koncentrációban erősen toxikus tenyésztett endotheliális sejtekre. Megfigyeltük azonban, hogy 24 óra elteltével ennek a reakcióelegynek a toxicitása nagymértékben lecsökkent (93,3 %-ról 51,9%). További inkubáció (48, 72, 96 óra) még tovább csökkenti a módosított LDL toxicitását (45,2%, 34%, 20,6%).



5. ábra: Hem/H₂O₂-dal oxidált LDL toxicitása endotheliális sejteken csökken az oxidációs reakcióidő növekedésével. Az LDL-t 5 µmol/l hemmel és 75 µmol/l H₂O₂-dal kezeltük 37°C-on 2, 24, 36, 72 és 96 óráig. 200 µg/ml LDL-t 3 óráig inkubáltunk konfluens endotheliális sejtekkel, majd MTT-próbát végeztünk a sejtek túlélésének mérésére.

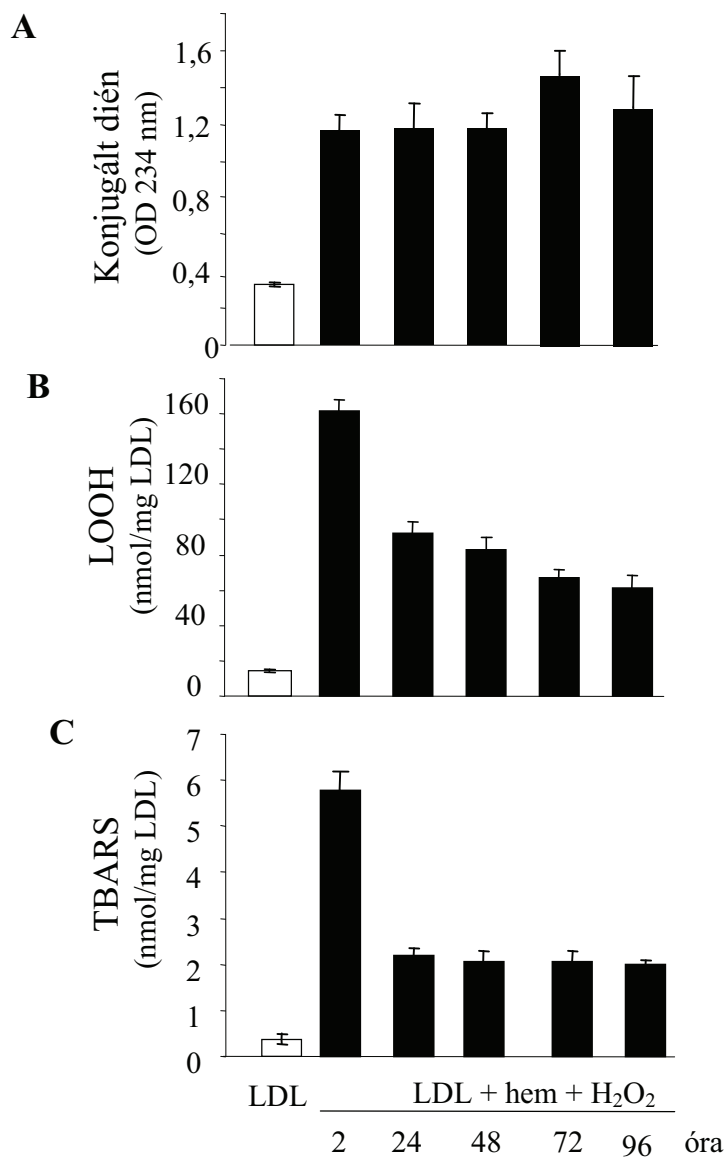
A toxicitási kísérletekkel párhuzamosan HO-1- indukciós vizsgálatot is végeztünk. A sejteket 50 µg/ml koncentrációjú oxidált LDL -lel kezeltük, és azt tapasztaltuk, hogy gén- és fehérjeindukció mértéke szintén függ az oxidáció időtartamától.



6. ábra: A hem/H₂O₂-dal oxidált LDL okozta endotheliális HO-1 indukció csökken az oxidációs reakcióidő növekedésével. Az LDL-t 5 μ mol/l hemmel és 75 μ mol/l H₂O₂-dal kezeltük 37°C-on 2, 24, 36, 72 és 96 óráig. 50 μ g/ml LDL-t 60 percig inkubáltunk konfluens endotheliális sejtekkel, majd visszaadtuk a sejtekre a médiát. A) 4 órás inkubáció után totál RNS-t izoláltunk és RT-PCR-ral meghatároztuk a minták HO-1 mRNS tartalmát. B) Az LDL-kezelés után 8 órával lizáltuk a sejteket, és Western blottal vizsgáltuk a hemoxigenáz-1 fehérjét. Mindkét esetben az indukciót a kezeletlen sejtekhez viszonyított növekményként fejeztük ki.

A citotoxicitás és a HO-1 indukció mértéke hasonlóan változik az idővel. A két órahosszáig oxidált LDL volt a leghatékonyabb induktor, 25-szörös génexpressziót és 3.3-szoros fehérjeindukciót eredményezve, és az indukció mértéke csökken az oxidáció időtartamának növelésével (24, 48, 96 óránál 18, 16, 7-szeres génindukciók és 2.9, 2.8, 1.5, 1.4-szeres fehérjeindukciók). Mivel az LDL oxidatív modifikációja során a zsírsavakból konjugált

diének, lipid-hidroperoxidok és tiobarbitursav-reaktív anyagok képződnek, így megmértük ezen lipidperoxidációs termékek mennyiségét az oxidáció 2., 24., 48., 72. és 96. órájában (7. ábra).

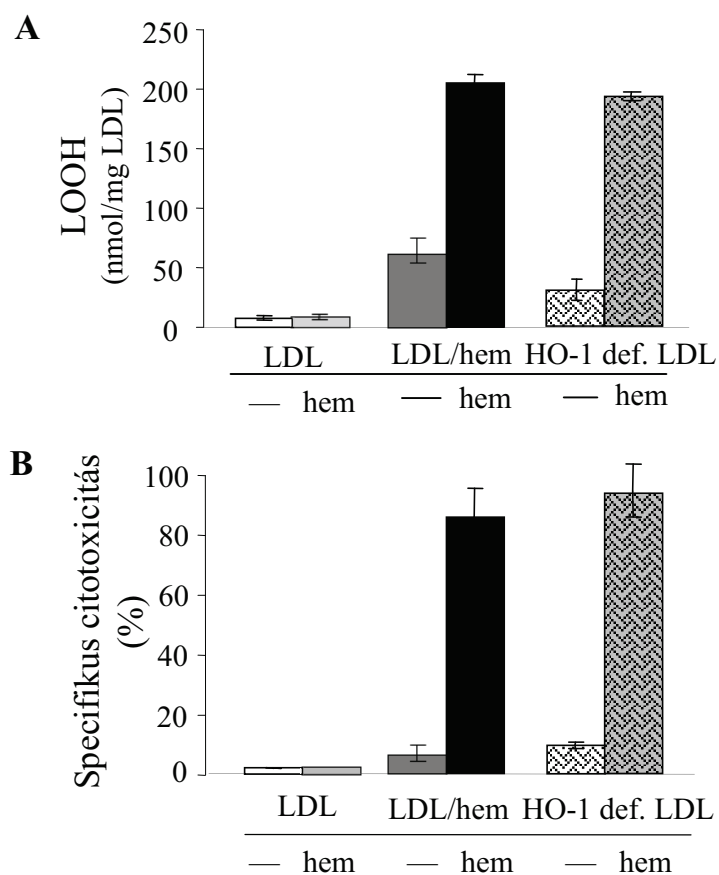


7. ábra: A lipidperoxidációs paraméterek időbeli változása az LDL hem-mediálta oxidációja során. Az LDL-t 5 $\mu\text{mol/l}$ hemmel és 75 $\mu\text{mol/l}$ H₂O₂-dal kezeltük 37°C-on 2, 24, 36, 72 és 96 óráig. A) A konjugált diének méréséhez 5 $\mu\text{g/ml}$ LDL-t 234 nm-en fotométerlünk. B) A lipid-hidroperoxidokat a FOX módszerrel határoztuk meg. C) A tiobarbitursav-reaktív anyagokat a Módszerekben leírtak szerint határoztuk meg.

Mindhárom termék a reakció első két órája alatt elérte a maximális mennyiséget. A konjugált dién-tartalom nem változott szignifikánsan 96 óráig, a TBAR-ok mennyisége 24 órára jelentősen lecsökkent és maradt ezen a szinten a kísérlet végéig, a lipid-hidroperoxid szint pedig fokozatosan csökkent a kísérlet időtartama alatt. Megállapítható, hogy mind a citotoxicitás, mind a HO-1 indukció mértéke a lipid-hidroperoxid szinttel mutat szoros összefüggést. Ez összhangban van azzal a korábbi eredményünkkel, hogy oxidált LDL LOOH-ja ekvimoláris mennyiségű kumin-hidroperoxiddal, mely egy szerves lipid-hidroperoxid, megegyező mértékű károsodást okoz endotheliális sejteken.¹¹¹ A lipid-hidroperoxidok kulcsszerepét támasztja alá az is, hogy az ebselen, egy szerves szelén vegyület, mely redukálja a hidroperoxidokat, védi a humán fibroblaszt sejteket az oxidált LDL okozta károsodástól.¹²⁷ A lipid-hidroperoxidoknak nemcsak az oxidált LDL okozta toxicitás, hanem az indukáló hatás tekintetében is központi jelentőségük van. Agarwal és munkatársai az oxidált LDL okozta HO-1 indukció mechanizmusát vizsgálták és megállapították, hogy az oxidált LDL-t alkotó vegyületek közül egy lipid-hidroperoxid, a 13-HPODE a leghatékonyabb induktor, mely transzkripciós szinten szabályozza a HO-1-et egy, a HO-1 promotor régiójában levő, rá specifikus elemén keresztül.¹²⁸ Az LDL lipidfrakciója triglicerideket, koleszterin-észtereket, foszfolipideket, szabad koleszterint, lizofoszfatidilkolint, foszfatidil-etanolamint, diacilglicerolt, ceramidot és foszfatidilinozított tartalmaz.¹²⁹ Oxidáció során ezekből számos biológiailag aktív vegyület képződik. Theron és munkatársai frakcionálták az oxidált LDL-t és megállapították, hogy míg a szabad zsírsavak és a foszfolipidek hidroperoxidjai kevésbé, a koleszterin és a koleszterin-észterek hidroperoxidjai, valamint a foszfatidilkolin kis szénatomszámú aldehid-származékai nagymértékben toxikusak humán endotheliális sejtekre.⁶⁷ Hughes és munkatársai sertésaorta simaizomsejtjein vizsgálták az oxidált LDL hatását, és megállapították, hogy elsősorban a 7-keto-koleszterin és a 7-hidroxi-koleszterin felelősek az oxidált LDL citotoxicitásáért.¹³⁰

4.1.2. Az LDL oxidációja hemmel

A hem hidrogén-peroxid nélkül is oxidálja az LDL-t, de a reakció lassabb.¹⁶ Egészséges önkéntesektől származó LDL-eken 16 órás hem-kezelést (5 μ mol/L) végeztünk, melynek során az LDL kissé oxidálttá (58 nmol LOOH/mg) és enyhén citotoxikussá (4%) válik (8. ábra).



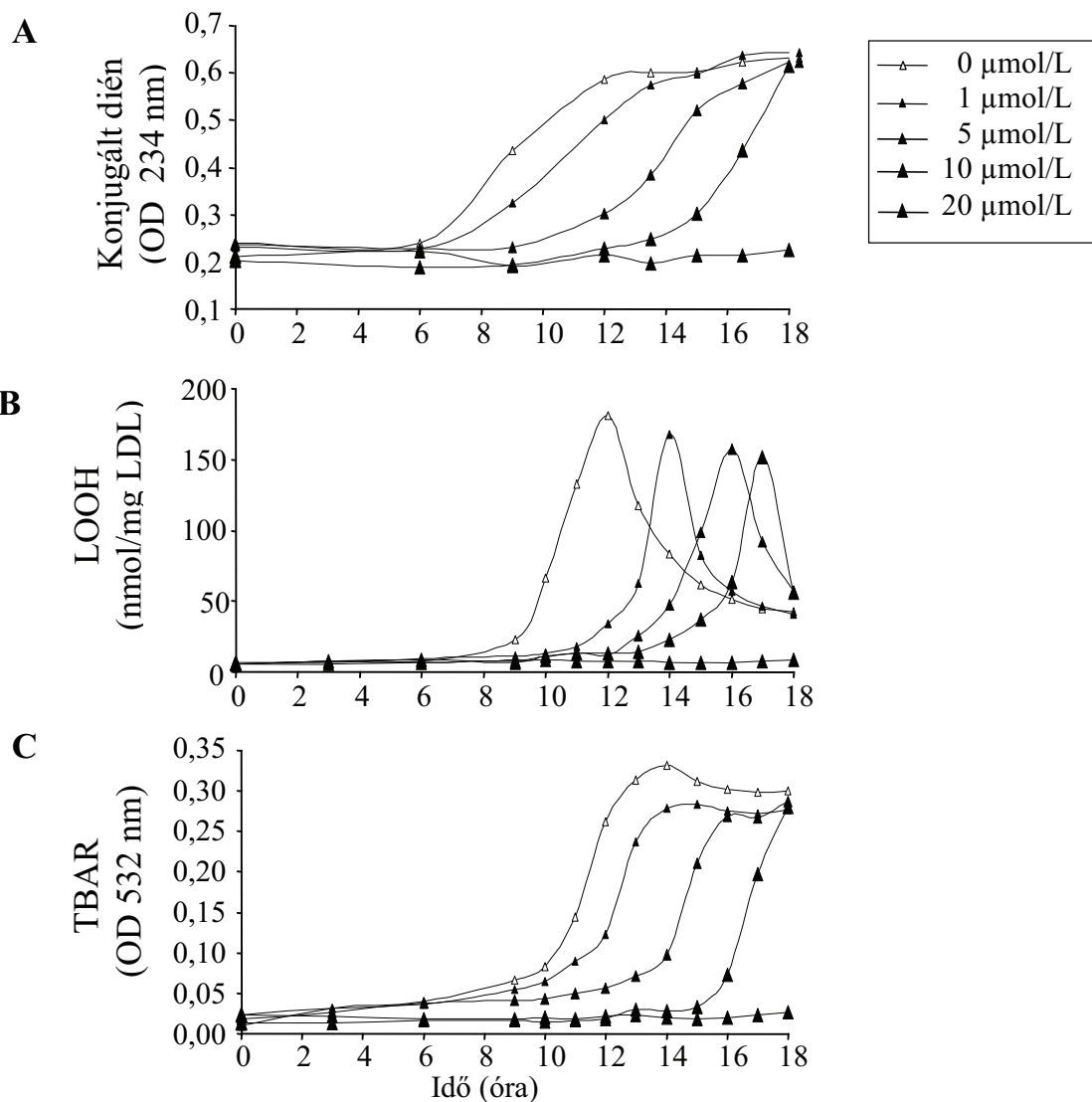
8. ábra: Kontrol LDL és a HO-1 deficiens beteg LDL-jének kezelése hemmel. LDL-hez, előzetesen 5 μ mol/L hemmel 16 órán át inkubált LDL-hez (LDL/hem) és a HO-1 deficiens beteg LDL-jéhez 1 μ mol/L hemet adtunk és 15 perc múlva mértük az LDL LOOH-tartalmát, a FOX módszerrel (A) és endotheliális citotoxicitását MTT-próbával (B).

Ezután újból hemet adtunk és rövid idő múlva vizsgáltuk a csoportokban az LDL-ek LOOH-tartalmát (8. ábra). A natív LDL-nek ilyen rövid hemkezelés hatására nem változott az

LOOH-tartalma. A HO-1 deficiens beteg plazmájából izolált LDL-nek, mely már kissé oxidált volt (30 nmol LOOH/mg) a beteg állandó hemolízise és magas ferrihemoglobin-szintje miatt, drámaian megnőtt a toxicitása és az LOOH- szintje.¹¹¹ Az egészséges önkéntesektől származó, hemmel kissé oxidált LDL-ben újabb hemkezelés hatására a lipid-hidroperoxid tartalom szintén nagymértékben megemelkedett 15 perc alatt (58-ról 205 nmol/mg-ra) és az LDL erősebben toxikus lesz (39%). Ez a kísérlet modellezi azokat a folyamatokat, melyek a hemoxigenáz-1 deficiens beteg szervezetében játszódtak le. A hemoxigenáz-1 deficiens beteg LDL-jének hasonló a lipid-hidroperoxid tartalma a csak hemmel oxidált, egészséges önkéntesektől származó LDL-hez. Az ismételt hem-expozíció mindkét LDL-ben gyorsan és nagymértékben megnöveli a LOOH-szintet és ezzel párhuzamosan az LDL toxicitását. Megállapítható, hogy a mérsékelt oxidált LDL-ben jelen levő kevés lipid-hidroperoxid hem hozzáadásakor ugyanazt a katalizáló hatást fejt ki a hem degradációjára, mint a hidrogén-peroxid.

