

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Nagy Emőke

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2010.

IMPRESSZUM

Témavezető: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

Debreceni Egyetem, Laki Kálmán Doktori Iskola

A Szigorlati Bizottság elnöke: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A Szigorlati Bizottság tagjai: Prof. Dr. Róth Erzsébet, az MTA doktora

Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

A szigorlat helye és ideje: DE OEC Klinikai Kutató Központ könyvtára

2010. november. 22. (hétfő), 11 óra

A Védési Bizottság elnöke: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

Opponensek: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktor

Dr. Soltész Pál, PhD

A Védési Bizottság tagjai: Prof. Dr. Róth Erzsébet, az MTA doktora

Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

Az értekezés védésének helye és ideje:

DEOEC I. Belgyógyászati Klinika tanterme

2010. november 22. (hétfő), 13 óra

1. BEVEZETÉS

Az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) oxidációja központi szerepet játszik az érrelmeszesedés patomechanizmusában. Az oxidált LDL citotoxikus az endotheliális sejtekre, adhézions molekulák expresszióját fokozza, serkenti kemotaktikus anyagok elválasztását, monociták akkumulációját és habos sejtek képződését eredményezi, befolyásolja a vaszkuláris tónust, növekedési faktorok termelését, kollagén szintézist indukál és immunogén.

In vitro több módszert alkalmaznak oxidált LDL előállítására: átmeneti fémeket (vas és réz), metalloproteineket, enzimeket (mieloperoxidáz, lipoxigenáz), reaktív nitrogénrészecskéket és számos vaszkuláris sejtet. Kutatócsoportunk korábban megállapította, hogy a hem, egy egyedülálló vastartalmú vegyület is előidézhetheti az LDL oxidatív módosulását, mely folyamat felgyorsul nyomnyi mennyiségű hidrogén-peroxid vagy polimorfonukleáris sejtekből származó oxidánsok jelenlétében. A módosított LDL kémiai és biológiai tulajdonságai az oxidáció módjától függően változatosak lehetnek. A hem a szervezetünkben legnagyobb mennyiségben a hemoglobinban fordul elő. Az oxidált hemoglobin (ferrihemoglobin) készséggel elengedi a hem-csoportját. A hemoglobin oxidációja *in vivo* bekövetkezhet hidrogén-peroxid hatására. Ennek során átmenetileg négy vegyértékű vasat tartalmazó ferrilhemoglobin (FeIII/FeIV=O) képződik, mely a hemoglobin fehérjéjének felszínén tirozil-gyököket generálva stabilizálódik. A fehérjén képződött gyökök intramolekuláris (ditirozil oldalláncok) vagy intermolekuláris (hemoglobin oligomerek) kovalens kötésekkel alakítanak ki.

A hem és a hem-katalizálta oxidált LDL citotoxikusak a vaszkuláris endotheliumra nézve. Kutatócsoportunk eredményei szerint ezek a sejtek védekezésükkel fokozott mértékben expresszálnak hemoxigenáz-1-et és ferritint. A hemoxigenáz (HO) a hemdegradáció első lépését katalizálja.

