

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

JENEY VIKTÓRIA

DEBRECEN, 2002

**VAS-PORFIRINEK ÉS HEM-PROTEINEK HATÁSÁRA
KIALAKULÓ OXIDATÍV STRESSZ-INDUKCIÓ ÉS
STRESSZ-ADAPTÁCIÓ**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

JENEY VIKTÓRIA

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Balla József

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Debrecen, 2002

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	oldal 5.
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6.
1. BEVEZETÉS	7.
1.1. Reaktív oxigéngyökök és a vas	7.
1.2. Hem: az emberi szervezet legelterjedtebb vaskomplexe	8.
1.3. Az LDL oxidatív modifikációja és az érlelmeszesedés	9.
1.4. Indukálható védelem az oxidatív stresszel szemben	11.
1.5. Hemproteinek	12.
2. CÉLKITŰZÉSEK	14.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16.
3.1. Endotheliális sejtizolálás és tenyésztés	16.
3.2. Humán polimorfonukleáris sejt (PMN) preparálás	16.
3.3. Hemoglobin preparálás	16.
3.4. LDL szeparálás	17.
3.5. Az LDL oxidatív rezisztenciájának meghatározása	18.
3.6. Az LDL oxidatív módosulásának detektálása	18.
3.7. LDL asszociált vas és hem kimutatása	19.
3.8. Endotheliális sejt citotoxicitás vizsgálat	20.
3.9. Hem-oxigenáz enzimaktivitás mérése	20.
3.10. Ferritin meghatározás	21.
3.11. Northern analízis	21.
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	22.
4.1. Vas-porfirinek és az endothelium	22.
4.1.1. Vas-porfirinek oxidatív ágensekkel szembeni szenzitizáló hatása endothel sejteken	22.
4.1.2. Vas-porfirinek hatása citoprotektív gének indukciójára	25.
4.1.3. A hem és a hem-arginát összehasonlítása az LDL oxidatív modifikációjában	31.
4.2. Hemproteinek pro-oxidáns és citotoxikus hatása	36.

4.2.1. Hemproteinekkal kezelt plazmából származó LDL-ek citotoxikus hatása	36.
4.2.2. Oxidatív modifikáció kimutatása hemproteinekkal kezelt plazmából származó LDL mintákban	38.
4.2.3. Az LDL oxidatív modifikációja in vivo körülmények között	43.
4.2.4. Citoprotektív anyagok indukciója hemproteinekkal kezelt plazmából izolált LDL-lel	46.
5. ÖSSZEFOGLALÁS	52.
6. IRODALOMJEGYZÉK	55.
7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	66.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Dr. Balla Györgynek, hogy megteremtette a háttérét, és mindvégig támogatta munkámat, és öccsének, Dr. Balla Józsefnek, hogy témavezetőként rengeteget tanított, számos elvi és gyakorlati tanáccsal segítette munkámat.

Köszönöm Dobolyi G Alicének a sejttenyésztésben, Dr. Varga Zsuzsának az E vitamin mérésekben, és Dr. Vokó Zoltánnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségét.

És ami a legfontosabb, külön köszönöm a szabadgyök laboratórium minden tagjának őszinte barátságát.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm a családom türelmét, biztatását és segítségét.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein

HO: hem-oxigenáz

FCS: Fetal Calf Serum

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

M199: média 199

PMN: polimorfonukleáris sejtek

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

HA: hem-arginát

Fe-DPBS: vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát

Fe-CP: vas-koproporfirin III

Fe-DPDG: vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol

Fe-DP: vas-deuteroporfirin

TBARS: tiobarbitursav-reaktív anyagok

LOOH: lipid-hidroperoxid

FerroHb: ferrohemoglobin

MetHb: methemoglobin

MetMb: metmioglobin

CytC: citokróma

CMetHb: ciano-methemoglobin

Hp: haptoglobin

PMA: forbol-mirisztol-acetát

1. BEVEZETÉS

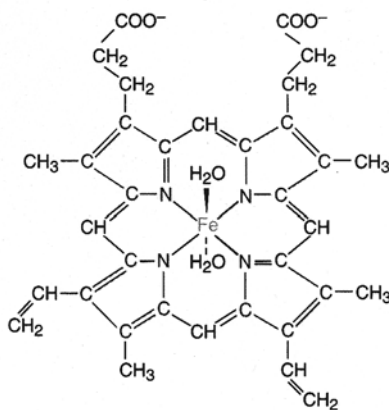
1.1. Reaktív oxigéngyökök és a vas

Körülbelül 2 milliárd évvel ezelőtt az addigi redukáló légkörben elkezdett felhalmozódni az oxigén, és megjelentek az első lélegző sejtek. Az oxigént felhasználó anyagcsere előnye, hogy közel 20-szor annyi energia felszabadulását teszi lehetővé, mint az anaerob glükózlebontás. A lélegző sejtekben fiziológiás körülmények között is keletkeznek reaktív oxigén-intermedierek. A mitokondriumban zajló sejtlégzés, a mikroszómális citokróm rendszerek működése, valamint a citoplazmában különböző oxidoreduktáz enzimek működése során szuperoxid anion gyökök ($O_2^- \bullet$) képződnek. A peroxisómákban hidrogén-peroxid (H_2O_2) keletkezik, a neutrofil granulociták szuperoxid aniont termelnek. Ezek az oxigén-intermedierek igen reaktívak, a legtöbb sejtalkotóval reakcióba lépnek, ezért az aerob szervezetekben számos enzimatikus mechanizmus alakult ki, melyek védelmet nyújtanak a reaktív oxigénfeleségekkel szemben. A reaktív oxigén által okozott károsodás megsokszorozódik szabad, katalitikusan aktív átmenetifém ionok, pl. vas jelenlétében (1-2). *Staphylococcus aureus*-szal végzett hidrogén-peroxid toxicitási kísérletekből kiderült, hogy vasmentes közegben 1000-szer annyi hidrogén-peroxid szükséges a baktérium elpusztításához, mint vasban gazdag tápközegben (3). Ezzel szemben a celluláris vas eltávolítása kelátképzőkkel megelőzi az aktivált neutrofil granulociták által termelt oxigéngyökökkel vagy hidrogén-peroxiddal előidézett endotheliális sejtkárosodást (4-5).

Bizonyított, hogy a vas azon formái fokozzák elsősorban az aktív oxigén toxicitását, melyek be tudnak jutni a sejtek lipid doménjeibe (6). A vas lipofil kelátképzőkkel (pl. 8-hidroxi-kinolinnal) komplex formában akkumulálódik az endothelium lipid membránjaiban, ezáltal a sejt sokkal érzékenyebbé válik mind exogén, mind endogén oxidatív stresszel szemben.

1.2. Hem: az emberi szervezet legelterjedtebb vaskomplexe

Az ember teljes vaskészletének kb. 70%-a a hemben található, mely a szervezet különböző funkciójú fehérjeiben általánosan előforduló lipofil tulajdonságú vaskomplex.



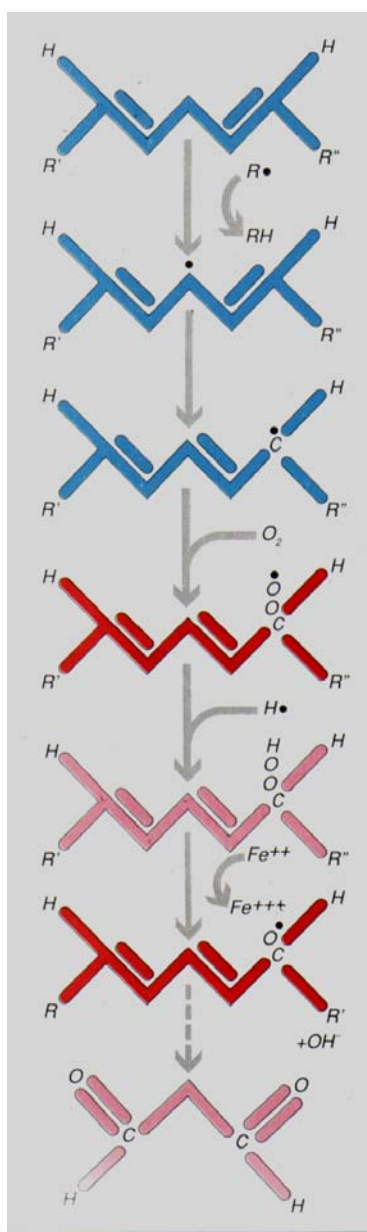
1. ábra Vas-protoporfirin IX

A hem a vas-8-hidroxi-kinolin keláthoz hasonlóan koncentrálódik az intakt endothelium hidrofób doménjeiben. A folyamat gyors, dóziszfüggő, és a sejtek által felvett hem nem távolítható el sem pufferrel, sem szérummal (7). Az endothelium által felvett hem direkt módon nem toxikus, de a sejteket nagyon érzékennyé teszi különböző eredetű és fajtájú reaktív oxigénfélésekre (7). A sejtek hemfelvétele, és az ennek következtében kialakuló oxidatív stresszérzékenység megakadályozható, a hemmel egyidejűleg sztöchiometrikus mennyiségben adott hemopexinnel (7-9). A hemben lévő vas központi szerepét az oxidatív stresszérzékenység kialakulásában az bizonyítja, hogy sem vasmentes protoporfirin IX, sem ön-protoporfirin nem szenzitizálja a sejteket.

A hem az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) oxidációját is katalizálja. Az oxidatív modifikációban képződő termékek további endothel aktivációt és károsodást okoznak (10). A lipidperoxidáció során a hem gyűrű degradálódik, és a vas szabaddá válik. Az LDL oxidatív módosulását azonban szabad Fe(II)/Fe(III) ionok nem idézik elő, bizonyítva a vas bejutásának szükségességét az LDL belsejébe.

1.3. Az LDL oxidatív modifikációja és az érrelmeszesedés

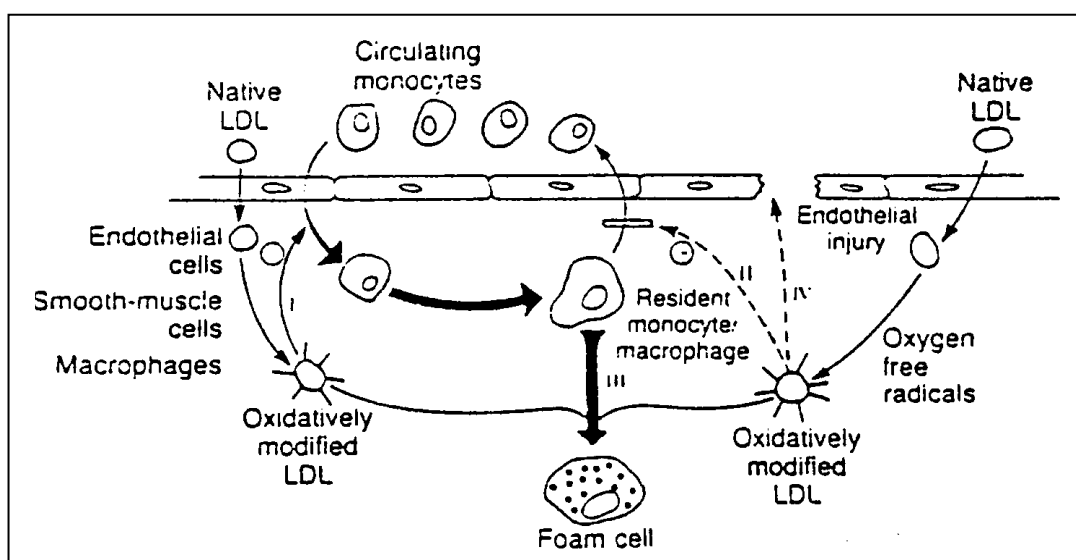
Az LDL oxidatív módosulása központi szerepet játszik az érrelmeszesedés patomechanizmusában (11-14). Az oxidált LDL citotoxikus az endotheliális sejtekre (10,15-16), adhéziós molekulák expresszióját váltja ki (17-19), serkenti kemotaktikus anyagok elválasztását (20-21), monociták akkumulációját (22) és habos sejtek képződését (12,15,23-29) eredményezi, befolyásolja a vaszkuláris tónust (30-33), növekedésifaktor termelést (34-35) és kollagén szintézist indukál és immunogén (36-37).



Az ateroszklerotikus elváltozásokban akumulálódó LDL oxidatív módosulása az érfalban zajló, reaktív oxigén-intermedierek által iniciált lipid-peroxidáció (13), mely folyamatnak 3 fő fázisát lehet elkülöníteni. Az iniciációs fázisban az LDL lipidoldékony antioxidánsai felhasználnak a gyökök elleni védekezésben. A reakció propagációs fázisában a szabadgyökök száma nő, az LDL-ben lévő többszörösen telítetlen zsírsavakból konjugált diének, lipid-hidroperoxidok, peroxil- és alkoxilgyökök képződnek, végül a zsírsav fragmentálódik, és aldehidek keletkeznek (38). A reakciót átmenetifém ionok katalizálják. A termináció alatt a gyökök egymással reagálnak, és ebben a fázisban módosul az LDL fehérje komponense, az apoprotein B-100 is. A módosulás során az apoprotein B lizin oldalláncain lévő ϵ -amino csoportok reagálnak az oxidált zsírsavakkal és rövid láncú aldehidekkel (39-40), végül az apoB fragmentálódik (41).

2. ábra A lipid-peroxidáció mechanizmusa

A 3. ábra szemlélteti az érfalban lejátszódó folyamatot (11), melynek eredménye az ateroszklerotikus elváltozás. Az oxidált LDL-ben lévő kemotaktikus anyagok hatására fokozódik az adhéziós molekulák expressziója, így az ér felszínén mononukleáris sejtek tapadnak meg, melyek egy része penetrál az endotheliumon és a szubendotheliális térbe jut. Visszatérésüket a keringésbe az oxidált LDL gátolja. Az oxidált LDL-ben bekövetkezett fehérjemódosulások eredményeként a monocita/makrofágok CD 36 (scavenger, vagy acetyl-LDL) receptorokon keresztül felveszik a módosult LDL-t, és habos sejtekké alakulnak (42). Az oxidált LDL ezen kívül toxikus az endotheliális sejtekre.



3. ábra Az ateroszklerotikus elváltozás kialakulásának mechanizmusa

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

1.4. *Indukálható védelem az oxidatív stresszel szemben*

A sejtes rendszerek a hem mediálta lipid-peroxidációval szemben indukálható védelemmel rendelkeznek, melynek központi fehérjéi a hem-oxigenáz (HO) és a ferritin. A hem-oxigenáz a hemdegradáció első és egyben sebesség-meghatározó lépését katalizálja. Felnyitja a porfirin gyűrűt, melyből biliverdin és szén-monoxid (CO) képződik, és a vas szabaddá válik (43-44). Három gén kódolja a hem-oxigenáz három izoenzimét. A HO-1 indukálható, a HO-2 és a HO-3 konstitutív módon expresszálódik (44-45). A HO-1 egy 32.8 kDa tömegű stresszfehérje, melynek a hemen kívül számos induktora van; nehézfémek, citokinek, hormonok, endotoxinok (46-47). A HO-1 induktorainak kémiai sokfélesége vezetett arra a hipotézisre, hogy a HO-1 hem degradációban betöltött funkcióján kívül 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 (44,48-49). In vitro és in vivo kísérletek bizonyítják, hogy az endogén HO-1 szintjének megemelése védelmet nyújt különféle oxidatív károsító hatásokkal szemben. Nath és társai leírták, hogy patkányokban rhabdomyolysis előtt intravénás hemoglobinnal a HO-1 szintje megemelkedik, és megelőzi a rhabdomyolysist követő vesekárosodást, valamint csökkenti a mortalitást (50). Otterbein és munkacsoportja bizonyította, hogy a HO-1 szintjének emelése géntranszferrel, vagy intravénás hemoglobinnal védelmet nyújt a hiperoxia vagy endotoxinok által előidézett tüdőkárosodás ellen (51-52). Vile és munkatársai humán fibroblasztokon végzett kísérleteikben a HO-1 UV sugárzással szembeni protektív hatását bizonyították (53).