4.1.3. A kén-hidrogén és az LDL- oxidáció

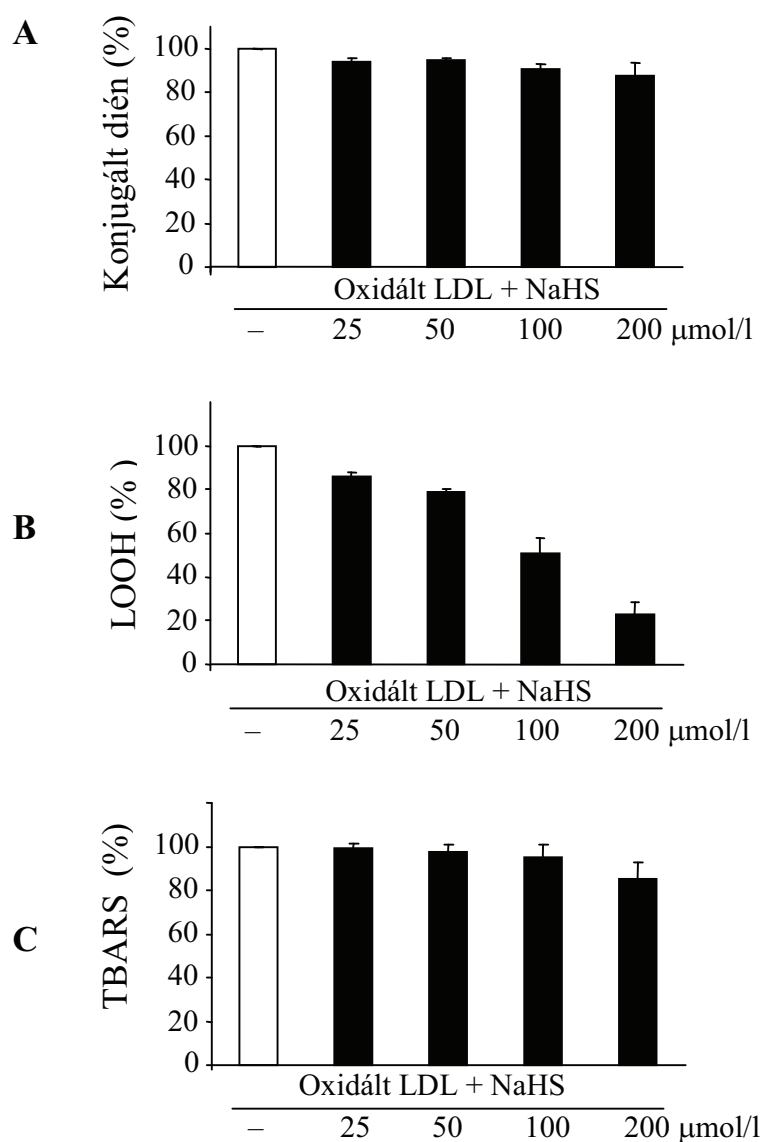
Kén-hidrogén-forrásként nátrium-hidrogén-szulfid (NaHS) vizes oldatát használtuk. LDL-t oxidáltunk hem/H₂O₂-dal úgy, hogy egyidőben különböző koncentrációjú NaHS-oldatokat is a reakcióelegyhez adtunk. Az oxidáció kinetikáját a lipidperoxidációs termékek (konjugált diének, LOOH-k és TBAR anyagok) mennyiségének időbeli követésével mértük (9. ábra). A kén-hidrogén –már a fiziológiástól sokkal kisebb mennyiségben- dózisfüggően lassítja az LDL hem-mediálta oxidációját. Ennek magyarázata lehet, hogy a kén-hidrogén redukálja a katalizátor H₂O₂-ot és a reakció elején képződő reaktív intermediereket, megakasztva ezzel az oxidációs lánreakciót.



9. ábra: A kén-hidrogén dózisfüggő mértékben gátolja az LDL oxidációját. 200 μg/mL LDL-t oxidáltunk 37 °C-on 5 μmol/L hemmel, 1-20 μmol/L NaHS jelenlétében. 2-3 óránként mintát vettünk és lemértük a konjugált dién, LOOH ésTBARS értékeket.

Ennek megerősítésére megvizsgáltuk, hogyan változnak az oxidált LDL lipidperoxidációs paraméterei kén-hidrogénnel történő kezelés hatására (10.ábra). Hemmel és hidrogén-peroxiddal oxidált LDL-t 30 percig kezeltünk különböző koncentrációjú NaHS-oldatokkal,

majd mértük a lipidperoxidációs paraméterek mennyiségét. A lipidperoxidációs paraméterek közül a LOOH szintjét csökkentette dóziszfüggően a kén-hidrogén kezelés, a konjugált dién és a TBARS értékeket nem befolyásolta számottevően.

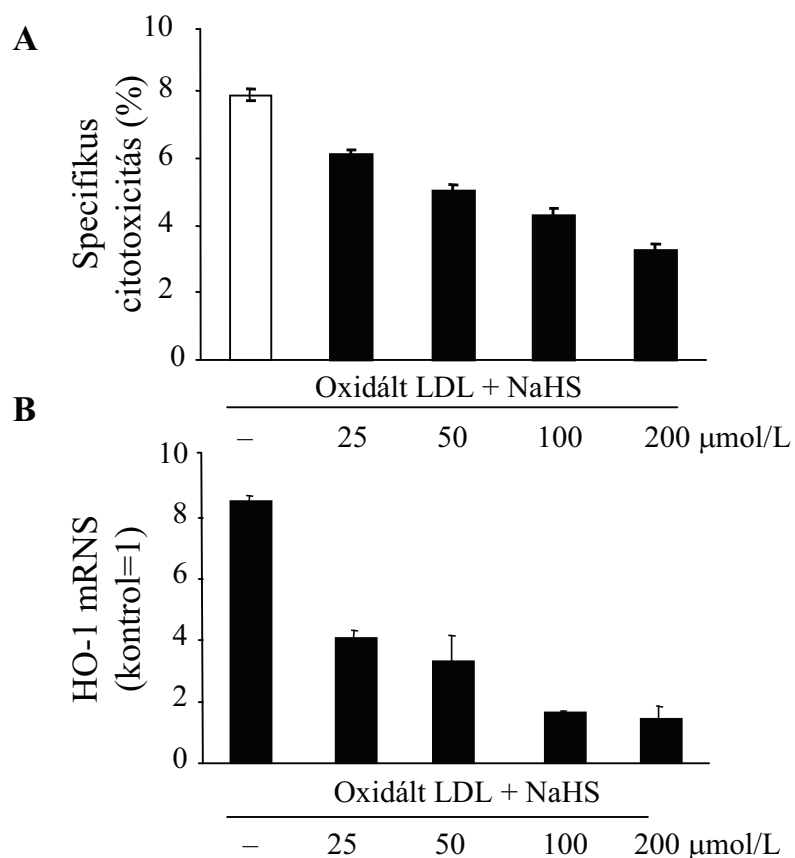


10. ábra: A kén-hidrogén csökkenti oxidált LDL lipid-hidroperoxid tartalmát.

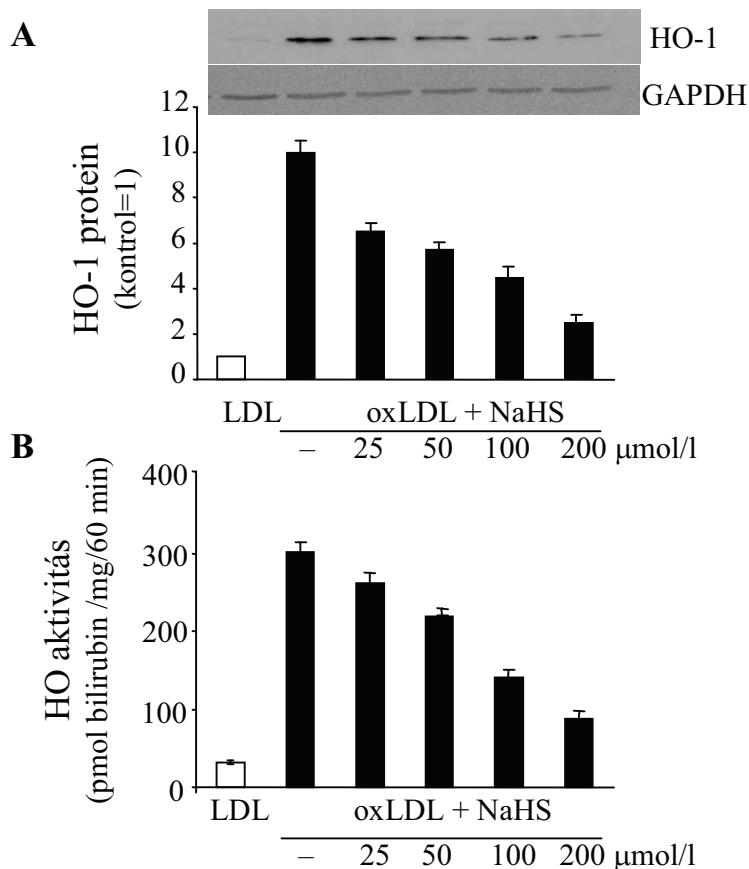
5 μmol/L hemmel 12 óra alatt oxidált LDL-t 30 percig inkubáltunk 37 °C-on 25-200 μmol/L NaHS oldatokkal, majd mértük a lipidperoxidációs paraméterek mennyiségét.

Az így módon kezelt oxidált LDL-t endotheliális sejtekre vittük és mértük a citotoxicitást és az LDL hemoxigenáz-indukáló képességét (11-12. ábra). A kén-hidrogén dóziszfüggően csökkenti az oxidált LDL okozta endotheliális citotoxicitást (11. A ábra), ezzel párhuzamosan

a HO-1 mRNS indukció is csökken (11. B ábra). Ugyanez a kén-hidrogén koncentrációjától függő csökkenés figyelhető meg a HO-1 fehérjeexpresszióban, mind Western blot vizsgálattal (12. A ábra), mind a hem-oxigenáz aktivitás mérésével (12. B ábra).



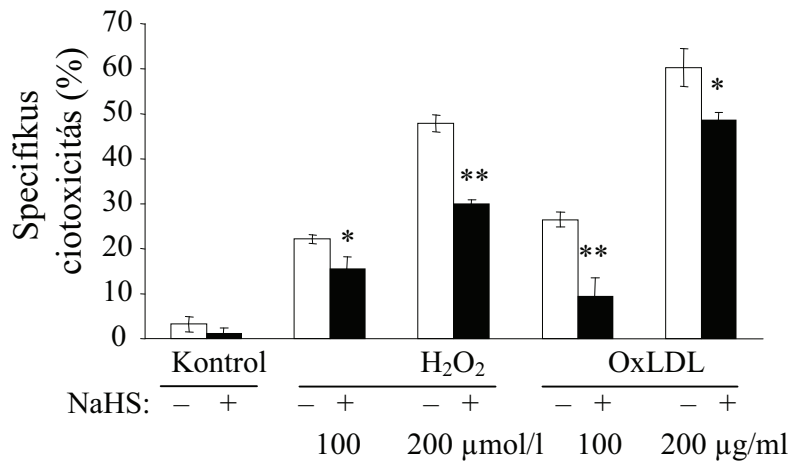
11. ábra: A kén-hidrogén kezelés mérsékeli az oxidált LDL citotoxicitását és HO-1 mRNS indukáló képességét. 5 μmol/l hemmel 12 óra alatt oxidált LDL-t 30 percig inkubáltunk 37 °C-on 25-200 μmol/l NaHS oldatokkal, majd endotheliális sejtekre tettük. A) Citotoxicitást mértünk 4 óra után MTT-próbával B) 1 h után totál RNS-t izoláltunk és HO-1mRNS indukációt mértünk real time PCR-ral.



12. ábra: A kén-hidrogén kezelés mérsékeli az oxidált LDL HO-1 fehérjeindukációs képességét. 5 $\mu\text{mol/l}$ hémnel 12 óra alatt oxidált LDL-t (200 $\mu\text{g/ml}$) 30 percig inkubáltunk 37 °C-on 25-200 $\mu\text{mol/l}$ NaHS oldatokkal, 1 órára endotheliális sejtekre tettük, majd 8 óra múlva a sejteket feldolgoztuk. A) A sejteket szolubilizáltuk és Western blottal vizsgáltuk a HO-1 és GAPDH (háztartási fehérje) fehérjék mennyiségét B) A sejtekből mikroszómát szeparáltunk és HO enzimaktivitást mértünk.

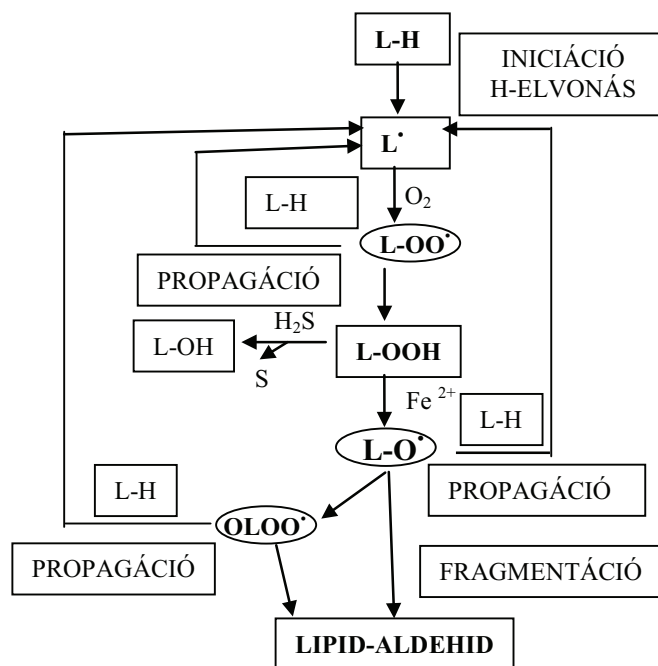
Mivel korábban megállapítottuk, hogy az oxidált LDL citotoxikus hatása és HO-1 indukálóképessége a lipid-hidroperoxid tartalmával arányos, így elmondható, hogy a kén-hidrogén a LOOH-ok redukcióján keresztül fejt ki antioxidáns hatást. A kén-hidrogén más mechanizmussal is védheti az endotheliumot oxidatív károsodással szemben. Endotheliális sejteket 4 órán át fiziológiás mennyiségű (50 $\mu\text{mol/l}$) kén-hidrogénnel előkezeltünk, majd H_2O_2 -dal és oxidált LDL-lel citotoxicitási vizsgálatot végeztünk (13. ábra). A kén-hidrogén

előkezelés mindkét toxikus ágenssel szemben ellenállóbbá tette a sejteket, minden alkalmazott koncentrációban csökkent a citotoxicitás.



13. ábra: A kén-hidrogén ellenállóvá teszi az endotheliális sejteket a hidrogén-peroxiddal és oxidált LDL-lel előidézett toxikus hatással szemben. A sejteket 4 óráig 50 μmol/l NaHS-dal kezeltük, majd 1 óráig 5 μmol/l hemmel szenzitizáltuk, végül 100 és 200 μmol/l-es H₂O₂-dal és 100 és 200 μg/ml-es oxidált LDL-lel inkubáltuk. 4 óra elteltével MTT-próbát végeztünk.

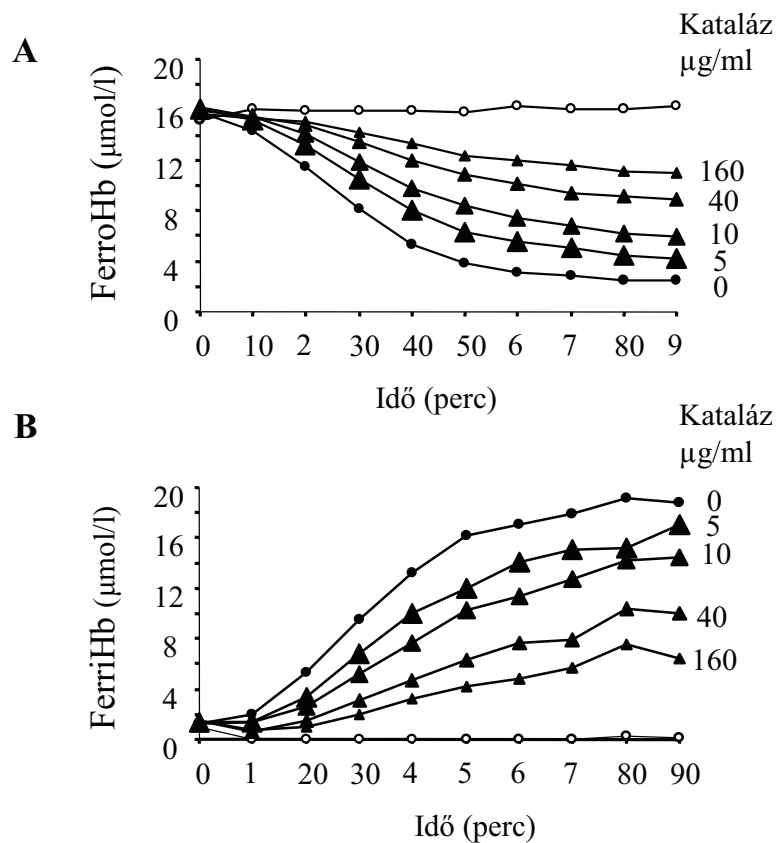
Eredményeink szerint a kén-hidrogén a lipid-hidroperoxidok redukción keresztül fejt ki lipidperoxidációt gátló hatását. A lipidoxidáció mechanizmusát és a kén-hidrogén szerepét a 14. ábra foglalja össze. A lipid-hidroperoxidok redukciónjával a kén-hidrogén gátolja alkoxil (LO•) és epoxi-allil-peroxil (OLOO•) gyökök képződését,¹³¹ így a propagáció két útvonalát megakadályozva lassítja a lipidoxidációt.