Felnyitja a porfirin gyűrűt, melyből biliverdin és szénmonoxid (CO) képződik, és a vas szabaddá válik. A hemdegradáció egyik terméke a biliverdinből képződő bilirubin, mely antioxidáns tulajdonságú. A másik termék a CO, melynek élettani tulajdonságai sokban hasonlítanak a NO-ra. Stimulálja a cGMP képződését, elősegíti az érfal relaxációját, és gátolja a trombocita aktivációt. Három gén kódolja a hem-oxigenáz 3 izoenzimét. A HO-1 egy transzkripciós szinten indukálódó 32.8 kD tömegű stresszfehérje, melynek a hemen kívül számos induktora van; nehézfémek, citokinek, oxidatív stressz. A másik két enziforma konstitutív módon expresszálódik. A HO-1 induktorainak kémiai sokfélesége (hem, nehézfémek, citokinek, hormonok, endotoxinok) vezetett arra a feltételezésre, hogy a HO-1-nek a hem lebontásán kívül a sejt homeosztázisának fenntartásában is fontos szerepe lehet. Egyre több megfigyelés utal arra, hogy a HO-1 és a ferritin indukciója véd az ateroszklerózis ellen. Humán ateroszklerotikus plakkokban megfigyelték a hem-oxigenáz-1 és a ferritin fokozott expresszióját. Megállapították, hogy a stresszfehérjék indukciója meggátolja az oxidált LDL okozta citotoxicitást endotheliális sejtekben és érlemezsedéses lézió kialakulását LDL-receptor knockout egerekben és apolipoprotein E-hiányos egerekben. 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. A páciens súlyos vérképzavar miatt került kétévesen kórházba, ahol hemolitikus anémiát, fokozott véralvadást, proteinuriát és hematuriát állapítottak meg, melyek endothelium-károsodásra utaltak. A beteg májszövetének és immortalizált limfocita sejtjeinek vizsgálata a hemoxigenáz aktivitás teljes hiányát mutatta ki, a HO-1 gén analízise mindkét allélban a gén mutációját állapította meg. Korábban feltártuk, hogy a beteg ferrohemoglobinja ferrihemoglobinná oxidálódott és az ezt követő *in vivo* hem-mediálta LDL-oxidáció az endothelium súlyos károsodását okozta.

Az előrehaladott ateroszklerózis súlyos klinikai következményei a nyugati világban a mortalitás vezető okai. Szövetteni, morfológiai vizsgálat alapján Sary nyolc csoportba osztotta az érlemeszesedés fázisait. A IV-es és V-ös típusú léziók közös jellemzője, hogy az intima alatt nagymennyiségű lipid halmozódik fel, melyet vékony fibrózus sapka fed be. Ezek a plakkok hajlamosak rupturálni mely trombózis, miokardiális infarktus vagy stroke kialakulásához vezethet. Az érlemeszesedéses lézió lipidmagjában koleszterin és zsírsavak oxidációs termékei (lipid-hidroperoxidok, aldehidek) detektálhatók, melyek toxikusak a vaszkuláris sejtekre.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak az LDL hem-mediálta oxidációjának körülményei a termék kémiai és biológiai tulajdonságaira. Megvizsgáltuk továbbá, hogyan befolyásolja az LDL oxidációját a kénhidrogén, mely erős redukáló ágens, és jelentős, 50 $\mu\text{mol/L}$ körüli koncentrációban van jelen a szervezetben, fiziológiás körülmények között.
2. Az LDL oxidációjához szükséges hem leggyakoribb forrása az oxidált hemoglobin. A hemoglobin könnyen oxidálható gyulladáshoz vezető sejtekből származó oxidánsok hatására, mely folyamat hidrogén-peroxid által irányított. Ez alapján feltételeztük, hogy az oxidált LDL-hez asszociált lipid hidroperoxidok is képesek a hemoglobin oxidálására.
3. Ismert, hogy az érlemeszesedéses plakkban 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 vörösvértestekkel, hemoglobinnal és hennel, megvizsgáltuk a

reakcióelegyek toxicitását és a HO-1 indukciós hatását tenyésztett endotheliális sejteken.

4. HO-1 hiányában a sejtek hemmel szembeni toleranciája csökkent az egészséges sejtekhez képest. Megvizsgáltuk, hogyan reagálnak a HO-1 deficiens sejtek oxidált LDL-lel illetve érelmeszesedéses lézióból származó lipiddel történő kezelésre.

3. MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

Humán umbilikális véna endotheliális sejtek tenyésztéséhez a sejteket köldökzsínór vénából diszpáz enzimmal nyertük ki. Az immortalizált humán hem-oxigenáz-1 deficiens és egészséges limfocita sejteket Akihiro Yachie-tól kaptuk (Kanazawa Egyetem, Japán).

LDL szeparálás

Az LDL-t Na₂EDTA-val alvadásgátolt vérből egy lépéses gradiens ultracentrifugálással izoláltuk.