A hem-oxigenáz által katalizált hemdegradáció egyik terméke a biliverdinből képződő bilirubin, mely antioxidáns tulajdonságú (54). A másik termék a CO, melynek élettani tulajdonságai sokban hasonlítanak a NO-ra. Stimulálja a cGMP képződését (55), elősegíti

az érfal relaxációját, és gátolja a thrombocita aktivációt (56-57). A HO-1 indukciója gyakran együtt jár más stresszfehérjék, például ferritin indukciójával. Balla és munkatársai endotheliális sejteken végzett differenciálindukciós kísérletek során bizonyították, hogy a hem előkezelés hatására kialakuló antioxidáns védelem nem elsősorban a HO-1-nek, hanem a megemelkedett ferritin szintnek köszönhető (58). A ferritin az intracelluláris vas tárolására specializálódott fehérje, melynek 1 mólja 4500 mól Fe(III) iont képes raktározni. Globuláris, 24 alegységből álló multimer. Az alegységeknek két típusa van; a könnyű- és a nehézlánc. A kétféle alegység fehérjén belüli aránya függ a sejt vasellátottságától, szervenként és fajonként is változhat. A ferritin nehéz láncának ferroxidáz aktivitása van, mely oxidáló ágens jelenlétében a citoszoláris Fe(II)-t Fe(III) ionná alakítja. A ferritin szintézisét az intracelluláris vas poszttranszkripcióssal módon szabályozza (59).

Az indukálható védelmi rendszerek in vivo jelentőségére utal egy Japán kutatócsoport által publikált közlemény (60) az első diagnosztizált HO-1 deficiens gyerekről, akinél az endothelium súlyos károsodását, valamint máj és veseszöveteiben vaslerakódást találtak. Hasonló endotheliális sejtkárosodást, máj és vesetoxicitást írtak le HO-1 knock-out egereknél (61). A HO-1 deficiencia humán eseténél és az egérmodellben is magas volt a plazma hemkoncentrációja.

1.5. Hemproteinek

A hem szervezetünkben fehérjékhez kötötten fordul elő. Balla és munkatársai endotheliális sejteken vizsgálták különböző in vivo előforduló hemproteinek oxidatív stresszel szembeni szenzitizáló hatását, valamint hogy hatásukra kialakul-e a HO-1 és ferritin indukción alapuló antioxidáns védelem (62). A vizsgált hemproteinek (ferrohemoglobin, methemoglobin, citokróm c, és metmioglobin) közül a methemoglobin a hemhez hasonlóan érzékenyítette a sejteket a hidrogén-peroxid kezeléssel szemben, a többi hemproteinnek nem volt ilyen hatása. A methemoglobin ezen kívül a sejtekben HO-1 és

ferritin indukciót idéz elő. A methemoglobinban a fehérje és a hem csoport közötti kölcsönhatást erősítve elmarad a szenzitizáló hatás, és a HO-1 génindukció is. Így feltételezhető, hogy a szabaddá váló hem a felelős a methemoglobin oxidatív stresszre érzékenyítő hatásáért, és a citoprotektív gének indukciójáért is.

A hemproteineknek nagy szerepe van az LDL oxidatív modifikációjában is. A hemproteinek közül a hemoglobin (63-64), a mioglobin (65), a tormaperoxidáz (66), és a mieloperoxidáz (14) is képes az LDL oxidatív modifikációját előidézni, bár a mechanizmus még nem teljesen tisztázott. Egyes szerzők szerint a hemproteinekből szabaddá váló hem csoport bejut az LDL-be és az ott jelenlévő kis mennyiségű lipid-hidroperoxidokkal reagálva a hem degradálódik, a vas szabaddá válik, ami további oxidatív folyamatokat katalizál. Az LDL a plazmában jelenlévő specifikus (haptoglobin, hemopexin) és aspecifikus (albumin) hemkötő fehérjékkel sikeresen kompetál a hemroteinekből szabaddá váló hemért. Teljes plazmához hemet adva a hem 80 %-a a HDL-hez és az LDL-hez kötődik (67). Camejo és munkacsoportja kimutatták, hogy hígított szérumban (20%), az LDL felveszi a hemet, és hidrogén-peroxid jelenlétében oxidálódik (68). Miller és munkacsoportja plazmamentes közegben hemoglobint reagáltatott hidrogén-peroxiddal, mely reakció az LDL oxidatív módosulását idézte elő, miközben ferril-hemoglobin képződést, az apolipoprotein B-100-ban keresztkötések kialakulását és a fehérje felszínén szabadgyökök képződését tapasztalták (69). A ferril-hemoglobin képződése tirozil-gyök képződéssel jár együtt (70-71). A Miller és munkacsoportja által feltételezett mechanizmusban nincs, vagy csekély a szerepe az LDL hemfelvételének, az LDL oxidatív modifikációja a tirozil gyökök hatására következik be.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A vas-protoporfirin IX bioszintézise soklépéses összetett folyamat számos enzim részvételével. Ha valamelyik enzim hibásan, vagy egyáltalán nem működik, akkor a folyamat megakad, és az intermedierek felhalmozódása változatos klinikai kórképeket okoz, melyeket összefoglaló néven porfíriáknak nevezünk (72-73). A porfíriák kezelésében fontos szerepe van az intravénás hem kezelésnek (74-78), melynek azonban súlyos mellékhatásai vannak; toxikus az endotheliumra, növeli a trombózis veszélyét (79-84). Finn kutatók alkalmaztak elsőként hem-arginátot hem helyett a porfíriák kezelésében (85-89). A hem-arginát kezelés során nem tapasztalták a hem káros mellékhatásait.

Kutatócsoportunk feltételezte, hogy a hem-arginátnak azért nincsenek vaszkuláris mellékhatásai, mert a benne lévő hem-vas nem, vagy kevésbé katalizálja a reaktív oxigén által előidézett endotheliális sejtkárosodást. Ezért célul tűztük ki különböző hidrofóbicitású vas-porfirinek katalitikus hatásának vizsgálatát endotheliális sejt kultúrán, és az LDL oxidatív modifikációjában. A különböző vas-porfirinek HO-1 és ferritin indukáló hatását is vizsgáltuk.

A keringő hem magas koncentrációja más klinikai kórképekben is előfordul. A hem-degradáló enzim, a hem-oxigenáz-1 hiánya egérben is és emberben is a hem plazmakoncentrációjának megemelkedéséhez, és endotheliális sejtkárosodáshoz vezet. Habár a hem közvetlen módon toxikus az endotheliumra, kísérleteinkben egy másik mechanizmust is feltételeztünk, melyen keresztül a hem az LDL oxidatív modifikációját okozva indirekt módon fejti ki toxikus hatását. További célunk volt az in vivo jelentős hemproteinek vizsgálata az LDL oxidatív modifikációjára teljes plazmában. Feltételeztük, hogy a szabad hemoglobin, ha oxidálódik, az LDL oxidatív modifikációján keresztül toxikus lehet az endotheliumra, valamint hogy az oxidált LDL citoprotektív anyagok (HO-

1 és ferritin) indukcióját idézi elő. A japán kutatócsoporttal, akik a hem-oxigenáz-1 deficiencia első felismert esetét leírták és kezelték, a gyerek LDL-jének karakterizálását is célul tűztük ki.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Endotheliális sejt izolálás és tenyésztés*

Humán umbilikális véna endotheliális sejtek tenyésztéséhez a sejteket friss köldökzsinórból nyertük (62). A vénát kanuláltuk, kimostuk, majd feltöltöttük 0.2% dispase enzimet tartalmazó média 199-nel. 6 óra elteltével (4°C) a sejteket kimostuk a vénából, centrifugáltuk (2000g, 4°C, 10 perc), és média 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.

3.2. *Humán polimorfonukleáris sejt (PMN) preparálás*

A PMN preparáláshoz 50 ml-es fecskendőbe 20 ml fiziológiás sóoldatban oldott 3%-os zselatint, 200 NE heparint és 20 ml vénás vért szívunk, 45 percig ülepedni hagyjuk, majd a felső réteget 50 ml-es centrifugacsőbe szedjük (10). Centrifugáltuk (400g, 10 perc, 4°C), majd a felülúszót leszívtuk, a sejteket 1,5 ml fiziológiás sóoldatban felfuszpendáltuk. A vörösvértestek eltávolítása céljából 15 ml jéghideg desztillált vizet adunk a sejtsuszpenzióhoz 25 másodpercre, majd 5 ml 3.6%-os NaCl oldattal visszaállítottuk a fiziológiás sókoncentrációt. Centrifugáltuk (400g, 5 perc, 4°C), és a sejteket 5 ml HBSS-ben felfuszpendáltuk, majd 1075 g/ml sűrűségű Percoll-ra rétegeztük. 20000g-vel 30 percig 4°C-on centrifugáltuk, a polimorfonukleáris sejteket leszívtuk, kétszer mostuk HBSS pufferrel, majd Bürker kamrában számoltuk.

3.3. *Hemoglobin preparálás*

A hemoglobin preparálását önkéntesektől levett, heparinnal alvadásgátolt vérből végeztük (62,90). 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 mM-os Na-foszfát (pH 7.4), puffert adunk, és 1 óráig jégen állni hagyjuk. A lizátumot centrifugálással (16800g, 4°C, 1 óra) elválasztottuk a

sejtmembrántól, majd ioncserés kromatográfiával tisztítottuk tovább DEAE-Sepharose CL-6B oszlopon. A hemoglobint 50 mM-os Tris bázissal eluáltuk (pH 7.4), majd betöményítettük. Methemoglobin előállításához a hemoglobint 1.5-szörös moláris mennyiségű kálium-ferricianiddal inkubáltuk 30 percig, majd dializáltuk. Cianomethemoglobin preparálásához a methemoglobint kétszeres moláris mennyiségű NaCN-dal reagáltattuk, majd a feleslegben maradt NaCN-ot gélszűrőssel (Sephadex G-25) távolítottuk el. Az oxihemoglobin és methemoglobin koncentrációkat a Winterbourn által leírt fotometriás módszerrel határoztuk meg (91).

3.4. LDL szeparálás

Az LDL szeparáláshoz Na₂EDTA-val (1 mg/ml végkoncentráció) alvadésgátolt vénás vért használtunk, melyet önkéntes donoroktól vettünk le, 12 órás éhezés után (92). A plazmát hemmel (40 μ M), ferrohemoglobinnal (20 μ M), methemoglobinnal (20 μ M), haptoglobinhoz kötött methemoglobinnal (20 μ M), cianomethemoglobinnal (20 μ M), metmioglobinnal (80 μ M) valamint citokrómmal (80 μ M) inkubáltuk 37°C-on 2 órán keresztül az LDL szeparálás előtt. A polimorfonukleáris sejtekkel (PMN) végzett kísérletekben nyugvó vagy forbol észterrel (PMA, 500 ng/ml) aktivált neutrofilokat (10^7 sejt/ml) heparinnal alvadésgátolt plazmában ferrohemoglobinnal (20 μ M), vagy a nélkül inkubáltuk 2 órán keresztül 37°C-on, majd a sejteket lecentrifugáltuk (400g, 5 perc, 24°C), és a plazmát további 2 órán át inkubáltuk 1 mg/ml EDTA jelenlétében. Az LDL szeparáláshoz 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 egy lépéses gradiens ultracentrifugálással izoláltuk (302000g, 4°C, 3 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 4°C-on tároltuk, rázástól és fénytől óvtuk, fehérjetartalmukat BCA protein módszerrel (Pierce) határoztuk meg.

3.5. Az LDL oxidatív rezisztenciájának meghatározása

Az LDL oxidatív rezisztenciájának mérésére munkacsoportunk kidolgozott egy módszert (93), melynek alapja az LDL hem mediálta lipid-peroxidációja. 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.

3.6. Az LDL oxidatív módosulásának detektálása

3.6.1. Konjugált dién meghatározás

Az LDL konjugált dién tartalmát 234 nm-en fotometrálassal határoztuk meg (10), az 50 µg/ml fehérjetartalmúra hígított LDL mintákból. Néhány esetben a konjugált dién képződésének kinetikáját követtük 234 nm-en, 37°C-on, az LDL-t (200 µg/ml), hemet vagy hem-arginátot (5 µM) és hidrogén-peroxidot (75 µM) tartalmazó reakcióelegyben.

3.6.2. Tiobarbitursav reaktív anyagok meghatározása

300 µl 200 µg/ml koncentrációjú LDL-hez 600 µl tiobarbitursav reagenst adtunk (0.375 g 2-tiobarbitursav, 2,08 ml 12 M HCl, 15 ml triklór-ecetsav 100 ml-ben), majd 15 percig forraltuk 100°C-on. Szobahőmérsékletűre hűtöttük, és centrifugáltuk 10.000g-vel, 15 percig. A tiszta felülúszót fotometráltuk 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 (10).

3.6.3. Az LDL lipid-hidroperoxid tartalmának meghatározása

Az LDL lipid-hidroperoxid tartalmát a Simon Wolff által leírt Ferrous Oxidation in Xilenol orange (FOX) módszerrel határoztuk meg (94), az eredményeket nmol LOOH/mg LDL protein egységben adtuk meg.

3.6.4. Az LDL fluoreszkamin-reaktív amin-csoportjainak meghatározása

200 µl 1 mmol/l koncentrációjú acetonban oldott fluoreszkaminhoz 800 µl LDL mintát adtunk úgy, hogy az LDL végkoncentrációja 50 µg/ml legyen. Vortexelés után fél órán át sötétben szobahőn inkubáltuk, majd a fluoreszcencia intenzitást mértük 390 nm-es gerjesztő, és 475 nm-es emissziós filterrel. A meghatározáshoz standardként lizint használtunk, és az eredményeket mol reaktív amincsoport/mol LDL egységben adtuk meg (10).

3.6.5. Az LDL elektroforetikus mobilitásának vizsgálata

Az LDL minták elektroforetikus mozgékonyágát agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk a Hydragel LIPO+Lp(a) kit (Sebia) segítségével.

3.7. LDL asszociált vas és hem kimutatása

A vasat spektrofotometriásan vas-ferrozin komplexet képezve mutattuk ki (10) redukáló környezetben. 130 µl 1.5 mg/ml fehérje tartalmú LDL mintához 117 µl vas-puffert adtunk (1M acetát puffer, pH 4.5, mely tartalmazott még 3% SDS-t, 170 mM aszkorbinsavat és 5.3 mM Na₂S₂O₅-ot), 15 percig 37°C-on inkubáltuk, majd 562 nm-en fotometráltuk (A₁). A mintákhoz ezután 13 µl ferrozin reagenst (9 mM ferrozin, 328 mM tiourea) adtunk, további 15 percig inkubáltuk, majd újra leolvastuk az abszorbanciát 562 nm-en (A₂). A vaskoncentráció kiszámításához a $2.79 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ extinciókoefficiens használtuk az A₂-A₁ abszorbanciára vonatkoztatva. Az LDL asszociált hem mennyiségét is fotometriásan határoztuk meg. 100 µl 1,5 mg/ml-es LDL mintához 300 µl hangyasavat adtunk, majd 398

nm-en fotometráltuk. A hem koncentrációját az $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ extinciókoefficiens segítségével számítottuk ki.

3.8. Endotheliális sejt 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 LDL-t (200 $\mu\text{g/ml}$) és hemet (5 μM) tartalmazó média 199-et tettünk. 4-5 órás inkubálás után a reakcióelegyet 500 μl 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatra cseréltük, és további 6-12 órán keresztül inkubáltuk, hogy az MTT-t az élő sejtek metabolizálják. Az élő sejtek által termelt formazánt feloldottuk 100 μl 10% SDS-ben és 500 μl forró izopropanol-HCl (98:2) elegyben, majd 570 nm-en fotometráltuk. Vas-porfirinekkal végzett kísérleteinkben a sejteket 2 μCi ^{51}Cr izotóppal jelöltük, majd mosás után 1 órán keresztül inkubáltuk a vas-porfirinek 5 μM -os oldataival. Az így előkezelt sejteket ezután hidrogén-peroxiddal (100 μM) vagy aktivált neutrofil granulocitákkal (2:1 PMN: endotheliális sejt arány) 2 órán keresztül oxidatív stressznek tettük ki, majd a sejtekből kijutott és a sejten belül maradt ^{51}Cr izotóp arányából specifikus citotoxicitást számoltunk.

