

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Mátrix mineralizáció és reszorpció az érfalban: a ferril-hemoglobin és a kén-hidrogén hatása a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusára

Zavaczki Erzsébet

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Mátrix mineralizáció és reszorpció az érfalban: a ferril-hemoglobin és a kén-hidrogén hatása a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusára

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Zavaczki Erzsébet
okleveles biológus/biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balla József

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rosivall László, az MTA doktora
Prof. Dr. Benyó Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja (online formában): 2021. február 5. 10:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Nagy Judit, az MTA doktora
Prof. Dr. Reusz György, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Nagy Judit, az MTA doktora
Prof. Dr. Reusz György, az MTA doktora
Prof. Dr. Rosivall László, az MTA doktora
Prof. Dr. Benyó Zoltán, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja (online formában): 2021. február 5. 11.30

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a karanyi.zsolt@med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző nap (2021. február 4.) 12 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. *A vaszkuláris kalcifikáció*

A vaszkuláris kalcifikáció, független rizikótényezőként, szerepet játszik számos érrendszeri megbetegedés patogenezisében, úgymint az ateroszklerotikus plakk kialakulása, miokardiális infarktus, koszorúér betegség és megemelkedett ischemiás epizódok perifériás érbetegségekben. A koszorúerek kalcifikációja növeli a hirtelen szívhalál esélyét. A dializált betegek artéria kalcifikációja szoros összefüggésben van a magas vérnyomással, mely hozzájárul a szív- és érrendszeri ischemiás betegségek és a bal kamra hipertrófia kialakulásához.

A vaszkuláris kalcifikációnak két eltérő megjelenési formája van: (1) az intima kalcifikáció, mely az ateroszklerotikus plakkok megjelenéséhez köthető, valamint (2) a media kalcifikáció, mely a tunica media diffúz kalcifikációjával jellemezhető, elsősorban a belső elasztikus lamina szintjében, és nem mindig társul ateroszklerózissal. A vaszkuláris kalcifikáció ez utóbbi megjelenési formája igen gyakran fordul elő hemodializált betegekben, továbbá a kalcifilaxis - mely diffúz arteriola kalcifikációt és bőr nekrozist mutató tünetegyüttes - kialakulása is majdnem kizárólag 5. stádiumú krónikus vesebetegségben (chronic kidney disease; CKD) szenvedő betegekben fordul elő, és kiemelkedően magas halálzási arányt mutat.

Megemelkedett foszfát (Pi) szint gyakran látható végstádiumú vesebetegségben szenvedő betegeknél, ahol a Pi homeosztázis zavart szenved, mivel a vese képtelen exkretálni a foszfátot. A vaszkuláris kalcifikáció a kardiovaszkuláris megbetegedések független rizikófaktoraként meghatározó kockázati tényező a hemodializált betegek halálzásiában.

1.2. *Simaizomsejtek kalcifikációja és oszteoblasztos differenciációja*

A vaszkuláris kalcifikáció kialakulásában az ásványi anyagok metabolizmusának zavara nagyon fontos rizikófaktornak tekinthető. A magas extracelluláris Pi szint nagyban hozzájárul a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásához. Korábbi tanulmányokban igazolták, hogy a megemelkedett Pi szint vaszkuláris simaizomsejtek (vascular smooth muscle cell; VSMC) kalcifikációját és oszteokondrogenikus fenotípus-váltását indukálja. A Pi felvétele a nátrium-dependens foszfát kotranszporter Pit-1 csatornafehéjén keresztül elengedhetetlen feltétele a VSMC-k kalcifikációjához és fenotípus váltásához. A vaszkuláris kalcifikáció egy szabályozott folyamat, melyben a VSMC-k oszteoblasztszerű sejtek fenotípusát veszik fel.

Ezt az elgondolást az is alátámasztja, hogy ezen sejtekben megemelkedik a Runt-related transcription factor 2 (Runx2) expressziója, mely egy oszteoblaszt-specifikus transzkripciós faktor. A Runx2-nek kulcsszerepe van az oszteoblaszt differenciációban, a csont mátrix fehérjék expressziójának szabályozásában, következésképpen a csont mineralizációban. Az alkalikus foszfatáz (ALP; a korai oszteogenezis fontos enzime) és az oszteokalcin (OCN; az egyik fő nem-kollagén fehérje a csontmátrixban) expressziójának emelkedése szintén megfigyelhető a VSMC-k magas extracelluláris Pi szintre adott válaszában.

A VSMC-k apoptózisa, amely mind az intimában az ateroszklerotikus plakkok esetében, mind pedig a mediában CKD esetében látható, szintén hozzájárul a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásához. Az apoptotikus VSMC-k kalcifikációs magként is funkcionálhatnak, illetve aktívan koncentrálnak a kalciumot és a foszfátot a hidroxipatit képzéshez.

1.3. Oszteoklasztok kialakulása és szerepe az érlelésesedésben

1.3.1. Az oszteoklasztok differenciációja

Az oszteoklasztok (osteoclast; OC) sokmagvú óriássejtek, melyek a monocita/makrofág vonal eredetű, csontreszorpcióra specializálódott sejtek. A makrofágok OC-irányú differenciációjához egyaránt szükséges a makrofág/monocita kolóniastimuláló faktor-1 (macrophage/monocyte colony stimulating factor-1; M-CSF-1) és az NFκB aktivátor receptor ligand (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RANKL). A RANKL és az NFκB aktivátor receptor (receptor activator of nuclear factor kappa-B; RANK) interakciója révén további gének aktiválódnak. Az aktivált T-sejt nukleáris faktor, citoplazma I (NFATc1) kulcsszerepet játszik az OC-ok érésében az OC-specifikus gének expressziójának szabályozása útján, mint például a dentritikus sejt-specifikus transzmembrán fehérje (DC-STAMP), a tartarát-rezisztens savas foszfatáz (TRAP), a katepszin K (CatK) és a kalcitonin receptor (CTR).

1.3.2. Oszteoklasztok az érlelésben

Az ateroszklerotikus plakkok kalcifikált régióinak környezetében oszteoklaszt-szerű (osteoclast-like cell; OLC) sejtek jelennek meg. A funkcionálisan aktív OLC-k jelentőségét a vaszkuláris kalcifikációban számos esetben bizonyították. A működő OLC sejtek nélkülözhetetlenek az érrendszerben a mineralizált depozitumok reszorpciójához, illetve az OLC sejtek funkcióvesztése a vaszkuláris kalcifikáció folyamatát segíti elő.