Az LDL oxidatív módosulásának detektálása

Az LDL konjugált dién tartalmát 234 nm-en fotometrállással határoztuk meg. A lipid-hidroperoxid tartalmat a Ferrous Oxidation of Xylenol orange módszerrel mértük, és fotometriásan követtük a tiobarbitursav reaktív anyagok koncentrációját.

Szövetminták hisztológiája

Az ateroszklerotikus érdarabokat szervdonor páciensekből nyertük. A mintákat paraffinba ágyasztuk, majd hematoxilin-eozinnal festettük.

Szövetminták lipidperoxidációjának vizsgálata

A szövetminták lipiddtartalmát kloroformmal extraháltuk és mértük a konjugált dién, a tiobarbitursav reaktív anyagok és a lipid-hidroperoxidok koncentrációját.

Szövetminták lipidanalízise

A lipidtartalom extrahálása után a neutrális lipideket vékonyréteg-kromatográfiásan vizsgáltuk. A zsírsavösszetétel meghatározásához a lipidet hidrolizáltuk majd a zsírsavakat metiláltuk és gázkromatográffal (GC/MS) végeztük a minőségi és mennyiségi analízist. A lipid α -tokoferol tartalmát folyadékkromatográfiával (HPLC) mértük.

Szövetminták vastartalmának meghatározása

A vasat vas-ferrozin komplexet képezve spektrofotometriásan mutattuk ki.

Hemoglobin preparálás

A hemoglobin preparálását vörösvértest lizátumból ioncserés kromatográfiával végeztük. Ferrihemoglobin előállításához a ferrohemoglobint $K_3Fe(CN)_6$ -tal inkubáltuk, az oxidálószer maradékát dializálással távolítottuk el.

Humán polimorfonukleáris sejt (PMN) preparálás

A PMN sejteket önkéntesektől vett heparinnal alvadésgátolt vér centrifugálásával nyertük.

Citotoxicitás vizsgálata endotheliális és immortalizált limfocita sejteken

A sejtek túlélését MTT redukciójával mértük, és ebből számoltuk a toxicitást.

HO-1 mRNS vizsgálata

A sejtekből az teljes RNS-t izoláltunk. Az RNS-ből hemoxigenáz-1-et és ciklofilint (háztartási gén) mértünk reverz transzkripció után real time PCR-rel.

HO-1 fehérje vizsgálata Western blottal

A sejtek szolubilizálása után a fehérjét SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, nitrocellulóz membránra blottoltuk és a HO-1-et poliklonális antitesttel jelöltük meg. Az antigén-antitest komplex láthatóvá tételét kemilumineszcenciás módszerrel végeztük, az autoradiogramokat denzitometráltuk.

Hemoxigenáz enzimaktivitás meghatározása

A HO enzimaktivitás meghatározásának során az endotheliális sejtekből nyert mikroszóma bilirubin generáló képességét mértük.

Oxidált hemoglobin vizsgálata

A hemoglobin hidrogén-peroxid mediálta oxidációja során keletkező hemoglobin multimereket Western blottal vizsgáltuk SDS-poliakrilamid gélen. A globin oxidációjának másik markerét, a ditirozint folyadékromatográfiával (HPLC) detektáltuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. AZ LDL HEM-KATALIZÁLTA OXIDÁCIÓJA

4.1.1. Az LDL oxidációja hemmel és hidrogén-peroxiddal, hosszabb idő alatt

A hem/H₂O₂-dal oxidált LDL 1-2 óra reakcióidő után nagymértékben toxikus tenyésztett endotheliális sejtekre. Megfigyeltük azonban, hogy 24 óra elteltével ennek a reakcióelegynek a toxikussága nagymértékben lecsökkent. A toxicitási kísérletekkel párhuzamosan HO-1- indukciós vizsgálatot is végeztünk; a sejteket szubletális dózisu oxidált LDL-lel kezeltük, és azt tapasztaltuk, hogy gén- és fehérjeindukció mértéke szintén függ az oxidáció időtartamától. Megmértük a lipidperoxidációs paraméterek időbeli változását az LDL hem-mediálta oxidációja során. Azt tapasztaltuk, hogy mind a citotoxicitás, mind a HO-1 indukció mértéke a lipid-hidroperoxid szinttel mutat szoros összefüggést.