3.9. Hem-oxigenáz enzimaktivitás mérése

A hem-oxigenáz enzimaktivitás meghatározásának során az endotheliális sejtekből szeparált mikroszóma bilirubin-generáló képességét mérjük (58). Az endotheliális sejteket 10 cm átmérőjű sejtenyésző edényben tenyésztettük. A sejtréteget háromszor mostuk, majd különböző vas-porfirinekkal (10 μM), vagy hemproteinekkal előkezelt plazmákból szeparált LDL mintákkal (50 $\mu\text{g/ml}$) kezeltük. 1 óra múlva eltávolítottuk a porfirineket, valamint az LDL-t a sejtekről, és médiában további 8 órán keresztül inkubáltuk, majd mostuk és a sejteket felkapartuk. A sejtuszpenziót centrifugáltuk (1000g, 10 perc, 4°C), a sejteket MgCl_2 -ot (2 mM) tartalmazó foszfát (100 mM, pH 7.4) pufferben felfuszpendáltuk, háromszor lefagyasztottuk (-70 °C) és felengedtük, végül szonikáltuk,

és centrifugáltuk (18800g, 4°C, 10 perc). A felülúszóhoz patkánymáj citoszolt (2 mg), hemet (20 μ M), glükóz-6-foszfátot (2 mM), glükóz-6-foszfát dehidrogenázt (0.2 U), és NADPH-t (0.8 mM) 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 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) használva számítottuk ki. A hemoxigenáz enzimaktivitást képződött bilirubin pmol/mg endotheliális sejtfehérje/60 perc egységben adtuk meg.

3.10. Ferritin meghatározás

Az endotheliális sejtek ferritin tartalmának mérésénél a sejteket a HO enzimaktivitás mérésnél leírtak szerint kezeltük, az LDL illetve a porfirinek eltávolítása után 16 óráig inkubáltuk, majd a sejteket Tris (10 mM), EDTA (5 mM), NaCl (150 mM) pufferben (pH 7.2) feloldottuk, amely tartalmazott még 1% Triton-X-100-at, és 0.5 % Nonidet P-40-et. A minták ferritin tartalmát az IMx ferritin enzyme immunoassay system (Abbott Laboratories) segítségével a Klinikai Kémiai és Molekuláris Patológiai Intézetben határoztuk meg.

3.11. Northern analízis

Vas-porfirinekkal valamint LDL mintákkal végzett HO-1, valamint H- és L-ferritin mRNS indukciós kísérleteinkben az endotheliális sejteket a hem-oxigenáz enzimaktivitás mérésénél leírtakkal azonosan kezeltük, azzal a különbséggel, hogy a minták eltávolítása után a sejteket csak 4 óráig inkubáltuk tovább médiában. A sejteket mostuk hideg HBSS pufferrel, majd RNS-t preparáltunk az RNA STAT-60 kit (Tel-Test Inc., Friendswood) segítségével. Az RNS mintákat (15 μ g/minta) agaróz gélelektroforézissel választottuk szét. Denaturáló ágensként a gél és a futtatópuffer is formaldehidet tartalmazott. A minták egyenletes felvitelét a gélre a riboszómális RNS alegységek azonos intenzitású ethidium-bromidos festődésével bizonyítottuk. Az elválasztott RNS-eket elektroblottolással pozitív

töltésű nylon membránra transzferáltuk, majd UV fénnel hozzákötöttük a membránhoz (UV Stratalinker, Stratagene). A membránt biotinnal jelölt (Bioprime DNA Labeling System, Gibco) humán HO-1 cDNS-sel hibridizáltuk (58), és a próbákat kemilumineszens módszerrel (Photogene Nucleic Acid Detection System Version 2.0, Gibco) detektáltuk. Vas-porfirinekkal végzett kísérleteinkben a membránt ^{32}P izotóppal jelölt cDNS-ekkel hibridizáltuk. A kapott autoradiogramokat denzitometráltuk, így a mRNS-ek mennyisége OD egységekben is kifejezhető.

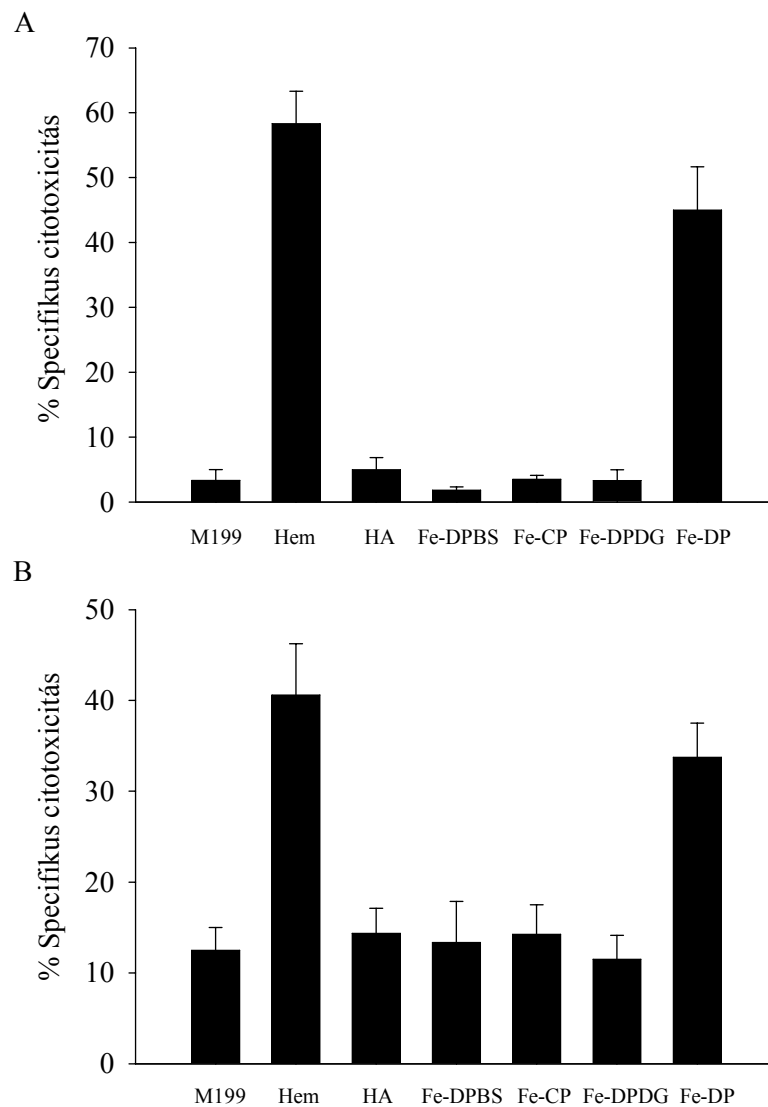
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. VAS-PORFIRINEK ÉS AZ ENDOTHELIUM

Az alábbi kísérletekben a hem szubsztituált származékait, valamint hem-arginátot használtunk. A szubsztituált származékok kialakítása során a vinil oldalláncok cserélődtek H-re (vas-deuteroporfirin IX), szulfonát csoportokra (vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát), propionát csoportokra (vas-coproporfirin III), vagy glikol csoportokra (vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol).

4.1.1. Vas-porfirinek oxidatív ágensekkel szembeni szenzitizáló hatása endotheliális sejteken

Munkacsoportunk előzetes eredményei alapján a hem fokozza a hidrogén-peroxiddal vagy aktivált neutrofil granulocitákkal előidézett endotheliális toxicitást. Kísérletünkben a fent említett vas-porfirinek hatását hasonlítottuk össze a hemmel (4. ábra). Endotheliális sejteket 1 órán keresztül inkubáltunk M199-nel, hemmel, hem-argináttal (HA), vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonáttal (Fe-DPBS), vas-coproporfirinnel (Fe-CP), vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikollal (Fe-DPDG), valamint vas-deuteroporfirin IX-cel (Fe-DP). A porfirinek eltávolítása után a sejteket (A) hidrogén-peroxiddal, vagy (B) aktivált PMN sejtekkel kezeltük, majd meghatároztuk a sejtpusztulás mértékét. A hem és a vas-deuteroporfirin hatására erőteljes toxicitást tapasztaltunk mind a hidrogén peroxiddal, mind az aktivált neutrofilokkal kezelt sejtekben. A többi vizsgált vas-porfirin és a hem-arginát sem okozott endotheliális szenzitizálást. Ennek magyarázata lehet, hogy a hem-arginát, valamint a szulfonáttal, propionáttal, illetve glikollal szubsztituált származékok hidrofilebbek mint a hem, vagy a vas-deuteroporfirin.

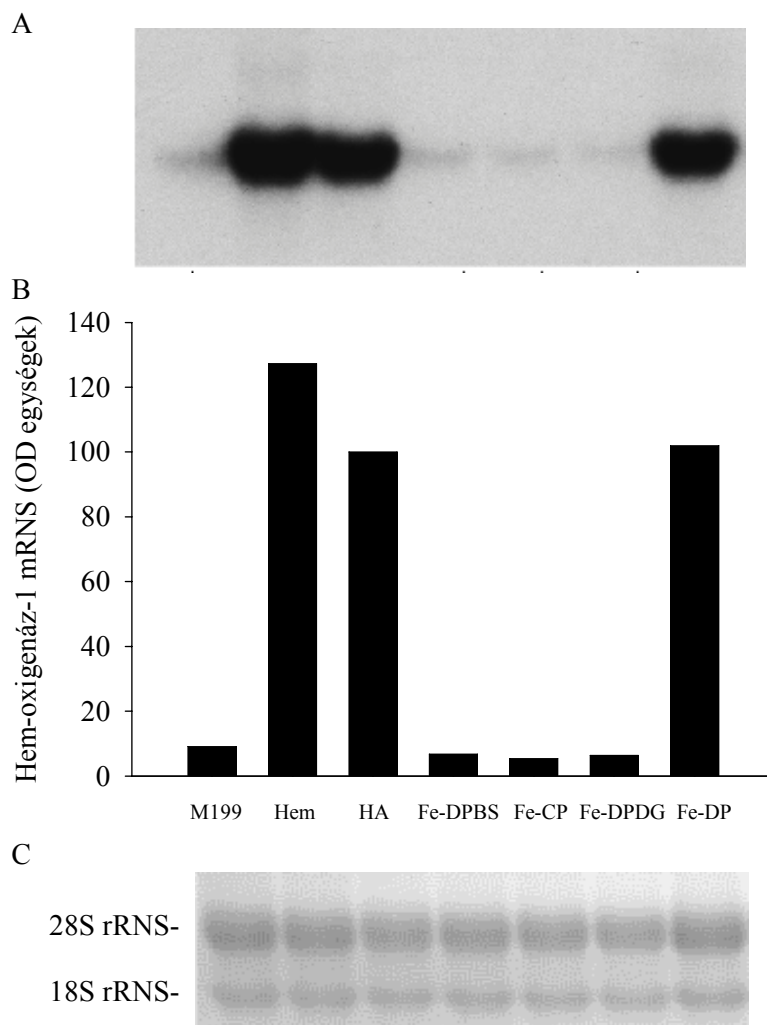


4. ábra Vas-porfírinek oxidatív stresszel szembeni szenzitizáló hatása

Konfluens ^{51}Cr izotóppal jelölt endotheliális sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk médiával, hem, hem-arginát, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, vas-koproporfirin III, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglicerol, valamint vas-deuteroporfirin IX 5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú, M199-ben elkészített oldataival. A sejteket ezután mostuk HBSS pufferrel, majd 2 órán keresztül (A) hidrogén-peroxiddal (100 $\mu\text{mol/l}$), illetve (B) aktivált neutrofil granulocitákkal (2:1 PMN:endotheliális sejt arány) kezeltük. Az eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

4.1.2. Vas-porfirinek hatása citoprotektív gének indukciójára

Endotheliális sejtekben a hem hem-oxigenáz mRNS és fehérje szintézist indukál. Megvizsgáltuk a különböző hidrofóbicitású vas-porfirinek hatását humán umbilikális véna endotheliális sejtek HO-1 mRNS szintjére (5. ábra), és HO enzimaktivitására (6. ábra).



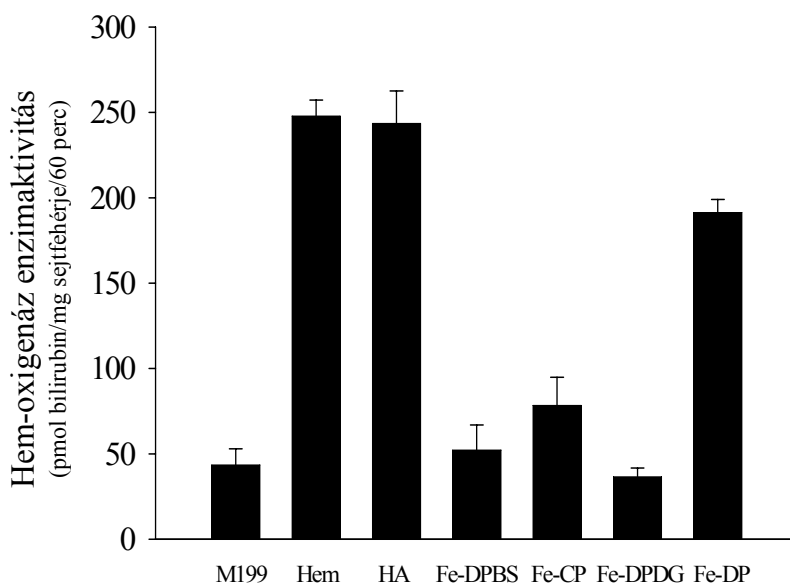
5. ábra Vas-porfirinek HO-1 mRNS indukciója

(A) Hem-oxigenáz-1 mRNS analízishez humán umbilikális véna endotheliális sejteket 60 percig média 199-nel, hem, hem-arginát, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, vas-coproporfirin III, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol, illetve vas-deuteroporfirin 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú oldataival kezeltük, majd további 4 órán keresztül porfirinmentes médiummal inkubáltuk. RNS-t izoláltunk, elektroforézis és blottolás után ^{32}P -vel jelölt hem-oxigenáz-1 cDNS próbával hibridizáltuk a membránt. (B) A membrán denzitometráálásával kapott

OD egységekben kifejezett HO-1 mRNS indukció. (C) A riboszómális RNS két alegységének ethidium-bromidos festése.

Endotheliális sejtekben a hem-arginát és a vas-deuteroporfirin a hemhez hasonló mértékű hem-oxigenáz-1 mRNS indukciót okozott, míg a többi vas-porfirin nem emelte a HO-1 mRNS szintet a kontrol szintje fölé.

Megmértük a vas-porfirinekkel kezelt sejtek hem-oxigenáz enzimaktivitását is. Amint az a 6. ábrán látható, a hem-arginát és a vas-deuteroporfirin kezelés a sejtek hem-oxigenáz enzimaktivitását a hemhez hasonlóan megemelte, míg a többi porfirinszármazéknak nem volt jelentős hatása az enzimaktivitásra.