Érelmeszesedéssel plakkokban a csontképződés egy gyakori jelenség, melyet a VSMC-k, oszteoblasztok és OLC-k jelenléte jellemez. Az OLC-k infiltrálódó makrofágokból differenciálódnak és elsősorban a koleszterol kristályok és a mineralizáció környékén figyelhetők meg. Az OLC-k kialakulása az érrendszerben függ a RANKL-tól, melyet különféle sejttípusok, úgymint VSMC-k és endotél sejtek is nagy mennyiségben szekretálnak. Az artériák mélyebb szöveti rétegeiben az OLC-k képesek a depozitumok bontására, ezáltal csökkentik a kalcifikáció mértékét és ellensúlyozzák a VSMC-kből származó oszteoblasztok aktivitását. Az egyensúly felbomlása a VSMC-kből származó oszteoblasztok csontképzése és az OLC-k csontreszorpciója között patológiás kalcifikációs folyamatokhoz vezet az érfalban.

1.3.3. Az oszteoklaszt-differenciáció gátlása

A RANK expressziója, valamint a RANK-RANKL interakciója nélkülözhetetlen az OC-k differenciációjához. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy RANK-/- egerekben nem differenciálódnak OC-k. Az oszteoprotegerin (OPG) egy szolubilis RANKL receptor, melynek szerepe van a csontreszorpció szabályozásában azáltal, hogy gátolja az OC-k működését. Az OPG dimerként verseng a RANK receptorral a RANKL-kötésért, így módon gátolja a RANK-RANKL interakciót. Az NFATc1 oszteoklasztogenezisben betöltött kulcsszerepére világítanak rá azok a tanulmányok, melyek NFATc1-deficiens egerek sérült OC differenciációját írják le. Továbbá, az NFATc1-deficiens embrionális őssejtek nem képesek OC sejtekké differenciálódni RANKL hatására. Zwerina és munkatársai már korábban leírták, hogy a hem gátolja az oszteoklasztogenezist és az OC-specifikus markerek (TRAP, CTR és DC-STAMP) expresszióját azáltal, hogy indukálja a hem-oxigenáz-1-et (HO-1), a hem katabolizmus legfontosabb enzimét.

1.4. A ferril-hemoglobin jelenléte az ateroszklerotikus plakkokban

Az ateroszklerotikus léziók sérülése révén gyakran alakul ki plakkon belüli hemorrhagia. Ezen bevérzett komplikált plakkokat erősen oxidáló milieu jellemzik, mintegy „halál zónát” képezve a vörösvértestek számára. Az eritrociták ezen halál-zónában lépve szétesnek, a kiszabaduló hemoglobin (Hb) gyors oxidáción megy keresztül, mely során methemoglobin (MetHb, Fe^{3+}) és ferril-hemoglobin (FHb, $\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$) képződik. A Hb oxidációját hem felszabadulás is kíséri. Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy a bevérzett komplikált léziókban MetHb és FHb található, a FHb pedig potenciális pro-inflammatorikus mediátor

az endotél sejtekben, indukálja azok morfológiai változásait, fokozza az endotel-réteg permeabilitását és növeli a monociták adhézióját. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az oxidált Hb formáknak jelentős szerepe van az ateroszklerózis patogenezisében.

1.5. A H₂S képződése és biológiai funkciója az érrendszerben

A kén-hidrogént (H₂S) kezdetben toxikus gáznak tekintették, bár nemrégiben felismerték, hogy a szén-monoxid és a nitrogén-monoxid mellett a harmadik endogén gáz-transzmitter. Emlősökben a H₂S három enzim, a cisztationin-β-szintáz (CBS), a cisztationin-γ-liáz (CSE) és a 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz (MST) segítségével képződhet a transzszulfurációs útvonalon, homociszteint, cisztationint és L-ciszteint használva szubsztrátként.

Az érrendszerben a H₂S a VSMC-k CSE enzim aktivitása révén képződik. A H₂S-nek számos fiziológiai hatása van az érrendszerben: (1) dilatálja az ereket azáltal, hogy nyitja a simaizomsejtekben az adenozin-5'-trifoszfát-szenzitív K⁺ csatornákat, (2) kardioprotektív hatású az iszkémia/reperfúzió okozta károsodás és a miokardiális infarktus ellen és (3) sérülést követően megóvjá a mitokondriumok szerkezetét és funkcióját. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a H₂S-nek közvetlen ateroszklerózist gátló hatása van. A H₂S magas koncentrációban apoptózist indukál, csökkenti a VSMC-k endotelin-indukálta proliferációját és befolyásolja az érrendszerben történő gyulladásos folyamatokat. Mi több, a H₂S gátolja az alacsony sűrűségű lipoprotein és az ateróma plakk lipidek oxidációját. CKD-ban betöltött funkcióját tekintve, a CKD 5. stádiumú betegeknél a plazma H₂S szintje alacsonyabb, mint az egészséges embereknél.

További bizonyíték a H₂S érbetegségekben betöltött jótékony hatására, hogy a kalcifilaxis sikeresen kezelhető intravénás szódium-tioszulfát terápiával, melynek háttérében az áll, hogy a szódium-tioszulfát emeli a CSE enzim expresszióját és ezáltal növeli a H₂S biogenezisést. Továbbá azt is megfigyelték, hogy a H₂S csökkenti a patkányokban a nikotin és D3 vitamin-indukálta vaszkuláris kalcifikációt.

2. Célkitűzések

A vaszkuláris kalcifikáció progresszióját két folyamat határozza meg: a simaizomsejtekből differenciálódott oszteoblaszt-szerű sejtek extracelluláris mátrix-képzése és a makrofágokból differenciálódott OLC sejtek mátrix reszorpciója. Vizsgálataink középpontjában azon faktorok megismerése állt, melyek hatással vannak ezekre a folyamatokra.

1. Célul tűztük ki annak a kérdésnek a tisztázását, hogy a bevérzett aterómákban nagy mennyiségben jelenlévő különböző oxidáltságú Hb formák vajon hogyan befolyásolják az OLC sejtek vaszkuláris kalcifikációt kompenzáló hatását.

- Megvizsgáltuk, hogy a különböző Hb formák hogyan hatnak az OLC sejtek differenciálódására és csontreszorpciós aktivitására.
- Ismert, hogy a HO-1 enzim gátolja az oszteoklasztogenezist. Feltételeztük, hogy az oxidált hemoglobinok HO-1 indukáló-képességük révén befolyásolják az OC-differenciációt, így a HO-1 szerepét HO-1 géncsendesített illetve HO-1^{-/-} knock-out sejteken vizsgáltuk.
- Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az oxidált Hb a közvetlen RANK-RANKL interakciót, mely az OC-irányú differenciáció nélkülözhetetlen lépése. Továbbá azt is vizsgáltuk, hogy az oxidált Hb az oszteoklasztogenezis mely jelátviteli útvonalán fejt ki hatását.
- Bevérzett ateroszklerotikus plakkokban vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a FHb jelenléte az OC-k differenciációját.