14. ábra: A kén-hidrogén szerepe a lipidperoxidáció gátlásában

4.2. A HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓJA

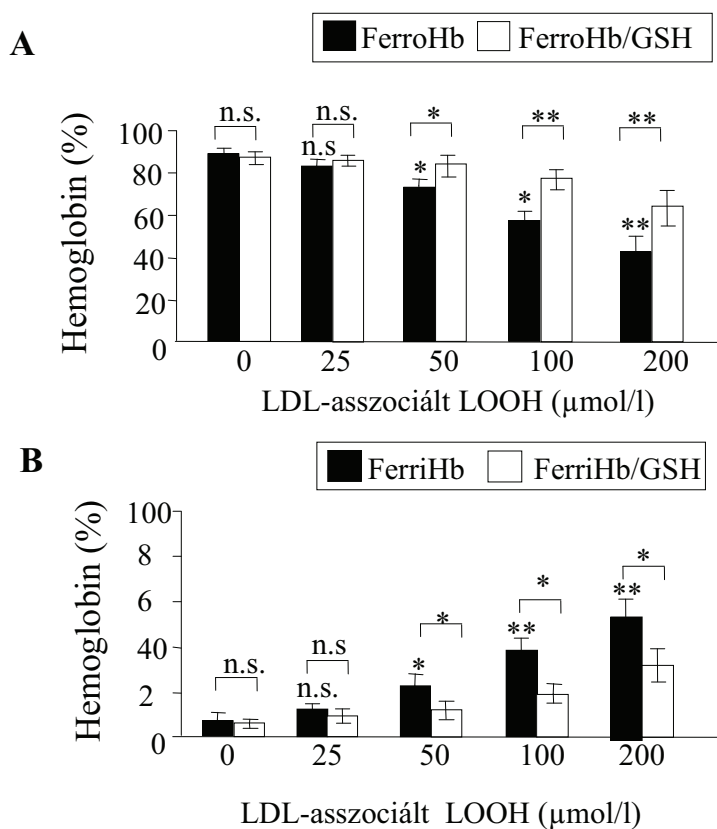
A HO-1 deficiens beteg plazmájában lezajló LDL-oxidációban kulcsszerepe van a ferrohémoglobin ferrihémoglobinná alakulásának, így kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen folyamatok vezethettek oda, hogy a beteg plazmájában a teljes hemoglobin 80%-a ferrihémoglobin volt ($60 \mu\text{mol/l}$).¹¹¹ Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy aktivált gyulladáscélzó sejtek képesek a vörösvértestekben levő hemoglobin oxidálására.²³ Mivel a hemoxygenáz-1 deficiens beteg állandó gyulladással küzdött, ez magyarázhatja az emelkedett ferrihémoglobin szint jelenlétét. Korábban megállapítottuk, hogy oldatban a hemoglobin gyorsan oxidálódik PMA-val aktivált polimorfonukleáris sejtek hatására,⁷⁶ mely folyamat kataláz enzimmel gátolható, mivel a folyamatot hidrogén-peroxid mediálja (15. ábra).



15. ábra: A ferrohémoglobin oxidációja aktivált PMN-sejtek hatására. 20 $\mu\text{mol/l}$ ferrohémoglobint kezeltünk PMA-val (500 ng/ml) aktivált PMN sejtekkel (10^7db/ml)-(●○), illetve különböző koncentrációjú kataláz enzimmel (▲▼). A) A ferrohémoglobin-koncentráció változása. B) A ferrihémoglobinszint változása.

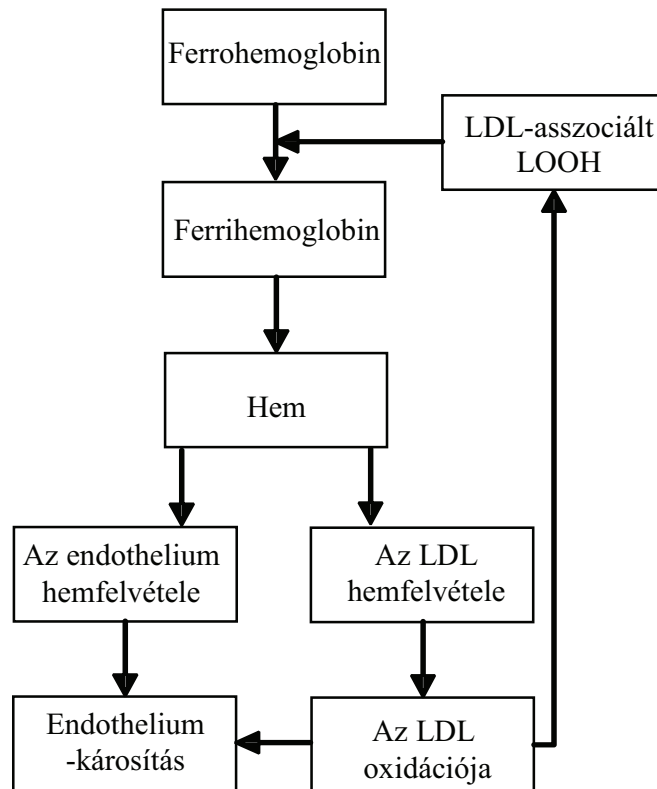
Ennek alapján merült fel a lehetőség, hogy lipid-hidroperoxid, illetve az oxidált LDL képes-e a hemoglobin oxidálására. Oxidált LDL valóban átalakítja a ferrohémoglobint ferrihémoglobinná *in vitro*, mely reakció mértéke és kinetikája az oxidált LDL lipid-hidroperoxid tartalmától függ (16. ábra). Ennek igazolására elvégeztük a kísérletet úgy is, hogy a hemoglobin hozzáadása előtt az oxidált LDL-ből eltávolítottuk a lipid-hidroperoxidokat. Ehhez az oxidált LDL-t egy óráig, 37 °C-on inkubáltuk ekvimoláris mennyiségű glutationnal, glutation-peroxidáz jelenlétében, melynek során az oxidált LDL lipid-hidroperoxid tartalma 90%-kal csökkent. A glutationnal kezelt oxidált LDL kevésbé

hatékonyan oxidálta a hemoglobint, ami a lipid-hidroperoxidok hemoglobin-oxidációban betöltött központi szerepét támasztja alá.



16. ábra: A hemoglobin dóziszfüggően oxidálódik oxidált LDL-hez asszociált lipid-hidroperoxidok hatására. 10 μmol/l ferrohémoglobint kezeltünk különböző LOOH-tartalmú oxidált LDL-lel (fekete oszlopok) és ekvimoláris mennyiségű glutationnal előkezelt oxidált LDL-lal (üres oszlopok). A) A ferrohémoglobin-koncentráció változása. B) A ferrihémoglobin-szint változása.

Ezzel a HO-1 deficiens beteg plazmájában végbemenő hemoglobin átalakulásának egy újabb lehetőségére világíthatunk rá, mely szerint a hemoglobin oxidációja oxidált LDL lipid-hidroperoxidjainak hatására megy végbe (17. ábra).



17. ábra. A humán hem-oxigenáz-1 deficienciában feltételezett oxidációs „ördögi kör”.

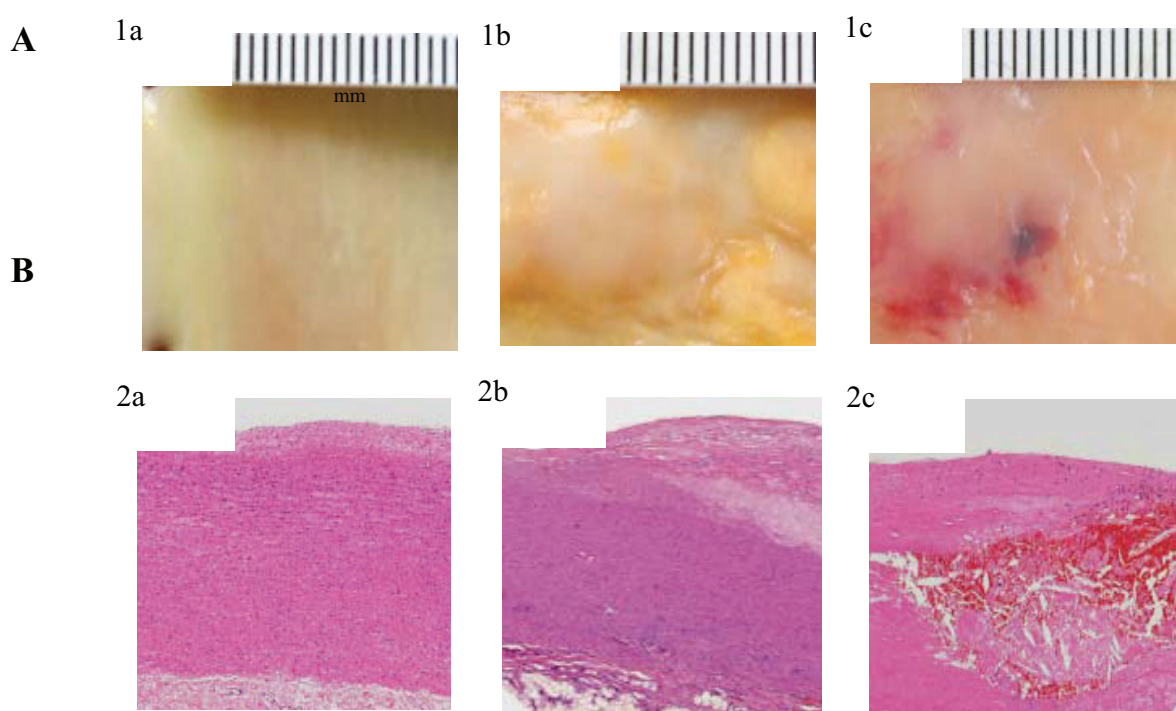
Ennek során a) a ferrohémoglobin ferrihémoglobinná oxidálódik, b) a ferrihémoglobinnól felszabaduló hem beékelődik az LDL-be, c) a hem-mediálta oxidáció során felnyílik a hem, vas szabadul fel, a vas katalizálja az LDL zsírsavjainak és proteinjeinek oxidációját, d) az LDL lipid hidroperoxidjai további ferrohémoglobint oxidálnak ferrihémoglobinná.

4.3. HEM ÉS HEMOGLOBIN INDUKÁLTA LIPIDPEROXIDÁCIÓ AZ ATEROSZKLEROTIKUS LÉZIÓKBAN

4.3.1. A vizsgálatba bevont érminták lipidtartalmának karakterizálása

A vizsgálatba bevont minták elsődleges osztályozása makroszkopikus szerkezetük alapján történt (18. A ábra). Kontroloknak tekintettük azokat a mintákat, melyeknél atheroszklerózisnak nem volt szemmel látható jele (20 db, 1a). A második csoportba (33 db)

kerültek a megvastagodott falú, az intima alatt nagy zsíros felhalmozódással rendelkező érminták (aterómák) melyeken fizikai sérülésnek nem volt nyoma (1b). A harmadik csoportba (28 db) soroltuk a megrepedt plakkokat, melyekben a zsírlerakódáson túl bevézést láttunk (komplikált léziók, 1c). A szövettani vizsgálat extracelluláris zsírfelhalmozódást és koleszterin-kristályokat mutatott ki az aterómában (18.B ábra, 2b) A harmadik csoport szövettani mintáiban (18. ábra, 2c) vörösvértesteket lehet látni a zsíros plakkban.



18. ábra: A vizsgálatba vont érminták makroszkópos képe (A) és szövettani metszetei (B).

Meghatároztuk a mintákban néhány lipidperoxidációs termék (konjugált diének, lipid-hidroperoxidok és tiobarbitursav-reaktív anyagok), az antioxidáns α -tokoferol és a szabad vas szintjét (4. táblázat). Mind a lipidperoxidációs termékek, mind a vas koncentrációja kissé emelkedett volt az aterómákban a kontrolokhoz képest, és legnagyobb volt a komplikált plakkokban mely arra utal, hogy az ateroszklerózis előrehaladásával fokozódik a plakk lipidjének oxidációja. Mivel az α -tokoferol zsírolékony vegyület, a nagyobb lipidtartalmú

mintákban több α -tokoferol található, mint a kontrolban. Ez korrelál korábbi eredményekkel, melyek kimutatták, hogy az érlemezésedéses plakkokban akkumulálódik az α -tokoferol.^{132,133}

	Kontrol n=20	Ateróma n=33	Komplikált lézió n=28
Lipidtartalom (mg /mg)	0.017 ± 0.002	0.031 ± 0.005	0.042 ± 0.009
Vas (nmol/mg)	0.059 ± 0.027	0.185 ± 0.096	0.433 ± 0.075
α -tokoferol (nmol/mg)	0.404 ± 0.104	1.442 ± 0.195	0.564 ± 0.139
Konjugált dién (A ₂₃₄ /mg)	0.006 ± 0.002	0.021 ± 0.003	0.047 ± 0.019
LOOH (nmol/mg)	0.003 ± 0.003	0.248 ± 0.106	0.465 ± 0.11
TBARS (nmol/mg)	0.002 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.028 ± 0.012

4. táblázat: Az érminták osztályzása. A vizsgált érminták vas, lipid, α -tokoferol -tartalma és a lipidperoxidációs termékek mennyisége, 1 mg szövetre vonatkoztatva.

Az aterómák α -tokoferol szintje jelentősen, 2,5-szer nagyobb, mint a komplikált lézióké, Ez azzal magyarázható, hogy oxidatív stressz érte a léziót, mely során megfogyatkozott az antioxidáns α -tokoferol. Összehasonlítottuk továbbá a kontrolok és az aterómák lipidösszetételét is (5. táblázat). Az ateroszklerotikus plakk lipidjeinek kb. 75%-át koleszterin és koleszterin-észterek alkotják, nagyobb frakciót képeznek még a szabad zsírsavak, tri-és digliceridek, foszfolipidek.⁴⁸ A főbb lipidfrakciók közül emelkedett volt az aterómában a koleszterin, illetve oxidált lipidek: oxidált koleszterin és lizo-foszfolipidek aránya a kontrolhoz képest, míg trigliceridek és szabad zsírsavak tekintetében nem volt különbség a két csoport között. A lipidek zsírsavösszetételét megvizsgálva azt kaptuk, hogy az aterómákban 1,9-szer több egyszeresen telítetlen zsírsav, de kevesebb (60%) többszörösen telítetlen zsírsav van, mint a kontrolokban. Az oleinsav felszaporodása és a linoleinsav hiánya az aterómákban a lipidek oxidatív modifikációját jelzi.

5. táblázat A kontrol erek és az aterómák lipid- és zsírsavösszetételének összehasonlítása.

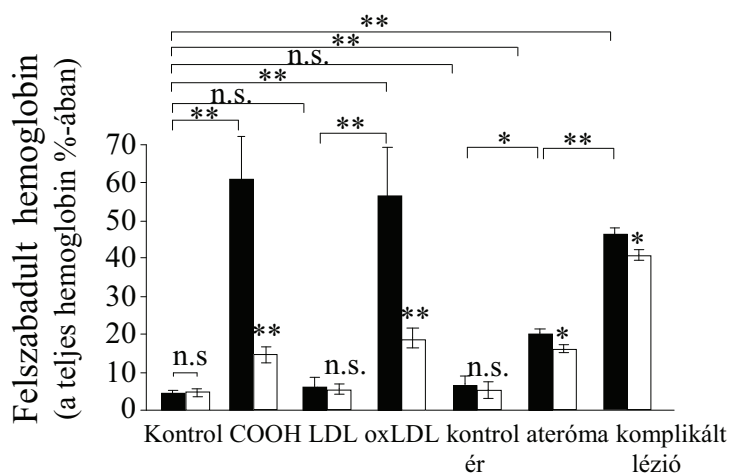
A lipidfrakciókat vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáltuk. A zsírsavösszetételt GC/MS segítségével mértük a lipid hidrolízise és zsírsavak illékonyá tétele után.