4.1.2. Az LDL oxidációja hemmel

A hem hidrogén-peroxid nélkül is oxidálja az LDL-t, de a reakcióidő 12-16 óra és az így kezelt LDL csak kevésbé lesz citotoxikus. Ismételt hem-expozíció azonban drámaian megnöveli a kissé oxidált LDL LOOH-tartalmát és fokozza citotoxicitását. Ugyanez figyelhető meg, ha a HO-1 deficiens páciens mérsékelten oxidált LDL-jét kis mennyiségű hemmel reagáltatjuk. Ez a kísérlet modellezi a páciens vérében meglévő körülményeket, akinek állandó hemolízise és magas ferrihemoglobin-szintje volt, így LDL-je ismétlődő hem-expozíciónak volt kitéve. Megállapítottuk, hogy a mérsékelten oxidált LDL-ben jelen levő

kevés lipid-hidroperoxid hem hozzáadásakor ugyanazt a katalizáló hatást fejt ki, mint a hidrogén-peroxid.

4.1.3. A kén-hidrogén és az LDL- oxidáció

Ha az LDL hemes oxidációját kén-hidrogén jelenlétében végezzük, azt tapasztaljuk, hogy az már alacsony koncentrációban is (5-10 $\mu\text{mol/L}$) jelentősen lassítja a reakciót. Már eloxidált LDL kén-hidrogénnel történő kezelése csökkenti az oxidált LDL LOOH-tartalmát, melynek következtében csökken a módosított LDL citotoxicitása és HO-1 indukáló képessége is. Másrészt viszont kén-hidrogénnel (50 $\mu\text{mol/L}$) történő előkezelés ellenállóvá teszi az endotheliális sejteket a hidrogén-peroxiddal és oxidált LDL-lel előidézett toxikus hatással szemben.

4.2. A HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓJA

A HO-1 deficiens beteg plazmájában lezajló LDL-oxidációban kulcsszerepe van a hemoglobin ferrihemoglobinná alakulásának, így kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen folyamatok vezethettek oda, hogy a beteg plazmájában 60 μM ferrihemoglobin volt mérhető. Korábban megállapítottuk, hogy oldatban a hemoglobin gyorsan ferrihemoglobinná oxidálódik aktivált PMN sejtek hatására, mely folyamat kataláz enzimmel gátolható, mivel a folyamatot hidrogén-peroxid mediálja. Oxidált LDL szintén képes a hemoglobint ferrihemoglobinná alakítani *in vitro*, a reakció mértéke és kinetikája az oxidált LDL lipid-hidroperoxid tartalmától függ. Ha az oxidált LDL-ből glutationnal eltávolítjuk a lipid-hidroperoxid tartalom nagy részét, az oxidált LDL kevésbé hatékonyan oxidálja a hemoglobint, ami a lipid-hidroperoxidok hemoglobin-oxidációban betöltött központi szerepét támasztja alá. Ezzel a HO-1 deficiens beteg plazmájában végbemenő hemoglobin átalakulásának egy újabb lehetőségére világítottunk rá, mely szerint a hemoglobin oxidációja oxidált LDL lipid-hidroperoxidjainak hatására megy végbe.

4.3. HEM ÉS HEMOGLOBIN INDUKÁLTA LIPIDPEROXIDÁCIÓ AZ ATEROSZKLEROTIKUS PLAKKOKBAN

4.3.1 A vizsgálatba bevont érminták lipidtartalmának karakterizálása

A mintákat makroszkopikus megjelenésük és szövettani vizsgálatuk alapján három csoportba soroltuk: kontrol, ateróma és komplikált léziók. Meghatároztuk az érmintákban néhány lipidperoxidációs termék (konjugált diének, lipid hidroperoxidok és tiobarbitursav-reaktív anyagok), az antioxidáns E-vitamin és a szabad vas szintjét, és azt találtuk, hogy 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. A lipidek zsírsavösszetételét megvizsgálva azt kaptuk, hogy az oleinsav több, míg a linoleinsav kevesebb az aterómákban mint a kontrolban, mely szintén a lipidek oxidatív modifikációját jelzi.