2. Célunk volt annak megismerése, hogy a H₂S hogyan befolyásolja a vaszkuláris kalcifikációt.

- Megvizsgáltuk, hogy az exogén eredetű H₂S-nek milyen hatása van a HAoSMC oszteoblasztos differenciációjára és extracelluláris mátrix képzésére.
- Az endogén H₂S-termelő enzim aktivitásának gátlásával tanulmányoztuk, hogy milyen hatása van az endogén H₂S szint csökkenése a HAoSMC-k oszteoblaszt-irányú transzformációjára.
- Célul tűztük ki annak feltárását, hogy mely enzim hiányában alakul ki a CKD betegek jellemző alacsony H₂S szint.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Engedélyek

Munkánk során a human arteria carotis mintákat carotis endarterektómián átesett betegektől gyűjtöttünk, melyeket a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A minta gyűjtése a Magyar Kormány Egészségügyi Tudományos Tanácsának Tudományos és Kutatás Etikai Bizottság jóváhagyásával, a DE OEC RKEB/IKEB 3712-2012 regisztrációs számú engedélyével készült.

Vizsgálatainkhoz egészséges és 5. stádiumú veseelégtelenségen szenvedő betegektől gyűjtöttünk vérmintákat, melyhez engedélyt a Nr. DEOEC RKEB/IKEB 3287A-2010 számon a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága adott ki. Írásos beleegyező nyilatkozatot minden résztvevő aláírt. A tanulmány megfelel az 1975 évi Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveivel.

3.2. Betegek

A kontrollok egészségügyi dolgozók közül kerültek ki, akik nem rendelkeztek olyan ismert betegségekkel, mint hipertenzió, dislipidemia, máj- és veseműködési zavarok (n=23, átlag életkor 53 év, 9 nő és 14 férfi). A beteg csoportba 5. stádiumú CKD betegek tartoztak, akik hemodialízis kezelésben részesülnek dialízis központunkban (n=21, átlag életkor 61 év, 13 nő és 8 férfi).

3.3. Sejtenyésztés és reagensek

Human Aorta Smaizomsejtek (HAoSMC) a Cambrex Bioscience-től (Wokingham, UK), az egér RAW264.7 makrofágok az ATCC-től (Manassas, VA, US) szereztük be. Kísérleteinkhez használt vegyszereket, ha másként nem jelöltük, a Sigma (St. Luis, MO, USA) cégtől szereztük be. A sejteket 10% FBS (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, US) tartalmú DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tenyésztettük.

3.4. In vitro oszteoklasztogenezis

RAW264.7 makrofágokat tenyésztettünk 24 lyukú tenyésztőedényben növekedési médiumban vagy 50 ng/mL RANKL (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) jelenlétében (oszteoklasztogénikus médium). Kétnaponta cseréltük a tenyésztőközeget.

3.5. Csontvelő eredetű mononukleáris sejtek izolálása

Csontvelői eredetű mononukleáris sejteket (BMDMs) vad típusú és hem-oxigenáz-1 deficiens egerek femur és tibia csontjából izoláltunk Madaan és munkatársai szerint. Az izolált BMDM sejteket 5 napig tenyésztettük RANKL (100 ng/mL) és M-CSF (50 ng/mL) tartalmú médiumban önmagában vagy 10 µmol/L Fhb jelenlétében.

3.6. Tartarát-rezisztens savas foszfatáz (TRAP) festés

RAW264.7 sejteket oszteoklasztogenikus médiumban tenyésztettünk 5 napig, majd az OC-irányú differenciációt TRAP festéssel vizsgáltuk Leukocyte Acid Phosphatase kit segítségével a gyártó ajánlása szerint. TRAP pozitív sokmagvú sejteket (több mint 3 sejtmag/sejt) oszteoklasztoknak tekintjük. Az OC-k területét Image J software-rel határoztuk meg.

3.7. Csontreszorpciós vizsgálat

Az OC-k csontreszorpciós aktivitásának méréséhez a RAW 264.7 sejteket hidroxipatit bevonatú Corning OsteoAssay Surface Plate-en tenyésztettük 6 napig. Image J software segítségével mértük meg a kialakult OC-k által lebontott területek nagyságát.

3.8. Hem-oxigenáz aktivitás mérése

6 lyukú tenyésztőedényben kezelt RAW264.7 sejtek mikroszóma frakcióit használtuk a HO aktivitás meghatározásához, Balla G és munkatársai munkája alapján. A HO enzim aktivitását a képződött bilirubin/mg fehérje/60 perc egységben fejeztük ki.

3.9. Immunhisztokémia

Az arteria carotis mintákat 4%-os formaldehid oldatban fixáltuk 1-3 napig. A kalcifikált mintákat ezt követően 1 mol/L EDTA/Tris pufferrel dekalcináltuk. 5 µm vastagságú paraffinba ágyazott mintákat xylen oldattal deparaffinizáltuk, majd etanollal rehidratáltuk, végül desztillált vízzel mostuk. Immunhisztokémiához a mintákat Dako EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent-ben (Dako Glostrup, Denmark) inkubáltuk 5 percig. A sorozat metszeteket TRAcP (Roche, Mannheim, Germany) vagy katepszin K (Abcam, Cambridge, UK) vagy CD68 (Roche) vagy Fhb ellenes antitesttel inkubáltuk ultraview univerzális DAB detektáló kitet alkalmazva. Az immunfestések intenzitását DFC 420 kamerával felszerelt Leica DM2500 fénymikroszkóppal detektáltuk.

3.10. Hemoglobin preparálás

A hemoglobin preparálást egészséges önkéntesektől származó heparinnal alvadást gátló vérből végeztük DEAE Sepharose CL-6B oszlopon, ioncserélő kromatográfiával. MetHb előállításához a Hb preparátumot hem csoportra nézve 1,5-szeres moláris mennyiségű $K_3Fe(CN)_6$ -dal inkubáltuk 30 percig 25°C-on. Fhb előállításához a Hb preparátumot hem-csoportra nézve 10-szeres moláris mennyiségű H_2O_2 oldattal inkubáltuk 60 percig 37°C-on. A minták koncentrációját Winterbourn egyenletei alapján határoztuk meg.

3.11. Keresztköött hemoglobinok detektálása Western blottal

Egészséges kontroll, kalcifikált aterómát vagy bevérzett kalcifikált aterómát tartalmazó arteria carotis mintákat 12%-os SDS gélen elektroforetizáltunk. A hemoglobin dimereket, tetramereket és polimereket HRP-vel jelölt anti-human Hb poliklonális antitesttel (Abcam, 1:15000) mutattuk ki.