		Kontrol n=20	Ateróma n=33	Szignifikancia p<0.05
Lipidösszetétel (mol%)	Koleszterin	16.9 ± 4.3	42.6 ± 11.2	0.01
	Oxy-szterolok	2.05 ± 0.5	5.14 ± 1.2	0.04
	Digliceridek	0	1.17 ± 0.2	0.04
	Trigliceridek	54.4 ± 12.5	35.8 ± 18.2	n.s.
	Szabad zsírsavak	17.3 ± 5.4	8.06 ± 4.5	n.s.
	Lizo-foszfolid	2.61 ± 0.6	4.42 ± 0.8	0.03
	Foszfatidil-szerin	6.61 ± 1.3	2.85 ± 2.2	0.04
	Zsírsavösszetétel (mol%)	C14:0	0	0.63 ± 0.6
C16:0		28.7±5.6	27.1 ± 8.2	n.s.
C18:0		10.98±4.3	10.1 ± 7.6	n.s.
C16:1		0	2.56 ± 0.92	0.04
C18:1		18.31±5.2	28.84 ± 8.3	0.02
C20:1		0.1±0.2	3.91 ± 1.1	0.04
C18:2		39.58±8.9	21.9 ± 7.6	0.02
C20:3		0.78±0.5	1.54 ± 1.2	n.s.
C20:4		1.54±0.9	1.21 ± 1.1	n.s.
Össz SFA %		39.68	37.83	n.s.
Össz MUFA %		18.41	35.31	0.02
Össz PUFA %		41.9	24.65	0.02

4.3.2. A lipid és a vörösvértestek reakciója

Az ateroszklerotikus lézió lipid elemei plakkruptúra során⁴⁵ vagy a neovaszkularizációban keletkező sérülékeny hajszálerek megrepedésekor⁴⁶ kerülnek közvetlen kapcsolatba vörösvértestekkel. A vörösvértestek fizikailag is sérülhetnek az érpályából való kilépéskor, de feltételezésünk szerint kémiai reakciók során is roncsolódhatnak. Ismert, hogy a kumin-hidroperoxid, mely egy zsíroldékony hidroperoxid, vörösvértestek lízisét okozza, a sejtmembrán lipid és protein alkotórészeinek oxidatív károsítása útján.¹³⁴ Mivel az aterómában

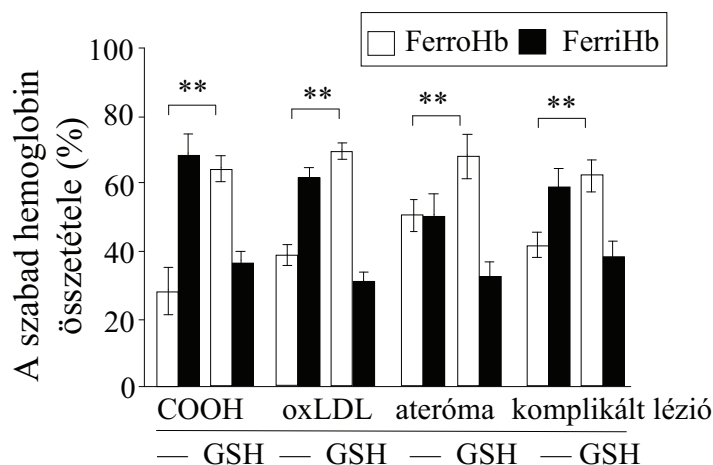
lipid-hidroperoxidok akkumulálódnak, megvizsgáltuk, hogy az oxidált LDL-nek, valamint aterómákból származó lipideknek van-e hemolitikus aktivitásuk (19. ábra).



19. ábra: Az ateróma lipidjei hemolízist okoznak. Kumin-hidroperoxidot (COOH; 50 $\mu\text{mol/l}$), LDL-t, oxidált LDL-t (250 $\mu\text{g/ml}$), 1 mg/ml lipidszuszpenziókat adtunk vörösvértest szuszpenzióhoz (fekete oszlopok). Ugyanezt a kísérletet elvégeztük úgy is, hogy a lipideket ekvimoláris mennyiségű glutation/glutation-peroxidázzal előkezeltük (üres oszlopok). Az ábrán a 24 óra alatt felszabadult hemoglobin arányát tüntettük fel.

Az érminták lipidjeit 24 órán át inkubáltuk ekvimoláris mennyiségű glutationnal (GSH-Px jelenlétében), ennek során a lipid-hidroperoxid szintjük 35-40%-kal csökkent. A kisebb LOOH-tartalmú plakklipidek hemolitikus aktivitása számottevően csökken (20-25 %-kal).

Az oxidált LDL illetve az ateróma lipidjének hatására a felszabaduló hemoglobin oxidálódik. A glutation/glutation-peroxidázos előkezelés a felszabadult hemoglobin oxidációját is csökkenti (20. ábra).



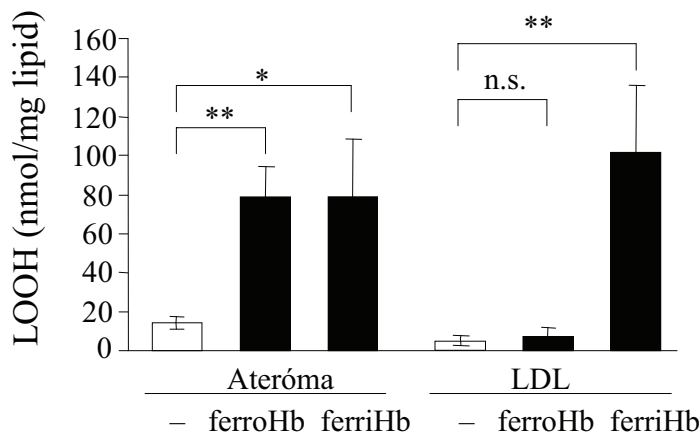
20. ábra: A felszabaduló hemoglobin oxidálódik lipid indukálta hemolíziskor. Kuminhidroperoxidot (COOH; 50 $\mu\text{mol/l}$), oxidált LDL-t (250 $\mu\text{g/ml}$), 1 mg/ml lipidszuszpenziókat adtunk vörösvértest szuszpenzióhoz (fekete oszlopok). Ugyanezt a kísérletet elvégeztük úgy is, hogy a lipideket glutation/glutation-peroxidázzal előkezeltük (üres oszlopok). Az ábrán a 24 óránál felszabadult hemoglobin összetételét tüntettük fel.

Az oxidált LDL és az érből származó lipid hemolitikus hatását illetve a felszabaduló hemoglobin oxidációját mérsékeli az LDL illetve lipid glutation/glutation-peroxidázzal történő előkezeltése, mely a lipid-hidroperoxid koncentrációját csökkenti a mintákban. Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a hemolitikus aktivitás nagyrészt a plakklipid lipid-hidroperoxidjainak tulajdonítható.

4.3.3. A lipid és hemoglobin reakciója

Az eredmények igazolják azt a feltételezést, hogy az ateróma lipidjével érintkező vörösvértestek nagymértékben lizálnak, a belőlük felszabaduló hemoglobin a jelenlevő lipid-hidroperoxidok hatására oxidálódik. Mivel a ferrihemoglobin- a hem-kibocsátás révén- képes az LDL oxidációjára, megvizsgáltuk, hogyan hat az oxidált hemoglobin az érlelmeszesedés lézió lipidjeire. Az aterómából származó lipidet kezeltük ferro- illetve ferrihemoglobinnal. Meglepődve tapasztaltuk, hogy ellentétben az LDL-lel, nemcsak a ferri-, hanem a ferrohemoglobin is indukálja az ateróma lipidperoxidációját, melyet a lipid hidroperoxid

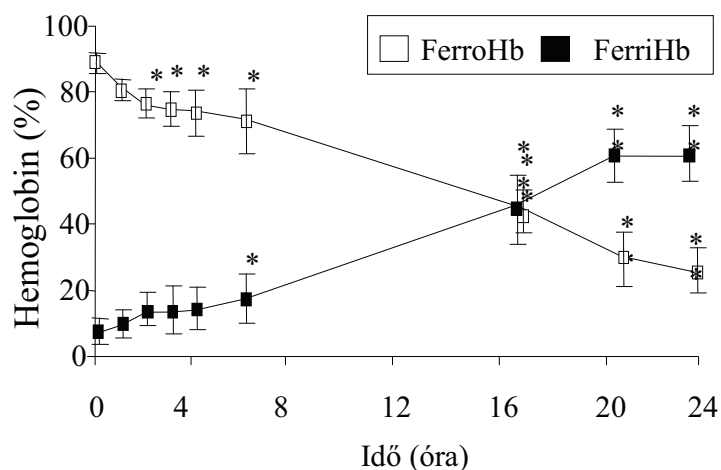
mérésével követtünk (21. ábra). Ferrohemoglobin hatására 4,5-szörösére, ferrihemoglobin hatására 4-szeresére nőtt az ateróma lipid LOOH-tartalma.



21. ábra: Ferro- és ferrihemoglobin lipidperoxidációt indukál az aterómából extrahált lipidben. 200 µg/ml LDL-t és 2 mg/ml lipidszuszpenziót kezeltünk egy éjszakán át 10⁻⁶ mol/l ferro- vagy ferrihemoglobinnal. A lipid-hidroperoxidot KI-os módszerrel mértük.

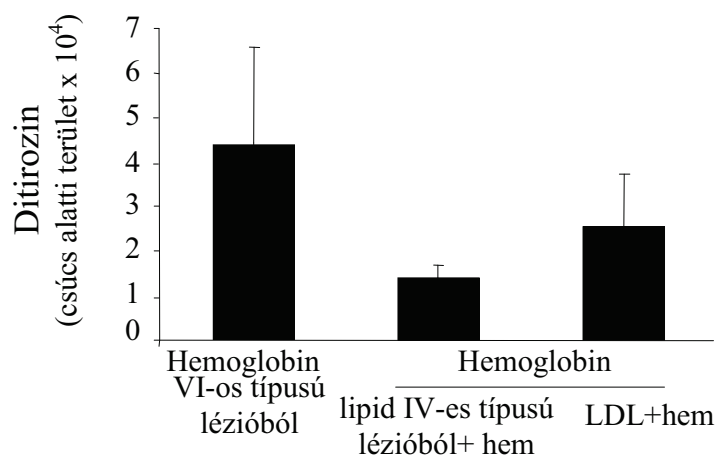
A ferrihemoglobinnal ellentétben a ferrohemoglobin szorosan köti a hemcsoportját, így magyarázatot kerestünk arra, miként válthatja ki mégis a plakklipid oxidációját. Korábban kimutatták, hogy a ferrohemoglobin könnyen oxidálódik a hemforrásként szolgáló ferrihemoglobinná gyulladásoos sejtekből származó oxidánsok hatására.²⁴ Azt is megállapítottuk, hogy *in vitro* az oxidatíván modifikált LDL is képes ugyanerre, és hogy a reakció kinetikája nagyban függ az LDL-hez kötött lipid-hidroperoxidok koncentrációjától (10. ábra). Ezért megvizsgáltuk, hogy az ateróma lipidjének lipid-hidroperoxid tartalma képes-e a ferrohemoglobint ferrihemoglobinná alakítani (22. ábra). Megállapítottuk, hogy az ateróma lipidje oxidálja a ferrohemoglobint. A képződő oxidált hemoglobin hem-kibocsátás révén lipidperoxidációt indukál, nő a lipid-hidroperoxid szint, mely további ferrohemoglobin oxidációját okozva tovább gyorsítja a lipidperoxidációt. A reakció során mind a ferrohemoglobin, mind az ateróma lipidje oxidálódik. Az ateróma glutation/glutation-

peroxidázos előkezelése mind a lipid-hidroperoxid tartalmat (30%), mind a hemoglobin-oxidációt (25%) csökkenti.



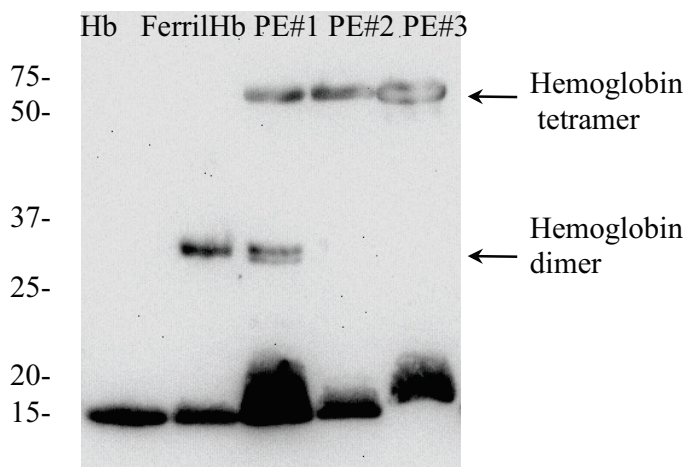
22. ábra: Aterómából származó lipid a ferrohémoglobint ferrihémoglobinná alakítja. 2 mg/ml ateróma lipidet együtt inkubáltunk 20 μ mol/l ferrohémoglobinnal 37°C-on, 24 órán át. Néhány óránként mintát vettünk, és centrifugálás után a felülúszóból fotometriásan mértük a hemoglobin összetételét.

Ezek után megvizsgáltuk a komplikált plakkokból kivont hemoglobint, mely szintén erősen oxidáltnak bizonyult: ferrihémoglobin 51%, hemikróm 29% és ferrohémoglobin 20%. Ismert, hogy a hidrogén-peroxid-mediálta hemoglobin-oxidáció során négyvegyértékű, instabil ferrilhemoglobin jön létre, mely a globin részről elektront elvonva stabilizálódik, a fehérjerészt módosítva²⁸⁻³¹. Feltételeztük, hogy az érlemeszesedéses plakk bevezésekor a felszabaduló hemoglobin lipid-hidroperoxid-mediálta oxidatív károsodást szenved, így fehérjeoxidációs termékeket kerestünk komplikált léziókból kivont hemoglobinban (23. ábra).



23. ábra: A komplikált lézió hemoglobinja dityrozint tartalmaz. Hemmel oxidált 200 µg/ml LDL-t és hemmel kezelt ateróma lipidet (1 mg/ml) reagáltattunk 100 µmol/l hemoglobinnal, 24 óráig, majd a Módszerekben leírtak szerint dityrozint mértünk. Komplikált, bevérzett léziót (n=5) sóoldattal mostunk, centrifugáltuk, és a felülúszóban levő hemoglobinnal dityrozint mértünk.

A bevérzett léziókból eltávolított hemoglobinnal dityrozint detektáltunk. A dityrosin képződésének mechanizmusát keresve ferrohemoglobint reagáltattunk $K_3Fe(CN)_6$ -tal, H_2O_2 -dal, oxidált LDL-lel és oxidált, aterómából származó lipiddel. A H_2O_2 -dal és a magas lipid-hidroperoxid tartalmú lipidekkel kezelt hemoglobinnal tudtunk dityrozint detektálni, míg a $K_3Fe(CN)_6$ -tal oxidáltban nem. Dityrosin mellett a komplikált lézió hemoglobinjában kovalensen kapcsolódó hemoglobin oligomereket is kimutattunk.