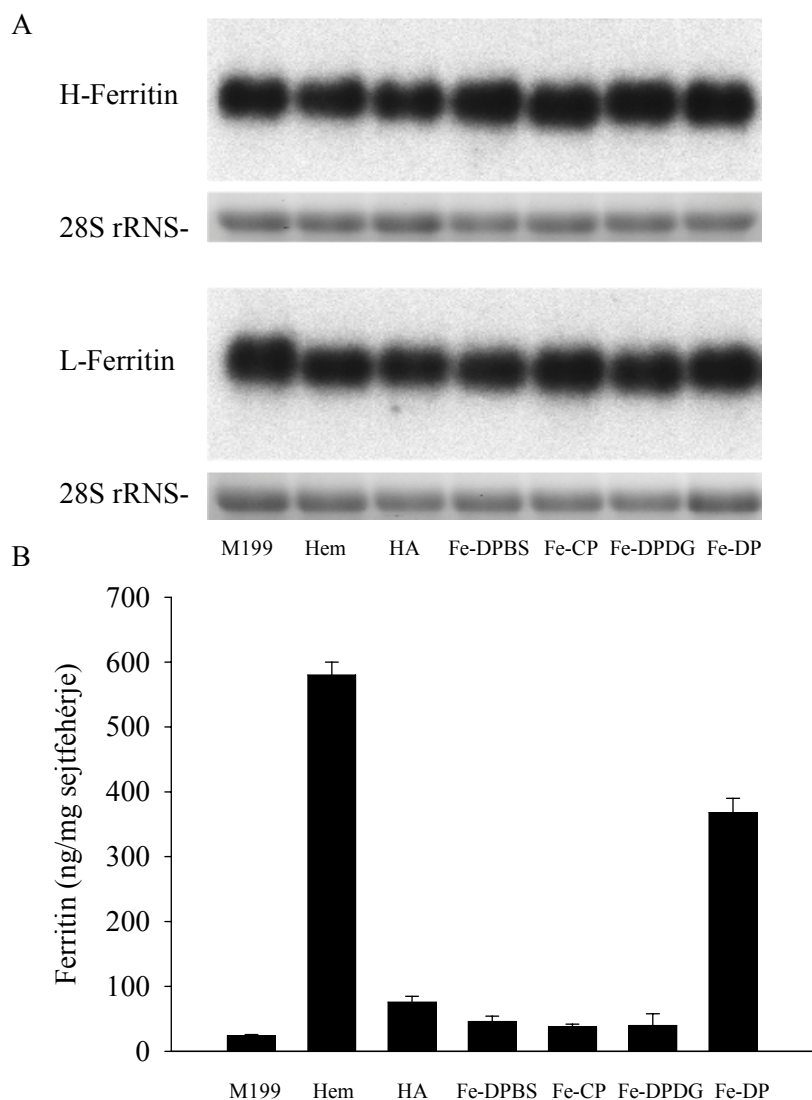
6. ábra. Vas-porfirinek hatása endotheliális sejtek hem-oxigenáz enzimaktivitására

Hem-oxigenáz enzimaktivitás meghatározásához humán umbilikális véna endotheliális sejteket 60 percig média 199-nel, hem, hem-arginát, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, vas-coproporfirin III, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol, illetve vas-deuteroporfirin 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú oldataival kezeltük, majd további 8 órán keresztül porfirinmentes médiummal inkubáltuk. A sejtek HO enzimaktivitását a

módszerek fejezetben részletezett módon határoztuk meg. Az eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

A hem-arginát nem szenzitizálta a sejteket a reaktív oxigénfajtákkal szemben, de a hemhez és a vas-deuteroporfirinhez hasonlóan bejutott a sejtekbe, amit a hem-oxigenáz mRNS indukció, és a megemelkedett enzimaktivitás bizonyít. A sejtek hemfelvétele szérummentes tápfolyadékból közel azonos mértékű hem és hem-arginát 5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú oldataiból. Egy óra alatt a kezdeti hem koncentráció 0.68 nmol hem/mg sejtfehérje hem-arginát hatására 5.04, hem hatására 3.94 nmol/mg-ra emelkedik. Szérum jelenlétében is van hemfelvétel, de csak 2 nagyságrenddel töményebb (600 $\mu\text{mol/l}$) hem illetve hem-arginát koncentrációk mellett.

A hem-oxigenáz gén hemindukciója együtt jár a sejtek ferritin tartalmának emelkedésével. Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy ez így van-e a többi porfirin esetében is. A vas-porfirinekkal kezelt sejtekből a ferritin mindkét alegységének (H és L) mRNS indukcióját, és a sejtek ferritin tartalmát mértük meg (7. ábra).



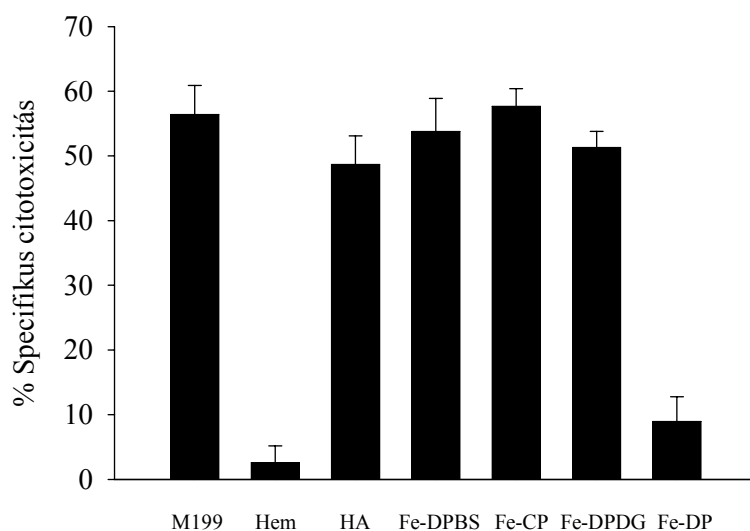
7. ábra. Vas-porfírinek hatása a ferritin expressziójára

(A) Humán umbilikális véna endotheliális sejteket 60 percig média 199-nel, hem, hem-arginát, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, vas-coproporfirin III, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol, illetve vas-deuteroporfirin 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú oldataival kezeltük, majd további 4 órán keresztül porfirinmentes médiummal inkubáltuk. RNS-t izoláltunk, elektroforézis és blottolás után a membránokat ^{32}P izotóppal jelölt H-, illetve L-ferritin cDNS próbákkal hibridizáltuk. A mintafelvitel egyenletességét a riboszómális RNS 28S alegységének egyenletes festődése bizonyítja. (B) A ferritin szint meghatározásánál a sejteket ugyanúgy kezeltük, mint a Northern analízisnél. 16 órával a porfírinek eltávolítása után a sejteket feloldottuk, és a ferritin szintet megmértük. Az eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

A vas-deuteroporfirin a hemhez hasonlóan megemelte a ferritin szintjét az endotheliális sejtekben. Ezzel szemben a hem-arginát szignifikáns ($p < 0.004$ a kontrollhoz viszonyítva), de sokkal kisebb mértékű ferritin szintemelkedést okozott. A ferritin könnyű és nehéz láncát kódoló mRNS-ek szintjét nem befolyásolták a vizsgált porfirinek. Ennek a magyarázata, hogy a ferritin szintézis szabályozása poszttranszkripció szinten zajlik.

A hem kezelés hatására indukálódó hem-oxigenáz enzim hasítja a hem gyűrűt, ami CO és bilirubin képződéssel jár. A reakcióban a vas kiszabadul a porfiringyűrűből, ami ferritin indukciót okozhat (95). Hem-arginátot használva a hem-oxigenáz szubsztrátjaként kevesebb bilirubin képződését tapasztaltuk (79.7 ± 12.8 pmol bilirubin/mg sejtfehérje/60 perc), mintha ugyanilyen koncentrációban ($20 \mu\text{M}$) hemet alkalmaztunk (259.1 ± 22.1 pmol bilirubin/mg sejtfehérje/60 perc) szubsztrátként. Ez magyarázhatja a kisebb mértékű ferritin szintemelkedést a hasonló hem-oxigenáz indukció ellenére is a hem-argináttal és a hemmel kezelt sejteket összehasonlítva.

Munkacsoportunk korábbi munkáiban kimutatta, hogy a ferritin megvédi a sejteket az oxidatív sejtkárosodásokkal szemben (58). Endotheliális sejteket vas-porfirinekkal kezeltünk 1 órán keresztül, majd 15 órányi inkubálás után hemmel és hidrogén-peroxiddal erőteljes oxidatív hatásnak tettük ki a sejteket, és meghatároztuk a specifikus citotoxicitást (8. ábra). A hem illetve a vas-deuteroporfirin előkezelés a sejteket ellenállóvá tette a hemmel és hidrogén-peroxiddal előidézett toxikus hatással szemben. A hem-arginát, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, a vas-coproporfirin III, illetve a vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol előkezelés azonban nem csökkentette a hem és hidrogén-peroxid citotoxikus hatását.

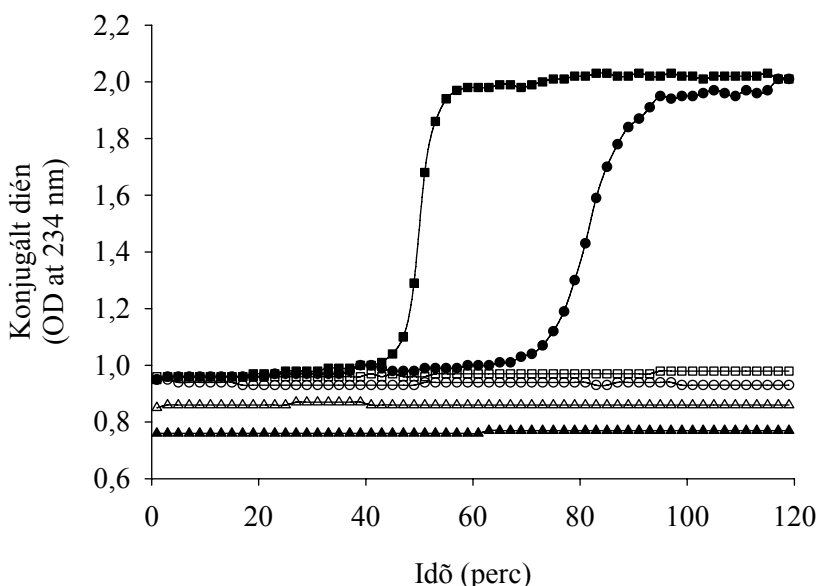


8. ábra. Az endothelium előkezelése vas-porfirinekkel

Humán umbilikális véna endotheliális sejteket 1 órán át előkezeltünk M199-nel, hem hem-arginát, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, vas-coproporfirin III, vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol, illetve vas-deuteroporfirin 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú oldataival, majd további 15 órán keresztül vas-porfirin mentes tápfolyadékban inkubáltuk. A sejteket ezután hemmel (5 $\mu\text{mol/l}$) kezeltük 60 percig, majd H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/l}$) hatásának tettük ki. 2 óra elteltével megmértük a specifikus citotoxicitást. Az eredmények 3, duplikátumban kivitelezett kísérlet átlagai.

4.1.3. A hem és a hem-arginát összehasonlítása az LDL oxidatív modifikációjában

Az oxidált LDL toxikus az endotheliumra. Az LDL hem illetve hem-arginát katalizálta lipid-peroxidációját oxidációs termékek – konjugált dién, lipid-hidroperoxid, valamint tiobarbitursav-reaktív anyagok – koncentrációjának meghatározásával követhetjük. Az LDL hem, illetve hem-arginát katalizálta lipid-peroxidációjának kinetikája különbözik egymástól. A 9. ábrán a hemmel és hidrogén-peroxiddal, illetve a hem-argináttal és hidrogén-peroxiddal kiváltott LDL lipid-peroxidációt konjugált dién képződéssel követtük.



9. ábra. A hemmel illetve hem-argináttal katalizált LDL lipid-peroxidáció kinetikája.

LDL-t (200 μg/ml) (▲) hemmel (5 μM) (□), hem-argináttal (5 μM) (○), hemmel és H₂O₂-dal (75 μM) (■), hem-argináttal és H₂O₂-dal (●), valamint csak H₂O₂-dal kezeltünk (△). A lipid-peroxidációt fotometriásan 234 nm-en, 37°C-on 120 percig követtük.

A reakció maximális sebességének eléréséig eltelt idő (ΔT at V_{max}) a hem-argináttal katalizált reakciónál hosszabb volt (82 perc), mint a hemmel katalizáltnál (51 perc), és a reakció maximális sebessége is kisebb volt (66.6 mOD/min), mint hem katalízis esetén (112.7 mOD/min). Hidrogén-peroxid hiányában lipid-peroxidáció nem következett be sem

a hemmel, sem a hem-argináttal kezelt LDL-ben a mérés időtartama alatt (120 perc). Azonban hosszabb inkubálás során a hem és a hem-arginát önmagában előidézi az oxidatív módosulásokat (I. táblázat).

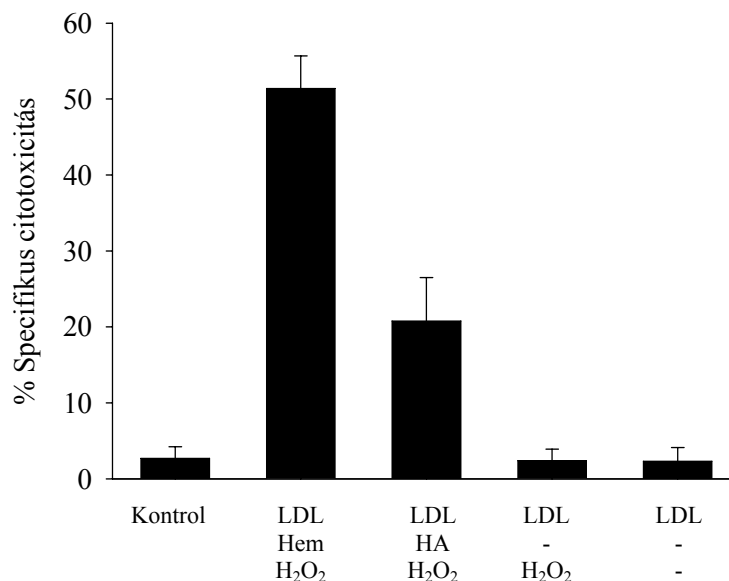
Hem hatására 18 óra alatt az LDL-ben megemelkedik a konjugált diének, lipid-hidroperoxidok és a tiobarbitursav-reaktív anyagok koncentrációja. Hem-arginát hatására ugyanekkora mennyiségű oxidációs termék 36 óra alatt keletkezik.

Paraméter	0 óra			18 óra			36 óra		
	LDL	LDL + Hem	LDL + HA	LDL	LDL + Hem	LDL + HA	LDL	LDL + Hem	LDL + HA
Conj. Dién (OD at 234 nm)	0.245±0.004	0.276±0.006	0.289±0.001	0.260±0.002	1.058±0.002	0.282±0.003	0.258±0.007	1.120±0.011	1.150±0.047
TBARS (nmol/mg LDL)	0.07±0.01	0.10±0.02	0.10±0.01	0.09±0.03	10.48±1.27	0.25±0.09	0.12±0.03	8.69±1.61	11.07±2.08
Total LOOH (nmol/mg LDL)	9.5±0.2	9.0±0.7	9.8±0.1	8.0±0.2	140.7±2.5	9.7±0.2	7.5±1.8	156.9±8.2	165.1±15.6

I. táblázat Konjugált dién, tiobarbitursav-reaktív anyagok, és lipid-hidroperoxid képződése hemmel illetve hem-argináttal kezelt LDL-ben

LDL-t (200µg/ml) hemmel (5µM) illetve hem-argináttal (5µM) inkubáltunk, a táblázatban jelzett ideig levegőn. A lipid-peroxidációt konjugált dién, tiobarbitursav-reaktív anyagok (TBARS) és lipid-hidroperoxid (LOOH) koncentráció mérésével monitoroztuk. A feltüntetett eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

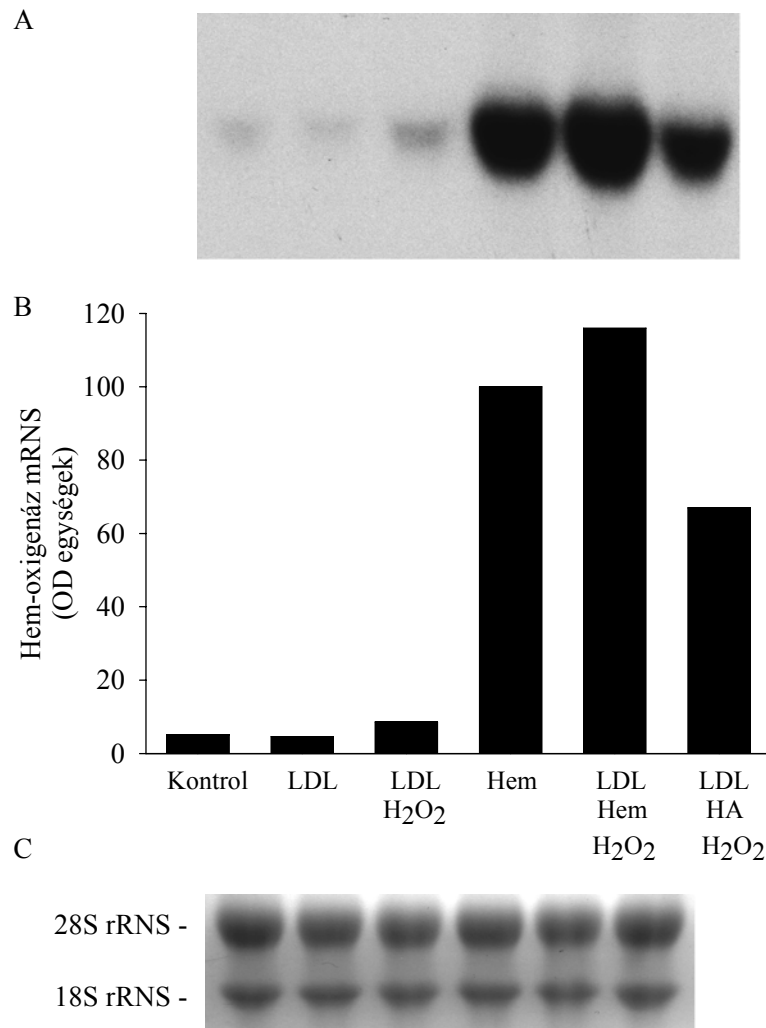
A hemmel és H₂O₂-dal, valamint a hem-argináttal és H₂O₂-dal kezelt LDL-ek citotoxikus hatása is különbözik (10. ábra). A hem-argináttal kezelt LDL toxicitása szignifikánsan kisebb, mint a hemmel kezelté (p<0.004).