3.12. Human carotis minták spektrum analízise

Egészséges carotis, kalcifikált aterómát, valamint bevérzett kalcifikált aterómát tartalmazó carotis mintákat folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően porítottuk, majd foszfát-pufferelt sóoldatban (phosphate buffered saline, PBS, pH 7,4) szonikálással homogenizáltuk. A mintákat 12000×g sebességen 20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót Beckman DU-800 spektrofotométeren 500-700nm hullámhossz tartományban fotometráltuk.

3.13. Sejt proliferáció vizsgálata

A RAW264.7 sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük 1-4 napon keresztül. Az élő sejtek mennyiségét MTT-vizsgálattal határoztuk meg.

3.14. Immunfluoreszcens festés

24 órás kezelést követően a fixált és blokkolt mintákat NFATc1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, US) ellenes antitest oldattal inkubáltuk. A másodlagos antitest Alexa Fluor® 488 (Thermo Scientific) fluoroforral konjugált kecskében termeltetett anti-egér IgG volt. A sejtmagokat Hoechst festékkel festettük. A nukleáris transzlokációt TCS SP8 STED mikroszkóppal Leica Application Software X (Leica, Mannheim, Germany) segítségével vizsgáltuk.

3.15. Citoplazma és sejtmag fehérje extrakció

A 6 lyukű tenyésztő edényben kezelt sejteket 10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM NaCl, 0,5 M Szukróz, 0,5% Triton X-100, és proteáz gátlókat tartalmazó pufferben lizáltuk, 10 percig jégen inkubáltuk, majd ezt követően 1000×g sebességen 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó tartalmazza a citoplazma fehérje frakciót. A sejtmagfehérjét tartalmazó pelletet magfehérje extrakciós pufferrel (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,5% Sodium deoxycholate, 0,1% SDS, és proteáz inhibitorok) szolubilizáltuk.

3.16. Rekombináns egér 6×His-RANKL expresszió

A rekombináns, N-terminális végén 6×His tagelt egér RANKL-ot *E.coli* Rosetta 2 sejtekben termeltettünk. C57BL egerek tüdő szövetéből RNS-t szeparáltunk, reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő, majd ezt pTriex-4 Neo vektorba klónoztuk. A protein expressziót 1 mM Izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk. A sejteket hideg lízis pufferben (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1% TritonX-100, proteáz inhibitorok és 1 mg/ml lizozim, pH 8.0) lizáltuk. A rekombináns RANKL fehérjét Protino Ni-TED 150 oszlopon, a gyártó utasításai alapján tisztítottuk meg, ezután Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Resin (Thermo Scientific) segítségével endotoxin-mentesítettük. A rekombináns fehérje minőségi analízisét Coomassie festéssel és Western blotlalt végeztük.

3.17. In vitro RANK-RANKL interakció vizsgálata

RAW264.7 sejteket lizáltunk hideg lízis pufferben (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2× proteáz inhibitor és 1% Triton X-100). A lizátum felülúszóját 4°C-on 15 µg RANK antitesttel billegtettük. Ezt követően az antigen-antitest komplexeket protein A/G mágneses gyöngyökkel (Thermo Scientific) inkubáltuk. Ezt követően a gyöngyöket háromszor mostuk detegergenseket tartalmazó hideg puffer oldattal (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,05% Igepal CA630 és proteáz inhibitorok), majd háromszor detegergenseket nem tartalmazó pufferrel (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) és koinkubáltuk 1µg RANKL-dal vagy 1µg RANKL és 10µM Fhb elegyével szobahőmérsékleten 60 percig. A gyöngyöket ezután mostuk háromszor 50 mM Tris pH 7.5 és 150 mM NaCl tartalmazó pufferrel és a mintákat eluáltuk redukáló ágens nélküli 2×SDS minta-pufferrel 50°C-on 10 percig. A RANK-RANKL interakció vizsgálatához az eluátumokat 100 mM ditiotreitollal (DTT) egészítettük ki, 95°C-on 10 percig denaturáltuk.

3.18. Kalcifikáció indukálása

Konfluens HAoSMC sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztettünk, melyhez a növekedési médiumot 3 mmol/L szervetlen foszfáttal ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4) egészítettük ki. Kísérleteink során a sejtenyészítő médiumokat kétnaponta friss médiumra cseréltük.

3.19. Kalcium depozíció mérése

3.19.1. Kalcium depozíció mennyiségi meghatározása kolorimetriás módszerrel

A 48 lyukú tenyésztőedényben kezelt sejteket kétszer mostuk PBS oldattal és decalkifikáltuk 0,6N sósav oldattal. A minták kalcium tartalmát QuantiChrome Calcium Assay Kit (Gentaur, Hayward, CA, US) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. Ezt követően a sejteket 0,1 mol/L NaOH és 0,1% SDS elegyével szolubilizáltuk, fehérje tartalmukat BCA protein assay kit (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg. A minták kalcium tartalmát fehérjetartalomra normalizáltuk.

3.19.2. Alizarin Red festés

A 48 lyukú tenyésztőedényben kezelt sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 4% paraformaldehid (PFA) oldatban fixáltuk. PBS-sel történő mosást követően 2% Alizarin Red S oldattal inkubáltuk 5 percig. Ezt követően háromszor mostuk desztillált vízzel.

3.20. Alkalikus- foszfatáz aktivitás mérése

HAoSMC sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben kezeltünk, majd kétszer mostuk PBS-sel, szolubilizáltuk 1% Triton X-100 és 0,9% NaCl tartalmú oldatban. 130 μ l Alkaline Phosphatase Yellow Liquid Substrate oldathoz 50 μ g proteintartalmú mintát adtunk, és a p-nitrofenol képződés kinetikáját 37°C-on 30 percig 405nm-en detektáltuk. A kinetikus görbe maximális meredekségét használtuk az aktivitás számításához.

3.21. Intracelluláris foszfát mérése

A sejtek szervetlen foszfát tartalmát QuantiChrome Phosphate Assay Kit (Gentaur) segítségével határoztuk meg. A tenyészeteket kétszer mostuk PBS-sel, ezt követően szolubilizáltuk 1% Triton X-100 oldattal. A foszfáttartalmat a minták fehérjetartalmára normalizáltuk.

3.22. Oszteokalcin mérés

A tenyészetek oszteokalcin tartalmának méréséhez az extracelluláris mátrixot 0,5 mol/L EDTA-ban (pH 6.9) oldottuk, ezt követően Osteocalcin Assay Kit (Bender MedSystems,

Vienna, Austria) segítségével a sejtenyészetek fehérjetartalmára normalizálva határoztuk meg az értékeket.