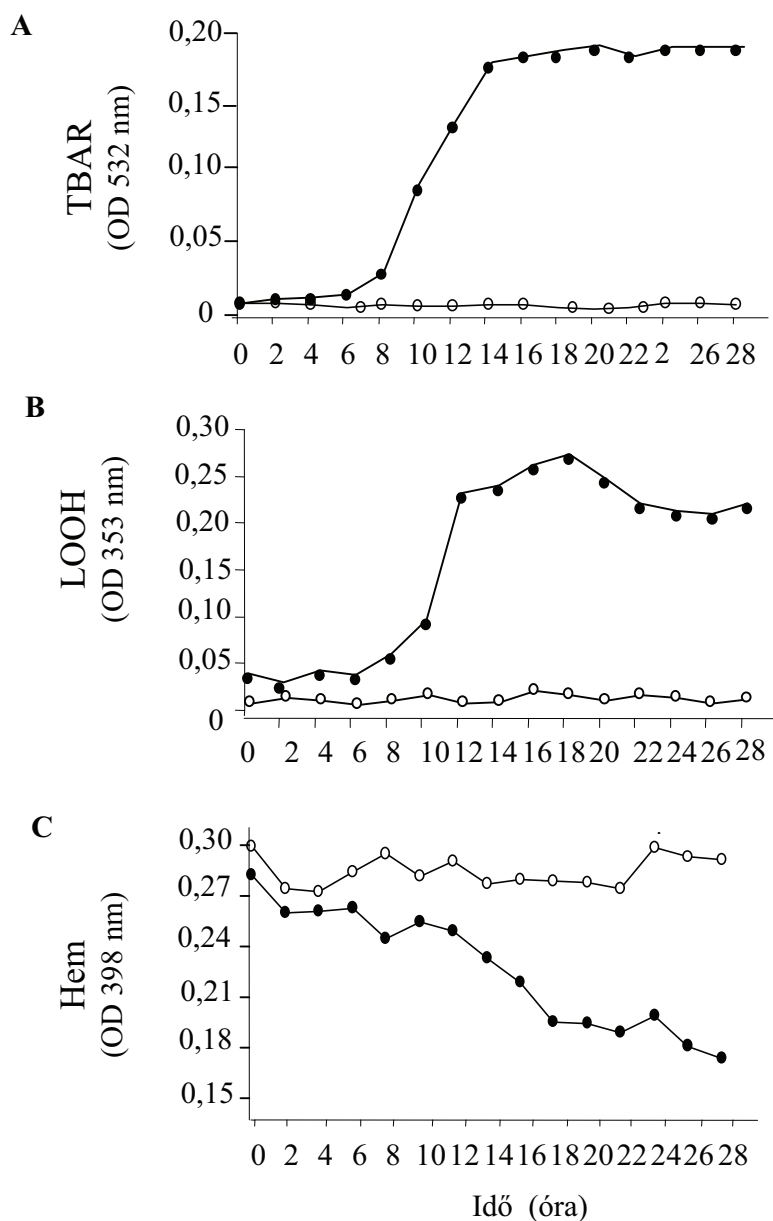


24. ábra: Hemoglobin tetramerek detektálhatók a humán komplikált léziók hemoglobinjában. Komplikált, bevérzett léziókat sóoldattal mostunk, centrifugáltuk, és a felülúszóban levő hemoglobinnal 150 nmolt vittünk géltre. FerrilHb: H₂O₂-dal oxidált hemoglobin.

Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a hemoglobin hidroperoxid-mediálta oxidációja során keletkező hemoglobin forma –a más módon képződött ferrihemoglobinnal ellentétben– proinflammatorikus ágens; endotheliális sejtekben adhéziós molekulák expresszióját fokozza, melyek makrofágok felszaporodását segítik az érfalban.¹³⁵

4.3.4. A lipid és hem reakciója

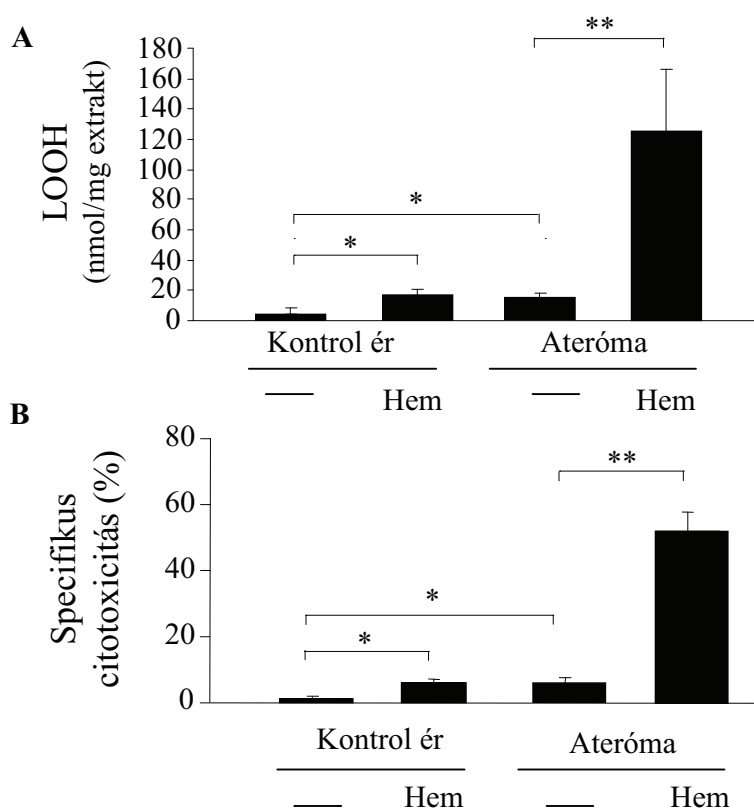
Az LDL hem-katalizálta oxidációjának analógiájára kezeltük az érmintákból kivont lipidet hemmel, és mértük a tiobarbitursav-reaktív anyagok (TBARS) és lipid-hidroperoxidok (LOOH) koncentrációját a reakció során (25. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az aterómából származó lipidben hemexpozíció hatására nő a lipid-hidroperoxid – és a TBAR-tartalom, mely a lipidperoxidáció jele. A TBAR és LOOH koncentrációja körülbelül 12 óra alatt éri el a maximumot, aztán közel állandó szinten marad a vizsgált 24 óra alatt. Ezzel egyidőben a hem koncentrációja hasonló kinetikával csökken, a hem degradálódik.



25. ábra. A hem lipidperoxidációt indukál az aterómából származó lipidben, mely hemdegradációval jár együtt. 1 mg/ ml lipidet tartalmazó szuszpenzióhoz 5 μ M hemet adtunk, 37°C-on 28 óráig követtük a reakció●: ateróma,○: kontrol ér. A) és B) Kétóránként 100-100 μ l mintát vettünk a reakcióelegyből, melyből TBARS-t és LOOH-t mértünk a Módszerekben leírtak szerint. C) Kétóránként hemet mértünk, hangyasavas módszerrel. Az ábrán egy reprezentatív mérés van feltüntetve.

4.3.5. Az oxidált lipid hatása endotheliális sejtekre

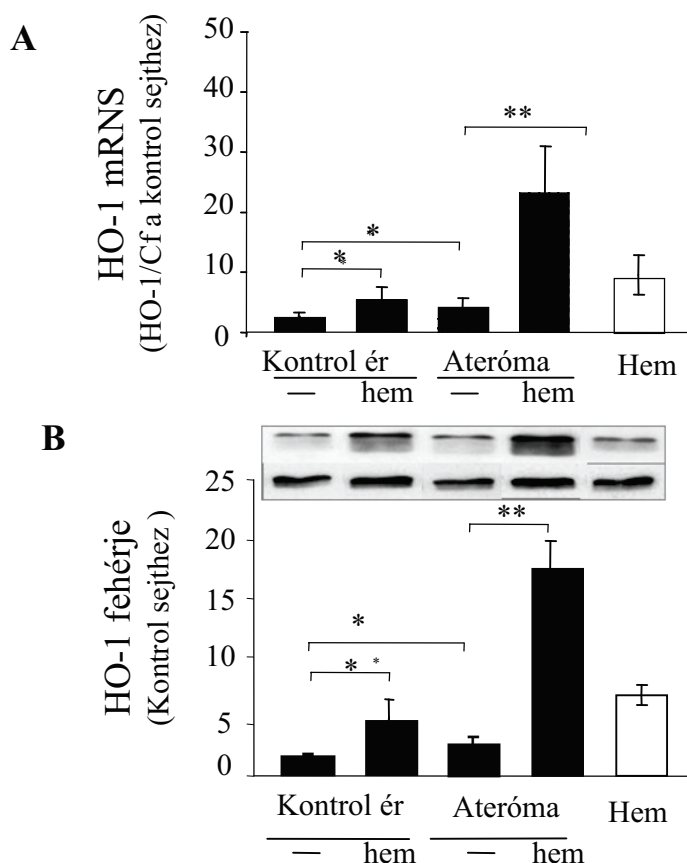
A plakklipid hem-mediálta oxidációjának kinetikája hasonlít az LDL hasonló körülmények közt végbemenő modifikációjához. Felvetődött a kérdés, hogy a hemmel oxidált aterómából extrahált lipid hasonló biológiai tulajdonságokkal bír-e, mint az oxidált LDL. Azt tapasztaltuk, hogy az atheromából származó lipid valóban citotoxikus endotheliális sejtekre, melyet nagyban fokoz a lipid hemmel való kezelése (26. ábra). A kontrol ér lipidje hemkezelés után sem okoz jelentős citotoxicitást (7%).



26. ábra: Hem-kezelés hatására az ateróma lipidje toxikus lesz endotheliális sejtekre. 2 mg/mL lipidszuszpenziót kezeltünk 5 μ mol/L hemmel egy éjszakán át, majd együtt inkubáltuk konfluens endotheliális sejtekkel 6-8 óráhosszáig. A sejtek túlélését MTT-próbával mértük.

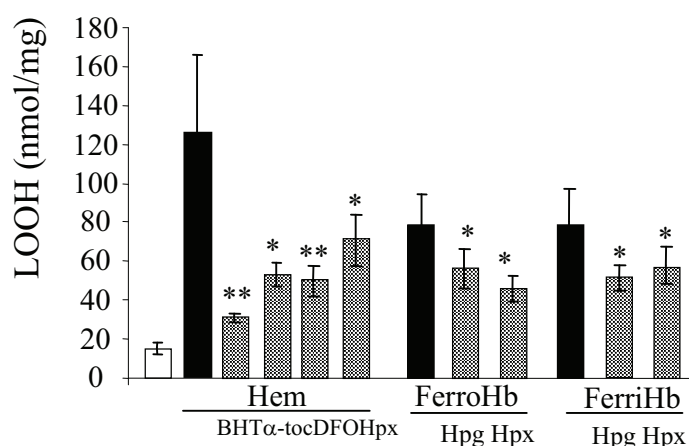
Szubletális dózisban a hemmel oxidált atheromából kivont lipid indukálja a stresszadaptációs HO-1-t, mind mRNS (24-szeres), mind fehérje szinten (17,5-szeres), míg a kontrol ér hemmel

kezelt lipidje csak kis mértékben okoz HO-1 indukciót (5-szörös gén-illetve 3-szoros fehérjeindukció), (27. ábra). Ez az indukció a reakcióelegyben levő el nem reagált hemnek tulajdonítható, mivel az indukció mértéke hasonló a reakcióhoz használt, 1 $\mu\text{mol/l}$ hem okozta HO-1 indukcióhoz (9-szeres gén- és 7-szeres fehérjeindukció).



27. ábra: Hemmel kezelt ateróma lipid endotheliális sejtekben HO-1-et indukál. 1 mg/ml lipidszuszpenziót kezeltünk egy éjszakán át 1 $\mu\text{mol/l}$ hemmel, majd endotheliális sejtekre tettük 60 percre, utána a lipidszuszpenziót médiára cseréltük. A) 4 óra után a sejtekből RNS-t izoláltunk és RT-PCR-rel mértük a HO-1 mRNS mennyiséget. B) 8 óra után a sejteket feloldottuk és a HO-1 fehérjét Western blottal vizsgáltuk. A feltüntetett eredmények a kezelt és kezeletlen sejtek HO-1 szintjeinek arányát mutatják.

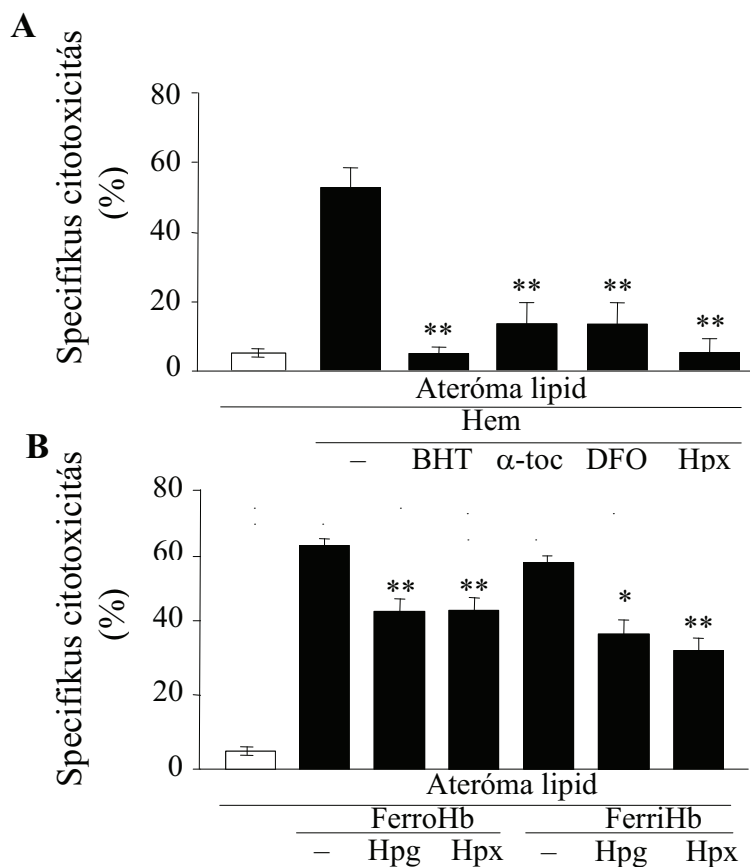
Az aterómából származó lipid hem- és hemoglobin-mediálta oxidációjának mértéke csökkenthető különböző gyökfogyó antioxidánsokkal, mint a BHT, α -tokoferol, a vaskeláló DFO, valamint a hem-kötő hemopexinnel¹³⁶ míg a hemoglobinok okozta oxidáció részben gátolható a haptoglobinnal is.¹³⁷ (28. ábra).



28. ábra: Az ateróma lipidjének oxidációja, és az oxidáció gátlása. 1 mg/ml lipidszuszpenziót egy éjszakán át kezeltünk 5 μmol/l hemmel, valamint 10 μmol/l BHT-val, / 40 μmol/l α-tokoferollal/ 100 μmol/l DFO-val/10 μmol/l hemopexinnel. 1 mg/ml lipidszuszpenziót egy éjszakán át kezeltünk 10 μmol/l ferro- és ferrihemoglobinnal és 20 μmol/ml haptoglobinnal. Ezután mértük lipid-hidroperoxidok mennyiségét a Módszerekben leírtak szerint.

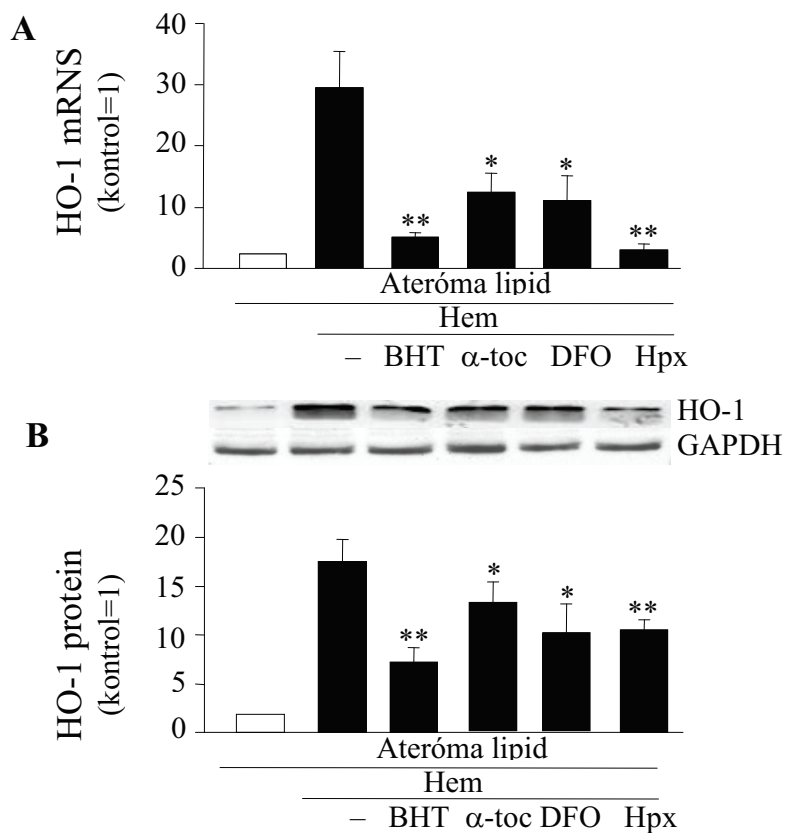
Leghatékonyabb antioxidánsnak a BHT bizonyult, míg az α-tokoferol, DFO és hemopexin közel hasonló mértékben gátolták az ateróma lipidjének oxidációját. A haptoglobin 30 %-ban gátolta a lipidoxidációt.

A hemmel kezelt ateróma lipid okozta specifikus citotoxicitás (29. A ábra) is csökkenthető antioxidánsok hozzáadásával. A BHT és a hemopexin nagymértékben, közel 90%-ban lecsökkenti a hemmel kezelt lipid okozta citotoxicitást, míg az α-tokoferol és a DFO körülbelül 2/3-val csökkenti azt. Haptoglobin pedig a ferro- és ferrihemoglobinnal kezelt lipid citotoxicitását mérsékeli körülbelül 30 %-kal (29. B ábra).