4.3.2. A lipid és a vörösvértestek reakciója

Az ateroszklerotikus lézió lipid elemei plakkruptúra során vagy a neovaszularizációban keletkező sérülékeny hajszálerek megrepedésekor kerülnek közvetlen kapcsolatba vörösvértestekkel. Megállapítottuk, hogy az ateróma lipidjei hemolízist okoznak, ami után a felszabaduló hemoglobin oxidálódik. A lipidek glutationnal történő előkezelése mérsékli mind a hemolízist, mind a felszabaduló hemoglobin oxidációját, mely arra utal, hogy e folyamatokban a lipid-hidroperoxidoknak kulcsszerepük van.

4.3.3. A lipid és hemoglobin reakciója

Mind a ferro-, mind a ferrihemoglobin oxidálta az aterómából származó lipidet 24 óra alatt. Mivel ferrihemoglobinnal ellentétben a ferrohemoglobin szorosán köti a hemcsoportját, így magyarázatot kerestünk arra, miként válthatja ki mégis a plakklipid oxidációját. Megállapítottuk, hogy az ateróma lipidjének lipid hidroperoxid tartalma képes-e ferrohemoglobint ferrihemoglobinná alakítani. 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.

A komplikált plakkokból kivont hemoglobin erősen oxidáltnak bizonyult: ferrihemoglobin 51%, hemikróm 29% és ferrohemoglobin 20%. A komplikált lézió hemoglobinjában fehérjeoxidációs markereket, ditirozint és hemoglobin oligomereket mutattunk ki, melyek arra utalnak, hogy a hemoglobin hidroperoxid-mediálta oxidatív károsodást szenvedett.

4.3.4. A lipid és hem reakciója

A hem lipidperoxidációt indukál az aterómából származó lipidben, mely hemdegradációval jár együtt. A reakció kinetikája hasonlít az LDL hasonló körülmények közt végbemenő modifikációjához.

4.3.5. Az oxidált lipid hatása endotheliális sejtekre

Ellentétben a kontrol erekből kivont lipiddel, az aterómából származó lipid citotoxikus endotheliális sejtekre, melyet nagyban fokoz a lipid hemmel való kezelése. Szubletális dózisban a hemmel oxidált ateróma lipid indukálja a stresszadaptációs HO-1-t, mind mRNS, mind fehérje szinten.

4.3.6. A plakklipid oxidációjának gátlása

Az aterómából származó lipid hem- és hemoglobin-mediálta oxidációjának mértéke csökkenthető különböző gyökfogó antioxidánsokkal, mint a BHT, E-vitamin, a vaskeláló DFO, valamint a hem-kötő hemopexinnel, míg a hemoglobinnal okozta oxidáció részben gátolható a haptoglobinnal is. A lipid oxidációjának gátlása mérsékeli a lipid citotoxicitását és a HO-1 indukáló képességét is.

Az ateróma lipidjének oxidációs termékei 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. Eredményeink a következőképp foglalhatók össze: 1) Vörösvértestek lépnek az aterómába. 2) Hemolízis és hemoglobin-

oxidáció történik, ferril- és ferrihemoglobin képződik. 3) Az oxidált hemoglobinból hem szabadul fel. 4) A hem interkalálódik a lipidbe; 5) A lipidoxidáció fokozódik a lézióban; 6) Az endothelium károsodik és hemoxigenáz-1 indukálódik a hem és a reaktív lipidrészecskék hatására.