3.23. *Plazma H₂S koncentráció meghatározása*

A CKD betegekől és egészséges kontroll személyektől származó vérmintákat centrifugáltuk (3000×g 3 perc), majd 40 µl plazmamintát adtunk az 50 µl 1% cink-acetátot, 40 µl 30 mmol/L FeCl₃-ot [1,2 mol/L HCl-ban oldva] és 50 µl 20 mmol/L N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidrokloridot [7,2 mol/L HCl-ban oldva] tartalmazó reakcióelegyhez. A fehérje-mentesítést 70µl 10% triklórecetsav hozzáadásával végeztük. Ezt követően a reakcióelegyet centrifugáltuk (3000×g 30 perc), majd a felülülő abszorbanciáját 670 nm hullámhosszon mértük, a H₂S koncentrációját kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

3.24. *Perifériás Mononukleáris sejtek (PBMC) szeparálása*

Perifériás mononukleáris sejteket vérből, Histopaque 1077 segítségével gradiens centrifugálással izoláltunk. CSE aktivitás méréséhez a sejtuszpenziót 100 mmol/L kálium-foszfát pufferben (pH 7.4) ultraszonikáltuk vagy a CSE fehérje-szintű expresszió vizsgálatához 1% Triton X-100 oldatban, proteáz inhibitorok jelenlétében szolubilizáltuk vagy a CSE mRNS mennyiségi meghatározásához TriReagent segítségével tártuk fel a sejteket és további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

3.25. *Cisztationin γ -láz aktivitás mérése*

CSE aktivitás mérését Stipanuk módszere alapján végeztük. A human PBMC sejtek CSE aktivitását cisztationin lebontás és cisztein képződés útján mértük. A sejtlyázumokat 60 percig 37°C-on inkubáltuk 2 mmol/L cisztationin, 0,25 mmol/L pyridoxal 5'-foszfát és 100 mmol/L Tris-HCl jelenlétében. Ezt követően savas ninhidrin reagenst adtunk az elegyhez és 5 percig forraltuk. A minták szobahőre történő lehülése után a cisztationin és cisztein tartalmakat 455 és 560 nm-en mért abszorbancia értékek segítségével határoztuk meg.

3.26. *Kvantitatív polimeráz láncreakció*

Totál RNS izolációja TriReagent (Zymo Research, Irvine, CA, US) segítségével történt, a minták reverz transzkripcióját High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével végeztük. A CKD betegek és kontroll csoport perifériás mononukleáris sejteiből QIAamp® RNA Blood Mini kittel (Qiagen, Hilden, Germany) preparáltunk RNS mintákat. Fluoreszcens jelölésű TaqMan próbákat (Thermo Scientific) használtunk a gének

expressziójának vizsgálatához, melynek során a 20 µl reakcióelegy 10 µl cDNS-ből és 10 µl Master Mix-ből (Thermo Scientific) állt, mely 1 µl TaqMan Assayt tartalmazott. A Runx2, Pit-1 és CSE gének kvantálása iQ SYBR Green Supermix-szel (Bio-Rad) történt. A detektálást iCycler iQ Real Time PCR rendszerrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) végeztük.

3.27. Western blot

Az NFATc1 és NFκB nukleáris transzlokáció kimutatásához sejtmag- illetve citoplazma-fehérje extraktumokat, az egyéb fehérje expressziós szintjének meghatározásához teljes sejtlizátumokat 12%-os SDS-PAGE elektroforézissel választottuk el. Az oszteokalcin kimutatásához az extracelluláris mátrixot 0.5 mol/L EDTA oldattal (pH 6.9) oldottuk, majd a mintákat 16,5% Tris-Tricin/Peptid-PAGE géltre vittük fel. Az elektroforézist követően nitrocellulóz membránra blottoltuk a mintákat, 5% tejjporral vagy 5% BSA-val (bovine serum albumin) szobahőmérsékleten blokkoltuk 1 órán át, majd az elsődleges antitestekkel 4°C-on, 16 órán át billegtetve inkubáltuk. Az antigen-antitest komplexeket kemilumineszcenciával tettük láthatóvá (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Detektálást követően a membránokat újra jelöltük GAPDH-ra, HSP-90-re vagy Lamin B1-re. A kemilumineszcencia kvantálását Image J software-rel végeztük.

3.28. siRNS transzfekció

HO-1 és CSE-specifikus siRNS-eket, valamint negatív kontroll siRNS-ek (Ambion, Austin, TX, US) transzfektálását a sejtekbe Oligofectamin Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint.

3.29. Statisztika

A statisztikai analízist GraphPad Prism 5 szoftverrel végeztük. Az eredményeket átlaga±standard hibaként ábrázoltuk. Az eredmények statisztikai elemzéséhez egyszempontos Anova *posthoc* Bonferroni vagy Newmann-Keuls próbát vagy *t*-tesztet használtunk. A $p < 0.05$ szignifikancia szintet *, a $p < 0.01$ szignifikancia szintet ** és a $p < 0.001$ szignifikancia szintet *** jelöli.

4. Eredmények

4.1. *A Fhb gátolja az oszteoklasztogenezist és az OC-k csontreszorpciós aktivitását*

A makrofágok RANKL hatására képesek oszteoklaszttokká differenciálódni. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a különböző hemoglobin-formáknak milyen hatása van a RANKL-indukálta oszteoklasztogenezisre. Ehhez egér makrofág RAW264.7 sejteket tenyésztettünk 50 ng/ml RANKL-tartalmú oszteoklaszt-differenciáló mediumban önmagában, vagy Hb, MetHb vagy Fhb jelenlétében. Elsőként TRAP festéssel és csontreszorpciós aktivitás mérésével vizsgáltuk meg a különböző Hb-formák hatását az oszteoklasztogenezisre. Kísérleteinkben a hemet, mint RANKL-indukálta oszteoklasztogenezis gátlószert, az oszteoklasztosodás gátlásának pozitív kontrolljaként alkalmaztuk. A RANKL-indukálta OC differenciációt és csontreszorpciós aktivitást szignifikánsan gátolta a hem és a Fhb, ellenben a Hb és a MetHb esetében ez a hatás nem figyelhető meg. Ezek után megvizsgáltuk, hogy a Fhb koncentrációja és oszteoklasztogenezist gátló hatása között van-e összefüggés. TRAP-festéssel és csontreszorpciós vizsgálattal megmutattuk, hogy a Fhb OC képződést gátló hatása dózis-függő, már 2,5 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban szignifikánsan képes gátolni az OC-k kialakulását.

Megvizsgáltuk, hogy a Fhb citotoxikus-hatás miatt képes-e gátolni az OC differenciációt. 4 napig tenyésztettünk RAW264.7 sejteket RANKL-dal önmagában vagy Fhb jelenlétében, majd MTT analízissel különböző időpontokban (1-4 napig) vizsgáltuk a sejtproliferációt és viabilitást. Eredményeink azt mutatják, hogy a kontroll kezelt sejtekhez viszonyítva RANKL hatására csökken a RAW264.7 sejtek proliferációja, akárcsak a RANKL+Fhb-nal egyidejűleg kezelt sejtek esetében is, viszont a Fhb-nak nem volt proliferatív hatása a sejtekre a RANKL-dal önmagában kezelt sejtekhez viszonyítva. Ezt követően megnéztük, hogy a csökkent proliferáció összefüggésbe hozható-e apoptotikus sejthalál jelenségével. Immunoblot segítségével hasított kaszpáz-3 fehérjét vizsgáltunk, mely hatékonyan jelzi az apoptotikus sejthalált. Bizonyítottuk, hogy az oszteoklasztogenezis során nem okoz sejthalált a RANKL kezelés Fhb-nal kiegészülve.