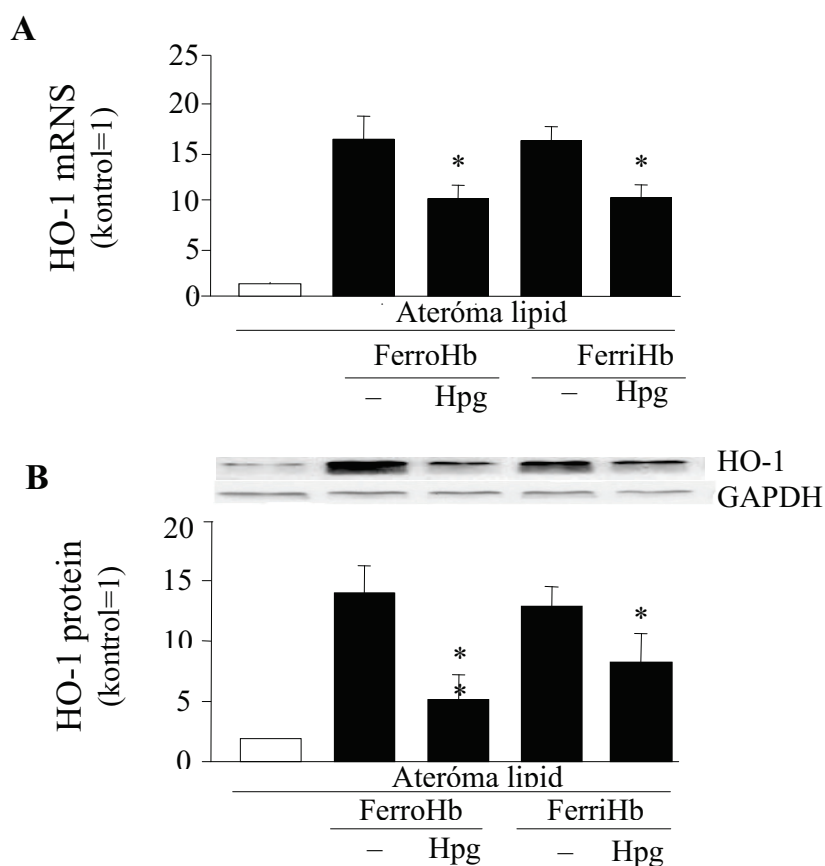
29. ábra: Az aterómából származó lipid oxidációjának gátlása a lipid citotoxicitását is mérsékli. A) 2 mg/ml lipidszuszpenziót kezeltünk hemmel és antioxidánsokkal, a 28. ábránál leírt módon. B) 2 mg/ml lipidszuszpenziót kezeltünk hemoglobinokkal és hemoglobin-haptoglobin komplexekkel a 28. ábránál leírt módon. Az endotheliális sejteket 6-8 óráig együtt inkubáltuk a kezelt lipiddel, majd MTT-próbával mértük a sejtek túlélését. Az eredmények 3 mérés átlagai.

Szubletális dózisban alkalmazva a hemmel (és antioxidánsokkal) kezelt lipidet endotheliális sejteken, a sejtek HO-1- expressziójának mértéke csökkenthető mind transzkripció, mind transláció szinten (30. ábra).



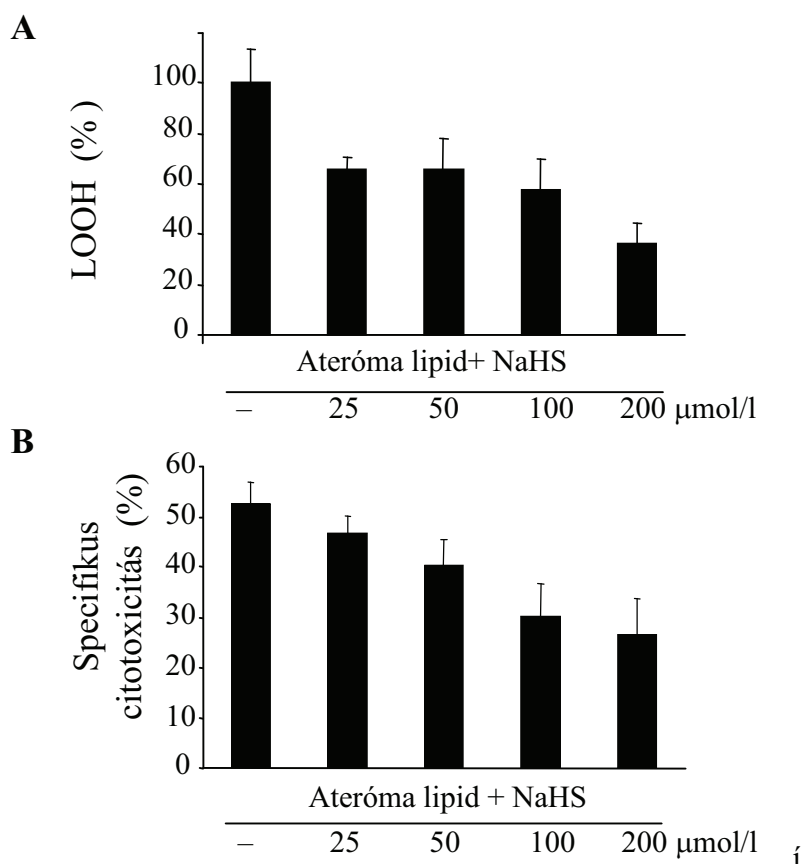
30. ábra: Az aterómából kivont lipid hemes oxidációjának gátlásával csökken a HO-1 indukáló hatása is. 1 mg/ml lipidszuszpenziót egy éjszakán át kezeltünk 5 μ mol/l hemmel, valamint 10 μ mol/l BHT-val/ 40 μ mol/l α -tokoferollal,/100 μ mol/l DFO-val/10 μ mol/l hemopexinnel, majd endotheliális sejtekre tettük a reakcióelegyet 60 percre. A) 4 óra elteltével RNS-t izoláltunk RT-PCR-rel mértük a HO-1 mRNS mennyiséget. B) 8 óra után a sejteket feloldottuk és a HO-1 fehérjét Western blottal vizsgáltuk. A feltüntetett eredmények a kezelt és kezeletlen sejtek HO-1 szintjeinek arányát mutatják.

A hemoglobinnal kezelt lipid HO-1 indukáló képessége szintén csökkenthető, ha haptoglobinnal együtt végezzük a lipid előkezelését (31. ábra).



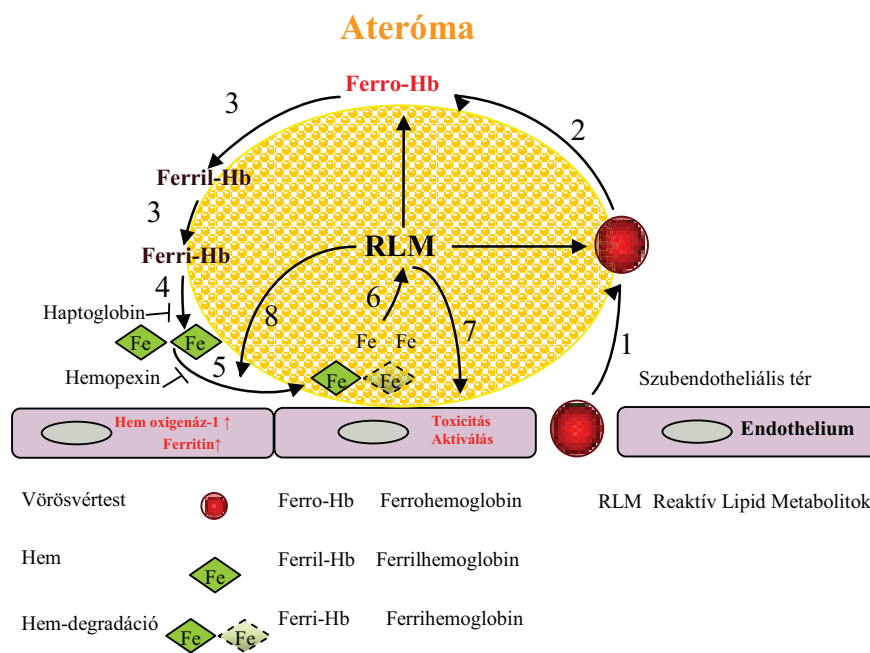
31. ábra: A hemoglobinnal oxidált, aterómából extrahált lipid HO-1-et indukál endotheliális sejtekben. 1 mg/ml lipidszuszpenziót egy éjszakán át kezeltünk 10 μ mol/l ferro-vagy ferrihemoglobinnal vagy ferroHb-haptoglobin és ferriHb-haptoglobin komplexszel (10 μ mol/l-20 μ mol/l), majd a szuszpenziót endotheliális sejtekhez adtuk 60 percre. A) HO-1 mRNS indukciót mértünk a 30. ábránál leírtak szerint. B) HO-1 fehérjeindukciót vizsgáltunk a 30. ábránál leírtak szerint.

Az aterómából származó lipid oxidációja kén-hidrogén hatására is csökken, hasonlóan az oxidált LDL-hez (32. A ábra). A csökkent LOOH-tartalmú lipid kevésbé citotoxikus (32. B ábra).



32. ábra: A hemmel kezelt ateróma lipid LOOH-tartalmát és toxikusságát a kén-hidrogén dóziszfüggő módon csökkentti. 1 mg/ml lipidszuszpenziót 16 órán át kezeltünk 5 μmol/l hemmel, majd 2 órán keresztül 25-200 μmol/l NaHS oldatokkal. A) Mértük a LOOH-koncentrációt. B) Endotheliális sejteket kezeltünk a reakcióeleggyel, 6 óra múlva MTT-próbát végeztünk.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a kiszabaduló ferrohémoglobin a plazmamentes környezetben ferrihémoglobinná alakulva hem-forrássá válik, mely képes oxidálni a plakk lipidjeit. Az oxidáció során a nagy molekulák fragmentálódnak, ezért a plakk rigiditása nő, és a kisebb méretű oxidációs termékek toxikusak a lézióban lévő élő sejtekre. Másrészt viszont képesek stresszadaptációt indukálni, mely magyarázatul szolgálhat a humán ateroszklerotikus plakkban kimutatható megnövekedett mennyiségű HO-1 jelenlétére is. A feltételezett mechanizmust a 33. ábra foglalja össze.

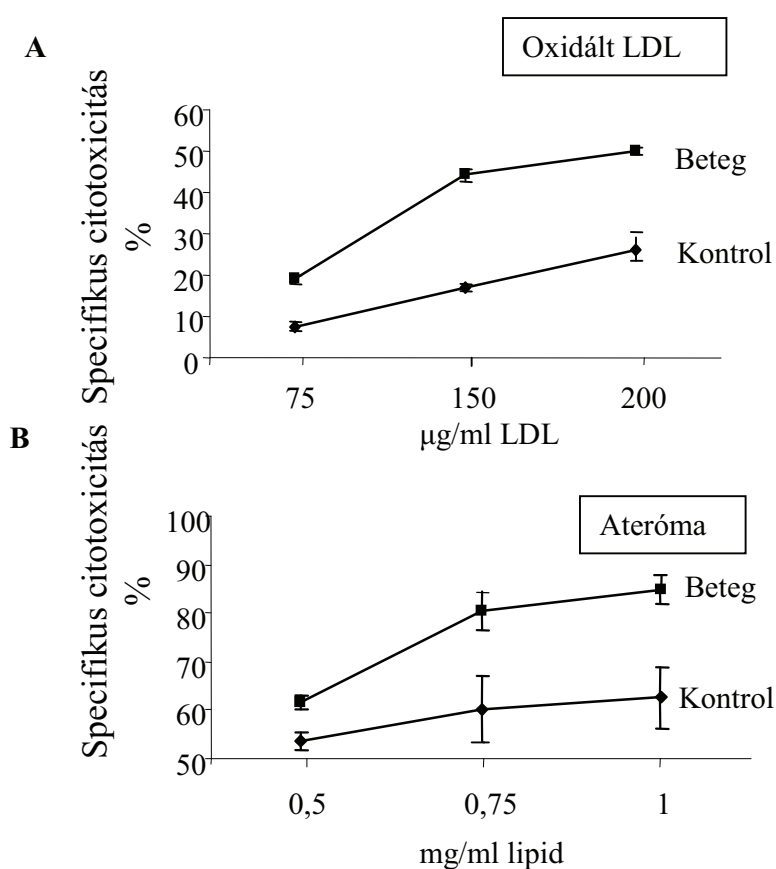


33. ábra 1) Vörösvértestek lépnek az aterómába; 2) Hemolízis és a felszabaduló hemoglobin oxidációja az oxidált lipid hatására; 3) Ferril-(a) és ferrihemoglobin (b) képződik; 4) Hem-felszabadulás; 5) A hem interkalálódik a lipidbe; 6) A lipoxidáció fokozódik a lézióban; 7) Az endothelium károsodik a reaktív lipidrészek hatására; és 8) Hem-oxigenáz-1 (HO-1) indukálódik a reaktív lipidrészek hatására.

4.4. HO-1 DEFICIENS SEJTEK ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ

A hemoxigenáznak nemcsak a hem lebontásában, hanem a sejtek oxidatív stresszel szembeni védekezésben is kulcsszerepe van. Hiányában a sejtek fokozottan érzékenyek az oxidatív károsító hatásokra. Hemoxigenáz-1 deficiens egerekben lipopoliszachariddal kiváltott endotoxémia nyomán súlyos máj-és vesekárosodást, valamint magasabb mortalitást tapasztaltak, mint a vad típusú állatokban.¹³⁸ HO-1 deficiens egerek fibroblaszt sejtjei hemtoxicitásra sokkal érzékenyebbek bizonyultak a vad típusú sejteknél,¹¹⁰ és a HO-1 hiányos betegtől származó, immortalizált limfocita sejtvonalról Yachie és munkatársai kimutatták, hogy érzékenyebbek hemtoxicitásra, mint az egészséges sejtek.¹⁰⁷ Ezeket az eredményeket alapul véve vizsgáltuk a HO-1 hiányos páciens sejteinek reakcióját hem által

oxidált LDL-re és hemmel kezelt ateróma lipiddre (34. ábra). Ehhez egészséges önkéntesektől és a HO-1-deficiens betegtől származó immortalizált limfocita sejteket használtunk. A citotoxicitási vizsgálatokban a beteg sejtjei minden általunk vizsgált koncentrációban érzékenyebbek bizonyultak hemmel oxidált LDL-lel és plakk lipiddel szemben, mint a kontrol sejtek.



34. ábra: A HO-1 deficiens sejtek érzékenyebbek oxidált lipid okozta oxidatív stresszre

A) Hem/H₂O₂-dal oxidált LDL-t (200 µg/ml) inkubáltunk egészséges és HO-1 deficiens immortalizált limfocita sejtekkel 16 órán át, majd MTT-próbával mértük a sejtek túlélését, az oxidált LDL koncentrációjának függvényében. B) Hemmel kezelt ateróma lipidet (1mg/ml) inkubáltunk immortalizált limfocita sejtekkel 16 órán át és vizsgáltuk a sejtek túlélését a lipid koncentrációjának függvényében.

Oxidált LDL-t szubletális dózisban is adtunk a sejtekhez és vizsgáltuk a sejtek védekezőmechanizmusát mRNS és fehérje szintjén.

6. táblázat: Egészséges és hem-oxigenáz-1 deficiens sejtek HO-1-mRNS tartalmának és HO-1-aktivitásának összehasonlítása alapállapotban és indukció után. 5 $\mu\text{mol/l}$ hemmel és 50 $\mu\text{g/ml}$ hem/H₂O₂-dal oxidált LDL-lel kezeltük a sejteket 16 órán át, majd a Módszerekben leírt módon mértük a gén- és fehérjeindukciót.

	mRNS szint (HO-1/ciklofilin aránya)		HO-1 aktivitás ($\mu\text{mol/h/mg}$ protein)	
	Kontrol sejt	Beteg sejt	Kontrol sejt	Beteg sejt
Kezelés nélkül	0,059 \pm 0,037	0,097 \pm 0,040	145,89 \pm 85,70	20,89 \pm 28,29
Hem	0,513 \pm 0,156	7,546 \pm 0,519	505,17 \pm 265,90	25,27 \pm 28,33
Oxidált LDL	3,140 \pm 0,934	2,353 \pm 0,679	352,25 \pm 70,51	68,78 \pm 42,38

HO-1 mRNS-t a kontrol és a beteg sejtvonalakban egyaránt tudtunk mérni, mivel primerjeinket egy a deléció által nem érintett génszakaszra terveztük. A beteg sejtvonalon a HO-1 mRNS alapszintje még magasabb is volt, mint a normál sejtekben. Hem és oxidált LDL mindegyik sejtvonalon indukálta a HO-1 mRNS-t, a beteg sejtekben még intenzívebben, mint a kontrolban (78-szoros és 8,7-szeres indukciók). Viszont amíg a vad típusú sejtben a hem és az oxidált LDL jelentősen megnöveli a HO-1 enzim aktivitását (3,5 és 2,4-szeresre), a HO-1 deficiens sejtekben nem változik a HO-1 aktivitás. A mutáció tehát nem érintette a gén promoter régióját, így a HO-1 mRNS indukciója bekövetkezik, de a képződő fehérje inaktív. A HO-1 deficiens beteg vaszkuláris tüneteinek kialakulásáért az oxidatív stressz és sejtjeinek megnövekedett stresszérzékenysége együtt felelősek. Mindez megerősíti azt a feltételezést, hogy a HO-1 kulcseleme a sejtek oxidatív stresszel szembeni védelmének.