4.4. HO-1 DEFICIENS SEJTEK ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ

Hemoxigenáz hiányában a sejtek fokozottan érzékenyek az oxidatív károsító hatásokra. A HO-1 hiányos betegtől származó immortalizált limfocita sejtvonalról kimutatták, hogy érzékenyebbek hemtoxicitásra, mint az egészséges sejtek. Hemmel oxidált LDL és hemmel kezelt ateróma lipid okozta toxicitásra a beteg sejtjei minden általunk vizsgált koncentrációban érzékenyebbnek bizonyultak, mint a kontrol sejtek. Szubletális dózisú hemmel és oxidált LDL-lel kezeltük a sejteket és vizsgáltuk a HO-1-tartalom alakulását. HO-1 mRNS-t a kontrol és a beteg sejtvonalakban egyaránt tudunk mérni, viszont amíg a vad típusú sejtben a hem és az oxidált LDL jelentősen megnöveli a HO-1 enzim aktivitását, 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.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

- A hem által oxidált LDL toxikussága és HO-1 indukáló képessége arányos a lipid-hidroperoxid tartalmával.
- A HO-1 deficiens beteg LDL-jének oxidáltsága és toxicitása kevés hem hozzáadásakor drámaian megnő, ugyanis a mérsékelten oxidált LDL-ben jelen levő kevés lipid-hidroperoxid hem hozzáadásakor ugyanazt a katalizáló hatást fejt ki, mint a hidrogén-peroxid a hem-mediálta LDL-oxidációban.
- Kén-hidrogén jelenlétében az LDL hem-mediálta oxidációja lassú.

- Oxidált LDL LOOH-tartalmát kén-hidrogénnel történő kezelés csökkenti, melynek következtében csökken az oxLDL citotoxicitása és HO-1 indukáló képessége endotheliális sejteken.
- A kén-hidrogén ellenállóvá teszi az endotheliális sejteket oxidatív stresszel szemben.
- Az LDL-hez kötődő lipid-hidroperoxidok dóziszfüggően oxidálják a ferrohemoglobint ferrihemoglobinná, mely folyamat a hemoxigenáz-1 deficiens beteg plazmájában is végbement.
- A nagy lipidtartalmú ateroszklerotikus plakkokban mind a lipidperoxidációs termékek, mind a vas koncentrációja kissé emelkedett volt a kontrolokhoz képest, és legnagyobb volt a komplikált plakkokban mely arra utal, hogy az ateroszklerózis előrehaladásával fokozódik a plakk lipidjének oxidációja.
- Plakkruptúrát követően az ateróma lipidjei hemolízist okoznak, ami után a felszabaduló hemoglobin oxidálódik.
- Ferro- és ferrihemoglobin egyaránt lipidperoxidációt indukálnak aterómából származó lipidben. Az ateróma lipidjéhez asszociált lipid-hidroperoxidok ferrihemoglobinná oxidálják a ferrohemoglobint, mely így hem-forrássá válva további lipidperoxidációt és hemoglobin-oxidációt indukál.
- A plakkruptúrát követő hemolízisben felszabaduló hemoglobint lipid-hidroperoxid-mediálta oxidáció károsítja, melynek bizonyítékeként bevérzett (komplikált) lézióból származó hemoglobinban fehérjeoxidációs markereket, ditirozint és hemoglobin multimereket detektáltunk.
- A hem lipidperoxidációt indukál az aterómából származó lipidben, mely hemdegradációval jár együtt.
- A hemmel vagy hemoglobinnal oxidált ateróma lipid toxikus lesz endotheliális sejtekre, szubletális dózisban pedig HO-1-et indukál.
- Az ateróma lipid hem-mediálta oxidációjának mértéke csökkenthető különböző gyökfogó antioxidánsokkal, vaskelálóval, valamint a hem-kötő

hemopexinnel, míg a hemoglobinok okozta LDL-oxidáció részben gátolható a haptoglobinnal. A lipioxidáció gátlásával mérséklődnek a sejtes reakciók is.

- Hem által oxidált LDL és hémrel kezelt ateróma lipid okozta toxicitásra a HO-1 hiányos beteg sejtjei érzékenyebbek bizonyultak, mint a kontrol sejtek.
- HO-1 mRNS a HO-1 deficiens sejtben is indukálható hem és oxidált LDL hatására, a képződő fehérje viszont inaktív.

6. 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. Cell Mol Biol. (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. Supression 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

Összesen: 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, Pocsi 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.

Impact factor: 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 Szabadgyökktató 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**