4.2. *A Fhb csökkenti a RANKL-indukálta OC-specifikus gének expresszióját*

A makrofágok OC-irányú differenciációjának feltétele a fehérje-expressziós mintázat változása, ezért megvizsgáltuk, hogy a különböző Hb formáknak milyen hatása van az OC-specifikus fehérjék (CTR, DC-STAMP és NFATc1) expressziójára mind RNS, mind fehérje

szinten. A RANKL szignifikánsan indukálta a CTR és a DC-STAMP expresszióját a RAW264.7 sejtekben, melyet a Fhb és a hem jelentősen, míg a MetHb kisebb mértékben csökkentette. A Hb nem volt képes gátolni a RANKL hatására megemelkedett CTR és DC-STAMP expresszióját. A RANKL-indukálta NFATc1 szint emelkedését csökkentette a Fhb és a hem, míg a Hb és MetHb nem volt képes gátolni a fehérje megemelkedett expresszióját.

4.3. A Fhb oszteoklasztogenezist gátló hatása nem HO-1 mediálta folyamat.

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a Fhb HO-1-et indukál endotél sejtekben, továbbá ismeretes, hogy *in vitro* a hem, a HO-1 indukcióján keresztül, gátolja az oszteoklasztogenezist. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Fhb OC-képződést gátló hatása összefüggésben van-e a HO-1-indukáló hatásával. A Fhb, hasonlóan a hemhez, HO-1 expressziót indukál RAW264.7 sejtekben, amely RNS, fehérje, valamint a HO enzim aktivitás fokozódásán is kimutatható.

HO-1-specifikus siRNS-sel csendesítettük a HO-1 expresszióját és vizsgáltuk a RANKL-indukálta oszteoklasztogenezist Fhb jelenlétében. Kimutattuk, hogy a Fhb HO-1-csökkentett sejtekben is gátolja az OC-k kialakulását, melyet TRAP-festéssel, csontreszorpciós analízissel és a CTR mRNS szintjeinek mérésével is bizonyítottunk.

Fenti eredményeinket vad típusú (*HO-1^{+/+}*) és HO-1 knock out (*HO-1^{-/-}*) egerekből származó BMDM sejteken is megerősítettük. Kimutattuk, hogy a Fhb gátolja a RANKL-indukálta CTR expresszióját mind a *HO-1^{+/+}* mind pedig a *HO-1^{-/-}* BMDM sejtek esetében. Eredményeink azt mutatják, hogy a Fhb oszteoklasztogenezist gátló hatása, a hemtől eltérően, a HO-1 expressziójától független mechanizmussal valósul meg.

4.4. A Fhb gátolja a RANK-RANKL interakciót

Az OC-k kialakulásának feltétele a RANKL kötődése a RANK receptorhoz, a RANKL pedig közvetlenül indukálja a RANK expresszióját. Ahhoz, hogy feltárjuk milyen molekuláris mechanizmus mentén gátolja a Fhb az OC kialakulását, megvizsgáltuk, hogy a Fhb befolyásolja-e a RANKL-indukálta RANK expressziót. Kimutattuk, hogy a Fhb szignifikánsan csökkenti a RANKL hatására bekövetkezett RANK expressziót mind mRNS, mind fehérje szinten. Immunoblottal vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a Fhb csökkenti a sejt-asszociált RANKL mennyiségét. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az exogén RANKL sejt-asszociációja jelentősen lecsökken amennyiben az oszteoklasztogenezis médium Fhb-t is tartalmazott. Fenti eredményeink megerősítése

céljából laboratóriumunkban N-terminális 6×His taggel ellátott egér RANKL-ot állítottunk elő. Kémcső kísérletünk során RAW264.7 sejtekből immunoprecipitációval RANK fehérjét tisztítottunk, melyet RANKL-6×His (1 µg) jelenlétében önmagában vagy FHb hozzáadásával inkubáltuk, majd immunoblottal vizsgáltuk a rekombináns RANKL asszociációját a RANK fehérjéhez. Vizsgálataink megerősítették azt az *in vitro* megfigyelésünket, hogy a FHb gátolja a RANK-RANKL interakciót. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a FHb a közvetlen RANK-RANKL kapcsolat gátlásával csökkenti a RANK expresszióját és gátolja a RAW264.7 sejtek oszteoklasztos differenciációját.

4.5. A FHb gátolja a RANKL-indukálta OC-differenciáció szignalizációját

A RANK-RANKL interakció számos jelátviteli útvonalat indít be, mely a makrofágok OC-irányú differenciációjához vezet. Munkánk során kimutattuk, hogy a RANKL indukálja a TRAF6 expresszióját, a p38 és JNK aktivációját, a c-Fos expresszióját, valamint az NFκB és NFATc1 nukleáris transzlokációját. FHb-kezelés hatására ugyanakkor csökkent a TRAF6 és c-Fos indukciója, a p38 és JNK foszforilációja, valamint az NFκB és NFATc1 nukleáris transzlokációja. Eredményeink megerősítik azt a hipotézisünket, hogy a FHb gátolja a RANK-RANKL interakcióját, ezáltal pedig a RANK downstream szignalizációját.

4.6. A bevérzést tartalmazó kalcifikált léziókban Hb oxidációs folyamatok zajlanak

Korábbi tanulmányainkban kimutattuk, hogy a bevérzett komplikált ateroszklerotikus plakkokban oxidált hemoglobin-formák jelennek meg, melyet jelen vizsgálatainkkal is alátámasztottunk. Spektrofotometriás elemzéssel kimutattuk, hogy a bevérzett komplikált léziókat tartalmazó érmintákban oxidált Hb található, míg az egészséges érmintákban vagy bevérzés nélküli kalcifikált léziókban nem mutatható ki oxidált Hb. Az egészséges kontroll érmintákhoz vagy kalcifikált ateroszklerotikus plakkokhoz viszonyítva, a bevérzett komplikált plakkokban jelentős mértékben van jelen kereszt kötött Hb dimer, tetramer és multimer.