Eredményeink alapján bővült a tudásunk a kissűrűségű lipoprotein oxidációjával kapcsolatban, mely fontos szerepet játszik az aterogenezisben. Az ateroszklerózis folyamatának pontosabb megismerése változatlanul aktuális. Az itt kidolgozott módszerekkel humán érminták lipidtartalmának oxidáltsági állapotát lehet meghatározni, ezeket a későbbiekben klinikai tanulmányok készítésénél lehet alkalmazni. Munkánk során új nézőpontból vizsgáltuk az érlelmeszesedéses lézió ruptúrájakor bekövetkező eseményeket. Bemutattuk, hogy a bevérzés nemcsak a trombusképződésen keresztül járul hozzá az érlelmeszesedés progressziójához, hanem a hemoglobin felszabadulásán és oxidációján keresztül a lipidperoxidációt is fokozza, ugyanakkor antiaterogén védelmet is indukál. Ezek alapján felmerül a kérdés, hogy egyéb bevérzésekkel járó kórképek esetén milyen szerep jut a hemoglobin és a hem által katalizált oxidatív károsító folyamatoknak.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A kissűrűségű lipoprotein hem-katalizált oxidációja során olyan módosított LDL jön létre, mely endotheliális sejtekre toxikus, kisebb dózisban pedig stresszadaptációs fehérjéket, hemoxigenáz-1-et és ferritint indukál. A módosított LDL kémiai és biológiai tulajdonságai változatosak lehetnek. Megvizsgálva az LDL-ben megjelenő lipidperoxidációs termékek mennyiségének időbeli változását megállapítottuk, hogy mind a citotoxicitás, mind a HO-1 indukció mértéke a lipid-hidroperoxid szinttel mutat szoros összefüggést. A hem önmagában is oxidálja az LDL-t, ez a reakció azonban lassú; 16 óra elteltével mérsékelten oxidált LDL jön létre, mely csak kevéssé citotoxikus. Ismételt hem-expozíció drámaian megnöveli a kissé oxidált LDL LOOH-tartalmát és fokozza citotoxicitását. Megállapítható, hogy a mérsékelten oxidált LDL-ben jelen levő kevés lipid-hidroperoxid hem hozzáadásakor ugyanazt a katalizáló hatást fejt ki, mint a hidrogén-peroxid a hem mellett. Megvizsgáltuk, hogyan hat az LDL oxidációjára a kén-hidrogén, mely egy erős redukálószer, és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban fordul elő a szervezetben fiziológiás körülmények között. Megállapítottuk, hogy a kén-hidrogén jelentősen lassítja az LDL hem-mediálta oxidatív modifikációját. Oxidált LDL LOOH-tartalmát csökkenti, melynek következtében csökken a módosított LDL citotoxicitása és HO-1 indukálóképessége is. Másrészt viszont a kén-hidrogénnel történő előkezelés ellenállóvá teszi az endotheliális sejteket a hidrogén-peroxiddal és oxidált LDL-lel előidézett toxikus hatással szemben. Korábban feltártuk, hogy a plazma hemoglobin oxidációja hemkibocsátás révén kulcsszerepet játszott az eddig ismert egyetlen hemoxigenáz-1 deficiens beteg intravaszkuláris LDL-oxidációjában és az endothelium súlyos károsodásában. Oldatban a hemoglobin gyorsan oxidálódik aktivált PMN sejtek hatására, mely folyamat katalízis enzimmel gátolható, mivel a folyamatot hidrogén-peroxid mediálja. Az LDL-hez kötődő lipid-hidroperoxidok is képesek dóziszfüggően oxidálni a ferrohemoglobint, mely folyamat

végbement a HO-1 deficiens páciens plazmájában is. A beteg LDL-je mérsékelten oxidált volt és tenyésztett endotheliális sejtekre nézve enyhén citotoxikusnak bizonyult. A mérsékelten oxidált LDL lipid-hidroperoxidjainak hatására hemoglobin-oxidáció történik. A ferrihemoglobinnal felszabaduló hem beékelődik az LDL-be, ahol a hem-mediálta oxidáció során felnyílik a hem, vas szabadul fel, a vas katalizálja az LDL zsírsavjainak és proteinjeinek oxidációját, az LDL lipid-hidroperoxidjai pedig további ferrihemoglobint oxidálnak.

A lipidperoxidációnak az érlemezés patomechanizmusában is fontos szerepe van. Emellett egyre több megfigyelés utal arra, hogy a HO-1 és a ferritin indukciója viszont véd az ateroszklerózis ellen. Az ateroszklerózis súlyos klinikai következményei a magas lipidtartalmú plakkok rupturáját követően jelentkeznek, amikor a vér alkotórészei kapcsolatba kerülnek a plakk lipidmagjával. A lézió lipid elemei a neovaszkularizációban keletkező sérülékeny hajszálerek megrepedésekor is közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a vörösvértestekkel. Kísérleteink során vizsgáltunk érlemezés jeleit nem mutató (kontol) erekből, nagy lipidmaggal jellemezhető érlemezéses lézióból (ateróma) és bevérzett plakkból (komplikált lézió) kivont lipideket. Mind a lipidperoxidációs termékek, mind a vas koncentrációja kissé emelkedett volt az aterómákban a kontrolokhoz képest, és legnagyobb volt a komplikált plakkokban mely arra utal, hogy az ateroszklerózis előrehaladásával fokozódik a plakk lipidjének oxidációja. Megállapítottuk, hogy az ateróma lipidjei hemolízist okoznak *in vitro*, vörösvértest szuszpenzióban, csakúgy, mint az oxidált LDL. Az így felszabaduló hemoglobin oxidálódik, az oxidáló lipid LOOH-tartalmával arányos mértékben. Az így módon oxidált illetve a komplikált léziókból származó hemoglobinban fehérjeoxidációs termékeket, ditirozint és hemoglobin multimereket detektáltunk, mely alátámasztja, hogy a hemoglobin lipid-hidroperoxid-mediálta oxidatív károsodást szenvedett. A lipid-hidroperoxidoknak e folyamatokban játszott központi szerepét hangsúlyozza az, hogy ha a lipid-hidroperoxid szintet lecsökkentjük (glutathion/glutathion-peroxidázzal), a lipid

hemolizáló illetve oxidáló képessége is csökken. Mivel a ferrihemoglobin oxidálja a natív LDL-t, ennek analógiájára vizsgáltuk ferro- és ferrihemoglobin hatását az aterómából extrahált lipiden, és azt tapasztaltuk, hogy –ellentétben az LDL-lel- az ateróma lipidben mindkét hemoglobin-forma lipidperoxidációt indukál. Ennek az a magyarázata, hogy az aterómában jelentős mennyiségű LOOH van jelen, mely a ferrohemoglobinnal való reakció során azt ferrihemoglobinná alakítja, a ferrihemoglobin lipidperoxidációt okoz, mely tovább fokozza a ferrohemoglobin oxidációját. A ferrihemoglobinnal felszabaduló hem lipidperoxidációt indukál az ateróma lipidjében, melynek kinetikája a hem/LDL reakciójához hasonlít. Az aterómából származó lipid endotheliális sejtekre toxikus, mely toxicitás nagymértékben megnő a lipid hemmel való kezelésének hatására, míg kontrol erek lipidje hemes kezelése nem vált ki citotoxicitást. A hemmel vagy hemoglobinnal kezelt ateróma lipid szubletális dózisban viszont HO-1-et indukál endotheliális sejtekben. Az aterómából származó lipid oxidációjának gátlása a lipid citotoxicitását és HO-1 indukáló hatását is mérsékeli. A lipid hemes oxidációja gátolható gyökfogókkal (BHT, α -tokoferol), vaskelálókkal (DFO) és a hemet komplexáló hemopexinnel, míg a ferro-és ferrihemoglobin okozta lipioxidáció a hemoglobint kötő haptoglobinnal mérsékelhető.

A HO-1 hiányos betegtől származó immortalizált limfocita sejtvonal érzékenyebb hemtoxicitásra, mint az egészséges sejtek. Citotoxicitási vizsgálatainkban a beteg sejtjei hemmel oxidált LDL-lel és ateróma lipiddel szemben is érzékenyebbnek bizonyultak, mint a kontrol sejtek. Szubletális dózisú hem és oxidált LDL kezelés hatására HO-1 mRNS-növekményt mindkét sejtvonalban tudtunk mérni, így megállapítható, hogy a mutáció nem érintette a gén promoter régióját. A HO-1 deficiens sejtekben azonban nem nő a HO-1 aktivitás, a képződő fehérje inaktív.

SUMMARY

Heme-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein (LDL) is one of the relevant mechanisms involved in LDL modification. Oxidized LDL is toxic to vascular endothelium, however, in sublethal dose induces heme oxygenase-1 (HO-1) and ferritin as a defense mechanism. The central importance of this protective system was recently highlighted by the discovery of a child diagnosed with HO-1 deficiency, who exhibited intravascular hemolysis, extensive endothelial damage as well as signs of severe atherosclerosis. Chemical and biological properties of oxidized LDL vary according to the way and degree of oxidation. We found that both cytotoxicity and expression of heme oxygenase-1 in endothelium strongly correlated to the lipid hydroperoxide content of oxidized LDL. We have also investigated the effect of H₂S, a strong reductant present in tissues at remarkable amount, on hemin-mediated oxidation of LDL and oxidized LDL-induced endothelial reactions. H₂S dose dependently delayed the accumulation of lipid peroxidation products during hemin-mediated oxidation. Moreover, H₂S decreased the LOOH content of oxidized LDL which was accompanied by reduced cytotoxicity. OxLDL-mediated induction of heme oxygenase-1, was also abolished by H₂S. H₂S can directly protect endothelium against hydrogen peroxide and oxLDL-mediated endothelial cytotoxicity. These results demonstrate novel functions of this gasotransmitter. We previously revealed the oxidation of plasma hemoglobin and a subsequent heme-catalyzed LDL oxidation that is toxic to endothelium in human heme oxygenase-1 deficiency. Drawing upon our previous observation we offer an alternative pathway for oxidation of plasma hemoglobin in the HO-1-deficient patient involving LDL-associated lipid hydroperoxide. LDL-associated lipid hydroperoxides were found to oxidize ferrohemoglobin to ferrihemoglobin – known to readily release its heme moieties – in a dose-dependent manner. We wondered if cells of the HO-1 deficient patient were prone to oxidative damage arising from heme-mediated oxidation of LDL. Indeed, we found elevated

cytotoxicity induced by heme-catalyzed oxidation of LDL in immortalized lymphocyte cells derived from the heme oxygenase-1 deficient patient.

Lipid peroxidation is a key event in the pathogenesis of atherosclerosis while there is growing evidence that induction of HO-1 and ferritin provides protection against atherosclerosis. Erythrocytes, hemoglobin and iron are present in advanced atherosclerotic lesions. Hematoma formation due to disruption of atheromatous lesion largely contributes to the morbidity from atherosclerosis. There is evidence that some hematomas may begin within the lesions as hemorrhages from neovasculature that sprout from the vasa vasorum. The present study was performed to examine whether red cell infiltration of atheromatous lesions promotes the later stages of atherosclerosis. We find that oxidation of ferrohemoglobin (FeII) in ruptured advanced lesions occurs generating ferrihemoglobin (FeIII) and via more extensive oxidation ferrylhemoglobin (FeIII/FeIV=O). The protein oxidation marker, dityrosine, accumulates in complicated lesions accompanied by the formation of crosslinked hemoglobin, a hallmark of ferrylhemoglobin. We demonstrate that exposure of normal red cells to lipids derived from atheromatous lesions causes hemolysis and oxidation of liberated hemoglobin. In the interactions between hemoglobin and atheroma lipids, hemoglobin and heme promote further lipid oxidation and subsequently endothelial reactions such as upregulation of heme oxygenase-1 and cytotoxicity to endothelium. Oxidative scission of heme leads to release of iron and a feed-forward process of iron-driven plaque lipid oxidation. The inhibition of heme release from globin by haptoglobin and sequestration of heme by hemopexin suppress hemoglobin-mediated oxidation of lipids of atheromatous lesions and attenuate endothelial cytotoxicity. We can conclude that the interior of advanced atheromatous lesions is a pro-oxidant environment in which erythrocytes lyse, hemoglobin is oxidized to ferri- and ferrylhemoglobin, and released heme-iron dependent oxidation of lipids is strongly favored. These events amplify the endothelial cell cytotoxicity of plaque components.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad Biol Med.* 1996; 20:707-727.
2. Hennig, Chow CK. Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis. *Free Ra. Biol Med.* 1988; 4:99-105.
3. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991; 88:1785-1792.
4. Kavanagh IC, Symes CE, Renaudin P, Nova E, Mesa MD, Boukouvalas G, Leake DS, Yaqoob P. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPAR γ , but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis.* 2003; 168:271-282.
5. Kontush A, Chancharme L, Escargueil-Blanc I, Therond P, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Chapman MJ. Mildly oxidized LDL particle subspecies are distinct in their capacity to induce apoptosis in endothelial cells: role of lipid hydroperoxides. *FASEB J.* 2003; 17:88-90.
6. Lynch SM, Frei B. Mechanisms of copper and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 1993; 34:1745-1753.
7. Paganga G, Rice-Evans C, Rule R, Leake D. The interaction between ruptured erythrocytes and low-density lipoproteins. *FEBS Lett.* 1992; 303:154-158.
8. Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL. Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1994; 93:1493-1501.
9. Hogg N, Rice-Evans C, Darley-Usmar V, Wilson MT, Paganga G, Bourne L. The role of lipid hydroperoxides in the myoglobin-dependent oxidation of LDL. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 314:39-44.

10. Rankin SM, Parthasarathy S, Steinberg D. Evidence for adominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res.* 1991; 32:449-456.
11. Savenkova MI, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1994; 269:20394-20400.
12. Wieland E, Parthasarathy S, Steinberg D. Peroxidase dependent metal-independent oxidation of low density lipoprotein *in vitro*: a model for *in vivo* oxidation? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:5929-5933.
13. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271:1424-1437.
14. Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A. Superoxide mediated modification of low density lipoprotein by arterial smoothmuscle cells. *J Clin Invest.* 1986; 77:757-761.
15. Steinbrecher UP. Role of superoxide in endothelial cell modification of LDL. *Biochim Biophys Acta.* 1988; 959:20-30.
16. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial cell injury. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11:1700-1711.
17. Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocyte and toxic oxygen species. *Lab Invest.* 1991; 64: 648-655.
18. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med.* 1992; 13:341-390.

19. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood*. 2000; 95: 3442-3450.
20. Streinbecher UP. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem*. 1987; 262:3603-3608.
21. Miller YI, Shaklai N. Oxidative crosslinking of LDL protein induced by hemin: involvement of tyrosines. *Biochem Mol Biol Int*. 1994; 34:1121-1129.
22. Ujhelyi L, Balla J, Muszbek L, et al. A microassay to assess the oxidative resistance of low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1998; 44:1762-1764.
23. Bunn HF, Jandl JH. Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. *J Biol Chem*. 1968; 243:465-475.
24. Weiss SJ. Neutrophil-mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. The role of superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1982; 257:2947-2953
25. Grinshtein N, Bamm VV, Tsemakhovich VA, Shaklai N. Mechanism of low-density lipoprotein oxidation by hemoglobin-derived iron. *Biochemistry*. 2003; 42:6977-6985.
26. Miller YI, Shaklai N. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1454:153-164.
27. Camejo G, Halberg C, Manschik-Ludin A, et al. Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res*. 1998;.39:755-766.
28. Giulivi C, Davies KJ. Hydrogen peroxide-mediated ferrylhemoglobin generation in vitro and in red blood cells. *Methods Enzymol*. 1994; 231:490-496.
29. Giulivi C, Cadenas E. Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24:269-279.

30. Maples KR, Kennedy CH, Jordan SJ, Mason RP. In vivo thiyl free radical formation from hemoglobin following administration of hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 277:402-409.
31. Reeder BJ, Grey M, Silaghi-Dumitrescu RL, Svistunenko DA, Bülow L, Cooper CE, Wilson MT. Tyrosine Residues as Redox Cofactors in Human Hemoglobin: Implications for engineering nontoxic blood substitutes. *J Biol Chem.* 2008; 283:30780-30787.
32. Svistunenko DA, Patel RP, Voloshchenko SV, and Wilson MT. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *J Biol Chem.* 1997; 272:7114-7121.
33. Vollaard NB, Reeder BJ, Shearman JP, Menu P, Wilson MT, Cooper CE. A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39:1216-1228.
34. Miller YI, Altamentova SM, Shaklai N. Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: Antioxidant role of haptoglobin. *Biochemistry.* 1997; 36:12189-12198.
35. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring: the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J.* 1985; 53:363-373.
36. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis.* 1989; 9 (Suppl. I): 19-32.
37. Gotto AM, Farmer JA. Risk factors for coronary artery disease. In *Heart disease: a textbook for cardiovascular medicine*, ed. Braunwald E Philadelphia, Saunders. 1988; 1153-1190.
38. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell.* 2001; 104: 503-516.
39. Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A, et al. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 1994;107(1):85-98.