10. ábra Hemmel illetve hem-argináttal kezelt LDL-ek citotoxikus hatása

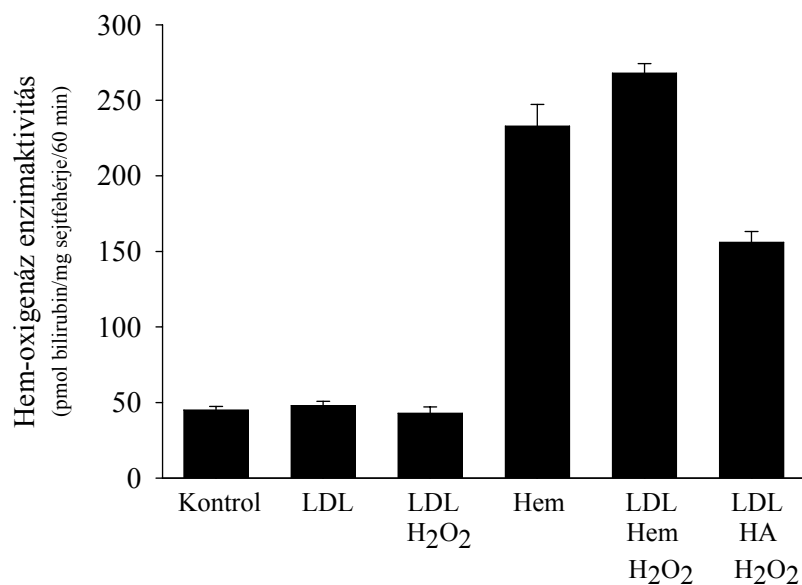
Humán umbilikális véna endotheliális sejteket hemmel (5 $\mu\text{mol/l}$) és H_2O_2 -dal (75 $\mu\text{mol/l}$), hem-argináttal (5 $\mu\text{mol/l}$) és H_2O_2 -dal, illetve csak H_2O_2 -dal kezelt, vagy natív LDL-lel (200 $\mu\text{g/ml}$) inkubáltuk 4 órán keresztül, majd meghatároztuk a specifikus citotoxicitást. A kontrol sejteket lipoprotein mentes HBSS pufferrel inkubáltuk. A feltüntetett eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

Az oxidált LDL alacsonyabb koncentrációban hem-oxigenáz mRNS-t indukál, és a sejtek HO enzimaktivitását is fokozza. Megvizsgáltuk a hemmel illetve hem-argináttal módosított LDL hatását a hem-oxigenáz expressziójára. A hemmel és hidrogén-peroxiddal kondicionált LDL az endotheliális sejtekben erőteljes HO-1 mRNS indukciót váltott ki (11. ábra), ami együtt járt az enzimaktivitás fokozódásával (12. ábra). Ezzel szemben a natív, vagy a hidrogén-peroxiddal előkezelt LDL nem emelte sem a HO mRNS szintet, sem az enzimaktivitást. A sejteket hem-argináttal és hidrogén-peroxiddal kondicionált LDL-lel kezelve HO-1 mRNS indukciót és enzimaktivitás fokozódást tapasztaltunk, de mértékük szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a hem/ H_2O_2 -kondicionált LDL által kiváltott hatás ($p < 0.001$).



11. ábra Hemmel illetve hem-argináttal kondicionált LDL-ek hatása a HO-1 mRNS indukciójára

(A) Humán umbilikális véna endotheliális sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk natív LDL-lel (50 µg/ml), H₂O₂-dal (6.25 µmol/l) kezelt LDL-lel, hemmel (1.25µmol/l) és H₂O₂-dal kezelt LDL-lel, illetve hem-argináttal (1.25 µmol/l) és H₂O₂-dal kezelt LDL-lel. A negatív kontrol sejteket 1 órán át HBSS pufferrel, a pozitív kontrolt hemmel (10µmol/l) kezeltük. A reakcióelegyek eltávolítása után a sejteket további 4 órán át tápfolyadékban inkubáltuk, majd RNS-t izoláltunk, elektroforézis után blottoltuk, és a membránt hibridizáltuk ³²P izotóppal jelölt HO-1 cDNS próbával. (B) A membrán denzitometráásával kapott OD egységekben kifejezett HO-1 mRNS indukció. (C) A riboszómális RNS két alegységének ethidium-bromidos festése.



12. ábra Hemmel illetve hem-argináttal kondicionált LDL-ek hatása a hem-oxigenáz enzimaktivitásra.

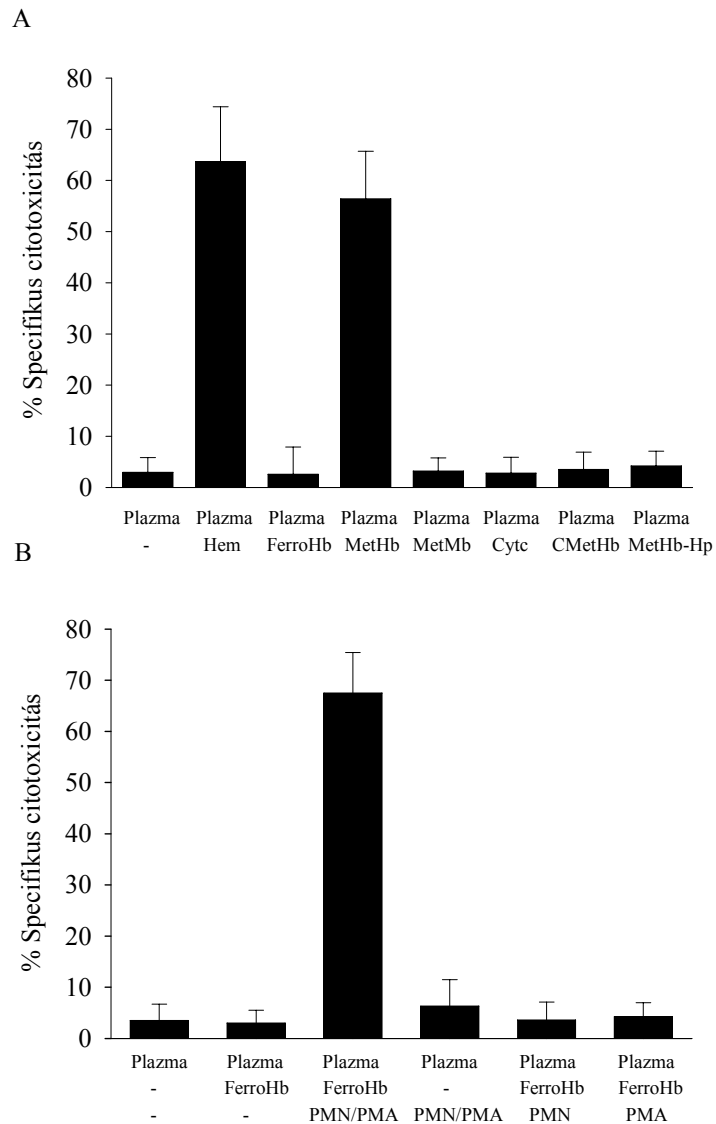
Humán umbilikális véna endotheliális sejteket a HO-1 mRNS indukció vizsgálatánál leírt módon kezeltünk. A reakcióelegyek eltávolítása után további 8 órán keresztül tápfolyadékban inkubáltuk a sejteket, majd meghatároztuk a HO enzimaktivitást. A feltüntetett eredmények 3, duplikátumban kivitelezett kísérlet átlagai.

4.2. HEMPROTEINEK PRO-OXIDÁNS ÉS CITOTOXIKUS HATÁSA

Az alábbi kísérletekben hem és élettanilag jelentős hem-fehérjék hatását vizsgáltuk az LDL oxidatív modifikációjára teljes plazmában. Az LDL minták biokémiai jellemzésén túl biológiai hatásukat is teszteltük humán umbilikális véna endotheliális sejteken.

4.2.1. Hemproteinekkal kezelt plazmából származó LDL-ek citotoxikus hatása

Endotheliális sejteket hemmel vagy különböző hemproteinekkal kezelt plazmából származó LDL hatásának tettük ki. A sejtekre a hemmel, illetve a methemoglobinnal inkubált plazmából származó LDL-ek toxikusak voltak (13A ábra). A ferrohemoglobin, metmioglobin és citokróm c, melyekben a hem csoport erősen kötődik a fehérjéhez, nem tették toxikussá az LDL mintákat. Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a toxikus LDL kialakulásában nagy szerepe van a hem kiszabadulásának a fehérje környezetéből. Ezért a methemoglobin hem csoportját megpróbáltuk erősebben kötni cianggal illetve haptoglobinnal (96). A cianomethemoglobinnal illetve haptoglobinhoz kötött methemoglobinnal kezelt plazmákból származó LDL-ek nem voltak toxikusak (13A ábra). A ferrohemoglobinnal inkubált plazmából származó LDL nem volt toxikus az endotheliális sejtekre, azonban munkacsoportunk (62) és más szerzők eredményei alapján (97-98) feltételeztük, hogy a ferrohemoglobin methemoglobinná alakulhat neutrofil eredetű oxidánsok hatására. Ha a plazmához a ferrohemoglobin mellett aktivált PMN sejteket is adtunk, akkor 30 perc alatt a ferrohemoglobin körülbelül 70%-a methemoglobinná alakult, és a szeparált LDL a sejtek 66%-át elpusztította (13B ábra). Ha a plazmához ferrohemoglobint és nyugvó PMN-eket, vagy aktivált PMN sejteket de ferrohemoglobint nem adtunk, akkor a szeparált LDL nem idézett elő sejtpusztulást. Az LDL-t nem tette toxikussá a plazmához együttesen adott ferrohemoglobin és forbol-észter sem. A ferrohemoglobin aktivált neutrofil mediálta oxidációja kataláz enzimmal gátolható, jelenlétében az LDL kevésbé válik toxikussá.



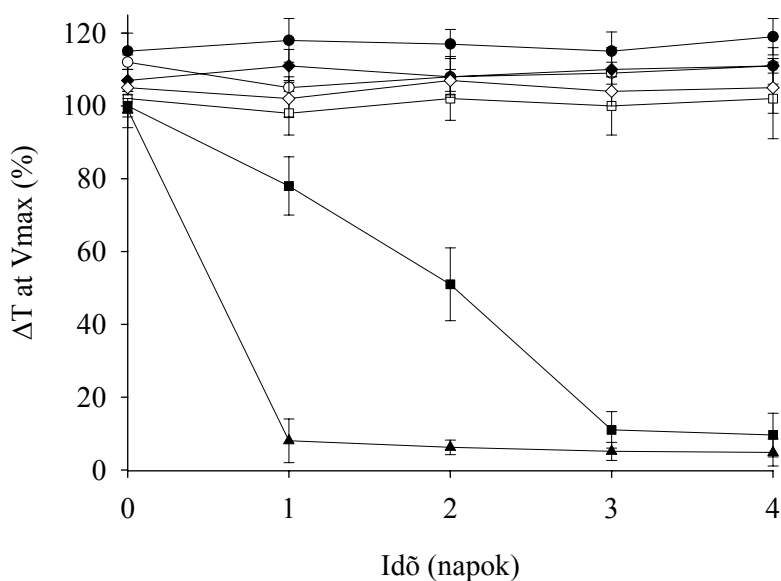
13. ábra Hemproteinekkal kezelt plazmákból származó LDL-ek citotoxikus hatása

(A) Konfluens humán umbilikális véna endotheliális sejteket natív LDL-lel (200 $\mu\text{g/ml}$ protein), valamint hemmel (80 μM), ferrohemoglobinnal (20 μM), methemoglobinnal (20 μM), metmioglobinnal (80 μM), citokróm c-vel (80 μM), cianomethemoglobinnal (20 μM), illetve haptoglobinhoz kötött methemoglobinnal (20 μM), kezelt plazmából szeparál LDL-lel 4 órán át inkubáltuk, majd MTT módszerrel meghatároztuk a specifikus citotoxicitást. (B) Endotheliális sejteket natív LDL-lel, illetve ferrohemoglobinnal (20 μM), ferrohemoglobinnal és forbol-észterrel (PMA, 500 ng/ml))aktivált neutrofilokkal ($10^7/\text{ml}$), aktivált neutrofilokkal, ferrohemoglobinnal és nyugvó neutrofilokkal, valamint ferrohemoglobinnal és forbol-észterrel előkezelt plazmákból szeparált LDL mintákkal inkubáltuk 4 órán keresztül, majd MTT módszerrel

meghatároztuk a specifikus citotoxicitást. A feltüntetett eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

4.2.2. Oxidatív modifikáció kimutatása hemproteinekkal kezelt plazmából származó LDL mintákban

A hemproteinekkal kezelt plazmából származó LDL-ek oxidatív rezisztenciáját a munkacsoportunk által kidolgozott hem-mediálta lipid-peroxidáción alapuló módszerrel (93) mértük meg közvetlenül a szeparálás után, és az azt követő négy napon. Az oxidatív rezisztenciát a hem-degradáció maximális sebességéig eltelt idővel (ΔT at V_{max}) jellemeztük.



14. ábra Hem és hemproteinek hatása az LDL oxidatív rezisztenciájára plazmában

Plazmát 80μM hemmel (▲), 20 μM ferrohemoglobinnal (□), 20 μM methemoglobinnal (■), 80μM metmyoglobinnal (◆), 80μM citokrómmal (◇), 20 μM cianomethemoglobinnal (○), illetve 20 μM haptoglobinhoz kötött methemoglobinnal (●), inkubáltunk 2 órán keresztül, majd LDL-t szeparáltunk, és mértük az LDL oxidatív rezisztenciáját a módszerek fejezetben részletezett módon a szeparálás napján, és az azt követő 4 napon.

A hemmel kezelt plazmából szeparált LDL oxidatív rezisztenciája a szeparálást követő napra gyakorlatilag nullára csökkent (14. ábra). Lassúbb, de a harmadik napra ugyanilyen arányú csökkenést figyeltünk meg, ha a plazmát methemoglobinnal inkubáltuk az LDL szeparálás előtt. Ferrohemoglobinnal kezelve a plazmát az LDL oxidatív rezisztenciája nem csökkent a 4 nap alatt. Ha a methemoglobint haptoglobinnal ekvimoláris arányban adtuk a plazmához, nem tapasztaltunk ΔT at V_{max} csökkenést, és akkor sem, ha a plazmát cianomethemoglobinnal, citokróm c-vel vagy metmioglobinnal kezeltük. Az oxidatív rezisztencia mellett az LDL mintákban különböző lipid-peroxidációs termékek koncentrációját is mértük (II. táblázat).

Paraméter	Plazma	Plazma + Hem	Plazma + FerroHb	Plazma + MetHb	Plazma + MetHb+Hp	Plazma + CianometHb
ΔT at V_{max} (s)	3130 $\pm$ 272	150 $\pm$ 118	3190 $\pm$ 346	300 $\pm$ 189	3721 $\pm$ 762	3480 $\pm$ 722
Konj. Dién (OD at 234 nm)	0.175 $\pm$ 0.011	0.483 $\pm$ 0.099	0.170 $\pm$ 0.05	0.321 $\pm$ 0.026	0.189 $\pm$ 0.027	0.166 $\pm$ 0.005
TBARS (nmol/mg LDL)	0.32 $\pm$ 0.09	14.22 $\pm$ 1.46	0.34 $\pm$ 0.21	6.65 $\pm$ 0.52	0.21 $\pm$ 0.12	0.31 $\pm$ 0.14
LOOH (nmol/mg LDL)	5.34 $\pm$ 2.28	142.82 $\pm$ 25.93	7.50 $\pm$ 4.49	101.5 $\pm$ 35.02	5.04 $\pm$ 1.29	4.72 $\pm$ 3.17
α -tocopherol (mol/mol ApoB-100)	7.71 $\pm$ 2.26	0.80 $\pm$ 0.86	7.59 $\pm$ 0.93	0.71 $\pm$ 0.78	6.88 $\pm$ 0.39	7.29 $\pm$ 1.09

II. Táblázat Lipid-peroxidációt jellemző paraméterek hemproteinekkal kezelt plazmákból izolált LDL mintákban

Hemmel (80 μ M), ferrohemoglobinnal (20 μ M), methemoglobinnal (20 μ M), haptoglobinhoz kötött methemoglobinnal (20 μ M), illetve cianomethemoglobinnal (80 μ M) kezelt plazmákból szeparált LDL-ek oxidatív rezisztenciája, konjugált dién-, tiobarbitursav-reaktív anyagok-, lipid-hidroperoxid-, valamint α -tocopherol koncentrációja a szeparálást követő 3. napon. A feltüntetett adatok 5 kísérlet átlagai.

A hemmel illetve methemoglobinnal elődézett oxidatív rezisztencia csökkenésével párhuzamosan az LDL-ek E vitamin tartalma erőteljesen lecsökkent, és emelkedett konjugált dién, TBARS és LOOH tartalmuk. Ezzel szemben a haptoglobinhoz kötött methemoglobin és a cianomethemoglobin sem okozta az LDL-ek oxidatív rezisztenciájának csökkenését, sem az α -tocopherol szint csökkenését. Ezekben a mintákban lipidperoxidációs termékek megjelenését sem tapasztaltuk.

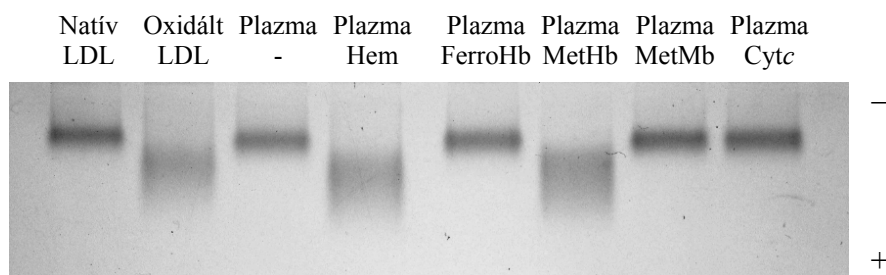
A plazmához adott ferrohemoglobin önmagában nem okozott LDL modifikációt, azonban ha a hemoglobint aktivált PMN sejtekkel együtt adtuk a plazmához, akkor a szeparált LDL oxidatív rezisztenciája és α -tocopherol tartalma lecsökkent, és a szeparálást követő 3. napon mért lipid-peroxidációs termékek szintje magasabb volt, mint a kontrol LDL-ben (III. táblázat). A plazmához adott aktivált PMN sejtek önmagukban nem okoztak LDL oxidációt, és akkor sem következett be LDL módosulás, ha a ferrohemoglobinton kívül nyugvó PMN sejteket, vagy forbol-észtert adtunk a plazmához.

Paraméter	Plazma	Plazma+Hb	Plazma+Hb + PMN/PMA	Plazma + PMN/PMA	Plazma+Hb + PMA	Plazma+Hb + PMN
ΔT at $V_{\max}$ (s)	3100 $\pm$ 330	3060 $\pm$ 364	320 $\pm$ 91	3260 $\pm$ 302	3180 $\pm$ 432	3060 $\pm$ 432
Konj. Dién (OD. 234 nm)	0.170 $\pm$ 0.004	0.176 $\pm$ 0.008	0.308 $\pm$ 0.089	0.180 $\pm$ 0.015	0.185 $\pm$ 0.010	0.169 $\pm$ 0.013
TBARS (nmol/mg LDL)	0.24 $\pm$ 0.13	0.47 $\pm$ 0.24	2.57 $\pm$ 0.83	0.29 $\pm$ 0.09	0.31 $\pm$ 0.17	0.22 $\pm$ 0.18
LOOH (nmol/mg LDL)	3.85 $\pm$ 2.12	3.35 $\pm$ 1.19	82.43 $\pm$ 4.26	3.78 $\pm$ 2.52	3.42 $\pm$ 2.60	4.21 $\pm$ 1.82
α -tocopherol (mol/mol ApoB-100)	7.65 $\pm$ 1.18	7.59 $\pm$ 0.93	0.45 $\pm$ 0.33	7.02 $\pm$ 0.34	8.09 $\pm$ 1.10	7.60 $\pm$ 1.17

III. táblázat Az LDL oxidatív modifikációja ferrohemoglobinnal és aktivált neutrofil granulocitákkal kezelt plazmában

Ferrohemoglobinnal (20 μ M), ferrohemoglobinnal és forbol-észterrel (PMA, 500 ng/ml) aktivált neutrofilokkal (10^7 /ml), aktivált neutrofilokkal, ferrohemoglobinnal és nyugvó neutrofilokkal, valamint ferrohemoglobinnal és forbol-észterrel előkezelt plazmákból izolált LDL-ek oxidatív rezisztenciája, konjugált dién, TBARS, lipid-hidroperoxid és α -tocopherol tartalma a szeparálás utáni 3. napon. A feltüntetett adatok 3 kísérlet átlagai.

Az LDL oxidatív módosulása során az apoB-100 fehérje töltésviszonyai is megváltoznak, így az LDL-ek elektroforetikus mobilitásának vizsgálatával is igazolható az oxidatív modifikáció kialakulása. A hemmel és methemoglobinnal kezelt plazmákból származó LDL-ek a pozitív pólus felé gyorsabban vándoroltak, hasonlóan az oxidált LDL-hez. Ezzel szemben a ferrohemoglobinnal, metmioglobinnal, illetve citokróom c-vel kezelt plazmákból származó LDL-ek a natív LDL-lel együtt vándoroltak (15. ábra).



15. ábra Hemproteinek hatása az LDL elektroforetikus mobilitására plazmában

Hemmel (80 μ M), ferrohemoglobinnal (20 μ M), methemoglobinnal (20 μ M), metmioglobinnal (80 μ M), illetve citokróom c-vel (80 μ M) kezelt plazmákból szeparált LDL-ek (3 μ g/minta) elektroforetikus mobilitását hasonlítottuk össze natív, illetve oxidált LDL-lel.

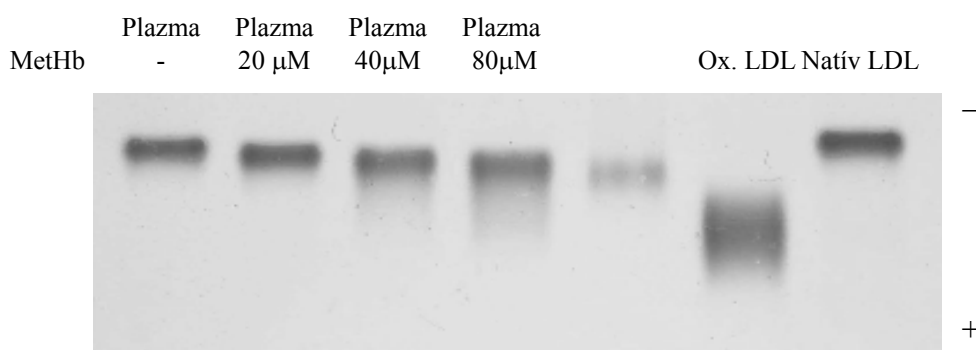
A hem és a methemoglobin által okozott LDL modifikáció idő- és dózisfüggő.

Hem koncentráció ($\mu\text{mol/l}$)	ΔT at V_{max} (%)		Konjugált dién (OD 234 nm)	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
5	100	98.2	0.1563	0.1602
10	87.7	79.1	0.1682	0.1727
20	75.5	6.9	0.1877	0.2721
40	2.0	2.1	0.2572	0.2857

IV. táblázat Az LDL hem-mediálta oxidációjának idő- és dózisfüggése

Plazmát 5,10,20, illetve 40 μM hemmel 2 órán át inkubáltunk, majd meghatároztuk az LDL-ek oxidatív rezisztenciáját és konjugált dién tartalmát 24 illetve 48 óránál.

Plazmához növekvő koncentrációban hemet illetve methemoglobint adtunk, és mértük az LDL-ek oxidatív rezisztenciáját, konjugált dién tartalmát (IV. táblázat) és elektroforetikus mobilitását (16. ábra). A hem és a methemoglobin koncentrációjának növekedésével párhuzamosan fokozódott az LDL oxidatív modifikációja; csökkent az oxidatív rezisztencia, nőtt a konjugált dién tartalom, és az LDL fehérjérszén bekövetkező töltésszám változás miatt gyorsult az LDL anód (+) felé vándorlása.

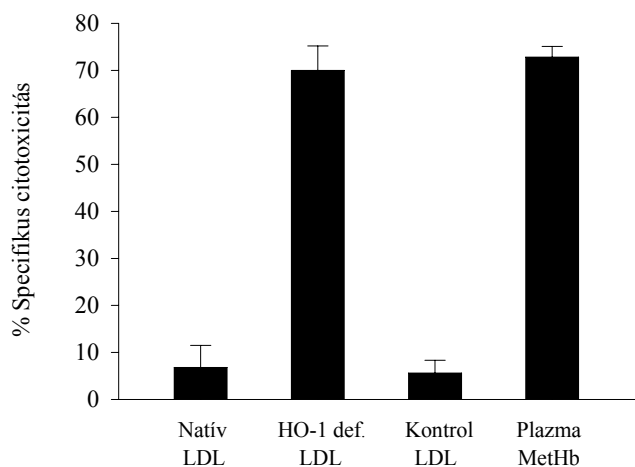


16. ábra Az LDL dózisfüggő oxidatív modifikációjának kimutatása lipid elektroforézissel

Plazmát 2 órán keresztül 20, 40, illetve 80 μM methemoglobinnal inkubáltunk, majd LDL-t szeparáltunk, és meghatároztuk a minták elektroforetikus mobilitását.

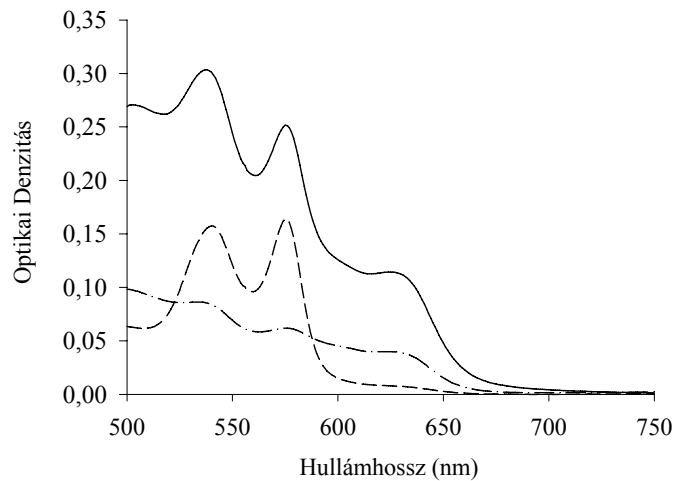
4.2.3. Az LDL oxidatív modifikációja in vivo körülmények között

Yachie és munkacsoportja 1999-ben publikáltak egy cikket egy HO-1 deficiens betegről (60), akinek krónikus intravaszkuláris hemolízise, és endotheliális sejtkárosodása volt. A gyerek plazmájából izolált LDL toxikus volt humán umbilikális véna endotheliális sejtekre, hasonlóan ahhoz az LDL-hez, melyet methemoglobinnal inkubált normál plazmából izoláltunk (17. ábra). A gyerek plazmájának spektruma alapján (18. ábra) megállapítottuk, hogy a plazmájában lévő hemoglobin túlnyomó része (80%) methemoglobin, koncentrációja pedig 60 $\mu\text{mol/l}$ körüli.



17. ábra HO-1 deficiens beteg LDL-jének citotoxikus hatása

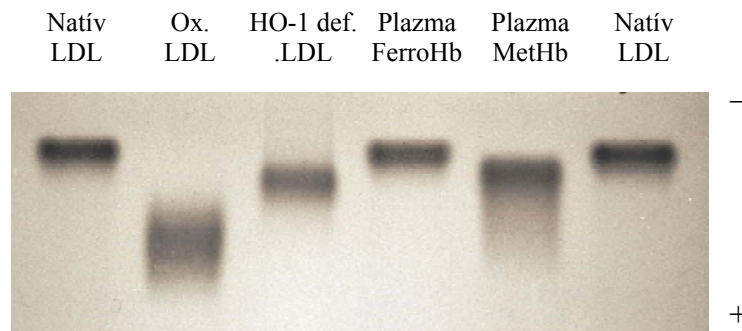
Humán umbilikális véna endotheliális sejteket natív LDL-lel, a HO-1 deficiens beteg plazmájából izolált LDL-lel, egy egészséges kontroltól származó LDL-lel valamint methemoglobinnal előkezelt plazmából szeparált LDL-lel kezeltünk 4 órán keresztül, majd MTT módszerrel meghatároztuk a specifikus citotoxicitást. A feltüntetett eredmények 2, triplikátumban kivitelezett kísérlet átlagai.



18. ábra A HO-1 deficiens beteg plazmájának spektruma

A HO-1 deficiens beteg plazmáját fiziológiás sóoldattal meghígítottuk, spektrumát felvettük (folytonos vonal), és összehasonlítottuk egészséges kontrol plazmához adott 2.5 μ M ferrohemoglobin (szaggatott vonal) és 2.5 μ M methemoglobin (pont-vonal) spektrumával.

A gyerek LDL-jének fokozott elektroforetikus mobilitása volt (19. ábra) hasonlóan a methemoglobinnal előkezelt plazmából izolált LDL-hez, ami a pozitív töltésű csoportok számának csökkenésével magyarázható. Ezt a szabad amin csoportok számának meghatározásával is bizonyítottuk, ami a HO-1 deficiens beteg LDL-jében 732 mol/mol apoB-100 volt, szemben a kontrol LDL-ben mért 978 mol/mol apoB-100 értékkel.



19. ábra A hem-oxigenáz-1 deficiens beteg LDL-jének lipid elektroforézise

Natív LDL (3 μ g), oxidált LDL, a HO-1 deficiens beteg plazmájából, ferrohémoglobinnal (20 μ M) illetve methemoglobinnal (20 μ M) inkubált plazmákból származó LDL-ek elektroforézise agaróz gélen.

A betegből izolált LDL oxidatív rezisztenciája gyakorlatilag nulla volt, és α -tocopherol tartalma is nagyon alacsony, 0.2 mol/mol apo B-100 volt (V. táblázat). A HO-1 deficiens beteg LDL-jének oxidatív módosultságát számos független módszerrel bizonyítottuk. LDL-jében magas volt a konjugált diének, lipid-hidroperoxidok, és tiobarbitursav-reaktív anyagok szintje. Ezeket az adatokat 62 egészséges kontrolltól levett, és a beteg plazmájával azonos módon tárolt és kezelt plazmákból izolált LDL eredményeivel hasonlítottuk össze. Statisztikai módszerekkel bizonyítottuk, hogy a beteg LDL-jének paraméterei kívül esnek a normál populáción belüli szóráson.

Paraméter	Kontrol plazmákból izolált LDL (n=62)				A HO-1 deficiens beteg LDL-je	
	Átlag	SD	Min	Max	Átlag	SD
ΔT at $V_{\max}$ (s)	3040.6	515.2	2220	4740	120	57
Konj. dién (OD at 234 nm)	0.1794	0.0156	0.1471	0.2203	0.436	0.055
TBARS (nmol/mg LDL)	0.316	0.094	0.128	0.577	1.75	0.31
LOOH (nmol/mg LDL)	4.689	1.417	2.170	8.140	32.6	2.53
α -tocopherol (mol/mol ApoB-100)	7.91	1.85	4.32	14.56	0.20	0.11

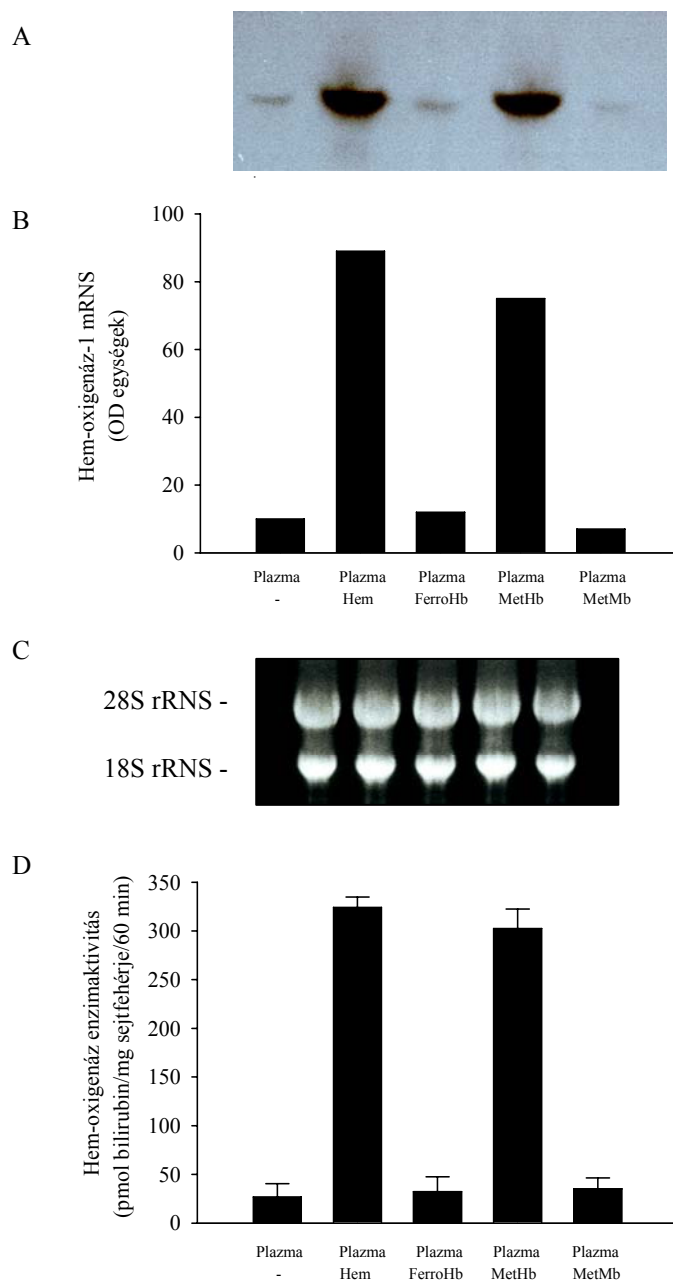
V. táblázat A HO-1 deficiens beteg LDL-jének lipid-peroxidációs paraméterei összehasonlítva egészséges kontrolok LDL mintáival

Egészséges önkéntesektől és a HO-1 deficiens beteg plazmájából azonos körülmények között LDL-t szeparáltunk, és meghatároztuk a minták oxidatív rezisztenciáját, konjugált dién, TBARS, lipid-hidroperoxid és α -tocopherol tartalmát.

A HO-1 deficiens beteg plazmájából izolált LDL vastartalma 8 mol/mol apoB-100 volt. Egészséges kontrol plazmával végzett kísérletben ezzel összemérhető mennyiségű hem-asszociációt mértünk, ha a plazmát 2 órán keresztül 60 μ M hemmel inkubáltuk a z LDL izolálás előtt. 72 órányi tárolás során a hem degradálódott az LDL-ben, és a vas-tartalom 2.9 mol/mol apo B-100-re emelkedett. A HO-1 deficiens beteg LDL-jében hemet nem tudtunk kimutatni.

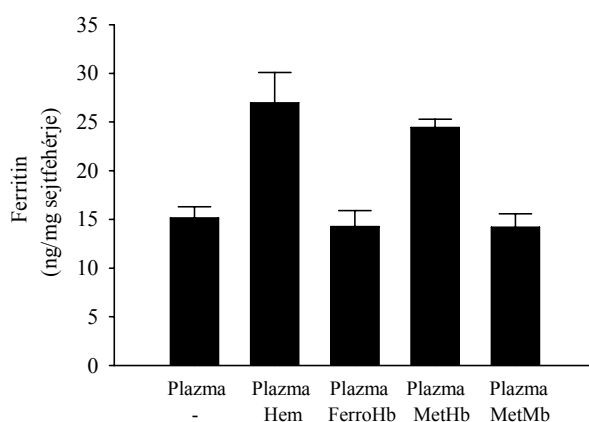
4.2.4. Citoprotektív anyagok indukciója hemproteinekkal kezelt plazmából izolált LDL-lel

Endotheliális sejteket szubletális dózisu, methemoglobinnal kezelt plazmából izolált LDL hatásának tettük ki. A sejtekben erőteljes hem-oxigenáz mRNS indukciót, és enzimaktivitás növekedést tapasztaltunk (20. ábra), mely együtt járt a ferritin szintjének emelkedésével (21. ábra).



20. ábra Hem-oxigenáz mRNS- és fehérjeindukció hemproteinekkal kezelt plazmából izolált LDL hatására

(A-B) Humán umbilikális véna endotheliális sejteket hemmel (80 μ M), ferrohemoglobinnal (20 μ M), methemoglobinnal (20 μ M), illetve metmioglobinnal (80 μ M) előkezelt plazmából izolált LDL mintákkal (50 μ g/ml) kezeltük, majd további 4 órán keresztül lipoprotein mentes médiummal inkubáltuk. RNS-t izoláltunk, elektroforézis és blottolás után a membránokat biotinnal jelölt HO-1 cDNS-ekkel hibridizáltuk. (C) A mintafelvétel egyenletességét a riboszómális RNS alegységeinek egyenletes festődése bizonyítja. (D) A HO-1 enzimaktivitás meghatározásánál a sejteket ugyanúgy kezeltük, mint a Norhern analízisnél. 8 órával az LDL minták eltávolítása után mértük a HO aktivitást. Az eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.



21. ábra Ferritin szintemelkedés hemproteinekkal kezelt plazmából származó LDL hatására

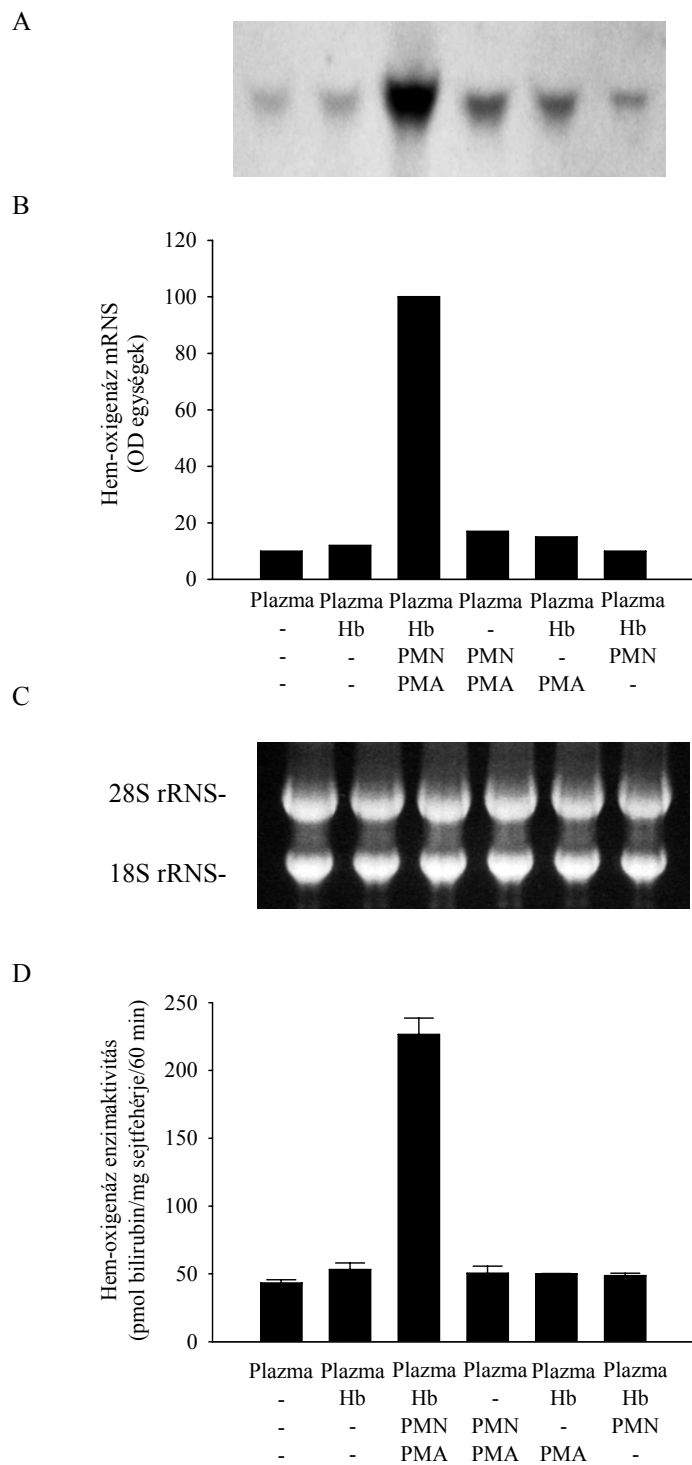
A ferritin mérésénél az endotheliális sejteket a HO indukciónál leírtak szerint kezeltük, majd az LDL minták eltávolítása után 16 órával mértük a sejtek ferritin tartalmát. A feltüntetett adatok 3 duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

A methemoglobinnal inkubált plazmából származó LDL-hez hasonlóan, a hemmel előkezelt plazmából származó LDL is indukálta a hem-oxigenázt. Ezzel szemben a ferrohemoglobinnal előinkubált plazmából szeparált LDL nem változtatta meg a sejtek HO-1 mRNS tartalmát és HO enzimaktivitását. A ferritin fehérje szintjében hasonló irányú változásokat tapasztaltunk. A hemmel előkezelt plazmából izolált LDL megduplázta a ferritin tartalmat, míg a ferrohemoglobinnak nem volt ilyen hatása. Mivel a ferritin

szintézis szabályzása poszttranszkripció szinten zajlik, így ezek a kezelések nem befolyásolták a ferritin két alegységének mRNS szintjeit. A hem-oxigenáz és a ferritin szintézisben bekövetkezett változások nem magyarázhatók az LDL-hez asszociálódott hem jelenlétével, mert a hem az LDL módosulása során degradálódik. Ha antioxidánsokkal megakadályozzuk az LDL oxidációját, nem következik be sem hem-oxigenáz, sem ferritin indukció, annak ellenére, hogy az LDL hem tartalma magas marad.

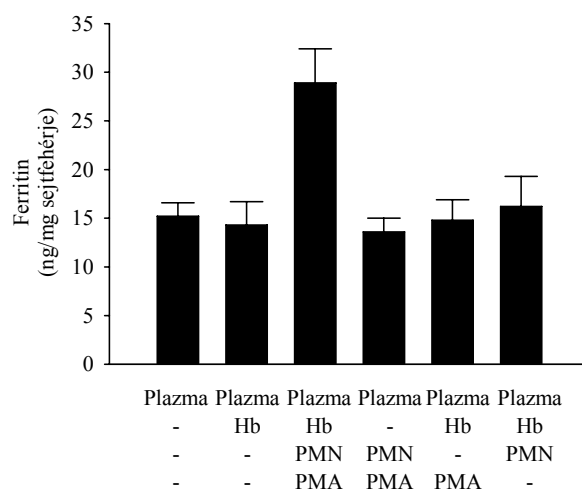
A ferrohémoglobinnal inkubált plazmából származó LDL nem indukálta a citoprotektív géneket, azonban ha a plazmához egyidejűleg aktivált neutrofil granulocitákat is adtunk, akkor az izolált LDL hem-oxigenáz mRNS indukciót és enzimaktivitás fokozódást okozott (22. ábra), ami együtt járt a ferritin szintjének emelkedésével (23. ábra). Ezzel szemben, ha az aktivált neutrofil granulocitákat ferrohémoglobin-mentes plazmához adtuk, nem következett be sem hem-oxigenáz sem ferritin indukció. Ugyancsak nem volt hatása sem a HO, sem a ferritin expresszióra a ferrohémoglobinnal és nyugvó neutrofilokkal inkubált plazmából származó LDL-nek.

A hem-oxigenáz-1 deficiens beteg LDL-jével kezelt egészséges endotheliális sejtek HO-1 enzimaktivitása 163 pmol bilirubin/mg sejtfehérje/60 min volt, szemben a kontrol sejtek 35 pmol bilirubin/mg sejtfehérje/60 min enzimaktivitásával, és a ferritin szint is megduplázódott a beteg LDL-jével kezelt sejtekben (15.4 vs. 26 ng/mg sejtfehérje).



22. ábra Ferrohemoglobint és aktivált neutrofilokat tartalmazó plazmából izolált LDL hem-oxigenáz indukciója

(A-B) Humán umbilikális véna endotheliális sejteket natív LDL-lel, illetve ferrohémoglobinnal (20 μ M), ferrohémoglobinnal és forbol-észterrel (PMA, 500 ng/ml) aktivált neutrofilokkal (10^7 /ml), aktivált neutrofilokkal, ferrohémoglobinnal és nyugvó neutrofilokkal, valamint ferrohémoglobinnal és forbol-észterrel előkezelt plazmákból szeparált LDL mintákkal (50 μ g/ml) kezeltük, majd további 4 órán keresztül lipoprotein mentes médiummal inkubáltuk. RNS-t izoláltunk, elektroforézis és blottolás után a membránokat biotinnal jelölt HO-1 cDNS próbával hibridizáltuk. (C) A mintafelvétel egyenletességét a riboszómális RNS alegységeinek egyenletes festődése bizonyítja. (D) A HO-1 enzimaktivitás meghatározásánál a sejteket ugyanúgy kezeltük, mint a Northern analízisnél. 8 órával az LDL minták eltávolítása után mértük a HO aktivitást. Az eredmények 3, duplikátumban végzett kísérlet átlagai.



23. ábra Ferrohémoglobint és aktivált neutrofilokat tartalmazó plazmából izolált LDL ferritin indukciója

A ferritin mérésénél az endotheliális sejteket az előző ábránál leírtak szerint kezeltük, majd az LDL minták eltávolítása után 16 órával mértük a sejtek ferritin tartalmát. A feltüntetett adatok 3 duplikátumban végzett kísérlet átlagai.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Akut porfíriák kezelésében sikeresen alkalmazzák a hemet, annak ellenére, hogy a kezelésnek gyakran súlyos, az érrendszert érintő mellékhatásai vannak. Hem-arginátot alkalmazva a mellékhatások nem jelentkeznek. Kísérleteinkben a hem-arginát, szemben a hemmel nem fokozta a hidrogén-peroxiddal, illetve aktivált neutrofil granulocitákkal előidézett endotheliális citotoxicitást. A vizsgált hem analógok közül a vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, a vas-koproporfirin III, és a deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol szintén nem szenzitizálta a sejteket. Ezzel szemben a lipid oldékony vas-deuteroporfirin IX fokozta az oxidatív sejtkárosodást.

A hem az LDL oxidatív modifikációját katalizálva is veszélyezteti a vaszkuláris sejtek integritását. A hemmel oxidált LDL toxikus az endotheliális sejtekre. A hemel illetve hem-argináttal katalizált LDL lipid-peroxidáció kinetikája eltér. A hem-argináttal katalizált reakciónál hosszabb a reakció maximális sebességéig eltelt idő (ΔT at V_{max}), és a propagációs fázisban mért maximális sebesség is lassúbb, mint a hemmel katalizált reakcióban. Lipid-peroxidációs termékek koncentrációjának mérésével is bizonyítottuk, hogy a hem-arginát kevésbé képes oxidálni az LDL-t mint a hem. Ennek következtében a hem-argináttal és hidrogén-peroxiddal kondicionált LDL kevésbé volt toxikus humán endotheliális sejtekre, mint a hemmel és hidrogén-peroxiddal kezelt LDL.

Annak ellenére, hogy a hem-arginát nem fokozta az oxidánsok mediálta citotoxicitást, a hemhez és a vas-deuteroporfirinhez hasonlóan bejut a sejtekbe, és hem-oxigenáz mRNS indukciót, valamint HO enzimaktivitás-növekedést okoz. A hem-oxigenáz indukciója együtt jár a ferritin szintjének emelkedésével. Azonban a hasonló mértékű HO indukció ellenére a hem-argináttal kezelt sejtekben a ferritin szintje csak megduplázódott, míg a hemmel kezelt sejtek ferritin szintje hússzorosa volt a kontrolnak. Bilirubin képződés alapján bizonyítottuk, hogy a hem-arginát rosszabb szubsztrátja a hem-oxigenáznak mint a

hem, így a reakcióban kevesebb vas válik szabaddá, ami magyarázhatja a ferritin indukcióban mért különbségeket a hemmel illetve hem-argináttal kezelt sejtek között. A vas-porfirinek nem befolyásolták a sejtek H- és L-ferritin mRNS szintjeit, ami a ferritin szintézis poszttranszkripció szabályzásával magyarázható.

A hem kezelés hatására bekövetkező HO és ferritin indukció a sejteket rezisztenssé teszi egy normál esetben toxikus oxidatív sokkal szemben. Számos tanulmányban bizonyították, hogy a rezisztencia kialakulásáért a ferritin a felelős. A ferritin az oxidatív károsodásban központi szereppel bíró intracelluláris vasat katalitikusan inaktív formában megköti. Hem illetve vas-protoporfirin kezelés hatására a sejtek hem-oxigenáz és ferritin szintje jelentősen megemelkedett, s a sejtek rezisztensek voltak a hemmel és hidrogén-peroxiddal előidézett oxidatív stresszel szemben. Hem-arginát hatására a sejtekben bekövetkező jelentős hem-oxigenáz, de csekély mértékű ferritin indukció nem nyújtott védelmet a hemmel és hidrogén-peroxiddal kiváltott citotoxicitás ellen. A hidrofílebb tulajdonságú vas-porfirinek: a vas-deuteroporfirin IX, 2,4-biszulfonát, a vas-koproporfirin III, és a vas-deuteroporfirin IX, 2,4-diglikol nem indukálták a hem-oxigenázt és a ferritint sem, így az oxidatív rezisztencia sem alakult ki a kezelt sejtekben.

A hem-katabolizmus defektusának súlyos patológiai következményei vannak mind humán HO-1 deficiencia esetén, mind HO-1 knock out egerekben. A hem direkt módon toxikus, ezen túl mi egy másik utat is feltételeztünk, melyben a hem az LDL oxidatív modifikációján keresztül fejti ki károsító hatását. Ezt a feltételezést erősíti, hogy hemmel illetve methemoglobinnal inkubált plazmákból izolált LDL minták toxikusak voltak humán endotheliális sejtekre. Hasonlóan toxikus LDL-t izoláltunk a HO-1 deficiens beteg plazmájából. A toxikus LDL kialakulásában központi szerepe van a ferrohémoglobin methemoglobinná alakulásának, ugyanis a methemoglobinból a hem kiszabadul, míg a

ferrohemoglobinnal nem. A hem disszociációja után a szabad hem csoport képes bejutni az LDL-be annak ellenére, hogy a plazmában magas koncentrációban vannak jelen specifikus és aspecifikus hemkötő fehérjék. A hem-fehérje kötés erősítésével például a cianomethemoglobinnal, vagy haptoglobinhoz kötött methemoglobinnal a hem csoport stabilizálódik, és nem alakul ki toxikus LDL. A hemmel illetve methemoglobinnal inkubált plazmákból származó LDL-ek oxidatív modifikáltságát több módszerrel bizonyítottuk. Az LDL-ekben lipid-peroxidációs termékek jelentek meg, E vitamin tartalmuk és oxidatív rezisztenciájuk lecsökkent, elektroforetikus mobilitásuk fokozódott. A HO-1 deficiens beteg plazmájának spektrális analíziséből kiderült, hogy plazmájában nagyon magas a methemoglobin koncentrációja ($\sim 60 \mu\text{M}$), így nem meglepő, hogy LDL-jének tulajdonságai a methemoglobinnal inkubált plazmából származó LDL tulajdonságaihoz hasonlítottak. A ferrohemoglobin önmagában nem idézte elő az LDL oxidatív modifikációját, azonban aktivált neutrofil granulocitákkal együtt adva a plazmához a szeparált LDL oxidált volt.

Az oxidált LDL endotheliális sejtekben citoprotektív géneket, hem-oxigenázt és ferritint indukál. A hemmel illetve methemoglobinnal kezelt plazmákból izolált LDL hatására humán umbilikális véna endotheliális sejtekben HO-1 mRNS indukciót, és a hem-oxigenáz aktivitás fokozódását tapasztaltuk. E mellett a sejtek ferritin szintje is megemelkedett. A ferrohemoglobinnal kezelt plazmából izolált LDL nem fokozta a hem-oxigenáz és a ferritin expresszióját, azonban aktivált neutrofil granulociták jelenlétében az LDL indukálta a hem-oxigenázt és a ferritint is.

A HO-1 deficiens betegből izolált LDL egészséges humán endotheliális sejtekben fokozta a hem-oxigenáz enzimaktivitást, és a ferritin szintet is megduplázta.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984;219:1-14.
2. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 1989;320:365-375.
3. Repine JE, Fox RB, Berger EM. Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.* 1981;256:7094-7096.
4. Gannon DE, Varani J, Phan SH, et al. Source of iron in neutrophil-mediated killing of endothelial cells. *Lab. Invest.* 1987;57:37-44.
5. Schraufstatter IU, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J. Clin. Invest.* 1988;82:1040-1050.
6. Balla G, Vercellotti GM, Eaton JW, Jacob HS. Iron loading of endothelial cells augments oxidant damage. *J. Lab. Clin. Med.* 1990;116:546-554.
7. 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.
8. Gutteridge JM, Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem. J.* 1988;256:861-865.
9. Eskew JD, Vanacore RM, Sung L, Morales PJ, Smith A. Cellular protection mechanisms against extracellular heme: heme-hemopexin, but not free heme, activates the N-terminal c-jun kinase. *J. Biol. Chem.* 1999;274:638-648.
10. 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.

11. Steinberg D, Parthasarathy A, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase atherogenicity. N. Eng. J. Med. 1989;320:915-924.
12. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. J. Clin. Invest. 1991;88:1785-1792.
13. 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.
14. Wieland E, Parthasarathy A, 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.
15. Morel DW, Hessler JR, Chisholm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. J. Lipid Res. 1983;24:1070-1076
16. Hennig B, Chow CK. Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis. Free Rad. Biol. Med. 1988;4:99-105.
17. Takahashi M, Ikeda U, Masauyama J et al. Monocyte-endothelial cell interaction induces expression of adhesion molecules on human umbilical cord endothelial cells. Cardiovasc. Res. 1996;32:422-429.
18. McEvoy LM, Sun H, Tsao PS, Cooke JP, Berliner JA, Butcher EC. Novel vascular molecule involved in monocyte adhesion to aortic endothelium in models of atherogenesis. J. Exp. Med. 1997;185:2069-2077.
19. 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.

20. 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.
21. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today.* 1990;11:97-101.
22. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:2995-2998.
23. Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis.* 198;8:348-358.
24. Steinbecher UP, Loughed 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.
25. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* 1990;85:1260-1266.
26. Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation.* 1997;96:3264-3265.
27. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 1994;344:793-795.
28. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J. Biol. Chem.* 1997;272:21654-21659.

29. Steinberg D. Low density lipoprotein and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 1997;272:20963-20966.
30. Andrews HE, Bruckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M. Low density lipoprotein inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature.* 1987;327:237-239.
31. Chin JH, Azhar S, Hoffmann BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J. Clin. Invest.* 1992;89:10-15.
32. Mangin EL, Kugiyama K, Nguy JH et al. Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoproteins on endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Circ. Res.* 1993;72:161-166.
33. Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F et al. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation.* 1996;93:1647-1650.
34. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature.* 1990;344:254-257.
35. Ananyeva NM, Tjuri AV, Berliner JA et al. Oxidized LDL mediates the release of fibroblast growth factor-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:445-453.
36. Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1989;9:567-578.
37. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R et al. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992;339:883-887.
38. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autooxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J. Lipid Res.* 1987;28:495-509.

39. Streinbecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation of endothelial cell modification of LDL : correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis*. 1987;1:135-143.
40. 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.
41. Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B 100. *J. Lipid Res.* 1987;28:1466-1477.
42. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76:333-337.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Shibahara S, Yoshida T, Kikuchi G. Induction of heme oxygenase by hemin in cultured pig alveolar macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 1978;188:243-250.

47. 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.
48. Keyse SM, Tyrell 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.
49. Taylor JL, Carraway MS, Piantadosi CA. Lung-specific induction of heme oxygenase-1 and hyperoxic lung injury. *Am. J. Physiol.* 1998;274:582-590.
50. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, et al. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J. Clin. Invest.* 1992;90:267-270.
51. 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.
52. 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.
53. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrell RM. Heme oxygenase-1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91:2607-2610.
54. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987;235:1043-1046.
55. 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.

56. Graser T, Vedernikov 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.
57. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* 1987;32:497-504.
58. Balla G, Jacob HS, Balla J, et al. Ferritin: A cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.* 1992;267:18148-18153.
59. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996;1275:161-203.
60. 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;103:129-135.
61. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme-oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:10925-10930.
62. 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.
63. Paganga G, Rice-Evans C, Rule R, Leake D. The interaction between ruptured erythrocytes and low-density lipoproteins. *FEBS Lett.* 1992;303:154-158.
64. Miller YI, Shaklai N. Oxidative crosslinking of LDL protein induced by hemin: involvement of tyrosines. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994;34:1121-1129.
65. 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.

66. Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1994;269:20394-20400.
67. Miller YI, Shaklai N. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1454:153-164.
68. 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.
69. 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.
70. Giulivi C, Cadenas E. Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;24:269-279.
71. 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.
72. Bloomer JR, Bonkowsky HL. The porphyrias. *Dis. Mon.* 1989;351:1-54.
73. Moore MR, McColl KE, Fitzsimons EJ, Goldberg SA. The porphyrias. *Blood Rev.* 1990;4:88-96.
74. Bonkowsky HL, Tscuhdy DP, Collins A et al. Repression of the overproduction of porphyrin precursors in acute intermittent porphyria by intravenous infusion of hematin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971;68:2725-2729
75. Watson CJ, Pierach CA, Bossenmaier I, Cardinal R. Postulated deficiency of hepatic heme and repair by hematin infusions in the inducible hepatic porphyrias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977;77:2118-2120.

76. Lamon JM, Frykholm BC, Bennett M, Tschudy DP. Prevention of acute porphyric attacks by intravenous haematin. *Lancet*. 1978;2:492-494.
77. McColl KE, Moore MR, Thompson GG, Goldberg A. Treatment with haematin in acute hepatic porphyria. *Q. J. Med.* 1981;50:161-174.
78. Bissell DM. Treatment of acute hepatic porphyria with hematin. *J. Hepatol.* 1988;6:1-7.
79. Dhar GJ, Bossenmaier I, Cardinal R, Petryka ZJ, Watson CJ. Transitory renal failure following rapid administration of a relatively large amount of hematin in a patient with acute intermittent porphyria in clinical remission. *Acta.Med. Scand.* 1978;203:437-443.
80. Morris DL, Dudley MD, Pearson RD. Coagulopathy associated with hematin treatment of acute intermittent porphyria. *Ann. Intern. Med.* 1981;95:700-701.
81. Glueck R, Green D, Cohen I, Tsao CH. Hematin: unique effects of hemostasis. *Blood*. 1983;61:243-249.
82. Peterson JM, Pierach CA. Hematin-induced hemolysis in acute porphyria. *Ann. Intern. Med.* 1984;101:877-878.
83. Khanderia U. Circulatory collapse associated with hemin therapy for acute intermittent porphyria. *Clin.Pharm.* 1986;5:690-692.
84. Goetsch CA, Bissell DM. Instability of hematin used in the treatment of acute hepatic porphyria. *N. Engl. J. Med.* 1986;315:235-238.
85. Tenhunen R. A new drug for porphyria. *Nord. Med.* 1986;101:032-133.
86. Tokola O, Linden IB, Tenhunen R. The effects of haem arginate and haematin upon the allylisopropylacetamide induced experimental porphyria in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 1987;61:75-78.

87. Mustajoki P, Tenhunen R, Tokola O, Gothoni G. Haem arginate in the treatment of acute hepatic porphyrias. *Br. Med. J.* 1986;293:538-539.
88. Herrick AL, McColl KE, Moore MR, Cook A, Goldberg A. Controlled trial of haem arginate in acute hepatic porphyria. *Lancet.* 1989;1:1295-1297.
89. Nordmann Y, Deybach JC. Acute attacks of hepatic porphyria: specific treatment with heme arginate. *Ann. Med. Interne.* 1993;144:165-167.
90. Balla J, Nath K, Balla G, Juckett MB, Jacob HS, Vercellotti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction in rat lung by hemoglobin in vivo. *Am. J. Physiol.* 1995;268:321-327.
91. 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.
92. Belcher JD, Balla J, Balla G, et al. Vitamin E, LDL, and endothelium. Brief oral vitamin supplementation prevents oxidized LDL-mediated vascular injury in vitro. *Arterioscler. Thromb.* 1993;13:1779-1789.
93. 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.
94. Jiang ZY, Hunt JV, 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.
95. Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Muno HN. Regulation of ferritin and heme-oxygenase synthesis in rat fibroblast by different forms of iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88:688-692.
96. Bunn HF, Jandl JH. Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. *J. Biol. Chem.* 1968;243:465-475.

97. Weiss SJ. Neutrophil-mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. The role of superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1982;257:2947-2953.
98. Dallegri F, Ballestrero A, Frumento G, Patrone F. Augmentation of neutrophil-mediated erythrocyte lysis by cells derived in vitro from human monocytes. *Blood.* 1987;70:1743-1749.

7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS and Vercellotti GM: Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword – promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood*, 95:3442-3450, 2000.

Impakt faktor: 8.977

2. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G: Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, in press, 2002.

Impakt faktor: 8.977

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

3. Nógrádi N, Pócsi I, Katona E, Jeney V, Boross P, Tözsér J, Facht J and Szentirmai A: Intracellular and extracellular cyclodextrin glycosyltransferases of *Bacillus macerans* show identical enzymological characteristic and antigenecity. *J. Basic Microbiol.* 36: 335-340, 1996.

Impakt faktor: 0.613

4. Ujhelyi L, Balla G, Muszbek L, Kakuk G, Jeney V, Jacob H, Vercellotti M, Balla J: Új klinikai kémiai módszer a low-density lipoprotein oxidatív rezisztenciájának mérésére: alkalmazása hemodializált, végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegeknél. *Magyar Belorvosi Archivum*, 52:243-247, 1999.

5. Szegedi A, Jeney V, Dobolyi A, Balla J, Hunyadi J, Balla G: Humán endothel sejtek és keratinocyták oxidatív károsító hatásokkal szemben mutatott érzékenységének vizsgálata és összehasonlítása. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle*, 5:201-204, 1999.

6. Bereczki D, Balla G, Csiba L, Jeney V, Valikovics A, Magyar T and Balla J: A possible role of decreased oxidative resistance of low-density lipoproteins in the early formation of carotid atherosclerosis. *Medical Hypotheses*, 56:694-696, 2001.

Impakt faktor: 0.760

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK

1. Jeney V, Balla J, Balla G: Modifikált LDL biológiai hatása vasculáris endothel sejtekre; az LDL oxidáció gátlása. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 4. Munkaértekezlete*, Eger, 1999.

2. Balla J, Balla G, Kakuk G, Jeney V, Ujhelyi L, Jacob HS and Vercellotti GM: Iron-protoporphyrin IX associated with arginate does not serve as a free radical catalyst but induces cytoprotectants in endothelial and tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 15:19A, 2000.

Impakt faktor: 2.056

3. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Balla G: Az LDL oxidációja a hemoxigenáz-1 deficiencia patomechanizmusában. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete*, Sárospatak, 2001.

EGYÉB ABSZTRAKTOK

4. Balla J, Balla G, Kakuk G, Jeney V, Ujhelyi L, Nath K and Vercellotti GM: Hemoglobin induced upregulation of heme oxygenase and ferritin in rat lung and kidney in vivo to prevent oxidant damage. *Nephrol Dial Transplant*, 14:41A, 1999.

Impakt faktor: 2.056

5. Ujhelyi L, Balla J, Kakuk G, Muszbek L, Jeney V, and Balla G: Alteration of oxidative resistance of low-density lipoprotein by hemodialysis treatment. *VIIIth Annual Clinical Nephrology Meetings Abstract book*, 8:45A, Washington D.C., 1999.

6. Ujhelyi L, Balla J, Jeney V, Varga Z, Kakuk G and Balla G: Uremic metabolites protect against oxidative modification of low-density lipoprotein. *Nephrol Dial Transplant*, 15:166A, 2000.

Impakt faktor: 2.056