4.7. A FHb jelenléte összefüggésben van az OLC sejtek hiányával a bevérzett kalcifikált léziókban

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a FHb jelenléte befolyásolja-e az OLC sejtek kialakulását bevérzett kalcifikált plakkokban az egészséges carotis mintákhoz és kalcifikált ateroszklerotikus plakkokhoz képest. A Ca depozitumok jelenlétét Von Kossa festéssel vizsgáltuk, amely kiterjedt extracelluláris kalcium felhalmozódást mutatott ki a kalcifikált plakkokban és a bevérzett

kalcifikált plakkokban. A bevérzett kalcifikált plakkokban jelentős mennyiségű FHB mutatható ki, míg az egészséges és kalcifikált plakkok esetében nem figyelhető meg pozitív festődés. A sokmagvú, OC karakterű óriássejtek jelenlétét TRAP festéssel és CatK festéssel mutattuk ki. A kalcifikált plakkokban, a kalcifikált területek környezetében számos TRAP- és CatK-pozitív OLC sejtet azonosítottunk, mely alátámasztja az OLC sejtek jelenlétét kalcifikált erekben. Ezzel ellentétben, a bevérzett kalcifikált plakkok esetében az OLC sejtek száma elenyésző, a kiterjedt plakk-kalcifikáció ellenére is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az OLC sejtek jelenléte a bevérzett kalcifikált aterómákban szignifikánsan kevesebb a bevérzés nélküli kalcifikált plakkokhoz viszonyítva, a bevérzett kalcifikált plakkokban pedig jelentős mennyiségű FHB van jelen.

4.8. A H₂S dózis-függően csökkenti a HAoSMC sejtek mineralizációját

A vaszkuláris kalcifikáció vizsgálatához egy olyan *in vitro* modellt hoztunk létre, melyben a HAoSMC-eket 7 napon át kalcifikáló médiumban (normál növekedési médium 3 mM Pi-vel kiegészítve) tenyésztettünk önmagában vagy H₂S jelenlétében. Pi hatására az extracelluláris Ca depozíció fokozódott, melyet a H₂S koncentráció-függő módon gátolt. Szignifikáns gátlást 50 µmol/L NaHS koncentrációnál tapasztaltunk. A H₂S kalcifikációt gátló hatásnak további megerősítéséhez Alizarin Red festést is végeztünk. A kalcifikáló médiumban tenyésztett sejtek esetében vörösen festődő kalcium depozitumokat figyelhettünk meg, míg H₂S hatására az extracelluláris kalcium felhalmozódás lecsökkent.

4.9. A H₂S gátolja a HAoSMC sejtek oszteoblasztos differenciációját

Az már ismeretes, hogy a vaszkuláris kalcifikáció *in vivo* nagymértékben hasonlít a csont mineralizációra, ezért megvizsgáltuk, hogy a H₂S gátolja-e a HAoSMC-k oszteoblaszt-szerű sejtékké történő tranzícióját. Vizsgálataink során elsőként a vaszkuláris kalcifikáció patogenezisében kulcsszerepet játszó ALP és OCN expresszióját vizsgáltuk HAoSMC-ken H₂S jelenlétében. A sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztve ~10-szeres ALP-aktivitás emelkedést tapasztaltunk a kontroll tenyészetekhez képest, melyet a H₂S dózis-függően gátolt. Az ALP aktivitáshoz hasonlóan, Pi hatására jelentős mértékű OCN szekréciót mutattunk ki, melyet a H₂S dózis-függően gátolt.

Ezt követően a kalcifikáció mester regulátorának, a Runx2 transzkripciós faktornak az expresszióját vizsgáltuk *in vitro* modellünkben. Kimutattuk, hogy a Pi növelte a Runx2

mRNS szintjét a kontroll médiumban tenyésztett sejtekhez képest, melyet a H₂S szignifikánsan gátolt.

A Pi-indukált kalcifikációban fontos szerepet játszik a Pit-1 nátrium-foszfát kotranszporterén keresztül történő Pi felvétel. Kimutattuk, hogy a H₂S koncentráció-függő módon gátolja a sejtek Pi felvételét. Ezt követően vizsgáltuk a Pi felvételben kulcsszerepet játszó Pit-1 transzporter expresszióját. Pi hatására szignifikánsan fokozódott a Pit-1 expresszója a HAoSMC-kben, melyet a H₂S kezelés jelentősen gátolt.

4.10. Az endogén H₂S képződése gátolja a HAoSMC sejtek kalcifikációját és oszteoblasztos differenciációját

Az érrendszerben a simaizomsejtek H₂S termelése egy piridoxal-5'-foszfát-dependens enzim, a CSE által történik. Eddigi eredményeink alapján feltételeztük, hogy a CSE enzim gátlása fokozott kalcifikációhoz vezethet. A CSE aktivitását először egy jól ismert gátlószerezrel, a DL-propargilglicin (PPG) segítségével gátoltuk. A PPG-vel kezelt sejtekben markáns CSE-aktivitás csökkenést tapasztaltunk, melynek hatására kétszeresére emelkedett az extracelluláris mátrix kalcium tartalma a PPG-vel nem gátolt sejtekhez viszonyítva. Ezen túlmenően, a PPG növelte az ALP aktivitást és az OCN expresszióját. A CSE-aktivitás szerepét a kalcifikáció gátlásában a CSE gén siRNS-sel történő csendesítésével is bizonyítottuk. Ezen vizsgálataink megerősítették, hogy a CSE aktivitás gén-csendesítéssel történő csökkentése a kalcifikáció fokozódásához vezet.

4.11. Végstádiumú vesebetegek csökkent plazma H₂S szintje csökkent CSE-aktivitással társul

Perna és munkatársai korábban kimutatták, hogy a végstádiumú vesebetegek plazmájának H₂S szintje alacsonyabb a kontroll populációhoz képest, mely hemodialízis során tovább csökken. Jelen eredményeink megerősítették ezt a megfigyelést. Mivel az érrendszerben történő H₂S termelés legfontosabb enzime a CSE, ezért megvizsgáltuk a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek és egészséges kontroll személyek perifériás mononukleáris sejteinek CSE expresszióját és aktivitását. CSE expressziójában sem mRNS sem fehérje szinten nem mutatkozott különbség a két mintavételi csoport között. Ellenben a CSE aktivitását vizsgálva – melyet cisztationin fogyással és cisztein képződéssel mértünk- a veseelégtelenségben szenvedő betegek mononukleáris sejtei jelentős aktivitás csökkenést mutattak az egészséges kontrollokhoz viszonyítva.

5. Összefoglalás

A vaszkuláris kalcifikáció kialakulása két ellentétes irányú folyamatnak: az oszteoblaszt-szerű sejtek megemelkedett mineralizációjának és az oszteoklaszt-szerű sejtek csökkent csontreszorpciójának az eredménye. Munkánk során azokat a tényezőket vizsgáltuk, amelyek hatással lehetnek ezekre a folyamatokra.

Az ateroszklerotikus plakkok bevézése igen gyakori jelenség, melynek eredményeként a sejtekből kiszabaduló Hb az erős oxidatív környezetben FHB-ná oxidálódik. Azt vizsgáltuk vajon az oxidált Hb hatással van-e az OC-k kialakulására, ezáltal befolyásolva a kalcium eltávolítását a kalcifikált ateroszklerotikus léziókból. A FHB csökkentette a RANKL-indukálta csontreszorpciós aktivitást és gátolta az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját. Ezen túlmenően a FHB gátolta a RANK-ból kiinduló oszteoklasztogenezis jelátviteli útvonalait. Ezek a hatások hem-oxigenáz 1 enzimtől függetlenek, melyet HO-1 gén knock-out RAW264.7 sejteken és egerekben is megmutattunk. A FHB verseng a RANK-kal a RANKL-kötésért, ami egy lehetséges mechanizmust mutat, melynek révén a FHB akadályozza az oszteoklaszt differenciációt. Kóros human carotis artériák esetében, az OLC-k nagymennyiségben vannak jelen a kalcifikált plakkokban és a kalcium felhalmozódás környékén lokalizálódnak, míg a FHB felhalmozódást mutató bevézett léziók esetében a kalcium akkumuláció ellenére is ezen sejtek száma lecsökkent. A FHB ezen hatásai azt bizonyítják, hogy a bevézett aterómákban jelenlévő FHB egy olyan különleges mikrokörnyezetet teremt, melyben az OLC-mediálta kalcium depozíció eltávolítása akadályozott, ezáltal gátolt az érrendszer endogén kalcium reszorpciós képessége.

Munkánk során vizsgáltuk a H₂S lehetséges szerepét a Pi-indukálta VSMC oszteoblaszt irányú differenciációjában és mineralizációjában. Bizonyítottuk, hogy a H₂S, függetlenül annak exogén vagy endogén eredetétől, gátolja az oszteoblaszt-specifikus gének (ALP, OCN és Runx2) expressziójának emelkedését. A Pit-1-en keresztül történő Pi-felvétel gátlása elengedhetetlen része a HAoSMC sejtek H₂S hatására bekövetkező kalcifikációs és fenotípus-váltási folyamat jótékony befolyásolásához. Végstádiumú CKD betegekben a redukálódott CSE aktivitás csökkent H₂S szinthez vezet, mely megkönnyíti a kalcifikáció megjelenését az érrendszerben. Ezek az eredmények új stratégiát nyújtanak a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásának gátlásához.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Balla József Professzor Úrnak a munkám során nyújtott szakmai segítségét, türelmét, továbbá, hogy kutatócsoportjának tagja lehettem.

Hálásan köszönöm Dr. Balla György Professzor Úrnak a támogatását, a kiváló ötleteket és együttgondolkodást.

Köszönettel tartozom a Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratórium minden jelenlegi és korábbi dolgozójának. Külön köszönöm a közös munka során nyújtott szakmai segítségét Dr. Jeney Viktóriának, Dr. Katkó Mónikának, Dr. Gáll Tamásnak, Nagy Annamáriának, Pethő Dávidnak és Dr. Oros Melindának. Köszönettel tartozom laboratóriumunk kiváló asszisztenseinek: Barna Erikának, Dr. Balázné Szőnyi Anikónak, Fürtös Ibolyának és Tóth Juditnak.

Köszönet illeti laboratóriumunk kollaborációs partnereit: Prof. Dr. Anupam Agarwal és Dr. Abolfazl Zarjou-t (Alabama Egyetem, USA), Prof. Dr. Méhes Gábort, Dr. Hendrik Zoltánt és Beke Líviát (Debreceni Egyetem, Patológiai Intézet) és Dr. Tóth Csaba Zsigmondot (Debreceni Egyetem, Sebészeti Intézet).

Végül, de nem utolsósorban köszönetemet fejezem ki a családomnak: férjemnek, Zsoltnak és kislányunknak, Dórának, szüleimnek és testvéreimnek, hogy türelmükkel és szeretetükkel támogatták a munkámat.

A kutatás az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (IRONHEARTH) és EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER) társfinanszírozásával valósult meg. A kutatást támogatta az Innovációs és Technológiai Minisztérium Tématerületi Kiválósági Programja (ED_18-1-2019-0028), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA) K112333 és K132828 valamint a Magyar Tudományos Akadémia (11003).

Munkámat szeretettel ajánlom gyermekemnek, Dórának!



Nyilvántartási szám: DEENK/250/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Zavaczki Erzsébet
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10020714

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Zavaczki, E.**, Gáll, T., Zarjou, A., Hendrik, Z., Potor, L., Tóth, C., Méhes, G., Gyetvai, Á., Agarwal, A., Balla, G., Balla, J.: Ferryl Hemoglobin Inhibits Osteoclastic Differentiation of Macrophages in Hemorrhaged Atherosclerotic Plaques.
Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020, 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/3721383>
IF: 5.076 (2019)
2. **Zavaczki, E.**, Jeney, V., Agarwal, A., Zarjou, A., Oros, M., Katkó, M., Varga, Z., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells.
Kidney Int. 80 (7), 731-739, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.212>
IF: 6.606

További közlemények

3. Nagy, A., Pethő, D., Gáll, T., **Zavaczki, E.**, Nyitrai, M., Posta, J., Zarjou, A., Agarwal, A., Balla, G., Balla, J.: Zinc Inhibits HIF-Prolyl Hydroxylase Inhibitor-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate.
Front. Physiol. 10, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01584>
IF: 3.367 (2019)
4. Oros, M., **Zavaczki, E.**, Vadász, C., Jeney, V., Tósaki, Á., Lekli, I., Balla, G., Nagy, L., Balla, J.: Ethanol increases phosphate-mediated mineralization and osteoblastic transformation of vascular smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 16 (9), 2219-2226, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01533.x>
IF: 4.753





5. Katkó, M., **Zavaczkí, E.**, Jeney, V., Paragh, G., Balla, J., Varga, Z.: Homocysteine metabolism in peripheral blood mononuclear cells: evidence for cystathionine beta-synthase activity in resting state.
Amino Acids. 43 (1), 317-326, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1080-2>
IF: 3.914
6. Zarjou, A., Jeney, V., Arosio, P., Polí, M., **Zavaczkí, E.**, Balla, G., Balla, J.: Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis.
J. Bone Miner. Res. 25 (1), 164-172, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.091002>
IF: 7.059
7. Molnár, Z., Emri, T., **Zavaczkí, E.**, Pusztahelyi, T., Pócsi, I.: Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*.
J. Basic Microbiol. 46 (6), 495-503, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200610174>
IF: 0.722

A köztől folyóiratok összesített impact faktora: 31,497

**A köztől folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
11,682**

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

Debrecen, 2020.08.28.