40. Famularo G, Trinchieri V, Santini G, De Simone C. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Ann Ital Med Int.* 2000; 15:144-155.
41. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation.* 1995; 92:1355-1374.
42. Constantinides P. Plaque fissuring in human coronary thrombosis. *J Atheroscler Res.* 1966; 6:1-17.
43. Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 1989; 2:941-944.
44. Falk E. Morphologic features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 1989; 63:114E-120E.
45. Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2000; 149(2):251-66. nmm,
46. Paterson JC. Vascularization and hemorrhage of the intima of arteriosclerotic coronary arteries. *Arch Pathol.* 1936; 22:313-324.
47. Barger AC, Beuwkes R III, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries-a possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1984; 310:175-177.
48. Guyton JR, Klemp KF. The lipid-rich core region of human atherosclerotic fibrous plaques: prevalence of small lipid droplets and vesicles by electron microscopy. *Am J Pathol.* 1989; 134:705-717.
49. Mitchinson MJ, Hothersall DC, Brooks PN, De Burbure CY. The distribution of ceroid in human atherosclerosis. *J Pathol.* 1985; 145:177-183.

50. Ball RY, Stowers EC, Burton JH, Cary NRB, Skepper JN, Mitchinson MJ. Evidence that the death of macrophage foam cells contribute to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*. 1995; 114:45-54.
51. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF. Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:1337-1345.
52. Williams KJ, Tabas I. The response-to retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*. 1998; 9:471-474.
53. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New Engl J Med*. 1999; 340(2):115-126.
54. Andreassi MG, Botto N, Colombo MG, Biagini A, Clerico A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35(4):265-269.
55. Pietila K, Nikkari T. Role of arterial smooth muscle cell in the pathogenesis of atherosclerosis. *Med Biol*. 1983; 61(1):31-44.
56. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320:915-924
57. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:677-685.
58. Steinbecher UP, Lougheed M, Kwan WC, Dirks M. Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J Biol Chem*. 1989; 264:15216-15223.

59. Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy, L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986; 6:505-510.
60. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:5134-5138.
61. Vora DK, Fang ZT, Liva SM et al. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res*. 1997; 80:810-818.
62. Reid VC, Brabbs CE, Mitchinson MJ. Cellular damage in mouse peritoneal macrophages exposed to cholesteryl linolate. *Atherosclerosis*. 1992; 92:251-260.
63. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995; 77:863-868.
64. Gorog P, Kovacs IB. Lipid peroxidation by activated platelets: a possible link between thrombosis and atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1995; 115:121-128.
65. Hu B, Peng SK, Brubaker D, Morin RJ. Influence of cholesterol oxides and antioxidants on prostacyclin production by cultured endothelial cells. *FASEB J*. 1990; 4:3734-3738.
66. Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1124-1130.
67. Theron P, Abella A, Laurent D, et al. In vitro study of the cytotoxicity of isolated oxidized lipid low density lipoprotein fractions in human endothelial cells: relationship with the glutathione status and cell morphology. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(4):585-596.
68. Irwin KC, Martin LL, Gunderson KG, Linberg LF, Morel D, DiCorleto PE. 7 β -hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the

- primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 11452-11456.
69. Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child FS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77:2214-2218.
70. Sevanian A, McLeod LL. Cholesterol autoxidation in phospholipid bilayers. *Lipids*. 1987; 22:627-631.
71. Carpenter KL, Taylor SE, Ballantine JA, Fussel B, Halliwell B, Mitchinson MJ. Lipids and oxidised lipids in human atheroma and normal aorta. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1167:121-130.
72. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, et al. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(12):2119-2137.
73. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, Balla G. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49: 1030–1043.
74. Agarwal A, Balla J, Balla G, Croatt AJ, Vercelotti GM, Nath KA. Renal tubular epithelial cells mimic endothelial cells upon exposure to oxidized LDL. *Am J Physiol*. 1996; 271:814-823
75. Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzman ML, et al. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:6798-6802.
76. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:9285-9289.

77. Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow RM. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol*. 1995; 269:H648-655.
78. Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med*. 2009; 15(2):50-58.
79. Balla G, Jacob HS, Balla J, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 1992; 267:18148-18153.
80. Juckett MB, Balla J, Balla G, Jessurun J, Jacob HS, Verceletti GM. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein *in vitro*. *Am J Pathol*. 1995; 147:782-789.
81. Balla J, Nath K, Balla G, Juckett MB, Jacob HS, and Verceletti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction in rat lung by hemoglobin *in vivo*. *Am J Physiol*. 1995; 268: 321–327.
82. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Antal-Szalmás P, Agarwal A, Balla G, Balla J. Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:1254-63.
83. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, Balla J. Ferritin-Ferroxidase Activity: A Potent Inhibitor of Osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 2009. [Epub ahead of print]
84. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968; 61: 748-755.
85. Choi AMK, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996; 15:9-19.

86. McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247:725-732.
87. Cantoni L, Rossi C, Rizzardini M, Gadina M, Ghezzi P. Interleukin-1 and tumor necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. Feedback regulation by glucocorticoids. *Biochem J*. 1991; 279:891-894.
88. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987; 235:1043-1046.
89. Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Seigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol*. 2001; 166: 4185–4194.
90. Ramos KS, Lin H, McGrath JJ. Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol*. 1989; 38:1368-1370.
91. Graser T, Vedemikov YP, Li DS. Study on the mechanism of carbon monoxide induced endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery and vein. *Biomed Biochim Acta*. 1990; 49:293-296.
92. Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest*. 1995; 96:2676-2682.
93. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol*. 1987; 32:497-504.

94. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblast by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 99-103.
95. Nath K, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response to rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest*. 1992; 90:267-270.
96. Otterbein LE, Sylvester SL, Choi AMK. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats. The role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995; 13:595-601.
97. Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, Cook JL, Alam J, Choi AMK. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest*. 1999; 103:1047-1054.
98. Lee PJ, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cells growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:10393-10398.
99. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase-1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:2607-2610.
100. Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1998; 152:711-720.
101. Pang JHS, Jiang MJ, Chen YL, Wang FW, Wang DL, Chu SH. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1996; 97(10):2204-2212.
102. Yuan XM, Anders WL, Olsson AG, Brunk UT. Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis*. 1996; 124(1):61-73.

103. Ishikawa K, Maruyama Y. Heme oxygenase as an intrinsic defense system in vascular wall: implication against atherogenesis. *J Atheroscler Thromb.* 2001; 8(3):63-70.
104. Ishikawa K, Sugawara D, Wang XP, et al. Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in LDL receptor knockout mice. *Circ Res.* 2001; 88:506–512.
105. Ishikawa K, Sugawara D, Goto J, et al. Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits. *Circulation.* 2001; 104:1831–1836.
106. Juan, SH, Lee TS, Tseng KW, et al. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2001; 104:1519–1525.
107. Yachie A, Niida Y, Wada T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest.* 1999; 103(1):129-135.
108. Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol.* 2002; 33(1):125-130.
109. Saikawa Y, Kaneda H, Yue L, Shimura S, Wada T, Toma T, Kasahara Y, Yachie A, Koizumi S. Structural evidence of genomic exon-deletion mediated by Alu-Alu recombination in a human case with heme oxygenase-1 deficiency. *Hum Mutat.* 2000; 16(2):178-179.
110. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:12510925-10930.
111. Jeney V, Balla J, Yachie A, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effect of circulating heme. *Blood.* 2002; 100(3):879-887.
112. Wang R. TwoTs company, threeTs a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002; 16:1792–1798.

113. Erickson PF, Maxwell IH, Su LJ, Baumann M, Glode LM. Sequence of cDNA for rat cystathionine -lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochem J.* 1990; 269:335–340.
114. Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel RP, Lancaster Jr JR. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal Biochem.* 2005; 341:40–51.
115. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 2001; 20:6008–6016.
116. Sivarajah A, McDonald MC, Thiemermann C. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock.* 2006; 26:154–161.
117. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:15560–15565.
118. Yang G, Sun X, Wang R. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB J.* 2004; 18:1782–1784.
119. Wu SY, Pan CS, Geng B, Zhao J, Yu F, Pang YZ, Tang CS. Hydrogen sulphide ameliorates vascular calcification induced by vitamin D₃ plus nicotine in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27:299–306.
120. Kamoun P, Belardinelli MC, Chabli A, Lallouchi K, Chadeaux-Vekemans B. Endogenous hydrogen sulphide overproduction in Down syndrome. *Am J Med Genet.* 2003; 116:310–311.

121. Lynch SM, Campione AL, Moore M K. Plasma thiols inhibit hemin-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1485:11–22.
122. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. Endogenous hydrogen sulphide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 318:756–763.
123. Winterbourn CC. Reactions of superoxide with hemoglobin. In: Greenwald RA editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC, Boca Raton, Fl. 1985:137-141.
124. Jiang ZY, Hunt JV, and Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*. 1992; 202:384-389.
125. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Biophys*. 1959; 37:911-917.
126. Giulivi C, Davies KJA. Mechanism of the formation and proteolytic release of H₂O₂-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. *J Biol Chem*. 2001; 276(26):24129-24136
127. Coffey MD, Cole RA, Colles SM, Chisolm GM. *In vitro* cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxyl, lipid and peroxy radicals. *J Clin Invest*. 1995; 96:1866-1873.
128. Hill-Kapturczak N, Voakes C, Garcia J, Visner G, Nick HS, Agarwal A. A *cis*-acting region regulates oxidized lipid-mediated induction of the human heme oxygenase-1 gene in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1416-1422.
129. Kirchhausen T, Fless G, Scanu AM. The structure of plasma low density lipoproteins: experimental facts and interpretations—a minireview. *Lipids*. 1980; 15(6):464-467.

130. Hughes H, Mathews B, Lenz ML, Guyton JR. Cytotoxicity of oxidized LDL to porcine aortic smooth muscle cells is associated with the oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14(7):1177-85.
131. Dix TA, Marnett LJ. Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxyhydroxy, and trihydroxy fatty acids by hematin. *J Biol Chem*. 1985; 260:5351–5357.
132. Micheletta F, Natoli S, Misuraca M, Sbarigia E, Diczfalusy U, Iuliano L. Vitamin E supplementation in patients with carotid atherosclerosis. Reversal of altered oxidative stress status in plasma but not in plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:136-14
133. Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of α -tocopherol and ascorbate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:1616-1624.
134. van den Berg JJ, Op den Kamp JA, Lubin BH, Roelofsen B, Kuypers FA. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. *Free Radic Biol Med*. 1992; 12(6):487-98.
135. Silva G, Jeney V, Chora A, Larsen R, Soares MP, Balla J. Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2009; [Epub ahead of print]
136. Gutteridge JM, Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J*. 1988; 256:861-865.
137. Gutteridge JM. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 917:319-223.
138. Wiesel P, Patel AP, DiFonzo N, et al. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*. 2000; 102(24):3015-3022.

7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK

1. Nagy E, Jeney V, Yachie A, P. Szabó R, Wagner O, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G, Balla J. Oxidation of hemoglobin by lipid hydroperoxide associated with low-density lipoprotein (LDL) and increased cytotoxic effect by LDL oxidation in heme oxygenase-1 (HO-1) deficiency. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand). 2005; 51(4):377-385.

Impakt faktor: 1,018

2. Jeney V, Komódi E, Nagy E, Zarjou A, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G, Balla J. Suppression of hemin-mediated oxidation of low-density lipoprotein and subsequent endothelial reactions by hydrogen sulfide (H₂S). Free Radic Biol Med. 2009; 46(5):616-623.

Impakt faktor: 5,399

3. Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklósi J, Méhes G, Csonka T, Smith A, Vercellotti GM, Balla G, Balla J. Red cells, hemoglobin, heme, iron and atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Apr 8. [Epub ahead of print]

Impakt faktor: 6,858

Impakt faktor: 13,275

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

4. Bereczki D, Nagy E, Pal A, Magyar MT, Balla J. Should soluble CD40 ligand be measured from serum or plasma samples? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(6):1129-30; author reply 1130-1.

Impakt faktor: 6,791

5. Balla J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW, Balla G. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 5:v8-12. Review.

Impakt faktor: 2,607

6. Szappanos H, Szigeti GP, Pal B, Rusznak Z, Szucs G, Rajnavolgyi E, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter E, Pócsi I, Marx F, Csernoch L. The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005; 371(2):122-32.

Impakt faktor: 2,098

7. Varga Z, Seres I, Nagy E, Ujhelyi L, Balla G, Balla J, Antus S. Structure prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro. *Phytomedicine.* 2006; 13(1-2):85-93.

Impakt faktor: 1,403

8. Ujhelyi L, Balla G, Jeney V, Varga Z, Nagy E, Vercellotti GM, Agarwal A, Eaton JW, Balla J. Hemodialysis reduces inhibitory effect of plasma ultrafiltrate on LDL oxidation and subsequent endothelial reactions. *Kidney Int.* 2006; 69(1):144-51.

Impakt faktor: 4,773

9. Szappanos H, Szigeti GP, Pal B, Rusznak Z, Szucs G, Rajnavolgyi E, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter E, Pocsi I, Marx F, Csernoch L. The antifungal protein AFP secreted by *Aspergillus giganteus* does not cause detrimental effects on certain mammalian cells. *Peptides.* 2006; 27(7): 1717-25.

Impakt faktor: 2,701

10. Balla J, Magyar MT, Bereczki D, Valikovics A, Nagy E, Barna E, Pal A, Balla G, Csiba L, Blasko G. Serum levels of platelet released CD40 ligand are increased in early onset occlusive carotid artery disease. *Dis Markers.* 2006; 22(3):133-40.

Impakt faktor: 2,438

11. Harangi M, Matyus J, Nagy E, Paragh G, Balla J, Olah AV. Identification of sulfhemoglobinemia after surgical polypectomy. *Clin Toxicol (Phila).* 2007; 45(2):189-92.

Impakt faktor: 1,706

12. Balla J, Jeney V, Varga Z, Komodi E, Nagy E, Balla G. Iron homeostasis in chronic inflammation. *Acta Physiol Hung.* 2007; 94(1-2):95-106. Review.

Impakt faktor: 0,453

Összesített impakt faktor: 38,245

KONFERENCIÁK

1. Varga Zs, Nagy E, Komódi E, Balla J, Balla G, Antus S. Structure-activity relationship (SAR) of silybin derivatives depends on the test system. *Inaugural COST 926 Conference*, Budapest, 2004. **poszter**
2. Nagy E, Seres I, Ujhelyi L, Balla Gy, Balla J, Antus S, Varga Zs. A szilibin antioxidáns hatását meghatározó szerkezeti elemek. *A Magyar Szabadgyökutató Társaság III. Konferenciája*, Debrecen, 2005. **előadás**
3. Nagy E, Jeney V, P. Szabó R, Ujhelyi L, Kárpáti I, Mátyus J, Balla Gy, Balla J. Hemoglobin-oxidáció és oxidált LDL okozta citotoxicitás humán hem-oxigenáz-1 deficienciában. *A Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése*, Debrecen, 2008. **előadás**
4. Nagy E, Jeney V, P. Szabó R, Ujhelyi L, Kárpáti I, Mátyus J, Balla Gy, Balla J. Hemoglobin-oxidáció és oxidált LDL okozta citotoxicitás humán hem-oxigenáz-1 deficienciában. *A Magyar Atherosclerosis Társaság XVII. Kongresszusa*, Sopron, 2008. **előadás**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Balla György és Balla József Professzor Uraknak, hogy csatlakozhattam a kutatócsoportjukhoz, és hogy témavezetőkként rengeteg elvi és gyakorlati tanáccsal segítettek munkámat.

Köszönet illeti munkatársaimat, a Vaszkuláris Biológiai Kutatólaboratórium dolgozóit (Dr. Jeney Viktóriát, Barna Erikát, Dobolyi Alice-t) a mindennapokban nyújtott segítségükért és barátságukért.

Külön köszönöm Dr. Varga Zsuzsának a lipidelemzésekben nyújtott segítségét és a sok egyéb szakmai tanácsot.

Köszönet jár laboratóriumunk kollaborációs partnereinek, akikkel együtt dolgozva többféle érdekes kutatási témával megismerkedhettem.

Végül köszönöm a családom türelmét és biztatását.

FÜGGELÉK
(KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI)