

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Humán podocyták
hem stresszre adott válaszreakciói

dr. Bányai Emese

Témavezető: dr. Jeney Viktória



Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	5
3. Bevezetés.....	7
4. Irodalmi áttekintés	9
4.1. A vese kiválasztó működése	9
4.1.1. A glomerulus felépítése.....	9
4.1.2. A podocyta szerepe	10
4.2. Intravaszkuláris hemolízis	12
4.2.1. Az intravaszkuláris hemolízis klinikai megjelenési formái.....	12
4.2.2. A Hb oxidációja és a hem disszociációja.....	13
4.2.3. Szisztémás és celluláris védelem az intravaszkuláris hemolízis során felszabaduló hem tartalmú molekulákkal szemben	14
4.2.4. Hemolízis és az akut vesekárosodás.....	18
4.3. A Hb-formák és a hem prooxidáns és proinflammatorikus hatásai	19
4.3.1. A hem prooxidáns jellege, a hem mint Fenton reagens.....	19
4.3.2. A hem proinflammatorikus jellege, a hem mint veszély asszociált molekuláris mintázat (DAMP)	20
4.3.3. Az oxidált Hb-formák prooxidáns és proinflammatorikus hatásai	21
5. Célkitűzések.....	23
6. Anyagok és módszerek	24
6.1. Humán podocyta sejtvonal tenyésztése	24
6.2. Humán umbilikális véna endothelsejtek (HUVEC) tenyésztése	25
6.3. Immunfluoreszcens festés.....	25
6.4. Time-lapse imaging videomikroszkópia	26
6.5. Humán veséből származó szövetminta immunhisztokémiai festése	26
6.6. Giemsa festés.....	27
6.7. Sejtmagok preparálása és a kromatin struktúra vizsgálata	27
6.8. Antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata	27
6.8.1. GPX aktivitás meghatározása	28
6.8.2. SOD aktivitás meghatározása	28
6.8.3. Kataláz aktivitás meghatározása	28
6.9. Western blot analízis	28

6.10. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)	29
6.11. Humán L-ferritin mérés ECLIA technikával	30
6.12. A podocyta citotoxicitásának vizsgálata	30
6.13. Tiobarbitursav reaktív anyagok meghatározása	30
6.14. ROS-termelés vizsgálata	31
6.15. Egér kísérletek	31
6.16. Hemoglobin-koncentráció meghatározása spektrofotometriás módszerrel egér plazmából és vizeletből	31
6.17. Hemoglobinok preparálása	31
6.18. Statisztika	32
7. Eredmények	33
7.1. Extracelluláris Hb, oxidált Hb-formák és szabad hem megjelenése egér plazmában és vizeletben steril hemolízist követően	33
7.2. A podocyta sejtvonal osztódásával és terminális differenciálódásával kapcsolatos vizsgálatok	35
7.2.1. A podocyta osztódása és differenciálódása	35
7.2.2. A sejtmag növekedése és a kromatin szerkezet változása a differenciálódás folyamata alatt	39
7.3. Hem hatása az endothelsejtek és a podocyta oxidatív stressztűrő képességére és ROS termelésére	41
7.3.1. Hem hatása az endothelsejtek és a podocyta oxidatív stressztűrő képességére	41
7.3.2. Hem hatása endothelsejtek és podocyta ROS termelésére	42
7.3.3. A hem indukálja a HO-1 mRNS és fehérje expresszióját endothelsejtekben és podocytaiban	43
7.3.4. A különféle oxidáltsági állapotú Hb-formák hatása az endothelsejtek és a podocyta HO-1 mRNS és fehérje expressziójára	44
7.3.5. A hem és a Hb-formák hatása a ferritin fehérje expressziójára endothelsejtekben és podocytaiban	45
7.3.6. Az oxidatív rezisztencia változása a podocyta differenciációja során	48
7.3.7. Az antioxidáns védelmi mechanizmusok változása a podocyta érése során	50
7.3.8. A FtH expressziójának változása a podocyta differenciációja során	51
8. Diskusszió	53
9. Konklúziók	60
10. Összefoglalás	62
11. Summary	64
12. Tárgyszavak/Keywords	65

13. Köszönetnyilvánítás.....	66
14. Irodalomjegyzék	67
15. Publikációs lista	76
16. Függelék.....	78

2. Rövidítések jegyzéke

ASC: apoptózis-asszociált fehérje

BCA: bicinkoniniksav

CD163: differenciációs klaszter-163

CKD: krónikus veseelégtelenség

CM: komplett médium

DAB: diamino-benzidin

DAMP: veszély/sejtkárosodás asszociált molekuláris mintázatok

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCF: 2',7'-dichlorofluorescein

DIC: disszeminált intravaszkuláris koaguláció

ECLIA: elektrochemilumineszcens immunoassay

FBS: magzati szarvasmarha szérum

FCS: magzati borjú szérum

FD: fluoreszcens jelintenzitás

FHb: ferrilhemoglobin

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

FtL: L-ferritin

FtH: H-ferritin

G6PD: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

GBM: glomeruláris bazálmembrán

GPX: glutation-peroxidáz

GR: glutation-reduktáz

GSH: redukált glutation

H₂DCFDA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát

HBSS: Hank féle pufferolt sóoldat

Hb: hemoglobin

HMOX: hem oxigenáz-1 gén

HUS: hemolitikus urémiás szindróma

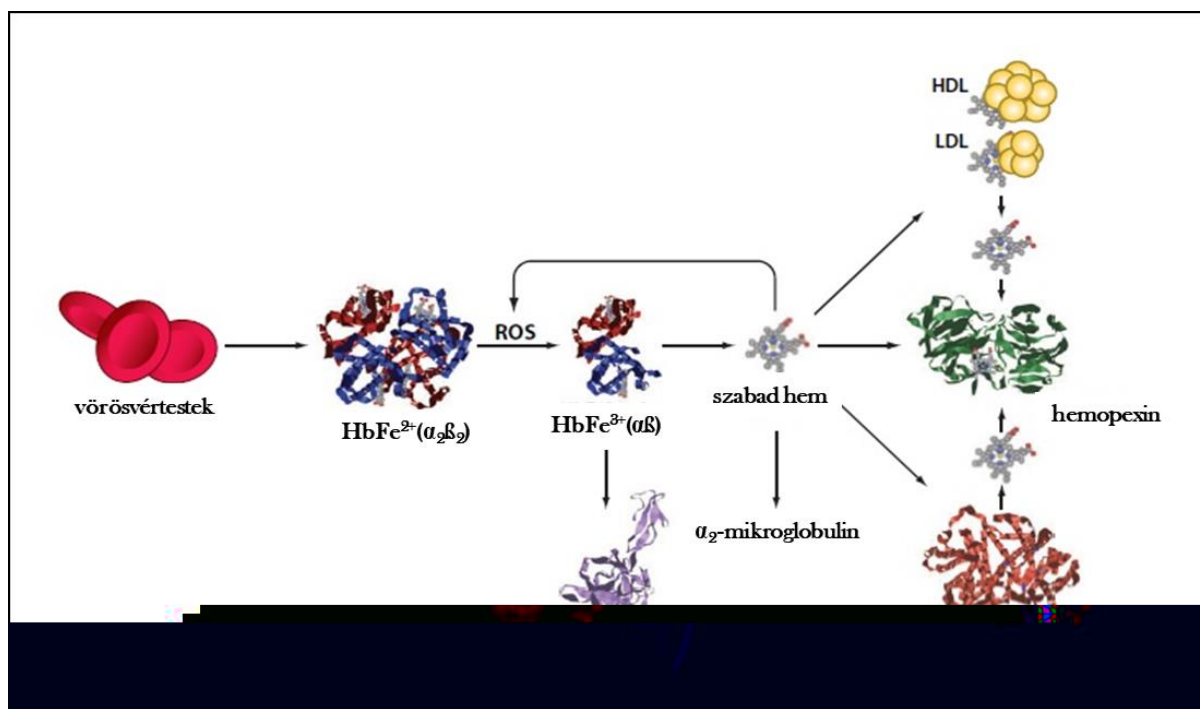
HO-1: hem oxigenáz-1 enzim

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HUS: hemolitikus urémiás szindróma
HUVEC: humán umbilikális véna endothelsejt
Hp: haptoglobin
HRP: tormaperoxidáz
Hx: hemopexin
ICAM: intercelluláris adhéziós molekula
IL: interleukin
LPS: lipopoliszacharid
MetHb: methemoglobin
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NADPH: redukált nikotinsavamid–adenin-dinukleotid-foszfát
NLRP3: Nod-like receptor család pyrin domént hordozó fehérje 3
OD: optikai denzitás
PAMP: patogén asszociált molekuláris mintázatok
PBS: foszfát puffer
PHZ: fenilhidrazin
PNH: paroxizmális nochtornális hemoglobinuria
ROS: reaktív oxigén gyökök
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 sejtenyésztő médium
SDS: nátrium-dodecyl szulfát
SOD: szuperoxid-dizmutáz
TBARS: tiobarbitursav-reaktív vegyületek
TBS-T: Tween 20-tartalmú Tris puffereelt sóoldat
TLR4: Toll-szerű receptor-4
TNF α : tumor nekrosis faktor-alfa
TTP: thrombotikus thrombocytopeniás purpura
Tris: tris-hidroximetil-aminometán
VCAM: vaszkuláris sejt adhéziós molekula
WT-1: Wilms-tumor-1 antigén

3. Bevezetés

Az oxigén-szállító hemoglobin (Hb) molekula számára a vörösvértesteken belüli mikrokörnyezet védelmet jelent a szervezetben folyamatosan képződő reaktív oxigéngyökök (ROS) oxidatív hatásával szemben. Intravaszkuláris hemolízissel járó kórállapotokban azonban a Hb az extracelluláris térbe jut. Az extracelluláris térben jelenlévő Hb potenciálisan veszélyes, ugyanakkor magas vastartalmánál fogva értékes molekula, keringésből való eltávolítását a plazma akut fázis fehérjéje, a haptoglobin (Hp) végzi. Masszív intravaszkuláris hemolízis esetén a plazma extracelluláris Hb tartalma meghaladhatja a Hp kötőkapacitását, mely a Hb plazmában való akkumulációját idézi elő. A plazmában jelenlévő oxidatív környezetben a Hb oxidációja következik be, amikor is különféle oxidációs állapotú Hb-formák megjelenésével kell számolnunk. Az oxidált Hb-formák közös tulajdonsága, hogy a hem prosztetikus csoportot a Hb-nál gyengébben kötik, mely a hem disszociációjához vezet (1. ábra).



1. ábra A vörösvértestekből szabadává váló hemoglobin sorsa

A vörösvértestekből a plazmába kerülő Hb ROS-ok hatására oxidálódik. A szabad Hb-t a haptoglobin köti meg és távolítja el a keringésből. Az oxidált Hb-ról könnyedén ledisszociál, így szabadává váló hem csoportot a hemopexin segít eltávolítani a keringésből, de más fehérjékhez is képes kötődni (pl. α₁-mikroglobulinhoz, albuminhoz, lipoproteinekhez). *Forrás: Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010;50:323-5.*

A hem egy prooxidáns és proinflammatorikus tulajdonságú molekula, plazmából való eliminációját a plazma hemkötő akut fázis fehérjéje, a hemopexin (Hx) végzi, melynek a Hp-hoz hasonlóan véges a kapacitása, így masszív intravaszkuláris hemolízist követően a hem akkumulálódik a plazmában (*1. ábra*). Intravaszkuláris hemolízis esetén az ereket bélelő endothelsejtek tekinthetők a plazmában akkumulálódó Hb-formák és a hem elsődleges celluláris célpontjának. A hemről ismert, hogy az endothelsejteket nagymértékben érzékenyíti oxidatív stresszel szemben, mely hatásért a hemben található vas-ion tehető felelőssé. Az oxidált Hb-formák pedig endothelsejt aktivációt indukálnak.

Masszív intravaszkuláris hemolízist követően a plazmában akkumulálódó Hb és a hem egy része a vesén keresztül a vizeletbe szűrődik át, és feltételezzük, hogy ezek a molekulák nephrotoxikus hatásuk révén közvetlenül hozzájárulnak a hemolitikus betegségeket kísérő akut veseelégtelenség kialakulásához.

A podocyták hosszú életű, a vese szűrőfunkciójában jelentős szerepet betöltő sejtek, azonban hem stressz tűrő képességük kevésbé ismert. Munkánk során így azt a célt tűztük ki, hogy a podocyták Hb-formákra illetve hem stresszre adott válaszát vizsgáljuk, és összehasonlíjuk az irodalomban sokkal részletesebben tanulmányozott endothelsejt hem stresszre adott válaszaival.

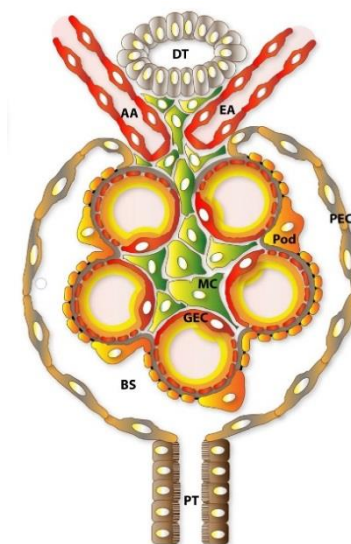
4. Irodalmi áttekintés

4.1. A vese kiválasztó működése

4.1.1. A glomerulus felépítése

A vese feladata a szervezetben képződő anyagcsere végtermékek eltávolítása a vérből. A vese funkcionális egysége a nefron, melyből egy emberi vese 1-2,5 milliót tartalmaz¹. A nefronnak része a glomerulus (2. ábra). Az itt kiválasztódó elsődleges szűrlet fehérjétől és alakos elemektől mentes ultrafiltrátum, melynek képződése a glomeruláris kapillárisok és a Bowman-tok között kialakult szemipermeábilis membránon keresztül valósul meg. Ezt a szemipermeábilis membránt alkotja a fenesztrált endothelsejtek, a glomeruláris bazálmembrán és a podocyták (vagy visceralis epithelsejtek) hármassága. A vér az afferens arteriolán keresztül jut a glomeruláris kapillárisok hálójába, majd az efferens arteriolán távozik.² A kettő között fennálló magas hidrosztatikai nyomás, valamint a koncentráció grádiens a hajtóereje a kis molekulák (víz, ionok, aminosavak, glükóz, urea, stb.) távozásának, míg a nagyméretű plazmafehérjéket (pl. albumin, hemoglobin, stb.) a membrán nem engedi át. A glomeruláris kapillárisok endothelsejtjei transzcelluláris pórusokat tartalmaznak, ezeket nevezik fenesztráknak³. A fenesztrák az endothelsejtek felszínének kb. 20%-át teszik ki². A makromolekulák tekintetében a fenesztrált és a nem fenesztrált endothelsejtek permeabilitása azonos mértékű⁴. A glomeruláris kapillárisok lumenét és a fenesztrák felszínét a negatív töltésű glycocalyx borítja, mely plazmakomponenseket adszorbeál a felszínen kialakítva ezzel az endothelt fedő sejtfelszíni réteget. Az endothelsejtek a glomerulus fejlődése során a podocyták differenciálódásának csak késői fázisában jelennek meg, azonban fontos szerepet töltenek be a podocyták életben maradásában⁵.

A mesangium a glomerulus középpontjában helyezkedik el. A mezangiális sejtek nem közvetlenül, de kontaktusban állnak a podocytákkal: a podocyták károsodása mezangiális sejtproliferációhoz vezet, míg a mezangium károsodása a podocyták leválásához és következményes proteinúrához. Fontos szerepet töltenek be a glomerulus fejlődésében és a podocyták differenciálódásában⁶.



2. ábra A glomerulus anatómiai felépítése

Az ábra a glomerulust felépítő négyféle sejtípust szemlélteti. A fenesztrált endothelsejtek, a podocyták és a közöttük elhelyezkedő bazálmembrán egy szemipermeábilis membránt alkotnak. A mesangiális sejtek és a mezangiális mátrix szerkezeti megerősítést nyújtanak a glomeruláris érgomolyag számára.

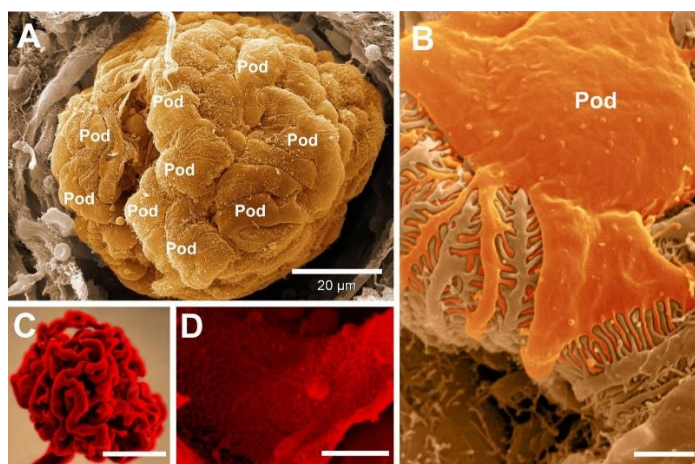
Pod: podocyt, PEC: parietalis epithel sejt, MC: mezangiális sejt, GEC: glomeruláris endothelsejt, BS: Bowman-tok ürege, PT: proximális tubulus, DT: disztális tubulus, AA: afferens arteriola, EA: efferens arteriola.

(Forrás: Rizaldy P. Scott and Susan E. Quaggin: *The cell biology of renal filtration*. 2015; *J. Cell Biol.* Vol. 209; No. 2: 199–210)

4.1.2. A podocyták szerepe

A fejlődés során az ureterbimbó hatására a nem differenciált mesenchymából alakulnak ki a podocyták⁶. Glomerulusonként átlagosan 550 podocytá található⁷. Az S-alakú testecske létrejöttének stádiumában figyelhetők meg legkorábban podocyták, melyek már expresszálják a podocytákra jellemző nefrin és podocin fehérjéket^{8–10}. Ezek a korai podocyták vaszkuláris endotheliális növekedési faktort termelnek, melynek hatására megindul az endothelsejtek bevándorlása az S-alakú vesekezdeménybe. Ebben a stádiumban a podocyták még hengerhámhoz hasonló sejtréteget alkotnak. A sejtek közötti laterális összeköttetések azonban a fejlődés előrehaladtával felbomlanak, kialakulnak a lábnyúlványok és a podocyták vándorolni kezdenek a kapillárisok mentén⁵. A podocyták végleges, érett fenotípusa epitheliális és mesenchymalis jellegeket is hordoz¹¹. A podocyták terminális differenciálódása szintén a fejlődési folyamat során következik be. A sejtciklus működését serkentő fehérjék expressziója csökken, míg a sejtciklust gátló fehérjéké (p27, p57) nő, mely folyamatok összesége vezet el a sejtciklus leállításához és a postmitotikus állapot kialakulásához az érett differenciált podocytáknál¹².

A differenciált podocyták sejtszerkezete igen különleges, csillag alakú sejttestjükből polipoid lábnyúlványok (pedicelek) nőnek ki, melyek faágszerűen elágaznak. Megfigyelhetők kisebb (másodlagos) és nagyobb méretű (elsődleges) nyúlványok egyaránt. Az elsődleges nyúlványok mikrotubulusokat és intermedier filamentumokat tartalmaznak, míg a másodlagos pedicelek aktin filamentekben gazdagok és fokális adhéziokon keresztül horgonyozzák ki a podocytaikat a glomeruláris bazálmembránhoz (GBM)¹³. A podocyta sejttestje és lábnyúlványai egymáshoz fésűfogszerűen illeszkedve beborítják a glomeruláris kapillárisok felszínét (3. ábra).² A szomszédos podocyta egymással érintkező másodlagos lábnyúlványai között jön létre a résdiafragma, melyet speciális intercelluláris junkciók alkotnak. A résdiafragma egy szerkezetileg porózus terület, mely szelektíven képes visszatartani a nagy molekulatömegű plazmafehérjéket a képződő ultrafiltrátumból. A résdiafragmát alkotó fehérjék között található két, a podocytaakra nézve karakterisztikus fehérje, a nefrin és a podocin. A lábnyúlványok leválása egyértelmű jele a podocyta károsodásának és szorosan összefügg az albuminuria és a proteinuria megjelenésével².



3. ábra A glomerulus anatómiai felépítése

(A) A pásztázó elektronmikroszkóppal készült felvételen látható a glomerulus, melyben a podocyta teljes egészében beborítja a kapillárisok felszínét. (B) A képen egy podocyta látható nagy nagyításban a szerteágazó és egymásba fonódó lábnyúlványaival. (C) A glomeruláris érgomolyag öntvény modellje a kapillárisrendszer tekervényes felépítését szemlélteti (F. Hossler felvétele, East Tennessee State University, Johnson City, TN). (D) A pásztázó elektronmikroszkóppal készült felvételen a glomeruláris kapilláris felszíne látható a pórusokkal (fenesztrákkal). Mércé (A) 20 μm , (B-D) 1 μm , (C) 50 μm .

(Forrás: Rizaldy P. Scott and Susan E. Quaggin: *The cell biology of renal filtration*. 2015; *J. Cell Biol.* Vol. 209; No. 2: 199–210)

4.2. Intravaszkuláris hemolízis

4.2.1. Az intravaszkuláris hemolízis klinikai megjelenési formái

Számos hematológiai betegségnek lehet elsődleges vagy másodlagos kóroki tényezője az intravaszkuláris hemolízis. A vörösvértestek szétesése elsődleges kóroki tényező sarlósejtes anémiában, thalasszémiában, paroxizmális nocturnális hemoglobinuriában (PNH), valamint glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz deficienciában (G6PD). Másodlagos kóroki tényező az intravaszkuláris hemolízis hemolitikus urémiás szindrómában (HUS) és thrombotikus thrombocytopeniás purpurában (TTP).

Sarlósejtes anémiában a krízis során a plazmában mérhető szabad Hb és szabad hem koncentrációja elérheti a 25 μM -t (alapállapotban 5-10 μM a plazmában a Hb-szint ezeknél a betegeknél). A plazma Hb- és hemkötő fehérjéi, a Hp és a Hx ekkora koncentrációk mellett depletálódnak, teljes mértékben eltűnnek a keringésből¹⁴. Egyes feltételezések szerint a szabad Hb-nak és a szabad hemnek jelentős szerepe lehet a vaszkuláris komplikációk kialakulásában sarlósejtes betegeknél. Ebben a prooxidatív környezetben a Hb-ból metHb képződik, mely könnyen elengedi a hem-csoportot (*l. ábra*). Hp és Hx hiányában a szabad hem a plazma egyéb komponenseihez kötődhet, mint például albumin vagy lipoproteinek (*l. ábra*). A hem hidrofób jellegének köszönhetően átjuthat a sejtmembránokon, bejuthat az endothelsejtek citoplazmájába. A TLR-4 útvonal aktiválásán keresztül proinflammatorikus és prothrombotikus választ indít el elősegítve ezzel a vér alakos elemeinek összetapadását és az érelzáródás kialakulását^{15,16}.

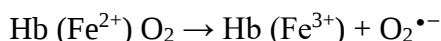
A megközelítőleg 40 napon túl tárolt vérkészítmények beadásakor fokozott a veszélye az akut hemolitikus transzfúziós reakció kialakulásának, mivel a tárolás során a vörösvértestek fragilissá és az immunválasszal szemben sérülékenyebbé válnak¹⁷. *In vivo* állatkísérletben tengerimalacokat masszív vérátömlesztésben részesítettek, melynek következtében poszttranszfúziós hemolízis következett be. A szabad Hb-szint a plazmában és az állatok vizeletében is magas volt, emellett akut veseelégtelenség, hipertenzió és vaszkuláris károsodás alakult ki. Amennyiben az állatok a transzfúzióval egyidőben Hp-t is kaptak intravénásan, a vaszkuláris és a vesekárosodás mértéke nem volt olyan kifejezett. Ezek a vizsgálatok alátámasztják a Hp szerepét az intravaszkuláris hemolízis által előidézett renális tubuláris károsodás kivédésében¹⁷.

Súlyos bakteriális infekció, parazita-infekció (malária) és szepszis esetén is kialakulhat hemolízis. Megfigyelték, hogy a Hx depléciója esetén ezen betegségek kimenetele súlyosabb, akár halálos is lehet¹⁸. A hem képes aktiválni a veleszületett immunrendszert a

mintázatfelismerő receptoron keresztül (TLR-4) a mikrobiális termékekkel, az endogén proinflammatorikus ligandokkal vagy a peroxidok okozta szöveti károsodással szinergista módon hatva¹⁹. A Hx képes enyhíteni a szabad hem toxikus hatását szepszisben¹⁸ azáltal, hogy gátolja a hem peroxidáz aktivitását, a veleszületett immunrendszer aktiválódását, elősegíti a szabad hem felvételét a májban, továbbá megakadályozza, hogy a baktériumok számára elérhető legyen a hem vastartalma²⁰. A Hx képes megakadályozni a gyulladásos citokinek felszabadulását az LPS-sel aktivált makrofágokból²¹. A malária egér modelljében igazolták, hogy a Hb/hem okozta oxidatív károsodás és a NO-deplécio szerepet játszik celebrális malária kialakulásában^{21–25}.

4.2.2. A Hb oxidációja és a hem disszociációja

Élettani körülmények között a Hb 1-2%-a metHb formában van jelen. Amikor az oxigén a hem-csoporthoz kapcsolódik, az oxigén egyik párosítatlan elektronja párt kap a Fe^{2+} -iontól, így az elektronvándorlás következtében Fe^{3+} -ion és szuperoxid-anion jön létre (1. táblázat). A szuperoxid-aniont a SOD-enzim H_2O_2 -dá alakítja. A H_2O_2 -dal való találkozáskor a Hb-ből két-elektronos oxidáció révén ferrilHb keletkezik ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$), a metHb-ből pedig ferrilHb-gyök ($\text{Hb}^{\bullet+}(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$) jön létre, melyben a párosítatlan elektron a globin-lánccal vagy a profirin-gyűrűvel reagál.



A ferrilHb további globin-gyökök létrehozására képes a ferril-ion és a globin molekula egyes aminosav oldalláncai ($\alpha\text{Tyr-24}$, $\alpha\text{Tyr-42}$, $\alpha\text{His-20}$, $\beta\text{Tyr-35}$, $\beta\text{Tyr-130}$, és $\beta\text{Cys-93}$) között megvalósuló intramolekuláris elektrontranszferen keresztül. Így jön létre a metHb-gyök²⁶. Arra is van bizonyíték, hogy az antioxidáns rendszerek működése ellenére intakt vörösvértestekben is létrejöhet ferrilHb, melynek különleges jellemzője a globin-láncokon képződő tirozil-gyökök közötti kovalens kötással létrejövő ditirozil-oldallánc. A ferrilHb tulajdonképpen globin-gyökök, porfirin-gyökök és keresztkötött hemoglobin-multimerek összessége²⁶.

Az erek falán növekvő atheroma lipidösszetevői, illetve az oxLDL-ből képződő lipidhidroperoxidok szintén képesek a hemoglobinnal metHb-t, ferrilHb-t vagy más kovalensen keresztkötött hemoglobinformát létrehozni^{27,28}. Keresztkötött hemoglobinformák jelenlétét *in*

vivo több kórállapotban is leírták, például subarachnoidealis vérzést követően a likvorban²⁹, vagy az érfal komplikált atherosclerotikus lézióiban²⁸.

A hemben található Fe^{2+} hat ligandum atom fogadására képes. Ezek közül négy ligandum atomot a porfirin váz négy nitrogénje biztosít. Az 5. koordinációs pozícióba a globin által biztosított hisztidin oldallánc nitrogénje kötődik, a 6. koordinációs helyre pedig az O_2 molekula kötődik be. A vas oxidációja következtében a hem elveszíti O_2 -kötő képességét, és lazul a globin-Fe kötés is, ennek következtében a hem-csoport disszociálhat a globinról.

Hb forma neve	Oxidáció módja	A hemvas oxidációs állapota	Tulajdonságok
Hemoglobin (Hb)	Az autooxidációtól védve tároljuk	+2	reverzibilis O_2 kötés
Methemoglobin (MHb)	$1e^-$ átvitelrel járó oxidáció a hem vas részvételével $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -tal előidézve	+3	nincs O_2 kötés hem disszociáció
Ferrilhemoglobin (FHb)	$2e^-$ átvitelrel járó oxidáció a hem vas részvételével H_2O_2 -dal előidézve	$+4 \rightarrow +3$, intramolekuláris e^- transzfer	Nem homogén kémiai entitás: globingyökök, porfiringyökök, globin-globin adduktok, globin-porfirin adduktok

1. táblázat A szervezetben előforduló hemoglobinformák és tulajdonságaik

4.2.3. Szisztémás és celluláris védelem az intravaszkuláris hemolízis során felszabaduló hem tartalmú molekulákkal szemben

A sejtek aerob anyagcsere folyamatában számos ponton keletkeznek reaktív oxigéngyökök, melyek kis mennyiségben nélkülözhetetlenek a sejtek differenciálódásához, az apoptózis lezajlásához, a sejtproliferációhoz és egyes jelátviteli utak működéséhez. Nagy mennyiségben viszont citotoxikusak, sejthalált, kromoszóma aberrációkat okozhatnak, illetve karcinogenezist indukálhatnak, mivel képesek károsítani a sejtek DNS állományát, a fehérjéket és a lipideket egyaránt. A vörösvértestekben legnagyobb mennyiségben a Hb autooxidációja révén keletkeznek reaktív oxigéngyökök. Ez a folyamat a Hb molekulának főként a sejtmembránhoz közel eső részein jellemző, mivel az a terület a citoszolikus antioxidáns rendszerek számára nehezen elérhető. A vörösvértestekben lévő Hb-ról azonban azt is leírták, hogy antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik: képes megkötni a β -lánc hem zsebében keletkező szuperoxid-anionokat, ezáltal csökkenti a Hb autooxidációjának a sebességét.

A NADH-methemoglobin-reduktáz enzim szintén hozzájárul a vörösvértestek antioxidáns védelméhez. Szerepe a Hb egy elektronos oxidációja révén létrejövő metHb redukálása, ez által a vörösvérsejt oxigénszállító kapacitásának fenntartása.

Az intracelluláris ROS mennyiségét az antioxidáns rendszerek szabályozzák. A ROS okozta károsodások kivédése, valamint a redox-szenzitív útvonalak szabályozása céljából a vörösvértestek és a többi sejt is nagy mennyiségben tartalmaznak antioxidáns enzimeket. Az emberi szervezetben a legjelentősebb antioxidáns enzimek a szuperoxid-dizmutázok (SOD), a kataláz, és a glutation-peroxidáz (GPX), valamint megemlítendő még a peroxiredoxinok. Legfontosabb nem enzimátikus gyökfogó, mely részt vesz a ROS-elleni védelemben, a redukált glutation. A SOD szuperoxid-gyökökből hidrogén peroxidot és molekuláris oxigént állít elő. A kataláz és a GPX pedig a hidrogén-peroxidot alakítja át vízzé, illetve a kataláz emellett még oxigént is képez. A SOD-nak és a kataláznak nincs szüksége kofaktorra a működéshez, míg a GPX számos kofaktort (glutation, NADPH, glükóz-6-foszfát) és fehérjét igényel. A GPX-nek 5 izoformája létezik. A glutation rendszeren belül a glutation-reduktáz és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz nem vesz részt közvetlenül a ROS eliminálásában, azonban lehetővé teszik a rendszer működését. A GPX felelős a vörösvértestekben a Hb oxidációjának kivédéséért. A háromféle SOD enzim erősen kompartmentalizált: a mangánt tartalmazó SOD (MnSOD) a mitokondriumokban, a rézt és cinket tartalmazó SOD a sejtmagban és a citoplazmában, az extracelluláris SOD (ecSOD) pedig néhány szövetben extracellulárisan fordul elő. A kataláz a peroxiszómában és a sejtek citoplazmájában fellelhető. A GPX főként a mitokondriumokban és a sejtmagban fordul elő izotípustól függően³⁰. Ezeknek az antioxidánsoknak a feladata az oxidatív stressz mértékének csökkentése a különböző sejtkompartmentekben.

4.2.3.1. A plazma Hb- és hemkötő fehérjei

A vörösvértestekből az extracelluláris térbe kerülő Hb – a hemhez hasonlóan – prooxidáns és proinflammatorikus tulajdonságokkal bír. A szervezetnek hatékony védelmi mechanizmusokat kellett kialakítania, hogy eltávolítsa a keringésből a hemolízis során szabaddá vált, potenciálisan toxikus hemoglobint.

A haptoglobin egy akut fázis fehérje, mely nagy mennyiségben van jelen a plazmában. A feladata az, hogy megkösse a szabad hemoglobint és a makrofágok segítségével eltávolítsa a keringésből. A Hp-Hb-komplex (>150 kDa) a makrofágok CD163-receptorához kötődik és endocitózis révén kerül felvételre a makrofágokba³¹. A Hp gátolja a Hb H₂O₂-dal előidézett oxidációját és a globinláncok polimerizációját³². A Hp képes megakadályozni, hogy az oxidált

Hb átadja a hem-csoportját az LDL molekulának és ezáltal lipid-peroxidációt indítson el³⁴. A Hp védő hatása az extracelluláris Hb által előidézett hipertenzióval és vesekárosodással szemben¹⁷.

A Hp-Hb-komplex internalizációját követően a makrofágokban a hem oxigenáz-1 (HO-1) enzim lebontja a hem-csoportot (biliverdinné, szén-monoxiddá és vassá), a felszabaduló vas pedig a ferritin molekulában tárolódva visszakerül a vas-körforgásba és újra hasznosul. Amikor a hemolízis során felszabaduló Hb mennyisége meghaladja a plazmában lévő Hp kapacitását, a szabad Hb egy részét a vese távolítja el^{17,33}. A 32-kDa-os $\alpha\beta$ -dimer kis méretének köszönhetően könnyen átjut az érfalak endothelsejt rétegén a subendothelialis és a perivascularis régiókba, eléri a vesét és az erek falát.

A Hp génpolimorfizmusa háromféle genotípus és ezáltal háromféle heterogén haptoglobin-fehérje kialakulását eredményezi: a dimer Hp1-1, a Hp2-1 és a polimer Hp2-2³⁵. A Hp2-2 genotípus fokozott kockázatot jelent 1-es és 2-es típusú diabéteszben a kardiovaszkuláris szövődmények kialakulása szempontjából. E mellett az is ismert, hogy a Hp2-2 genotípussal rendelkező diabéteszes betegek carotis-plakkjában magasabb a vas koncentrációja. Ez arra enged következtetni, hogy a szabad Hb semlegesítése ebben az esetben nem zajlik megfelelően³⁶. Szintén a Hp2-2 genotípusú diabéteszes betegeknél az atherosclerotikus plakkokban kevesebb simaizomsejtet és nagy mértékű makrofág-infiltrációt észleltek, melyek az instabil plakk jellemző vonásai³⁷. Hp2-2 genotípusú egészséges önkéntes férfiaknál magasabb keringő oxLDL-szintet mértek a plazmában, mint a Hp1-1, vagy a Hp2-1 genotípusú alanyoknál³⁸. Ellentmondásos közlemények születtek arról, hogy ezeknek a fehérjéknek eltérő-e a Hb-kötő kapacitása, illetve hogy ezek eltérő mértékben képesek-e gátolni a Hb-ből az endothelsejtekbe és az LDL-re történő hem-transzfert^{35,39}.

A hemopexin egy plazma glikoprotein, mely intravaszkuláris hemolízisben a másodlagos védvonalban tölt be fontos szerepet a Hb-ből származó hem-csoport megkötésében. A hem-csoportot inert állapotban képes megkötni, az ismert fehérjék közül a legnagyobb affinitással. Fontos szerepe, hogy megakadályozza a lipoprotein partikulák oxidációját a plazmában és gátolja a hem és a sejtfelszíni receptorok (pl. TRL4-receptor) közötti kölcsönhatást¹⁷. A Hx-hem-komplexet az LDLR1/CD91-receptoron keresztül veszik fel a sejtek endocytosis révén. A CD91-receptor legnagyobb mennyiségben a májban és a lépben, a makrofágokban és a hepatocitákban expresszálódik⁴⁰. A felvételre került komplexből a hemet a hem-oxigenáz-1 enzim bontja, a képződő vas pedig a ferritinben tárolódik.

Egy intravaszkuláris hemolízis vagy vérzés során a Hb és a hem felvételét biztosító mechanizmusoknak (Hp, Hx), valamint a hem lebontását (HO-1) és a vas tárolását (ferritin)

biztosító folyamatoknak precízen és összehangoltan kell működniük ahhoz, hogy csökkenteni tudják a vesét érő Hb/hem/vas terhelés mértékét és ezáltal megóvják az oxidatív károsodástól²⁶.

4.2.3.2. A hem-oxigenáz/ferritin rendszer

A hem molekula egy porfirin-vázis vegyület, melyben a négy pirrolgyűrű egy két vegyértékű vas-ionnal (Fe^{2+}) alkot komplexet. A hem számos molekula, köztük a vörösvérsejtekben megtalálható oxigénszállító Hb prosztetikus csoportját képezi. Hemolízis során a vörösvérsejtekből felszabaduló Hb az érpályába kerül, ahol az ott jelen lévő szabadgyökök hatására oxiHb-ből (ferro-vas, Fe^{2+}) metHb-ná oxidálódik (ferri-vas, Fe^{3+}). A metHb kevésbé szorosan képes kötni a hemet, melynek következtében szabad hem keletkezik⁴¹. A hem egy erősen hidrofób vegyület, mely képes átjutni a sejtmembránon, a szabad hem molekulából képződő szabad vas pedig katalizálja az oxidatív sejtkárosodást⁴². A hem fokozza a leukocyták, illetve a szabadgyökök által elindított oxidatív sejtkárosodás mértékét, melynek leginkább az erek falát bélelő endothelsejtek vannak leginkább kitéve intravaszkuláris hemolízis esetén⁴³. Az endothelsejtek hem stressztűrő képessége e miatt széleskörűen tanulmányozott terület. Hem hatására az endothelsejtekben indukálódik a hem oxigenáz/ferritin rendszer, mely nagymértékben fokozza a sejtek oxidatív stressztűrő képességét. A hem-oxigenáz enzim katalizálja a prooxidáns hatású hem molekula lebomlását⁴⁴, melynek során vas-ionok, biliverdin és szén-monoxid keletkezik^{45,46}. A hem-oxigenáz enzimnek három izoformája létezik, melyet háromféle gén kódol (HMOX1, HMOX2, HMOX3). A hem-oxigenáz-1 (HO-1) izoforma egy 32-kD-os hősokkfehérje, mely transzkripciós szinten indukálható és citoprotektív tulajdonságokkal rendelkezik. A HO-1 fehérjének számos induktora van, melyek közül jelen dolgozat keretein belül kiemelendő a hem és a Hb formák. A hem-oxigenáz-2 (HO-2) és hem-oxigenáz-3 (HO-3) izoformák konstitutívan expresszálódnak fiziológias körülmények között⁴⁷.

A ferritin egy 450 kD méretű, 24 alegységből álló akut fázis fehérje, mely az embereknél és az emlősöknél egyaránt a legfontosabb intracelluláris vastároló molekula. A vízdékes ferritin molekula egy fehérjeburokból (apoferritin) és vasmicellákból áll⁴⁸. Egy apoferritin molekula körülbelül 4500 vas atom szekvesztrálására képes. A multimer H- és L-ferritin alegységekből épül fel, melyek aránya szövetenként eltérő, illetve bizonyos stimulusok hatására változhat. A H-alegység ferroxidáz aktivitással rendelkezik. Az L-alegységnek a vas ferritin molekulába történő bejuttatásában és benttartásában van kiemelt szerepe. A vasraktározó

szövetekben magasabb az L-alegység aránya a H-alegységhez képest, mely elősegíti a vas beépülését a ferritin molekulába⁴⁹.

A ferritinnek kritikus szerepe van az intracelluláris vasháztartás egyensúlyban tartásában, az átmeneti vasraktár („labile iron pool”) szabályozásában^{47,50–53}. A ferritin egyik legfontosabb feladata, hogy korlátozza a szabadgyök képződéshez rendelkezésre álló szabad vas-ionok mennyiségét. Korábban már felismerték, hogy a hemmel kezelt endothelsejtekben fokozódik a ferritin szintézise, melynek hatására a hidrogénperoxid csak jóval kisebb mértékű citotoxikus választ vált ki⁵⁴. A hem és hidrogénperoxid hatására kialakult oxidált LDL idő- és dózisfüggő toxicitást mutat az endothelsejtekre nézve. Az apoferritinnel előkezelt sejtek azonban rezisztenssé válnak az oxidált LDL toxikus hatásával szemben. Ez a jelenség nem figyelhető meg a ferroxidáz aktivitás nélküli mutáns ferritinnel kezelt endothelsejteknél, vagyis a ferritin citoprotektív hatása elsősorban a H-lánc ferroxidáz aktivitásának köszönhető⁵⁵. A tumorsejtek oxidatív károsodással szembeni érzékenységet fordítottan arányosan befolyásolja az adott tumorsejtben jelenlévő ferritin mennyisége. A malignus tumorokban gyakran előforduló érújdonképződés és bevérzések hatására a szövetek közé kerülő vörösvérsejtekből felszabaduló vas elősegíti a tumorsejtek oxidatív károsodását. Míg az emlődaganatból származó sejteknél (BT-20) az 1 órás hem előkezelés jelentősen fokozta a hidrogénperoxid által kiváltott citotoxikus választ, addig a jelentős mennyiségű intracelluláris ferritint tartalmazó vastagbélrák-sejtek (Caco-2) rezisztensnek bizonyultak a behatással szemben. A hem előkezelés végsősoron mindkét sejttypusnál a ferritin szintézis fokozódásához vezetett, noha az is észlelhető volt, hogy a hem a H-ferritin mRNS szintézisét igen intenzíven fokozta, míg ez a hatása az L-ferritinre nézve csekély volt⁵⁶.

A hem által kiváltott HO-1 indukciónak a cerebrális malária megelőzésében is fontos szerepet tulajdonítanak. A vörösvértestekben replikálódó Plasmodium falciparum életciklusa során a fertőzött vörösvérsejtek rupturálnak, melynek során hemoglobin szabadul fel⁵⁷.

4.2.4. Hemolízis és az akut vesekárosodás

A hem és a hem-csoportot tartalmazó fehérjék akut és krónikus nephrotoxicitása régről ismert. Akut veseelégtelenséget három különféle mechanizmus alapján okozhatnak a hem-csoportot tartalmazó fehérjék: egyrészt csökkentik a vese vérátáramlását, direkt citotoxikus hatást képesek kifejteni, illetve a hem-csoportot tartalmazó fehérjék a Tamm-Horsfall fehérjével együtt öntvényeket képeznek a tubulusokban⁵⁸. A lipofil hem molekula prooxidáns, proinflammatorikus és apoptotikus hatása révén képes renális sejtkárosodást előidézni. A hem károsítja a mitokondriális légzési lánc működését is⁵⁹. Zarjou és mtsi. azt igazolták, hogy az

akut vesekárosodást okozó rhabdomyolysisben a proximális tubuláris epithelsejtekben található H-ferritinnek kritikus szerepe van a vas forgalom lebonyolításában és a sejtek túlélésében⁶⁰. Az ismétlődően kialakuló akut vesekárosodás – különösen ha az egyes epizódok között nem tér vissza a teljes vesefunkció –, hajlamosít krónikus veseelégtelenség kialakulására⁵⁸.

4.3. A Hb-formák és a hem prooxidáns és proinflammatorikus hatásai

4.3.1. A hem prooxidáns jellege, a hem mint Fenton reagens

A reaktív oxigén gyökök az élő szervezetben megtalálható olyan instabil molekulák, amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, ezért elektronszerkezetük stabilizálásának céljából kémiai reakcióba lépnek más vegyületekkel, molekulákkal. A szabadgyökök élettartama rövid, élettani hatásukat tekintve azonban rendkívül jelentősek.

A ROS-t hosszú éveken keresztül úgy tartották számon a tudományban, mint a biológiai szervezetre toxikus anyagcsere-mellékterméket. Az utóbbi években azonban egyre több bizonyíték gyűlt össze arra vonatkozóan, hogy a ROS-ok fontos jelátviteli molekulák. A ROS termelésében résztvevő egyik legfontosabb enzimsalád a NADPH-oxidázok, maga a folyamat pedig szigorúan szabályozott. A ROS-ok szerepet játszanak a sejtek oxidatív egyensúlyi állapotának fenntartásában, a jelátviteli folyamatok továbbításában. A mitokondriális ROS-termelés befolyásolja a sejtek energiaállapotát, a sejtek túlélését és jelátviteli szinten a sejtek stresszválaszát.

Az emberi szervezet teljes vaskészletének mintegy 70%-a a Hb molekula hem prosztetikus csoportjában van jelen. Az élő szervezet túléléséhez nélkülözhetetlen, hogy a vas bármikor hozzáférhető legyen és be tudjon épülni a hem molekulába. A vas létfontosságú a sejtek életben maradását biztosító folyamatokban a résztvevő enzimek kofaktoraként, fontos szerepet tölt be a sejtciklusban, a ribonukleotidok dezoxiribonukleotiddá alakulásában, valamint az elektrontranszportban és még sok más folyamatban a sejt életében. A vas fontos, de ugyanakkor veszélyes elem is, mivel elektront szolgáltat a szuperoxid-gyökök képződéséhez, illetve a vas és az oxigén között lejátszódó Fenton-reakció következtében a reaktív hidroxil-gyökök keletkezésében is részt vesz ($2 \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$; $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$). A vas toxicitása a celluláris rendszerekben javarészt annak köszönhető, hogy a vas részt vesz ezen reaktív oxigénformák (mint például a hidrogén-peroxid, vagy a hidroxil-gyök) kialakulásában. Ezek a reaktív oxigén gyökök közvetlenül károsítják a DNS-t, a sejtfehérjéket, a lipideket és sejthalált képesek indukálni⁴⁸. A szabad gyökök

eliminálására kiépült védelmi mechanizmusok precíz egyensúlyt tartanak fenn a szervezetben, mely a sejtek túlélését biztosítja.

4.3.2. A hem proinflammatorikus jellege, a hem mint veszély asszociált molekuláris mintázat (DAMP)

A veleszületett (innate) immunrendszer receptorai folyamatosan figyelik az extracelluláris teret és a szubcelluláris kompartmenteket infekció, szöveti vagy celluláris károsodás veszélyét jelentő ingerek után kutatva. Fertőzés esetén a patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP), míg steril szöveti károsodás esetén a veszély/sejtkárosodás-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP) az őket felismerő receptorokhoz bekötődve aktiválják az inflammaszómaikat és segítik az innate immunrendszer sejtjeit a károsodás felismerésében és lokalizálásában, ezáltal a megfelelő sejtek elkezdhetik a veszély elhárítását.

Hemolízis során a széteső vörösvértestekből felszabaduló Hb oxidált formái könnyen képesek elengedni a hemet. Ilyenkor hirtelen nagy mennyiségben szabadul fel és kerül ki az ér pályába a hem. A hem prooxidáns^{28,34,43,61,62} tulajdonságai mellett veszély-asszociált mintázatként is funkcionál^{63–65}. A hem a makrofágok TLR4-receptorán keresztül fokozza a TNF- α termelődését. A hemnek ez a hatása függ a hem porfirin-gyűrűjében a vas és a vinil-oldalláncok elhelyezkedésétől¹⁵. Azt is leírták, hogy a hem-mediálta TLR4 aktivációjának fontos szerepe van az intracerebrális vérzés során kialakuló neuroinflammációs folyamatban⁶⁶. A metHb-ről szintén leírták, hogy fontos aktivátora a TLR-4-nek, elősegíti a neuroinflammáció kialakulását subarachnoideális vérzésben⁶⁷. Egerekkel végzett kísérletekben kimutatták, hogy a hem gyulladásához hasonló választ vált ki a szervezetben azáltal, hogy az NLRP3 inflammaszóma aktiválásán keresztül indukálja a makrofágokban az IL-1 β termelését⁶⁸. A hem ROS generálása révén is képes inflammaszóma aktivációt kiváltani. Az endogén termelődő ROS-ok közül elsősorban a szuperoxid anion (O_2^-) és a H_2O_2 járulnak hozzá a podocytákban az inflammaszóma kialakulásához és aktivációjához, következményesen a podocyták károsodásához és a glomerulosclerosis létrejöttéhez⁶⁹.

Podocytákban is igazolták az inflammaszóma komplex komponenseinek, az NLRP3-nak, az ASC-nek és a kaspáz-1-nek a jelenlétét⁷⁰. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja a podocyták károsodásához (lábnúlványok leválása, a citoszkeleton átrendeződése, a résmembrán alkotó fehérjék eltűnése) és következményes glomerulosclerosis kialakulásához vezet homociszteinnel kezelt egerekben⁷⁰.

4.3.3. Az oxidált Hb-formák prooxidáns és proinflammatorikus hatásai

A hem tartalmú fehérjék, mint a Hb és a mioglobin katalitikusan aktív vasat szolgáltatnak a Fenton-reakcióhoz, melyen keresztül hidroxil-gyökök képződése valósul meg²⁶. A Hb és a mioglobin az extravazális térbe kikerülve szöveti károsodást indíthatnak el. Rhabdomyolysis következtében tömegesen felszabaduló mioglobin szokatlanul nagy mennyiségű hem felszabadulásával jár, mely a vesében a hem degradáló HO-1 enzim, valamint az endogén citoszoláris vasraktár ferritin szintézisének fokozódását váltja ki. A toxikus behatást megelőzően alkalmazott intravénás Hb-kezelés protektív antioxidáns választ vált ki a vesében, ezáltal képes kivédeni a rhabdomyolysis okozta vesekárosodást, megelőzni a veseelégtelenség kialakulását⁷¹. A vaskeláló dezferroksamin szintén képes kivédeni a Hb-indukálta károsodást, ami arra utal, hogy a károsító ágens közvetlenül maga a hem-vas²⁶.

A vörösvértestekből felszabaduló Hb-t a ROS-ok metHb-ná oxidálják. A metHb a hemhez hasonlóan képes oxidatív károsodást okozni az endothelsejtekben. Megfigyelték, hogy a metHb a hemhez hasonlóan fokozza a HO-1 és a ferritin szintézisét. Disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC) során a szövetekbe kilépő fehérvérsejtek metHb-ná oxidálják a felszabadult Hb-t, melyről könnyebben ledisszociál a hem. A szervezet védekező rendszere nem képes ekkora mennyiségű hem azonnali megkötésére, a szabaddá váló hem molekulák az endothelsejtek oxidatív károsodását okozzák. Az endothelsejtek érzékenyítése a hem indukálta HO-1/ferritin rendszer aktiválása által segíthet kivédeni az oxidatív stressz okozta akut szervkárosodást⁶².

A Hp és Hx Hb illetve hem kötő plazmafehérjék kapacitásának kimerülése után a hem az LDL-hez kötődhet, és előidézhetheti az LDL molekula oxidatív károsodását. A hem mellett ugyanilyen hatást képesek kiváltani a hem csoport disszociációjára hajlamos oxidált Hb formák, a metHb és a ferrilHb is^{27,72}.

Az atherosclerotikus plakkokban fellépő érújdonképződés révén a vörösvértestekből kiszabaduló Hb oxidálódik, prooxidáns és proinflammatorikus hatása révén pedig károsítja az érfal endothelsejtjeit, melyek védelmében igen fontos szerepet játszik a hem-oxigenáz-1/ferritin rendszer⁷³. Az előrehaladott állapotú, rupturált atherosclerotikus plakkban ismeretes, hogy a Fe^{2+} -t tartalmazó oxiHb-ből oxidáció hatására Fe^{3+} -t tartalmazó metHb képződik, azonban igen erőlyes oxidáció hatására a Hb-ban kialakuló kovalens ditirozin keresztkötések révén ferrilHb is létre jön. A plakk lipidek hatására az érből kilépő vörösvértestek membránja károsodik. A folyamat során oxidálódott Hb-ből felszabaduló hem további lipid-oxidációt okoz, az endothelsejtekben pedig aktiválja a HO-1/ferritin rendszert, mely az endothelsejtek károsodásának kivédését célozza²⁸.

A Fe^{4+} (ferril) állapotban nem stabil, ezért könnyen visszatér a stabilabb Fe^{3+} állapotba, miközben a globin-láncokat alkotó aminosavakkal reakcióba lép. Az így keletkező globin láncon lokalizált párosítatlan elektronok egymással kapcsolódva kovalens kötéseket alakítanak ki, melyek révén keresztkötött Hb multimerek képződnek. A ferrilHb az endothelsejteken fokozza a gyulladásos folyamatban résztvevő adhézións molekulák (ICAM-1, VCAM-1, E-szelektin) expresszióját, ezáltal elősegíti a gyulladásos sejtek kivándorlását a szövetek közé. A ferrilHb az aktin-citoszkeleton átrendeződése révén károsítja az endothelsejt réteg integritását, valamint fokozza az endothelsejtréteg permeabilitását²⁷.

Az oxidált Hb-ból kiszabaduló hem felerősíti a szervezet veleszületett immunrendszerének a mikrobiális molekulákra (pl. LPS) adott válaszreakcióját. A hemnek ez a hatása a ROS képződésétől függ⁷⁴.

5. Célkitűzések

Korábbi megfigyeléseink és a szakirodalmi ismeretek alapos áttanulmányozását követően az alábbi hipotéziseket és célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Hipotézis: Steril hemolízis esetén a plazmában megemelkedik az extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák (metHb, ferrilHb), illetve a Hb-hoz nem kötött úgynevezett „szabad” hem koncentrációja.

Célkitűzés: Steril hemolízis egérmódelben vizsgáljuk az extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák, illetve a szabad hem mennyiségét a plazmában.

2. Hipotézis: Nagyfokú steril hemolízis esetén a keletkező extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák illetve a szabad hem egy része a vesén keresztül a vizeletbe szűrődik ki.

Célkitűzés: Steril hemolízis egérmódelben vizsgáljuk az extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák, illetve a szabad hem mennyiségét a vizeletben.

3. Hipotézis: A steril hemolízis során képződő extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák illetve a szabad hem prooxidáns tulajdonságú molekulák, melyek fokozzák az a podocyták ROS-termelését és sejthalált indukálnak.

Célkitűzés: *In vitro* körülmények között vizsgáljuk a különböző oxidáltsági állapotú Hb-formák, illetve a szabad hem ROS-termelésre kifejtett hatását és sejtoxicitást indukáló hatását humán podocytákon.

A podocytákkal végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása az endothelsejtekkel kapcsolatos ismereteinkkel.

4. Hipotézis: A hem illetve a különböző oxidáltsági állapotú Hb-formák aktiválják a HO-1/ferritin rendszert podocytákban, mely segíti a sejtek túlélését intravaszkuláris hemolízist követően.

Célkitűzés: *In vitro* körülmények között vizsgáljuk az extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák, illetve a szabad hem hatását podocyták HO-1 és ferritin expressziójára, és analizáljuk ezen fehérjék szerepét a podocyták hem-stressz elleni védelmében.

A podocytákkal végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása az endothelsejtekkel kapcsolatos ismereteinkkel.

6. Anyagok és módszerek

6.1. Humán podocyta sejtvonal tenyésztése

A human podocyta sejtvonalat Moin Saleem (University of Bristol) adományozta kutatócsoportunknak. A sejteket egy 3 éves gyermek veséjéből nyerték, akinél prenatálisan hydronephrosist diagnosztizáltak az egyik oldali vesében. Az operációval eltávolított vese szövettani vizsgálata hegesedést, glomerulosclerosist és tubuláris atrophíát igazolt tág kehelyvégekkel. Dysplasia jelei nem voltak láthatóak. A szövettani vizsgálat a prenatális időszakban kialakult egyoldali obstruktív/reflux nephropathia fennállását igazolta. Ebben a kórképben a glomerulusok intaktak, vagyis a vese szövettani mintából nyert podocyták egészségesnek tekintendők. A donor ellenoldali veséje élettani paraméterekkel rendelkezett. A szövetmintából glomerulusokat izoláltak, melyeket penicillin, streptomycin, inzulin, transferrin és nátrium-szelenit elegyével kiegészített, 10%-ban FCS-t tartalmazó RPMI 1640 típusú médiumban tenyésztettek^{75,76}. Az ezt követően megjelenő, majd konfluenssé váló epithelsejt-szigeteket retrovírusba épített termoszenzitív SV40-T, valamint egy telomeráz génnel transzfektáltak és a megfelelő sejtklónokat szaporították tovább. A létrehozott sejtvonalat AB 8/13 jelöléssel látták el (AB: a beteg azonosítója, 8: a tsSV40 gén, 13: a hTERT gén jelenlétére utal).

Az AB 8/13 típusú normál humán podocyta típusú sejtvonalat „permisszív” körülmények között 33°C-on szaporítottuk 75 cm²-es tenyésztőfelületű (T75-ös) műanyag flasksban. Sejttenyésztő médiumnak RPMI 1640 médiumot használtunk, mely 10%-ban FBS-t, antibiotikumokat (10.000 unit/mL penicillin G, 10 mg/mL streptomycin, és 25 µg/mL amphotericin B), valamint inzulin (10 µg/mL), transferrin (5,5 µg/mL) és nátrium-szelenit (5 ng/mL) elegyét tartalmazta. A sejttenyésztéshez felhasznált anyagokat a PAA Laboratories Ltd.-től (Cölbe, Németország) szereztük be. A tenyészeteken 2-3 naponta cseréltük a médiumot. Miután a sejtek elérték az 50-60%-os konfluenciát, 37°C-os inkubátorba helyeztük át a tenyészetet ún. „nem permisszív” körülmények közé, ahol a sejtosztódás folyamata megállt és a podocyták differenciálódásnak indultak az elkövetkező 14 napban. Kísérleteinkhez 14-20-szor passzált sejteket használtunk fel.

6.2. Humán umbilikális véna endothelsejtek (HUVEC) tenyésztése

Az endothelsejtekkel végzett kísérletekhez humán umbilikális véna endothelsejteket használtuk modellként. A sejtenyésztésnél használt vegyszerek a Sigma-tól származtak (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A sejteket 0,2%-os diszpáz enzim oldattal szeparáltuk. Médium 199-hez adtuk hozzá az enzimet, majd a sterilre szűrt oldattal feltöltöttük az előzetesen vérmentesített vénát. A lezárt köldökszinórt fiziológiás sóoldatba helyeztük és 6 órán át inkubáltuk 4°C-on. A vénából kimosott sejteket lecentrifugáltuk (2000 g, 4°C, 15 min) és CM-ban (Complett Medium: Médium 199, mely tartalmazott 10% FBS-t, 5 U/l heparint, 1 mM Na-piruvátot, 5 mM L-glutamint 0,5% EndoGrow növekedési hormont, valamint 10.000 unit/mL penicillin G, 10 mg/mL streptomycin és 25 µg/mL amphotericin B elegyét) felfuszpendálva egy zselatinnal bevont felszínű T75-ös tenyésztő edénybe helyeztünk. Az edényben átlagosan 3-4 nap alatt váltak konfluenssé a sejtek.

6.3. Immunfluoreszcens festés

A podocytaikat poli-L-lizin bevonatos, 4 rekeszes sejtenyésztő lemezen növesztettük, amíg a tenyészet el nem érte az 50-60%-os konfluenciát. A médiumot eltávolítottuk a kamrákból, a lemezeket kétszer alaposan átmostuk PBS-sel, majd frissen előkészített 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk a sejteket. Az immunfestés során a mintákat jégen tartottuk. Annak érdekében, hogy minimalizáljuk az ellenanyag aspecifikus kötődését, PBS-ben hígított 5%-os szamár szérummal blokkoltuk a mintákat 20 percig. A humán synaptopodin elleni elsődleges antitestet (sc-21537, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany) 1:200-szoros hígításban, míg a kecske ellenes Cy3-konjugált másodlagos antitestet (ab6949, Abcam, Cambridge, UK) 1:50 hígításban adtuk a mintákhoz. Az antitesteket tartalmazó oldat 5%-os szamár szérumot tartalmazott. Az egyes antitestek között PBS-sel mostuk a mintákat egymást követően két alkalommal 2, illetve 3 percig. A citoszkeletont felépítő F-aktin hálózatot FITC-cel konjugált falloidinnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tettük láthatóvá (50 µg/mL, 40 percig). A jelerősítéshez biotin-streptavidin rendszert alkalmaztunk. DAPI magfestőt tartalmazó EverBrite™ mounting medium (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) rögzítőszer segítségével illesztettük a fedőlemezt a tárgylemezhez, mely lehetővé tette a magok vizualizálását és segített megőrizni a fluoreszcens jelet. A mintákat Leica DM4000 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, a képeket pedig Leica DFC310 FX típusú digitális színes fényképező segítségével készítettük (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

6.4. Time-lapse imaging videomikroszkópia

Egy T25-ös sejttenyésztő edényben szaporítottuk a podocytaikat. Miután a sejttenyésztet elérte a 60%-os konfluenciát 37°C-ra állítottuk az inkubátor hőmérsékletét. A 0. naptól a 14. napig videomikroszkóp segítségével követtük a sejtek differenciálódásának folyamatát. A time-lapse videomikroszkópiát a Nagy Gábor és mtsi. által közzétett módszer alapján végeztük⁷⁷. Két inverz mikroszkóphoz egy nagyfelbontású digitális kamera került csatlakoztatásra, mely egy kettős képrögzítő számítógépes rendszer felé továbbította az információt. A kamera megvilágítása úgy lett kialakítva, hogy ne okozzon hő-, illetve fénykárosodást a sejttenyésztetben. A hidegfehér fényű diódák a képrögzítő rendszerrel szinkronban működtek. Percenként rögzített képeket a rendszer. A teljes videó anyagát adatnyerés céljából adatbázis formátumba importáltuk. Az expozíciós időt a képernyő jobb sarkában tüntettük fel. 30 képkockát jelenítettünk meg egy másodperc alatt, vagyis a valóságban eltelt 30 perc eseményeit láthatjuk a videón 1 másodperc alatt.

6.5. Humán veséből származó szövetminta immunhisztokémiai festése

Világossejtes veserák miatt eltávolított humán daganatos vese ellentétes pólusából, a vese cortexéből származó szövetmintát formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk, 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk belőle, majd elvégeztük az epitópok feltárását. Az endogén peroxidáz aktivitás semlegesítése végett 15 percig 3%-os H₂O₂ oldattal kezeltük, majd 20 percig blokkoltuk a mintákat. A glomerulusban található podocytaikat Wilms tumor-1 (WT-1) elleni antitesttel tettük láthatóvá (sc-192, 1:50; Sanra Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Németország), a bennük expresszáldó H-ferritint pedig a Paolo Arosiotól kapott monoklonális antitest segítségével festettük meg (1:150; 6,5 µg/mL). A metszeteket 15 percen keresztül inkubáltuk avidin-biotin-HRP komplexszel, mielőtt hozzáadtuk a biotinnal konjugált másodlagos antitesteket. Vectastain Elite ABC előhívó kitet (PK-6102; Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Egyesült Királyság) alkalmaztunk a gyártó útmutatása szerint. A vizsgált antigéneket Vector VIP (lila: SK-4600; Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Egyesült Királyság) és DAB (diaminobenzidin, barna: SK-4100; Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Egyesült Királyság) szubsztrátok segítségével tettük láthatóvá. A mintákkal párhuzamosan pozitív és negatív kontroll-festéseket is végeztünk.

6.6. Giemsa festés

Módosított Giemsa festést végeztünk a párhuzamosan tenyésztett, különböző korú és differenciáltsági fokú podocyta sejt kultúrákon. A monolayerben tenyésztett sejteket metanollal fixáltuk 5 percig, majd levegőn szárítottuk. Ezt követte a frissen elkészített Giemsa oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) történő 10 perces festési fázis. A főlegben lévő festékmolekulákat desztillált víz segítségével lemostuk a mintákról, majd egy újabb szárítási lépés következett szobalevegőn. A rózsaszín festődés a citoplazmát, míg a kék festődés a magot jelöli a 100x-os nagyításban vizsgált és fényképesen dokumentált mintákon.

6.7. Sejtmagok preparálása és a kromatin struktúra vizsgálata

A nem differenciált és a differenciált podocyta sejt egyaránt megvizsgáltuk a kromatin dekonkondenzáció és a kromoszóma kondenzáció jellegzetességeit a sejtciklus eltérő fázisaiban. A sejtmagok feltárásához elsőként reverzibilisen permeabilizáltuk a sejteket hipotóniás pufferben 0°-on 2 percig, majd ezt követően 3 órán keresztül 10% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumban regeneráltuk őket. 0,1 ng/ml colcemiddel metafázis-blokkot végeztünk, ezt követően tripsinnel és duzzasztópufferrel kezeltük a sejteket. A magizolálást 20x térfogatú jégcet és metanol 1:3 arányú elegyének lassú hozzáadásával végeztük. A folyamat végén fixáló oldattal fixáltuk a sejtmagokat és a sejtmag preparátumot 30 cm távolságból tárgylemezre cseppentettük. Levegőn szárítottuk a tárgylemezeket, majd növekvő koncentrációjú etanol oldattal (70%, 90%, 100%) dehidratáltuk a mintákat⁷⁸. A folyamat legvégén DAPI-t tartalmazó sejtrögzítő közeget helyeztünk a fedőlemez alá (EverBrite mounting medium, Biotium Inc., Hayward, CA, USA). Gerjesztőfény hatására a DAPI által emittált látható kék fény által kirajzolt mintázatot fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk.

6.8. Antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata

Nem differenciált és differenciált podocyta sejtenyészeteket használtunk ehhez a kísérlethez. A sejtekhez KH_2PO_4 puffert adtunk (100 mmol/L, pH=7,4), majd ultrahangos eljárással 3x5 másodpercig jégen szonikálva feltártuk őket. Ezt követően a sejtlizátumot, 16800 g-vel 4°C-on 10 percig centrifugáltuk. A kataláz, a SOD és a GPX enzimek aktivitását a centrifugálás után nyert felülúszókból határoztuk meg⁷⁹.

6.8.1. GPX aktivitás meghatározása

A GPX aktivitását a mintákban kolorimetriás assay segítségével mértük (Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit, K762-100, Biovision). Az előkészített mintákhoz egy NADPH-t, glutation-reduktázt (GR) és glutationt (GSH) tartalmazó reakcióelegyet adtunk. Az enzimreakciót az elegyhez adott kumin-hidroperoxiddal váltottuk ki. A GP redukálta a kumin-hidroperoxidot miközben a glutationból oxidált glutation képződött. Ez utóbbi folyamat szubsztrátjaként a NADPH szolgált. A NADPH fogyása a reakció elegyből arányos volt a GP aktivitásával. A minták optikai denzitás (OD) értékét 340 nm-en mértük.

6.8.2. SOD aktivitás meghatározása

A SOD aktivitást kolorimetriás eljárással mértük (Superoxide Dismutase Activity Assay Kit, K335-100, Biovision), mely azon az elven alapul, hogy a reakcióelegyben jelen lévő WST-1 szuperoxid-anion jelenlétében vízdékony formazán kristállyá redukálódik. A folyamatot gátolja a mintában lévő SOD enzim. A SOD gátló aktivitását a kristályokat tartalmazó elegy abszorbanciájának 450-nm-en történt mérése alapján számítottuk ki.

6.8.3. Kataláz aktivitás meghatározása

A kataláz aktivitását a mintákban kolorimetriás eljárás alapján mértük (Catalase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit, K773-100, Biovision). A mintában jelen lévő kataláz enzim a hidrogén-peroxidból víz és oxigén képződését eredményezi. Az el nem reagált hidrogén-peroxid az OxiRed™ festékkal reakcióba lép, az 570 nm-en mért abszorbanciaváltozás alapján kiszámítható a mintában lévő kataláz-aktivitás.

6.9. Western blot analízis

A kísérlethez felhasznált podocyta- és endothelsejteket 6 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük. A sejteket 1 órán keresztül kezeltük hem tartalmú oldattal szérumentes körülmények között, majd eltávolítottuk a hemet és további 8 órán keresztül 10% FBS tartalmú RPMI 1640 médiumban 37 °C-os inkubátorban 5%-os CO₂ szint mellett tartottuk a sejteket. A kezelést követően a sejteket mostuk majd lizáltuk 200 µL szolubilizáló oldatban (Tris-HCl puffer [10 mM Tris-HCl pH=7,2; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl], 1% Triton-X 100, 0.5% Nonidet P-40 és proteáz inhibitor koktél (Roche, Basel, Switzerland). A sejtlizátumot centrifugáltuk, a felülúszót megtartottuk és meghatároztuk a sejtlizátumok fehérjekoncentrációját BCA Protein módszerrel. A H-ferritin vizsgálatához a mintákat (25 µg fehérje) 6%-os natív poliakrilamid gélen választottuk szét (250 V, 120 mA, 3 óra), majd

nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100 V, 75 perc). A natív gél alkalmazását az indokolta, hogy a kimutatáshoz használt antitest a H-ferritinnek egy olyan konformációs epitópját ismeri fel, mely a fehérje natív szerkezetének megőrzése mellett tud csak bekötődni. A membrán blokkolását követően (6%-os tejpor TBS-T-ben oldva, 1 óra, szobahő) egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk 1% tejporthoz tartozó TBS-T oldatban az elsődleges antitesttel (egér anti-humán FtH, hígítás: 1:1000 [Paolo Arosio ajándéka]). A HO-1 kimutatása során a fehérjék szeparálását 12%-os SDS-poliakrilamid gélen végeztük. A kimutatáshoz egér anti-human HO-1 elsődleges antitestet alkalmaztunk (hígítás: 1:2500 Calbiochem, 374087). A kovalens módon keresztkötött Hb formák kimutatása során 15 µL vizeletet szeparáltunk 12%-os SDS-poliakrilamid gélen. A Hb kimutatása során kecskében termeltetett poliklonális tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-Hb antitestet használtunk (hígítás: 1:10000, Abcam). A FtH és a HO-1 kimutatása során az elsődleges antitest bekötődése után a membránt mostuk, majd HRP-vel konjugált anti-egér IgG-t adtunk a membránhoz (hígítás: 1:15000, Amersham) mellyel 90 percen keresztül inkubáltuk szobahőn. Alapos mosást követően a blotot kemilumineszcens előhívóval (Amersham) tettük láthatóvá. A filmet digitalizáltuk és az AlphaDigi-Doc RT (Alpha Innotech) szoftver segítségével megmértük az egyes fehérje sávok optikai denzitását.

6.10. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

Az endothelsejteket és a differenciált podocytaikat 6 lyukú tenyésztőedényben kezeltük. A sejteket RNA-STAT60 (Tel-Test B Labs, Alvin, TX USA) reagensben szolubilizáltuk, és RNS-t izoláltunk a reagens gyártója által biztosított protokollt követve. Az RNS koncentrációját és tisztaságát a minta optikai denzitása alapján (OD260, OD280) határoztuk meg. A mintákból kinyert RNS-t cDNS-sé írtunk át SuperScript™ II reverz transzkriptáz (Invitrogen, Waltham, MA, USA) segítségével. A cDNS mintákkal összeállított PCR reakciót valós idejű qPCR készülékben (CFX96 Real-Time System, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) futtattuk. A HO-1 gén amplifikációja során iTaq™ polimerázt (Bio-Rad, Inc, Hercules, CA, USA) és validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát, valamint a tervezett primereket alkalmaztunk (forward primer [674+] (5'-): GGT-GAT-AGA-AGA-GGC-CAA-GAC-TG [23 bázis], reverse primer [755-] (3'-): GGT-GTC-ATG-GGT-CAG-CAG-CT [20 bázis], próba: [705+](5'):FAM-CTC-AAC-ATC-CAG-CTC-TTT-GAG-GAG-TTG-CAG). Háztartási géneként a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) használtuk, a GAPDH mRNS szintjét TaqMan módszerrel határoztuk meg. A kapott C_t (threshold cycle) értékek alapján a relatív génexpressziós változásokat delta-delta C_t módszer segítségével számítottuk ki.

6.11. Humán L-ferritin mérés ECLIA technikával

A méréshez az endothelsejteket és a podocytaikat 6-lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük és kezeltük. A méréshez a Western blothoz alkalmazott szolubilizáló oldatban vettük fel a sejteket. A ferritin meghatározását elektrochemilumineszcens immunoassay (ECLIA) módszerrel végeztük (katalógus szám: 03737551) Roche MODULAR ANALYTICS E170 automatával. A mérési módszer szendvics technikán alapul. A mintában a biotinizált monoklonális humán L-ferritinre specifikus antitest, a humán L-ferritin, illetve a ruténium komplex-szel jelölt monoklonális ferritin-specifikus antitest reakciója során immunkomplex jön létre. A streptavidinnel fedett mikropartikulumok hozzáadása után a komplex szilárd fázishoz kötődik a biotin és a streptavidin között kialakuló kölcsönhatás következtében. Az automata mérőcellájában a mikropartikulumok mágnesesen hozzátapadnak az elektróda felszínéhez. Az elektródára kapcsolt feszültség kemilumineszcens fénykibocsátást indukál, amit egy fotomultiplier mér.

6.12. A podocyta citotoxicitásának vizsgálata

Nem differenciált és differenciált podocytaikat 96 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettünk. A sejteket HBSS-oldatban 1,25-5 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációjú hemmel, 125-500 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációjú H_2O_2 -dal, vagy e két anyag kombinációjával kezeltük. A kombinált kezelésnél a H_2O_2 hozzáadását a sejtenyészethez 1 órás hem-előkezelés előzte meg. A kezeléssel párhuzamosan kontrollokat is alkalmaztunk. A kezelést követően átmostuk a lyukakat, majd minden lyukhoz frissen készített MTT (3-2,5-difenil-tetrazolium-bromid) reagenst adtunk és 37°C-on 30 percig inkubáltuk a sejteket. Az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimei által termelt formazán kristályokat DMSO-ban oldottuk, az oldat abszorbanciáját pedig spektrofotométer segítségével mértük 590 nm-en. A sejtek által termelt formazán mennyisége jól korrelál az élő sejtek számával.

6.13. Tiobarbitursav reaktív anyagok meghatározása

Nem differenciált és differenciált podocytaikat 6-lyukú tenyésztőedényben tenyésztettünk. Hemmel (1,25-5 $\mu\text{mol/L}$) és H_2O_2 -dal (125-500 $\mu\text{mol/L}$) kezeltük a sejteket HBSS-ben 37°C-on 4 órán keresztül. Lyukanként 200 μl mennyiségű 6% SDS tartalmú KH_2PO_4 pufferben (100 mmol/L, pH=7,4) szedték fel a sejteket. Minden mintához 400 μl TBAR-reagenst (0,375 g 2-tiobarbitursav, 2,08 ml HCl, 15 ml 10% triklórecetsav, majd desztillált vízzel kiegészítettük a 100 ml-es végtérfogat eléréséhez) adtunk. 30 percig tartó 90°C-os inkubálást követően lehűtöttük a mintákat, majd 100 μl n-butanol hozzáadásával és

intenzív vortexeléssel extrahálást végeztünk. Az egyes fázisokat centrifugálással szeparáltuk (2000 g, 20°C, 10 perc). A szerves anyagokat tartalmazó fázis optikai denzitását 532 nm-en mértük.

6.14. ROS-termelés vizsgálata

Endothelsejteket és differenciált podocytaikat használtunk fel ezekhez a mérésekhez. A sejteket 96-llyukú tenyésztőedényben tenyésztettük. Nem fluoreszcens 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátot (H₂DCFDA) adtunk a sejtekhez 30 percre (Invitrogen, Waltham, MA, USA). A sejteket hem előkezelés (5 µmol/L, 30 perc) nélkül vagy azt követően H₂O₂-dal (100 µmol/L) kezeltük. A ROS-termelés eredményeként végbemenő oxidáció és az intracelluláris észterázok hatására a H₂DCFDA-ból fluoreszcens 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) képződik, melynek mennyiségét fluoreszcens módon határoztuk meg. Ehhez a mintákat 495 nm hullámhosszúságú fénnel gerjesztettük, és az emittált fény intenzitását 525 nm-en mértük meg.

6.15. Egér kísérletek

A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyével végeztük. 12 darab C57BL/6 egeret (8-10 hetes, hím) véletlenszerűen két csoportra osztva használtunk fel. A hemolízist PHZ (0. időpontban 50 mg/kg, majd 16 óra elteltével 30 mg/kg, 200 µL steril PBS-ben oldva) intraperitoneális (i.p.) adásával váltottuk ki. A kontroll egerek PBS-t (200 µl, i.p.) kaptak.

6.16. Hemoglobin-koncentráció meghatározása spektrofotometriás módszerrel egér plazmából és vizeletből

C57BL/6 egerekben PHZ-val steril hemolízist indukáltunk, majd a kijelölt időpontokban vér, illetve vizeletmintát gyűjtöttünk. A Hb, metHb és hemikróm koncentrációját spektrofotométer segítségével 560, 577 és 630 nm-en detektált optikai denzitás értékek alapján számítottuk ki az előzőekben publikált egyenletek és extinkciós koeficiensek segítségével⁸⁰.

6.17. Hemoglobinok preparálása

Égészséges önkéntesektől nyert, heparinnal alvadásgátolt vérből a vörösvértestekből hemoglobint preparáltunk. A vérmintához azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot adtunk, majd a mintából centrifugálással kinyertük a vörösvértesteket (2000 g, 4 °C, 5 perc). A vörösvértesteket fiziológiás sóoldattal mostuk, majd a mosott vvt preparátumhoz Na-foszfát

puffert adtunk (5 ml vvt-masszához 30 ml 5 mmol/L koncentrációjú Na-foszfát puffert), majd 30 percig jégen inkubáltuk. A vvt-lizátumhoz 1/20-ad térfogatarányban Tris bázist (1 mol/L) adtunk. A DEAE Sepharose CL-6B (*Sigma-Aldrich*) gyantát tartalmazó oszlopra 35 ml vvt-lizátumot vittük fel. Az oszlopot Tris bázis pufferrel (50 mmol/L, pH: 8,2) mostuk 1,5 ml/perc áramlási sebességgel mindaddig, amíg a mosó oldat víztiszta lett. Ezt követően Tris bázis pufferrel (50 mmol/L, pH: 7,4) eluáltuk a hemoglobint az oszlopról. A hemoglobin koncentrációját az alábbi egyenlet segítségével számítottuk ki: $[Hb]=66 \times A_{574}-80 \times A_{630}$; $[metHb]=279 \times A_{630}-3 \times A_{574}$.

MetHb előállításához 1,5-szeres moláris mennyiségű $K_3[Fe(CN)_6]$ -tal reagáltattuk a hemoglobint (30 perc, szobahő). A ferrylHb előállítása céljából 10-szeres moláris mennyiségben adtunk H_2O_2 -dot a hemoglobinhoz. A feleslegben maradt oxidáló ágenseket 12 kDa cut-off méretű dialízis membrán segítségével távolítottuk el (fiziológiás sóoldattal szemben 2x1 órán, majd egy éjszakán keresztül végeztük a dialízist). A kapott mintát centrifugálással (Amicon Ultra, 152 kDa-os membránszűrővel ellátott centrifugacső használatával) töményítettük majd kis frakciókban folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk.

6.18. Statisztika

Az adatok statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism 5.0 szoftvert (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) alkalmaztuk. Két csoport közötti különbséget páratlan t-teszttel vizsgáltuk. A többszörös összehasonlításokat ANOVA segítségével végeztük Tukey post-hoc teszttel kiegészítve. Az eredmények három független kísérlet átlag $\pm$ SEM vagy SD értékét mutatják. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

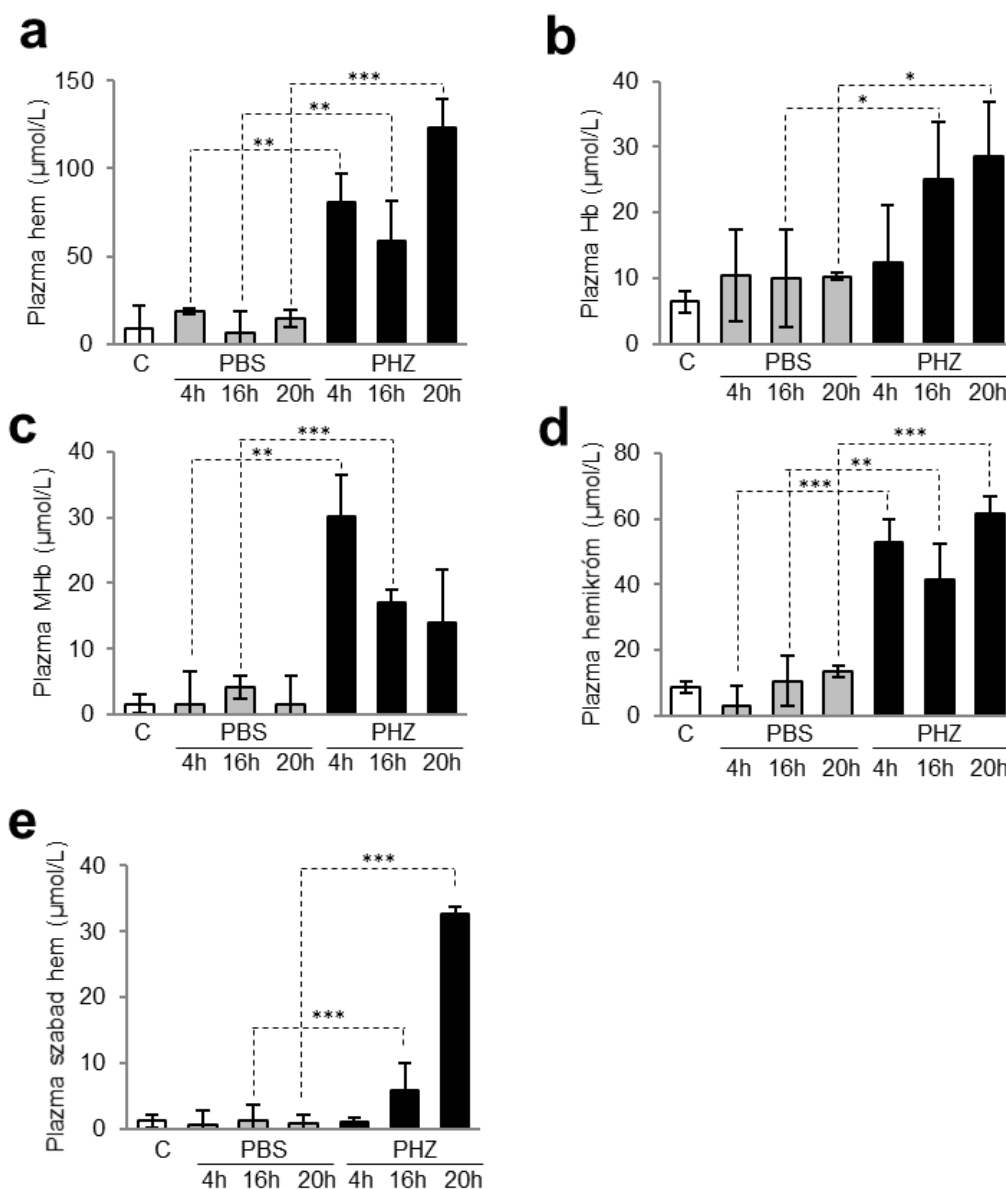
7. Eredmények

7.1. Extracelluláris Hb, oxidált Hb-formák és szabad hem megjelenése egér plazmában és vizeletben steril hemolízist követően

Intravaszkuláris hemolízis során a Hb az extracelluláris térbe kerül, ahol oxidálódhat a plazma vörösvértestekhez viszonyított alacsonyabb kapacitású antioxidáns rendszere miatt. Munkánk során elsőként ezt a jelenséget tanulmányoztuk azzal a szándékkal, hogy világos képet nyerjünk az intravaszkuláris hemolízis során képződő Hb oxidációs állapotáról, plazma koncentrációjáról, és a hem disszociációjának mértékéről.

Modellünkben C57BL/6 egerekben indukáltunk steril hemolízist fenilhidrazin (PHZ) intraperitoneális injektálásával. Az egerek plazmájában meghatároztuk a hem, a Hb, a metHb és a hemikróm teljes koncentrációját a 0. órától számított 4, 16 illetve 20 óra elteltével. A mért adatokból kiszámítottuk a plazma szabad hem koncentrációját, melyet nem hemoglobinhoz asszociált hemként definiáltunk.

A PHZ-nal indukált hemolízis során jelentős mértékben megnőtt a plazmában az extracelluláris Hb, a metHb, és a hemikróm mennyisége, valamint a szabad hem koncentrációja is (4. ábra a-e). A változás már 4 óra elteltével jól észlelhető volt, 16 óra után pedig minden mért paraméter tekintetében szignifikáns változást tapasztaltunk.

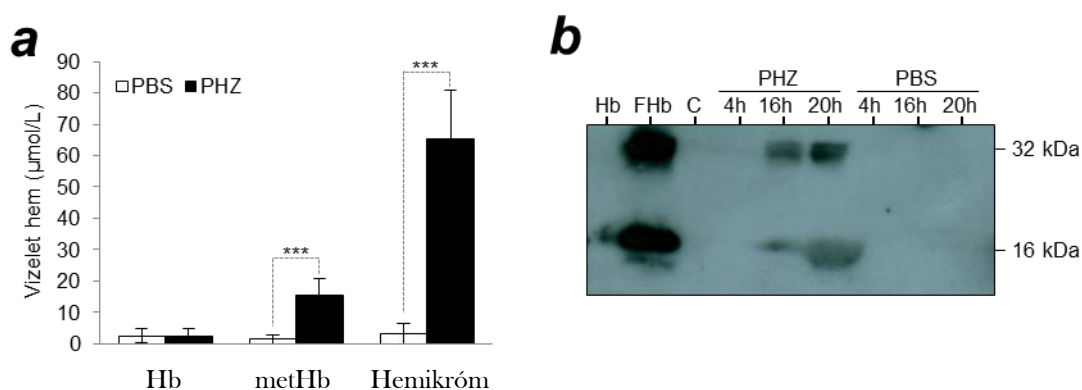


4. ábra A plazmában steril hemolízist követően megemelkedik a totál hem, a Hb, a metHb a hemikróm és a szabad hem mennyisége

C57BL/6 egerekben PHZ-nal (50 mg/kg, majd 16 óra elteltével 30 mg/kg, 200 μL steril PBS-ben oldva intraperitonealisan alkalmazva, [n=6]) steril hemolízist indukáltunk, a kontroll egereket (n=6) pedig 200 μL PBS-sel injektáltuk. Az egerek plazmájából spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg (a) a teljes hem, (b) a Hb, (c) a metHb és (d) a hemikróm koncentrációját. (e) A szabad hem koncentrációját a mért értékekből számítottuk. Az ábrán 6 kontroll és 6 kezelt egérből nyert plazma triplikátumban mért értékeinek átlaga ± SD van feltüntetve. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005.

Masszív intravaszkuláris hemolízist követően hematuria is kialakulhat. Megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott egérmodellben megfigyelhető-e a hemoglobin formák vizeletbe való

szekréciója. Ennek érdekében meghatároztuk a Hb, a metHb és a hemikróm koncentrációját PBS-sel, illetve PHZ-nal kezelt C57BL/6 egerek vizeletében 20 órával a hemolízis indukcióját követően (5. ábra). A PHZ-nal kezelt egerek vizeletének Hb tartalma nem tért el a PBS-sel kezelt egerekétől, azonban jelentős emelkedést tapasztaltunk a vizeletben jelenlévő oxidált Hb-formák: a metHb és a hemikróm koncentrációjában (5. ábra). A Hb 2 elektronos oxidációja során ferril (Fe^{4+}) oxidációs állapotú Hb-formák keletkeznek. Megvizsgáltuk a kovalens módon keresztkötött Hb-formák jelen vannak-e a vizeletben steril hemolízist követően. Hb monomer (16 kDa) és dimer (32 kDa) jelenlétét igazoltuk a PHZ-nal kezelt egerek vizeletében 16 illetve 20 órával a kezelést követően. Ugyanakkor a kontroll egerek vizeletében Hb-formák jelenlétét nem tapasztaltuk.



5. ábra A vizeletben steril hemolízist követően megemelkedik az oxidált Hb-formák mennyisége

C57BL/6 egerekben PHZ-nal (50 mg/kg, majd 16 óra elteltével 30 mg/kg, 200 μL steril PBS-ben oldva intraperitonealisan alkalmazva, [n=6]) steril hemolízist indukáltunk, a kontroll egereket (n=6) pedig 200 μL PBS-sel injektáltuk. Az egerektől 4, 16 illetve 20 órával időpontokban vizeletmintát gyűjtöttünk. A vizeletből spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg (a) a Hb, a metHb és a hemikróm koncentrációját a 20 órával mintából. Az ábrán 6 kontroll és 6 kezelt egérből nyert vizelet értékeinek átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. ***p < 0,005. (b) A kovalens módon keresztkötött Hb-formák vizeletben való jelenlétét Western blot technikával vizsgáltuk. Reprezentatív Western blot 3 független kísérlet alapján.

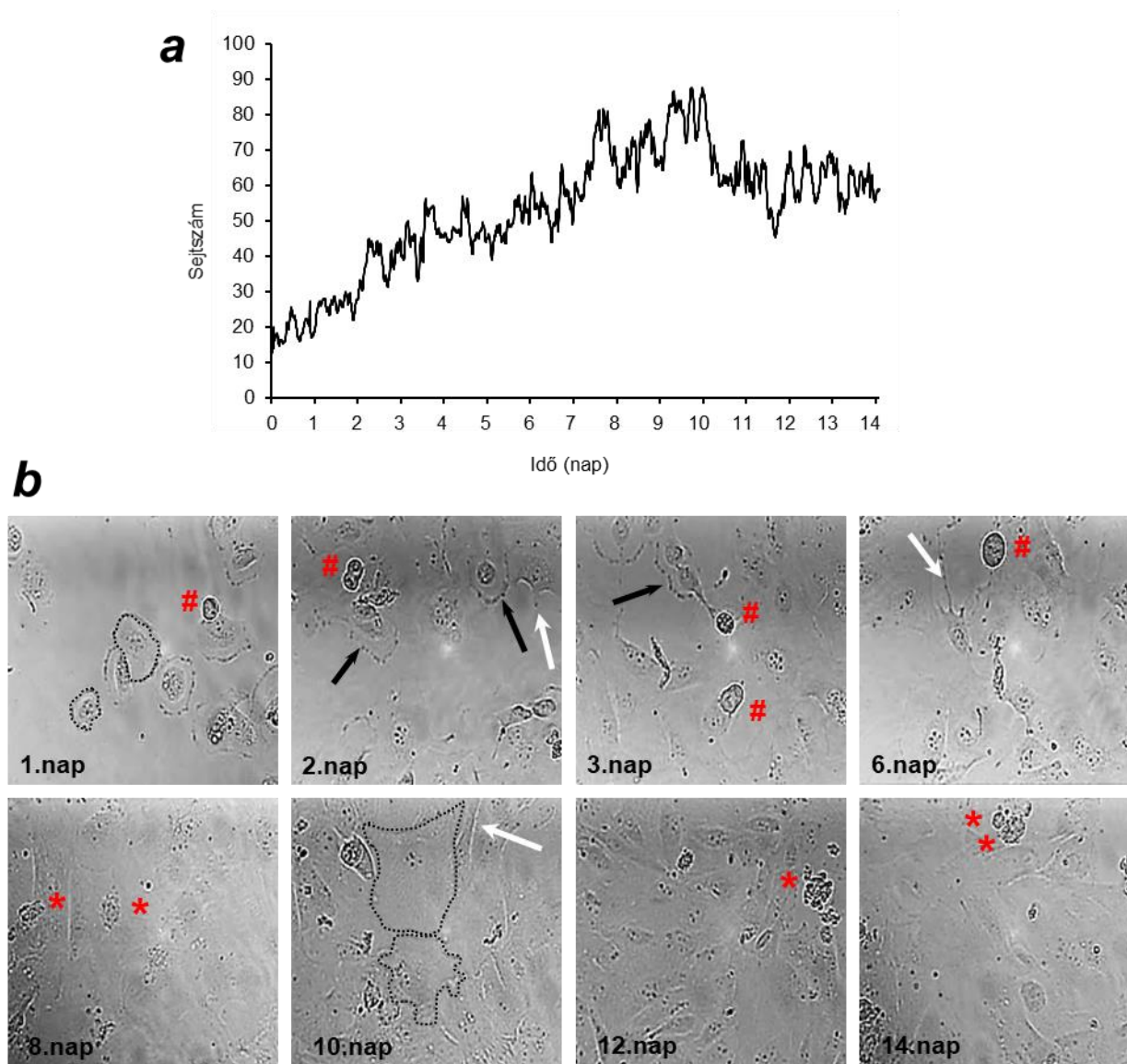
7.2. A podocyta sejtvonal osztódásával és terminális differenciálódásával kapcsolatos vizsgálatok

7.2.1. A podocyták osztódása és differenciálódása

Amint a 33°C-on permisszív körülmények között osztódó podocyta sejtenyészet elérte az 50-60%-os konfluenciát, nem permisszív körülmények közé 37°C-ra helyeztük át a sejtenyszetet, hogy megkezdődhessen a sejtek differenciálódása. 14 napon át videomikroszkóp segítségével követtük a sejtek morfológiájának, valamint a sejtszámnak a

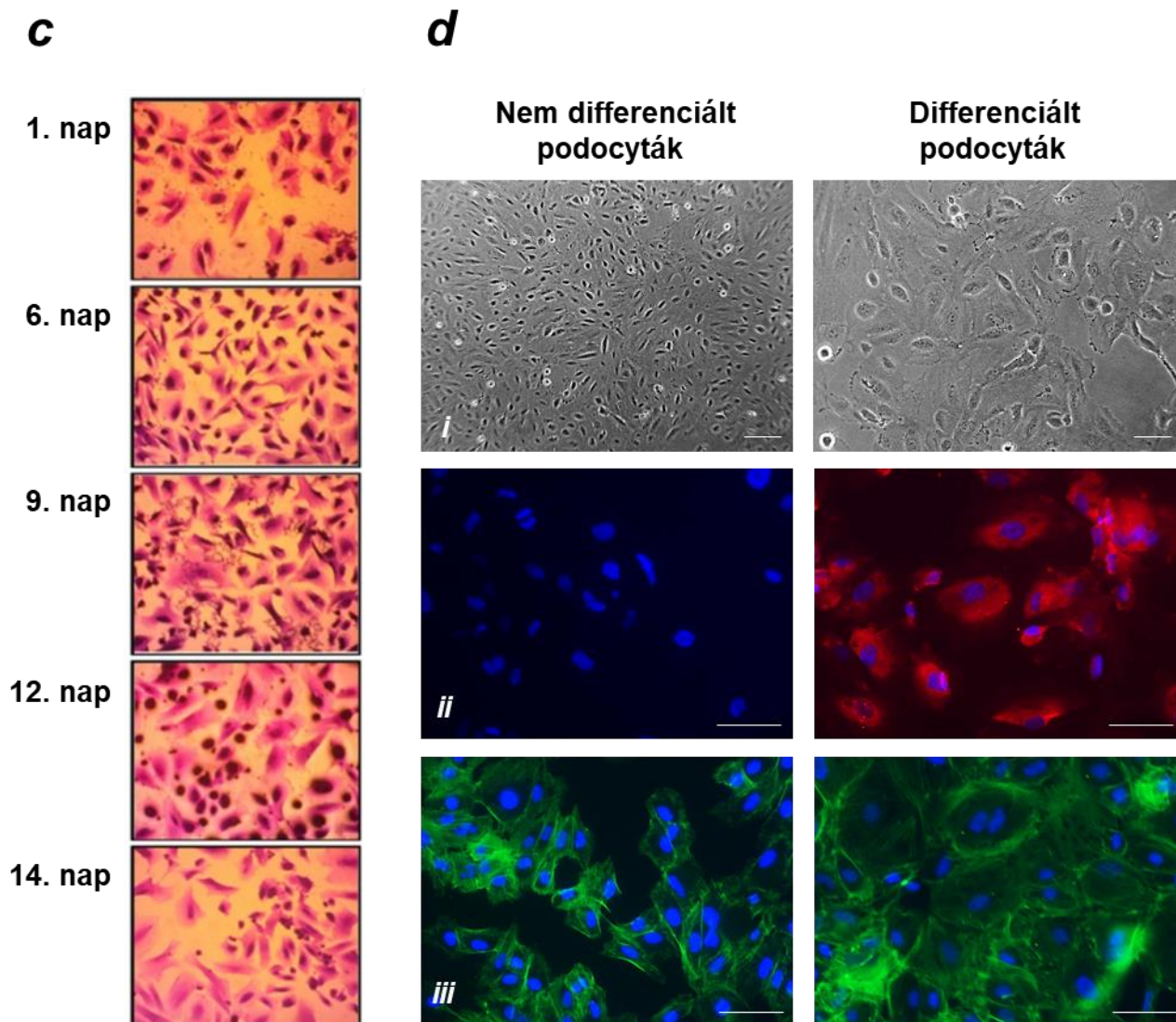
változását. A növekedési görbe elemzéséből azt láttuk, hogy az első 9 napban a sejtszám nőtt (6.a ábra). Azt követően, hogy a sejtek száma a 9-10. nap között elérte a maximális értéket, egy enyhe csökkenést követően közel állandóvá vált. A 10-14. nap között már csak elvétve láttunk sejtosztódást.

Miután a sejteket 37°C-ra helyeztük, a nem differenciált sejtek fokozatosan vették fel a differenciált podocytákra jellemző morfológiát (6.a-d ábra). A nem differenciált kisméretű, epithelszerű sejtek megjelenésére jellemző volt a macskakő-rajzolat. Ezzel szemben a differenciált podocytáknál megfigyelhető volt a sejtest jelentős mértékű megnövekedése, szabálytalan alakúvá válása (6.b ábra, *szaggatott vonallal jelölt részletek*), valamint számos, különböző alakú és méretű rövid lekerekített (6.b ábra, *fehér nyilak*), vagy hosszú orsószerű (6.b ábra, *fekete nyilak*) lábnyúlvány megjelenése. Az orsószerű nyúlványok kialakulását megelőzően gyakran megfigyelhető volt a citoplazmatikus kitüremkedések részleges visszahúzódása. A differenciált sejtek között több esetben észlelhető volt a celluláris hypertrophia, illetve a sejthalál kialakulása (6.b ábra, *piros csillagok*), míg más sejtek nyúlványokat kezdtek növesztetni. A képeken piros kettős kereszttel jelölt sejtek mitotikus sejtek, melyek az osztódás idejére felváltak az edény aljáról. Számos két magvú, nem osztódó sejtet is felfedeztünk a tenyészetben. Noha a 9. nap után a sejtszám kis mértékben csökkent, a sejtek motilitása változatlanul élénk maradt. A sejtek migrációja mindaddig megfigyelhető volt, amíg a tenyésztő edény alját teljes egészében be nem fedték.



6. ábra A podocyták differenciálódása nem permisszív körülmények (37°C) között.

(a) Podocytá tenyészet (50-60%-os konfluenciájú) sejtszámának követése 37°C-on 14 napon keresztül videomikroszkópia segítségével. A grafikon 3 különálló kísérlet reprezentatív eredményét mutatja. (b) A podocyták alakjának és méretének változása a differenciáció során. A szaggatott vonalak egy-egy sejtet körvonalaznak a fáziskontraszt képeken. A fekete nyilak a differenciált, különféle nyúlványokkal rendelkező podocyták rövid, lekerekített nyúlványait, míg a fehér nyilak a hosszú, orsószerű nyúlványokat jelölik. A képeken piros kettős kereszttel jelölt sejtek mitotikus sejtek, melyek az osztódás idejére felváltak az edény aljáról. Piros csillag jelöli az apoptotikus sejteket.



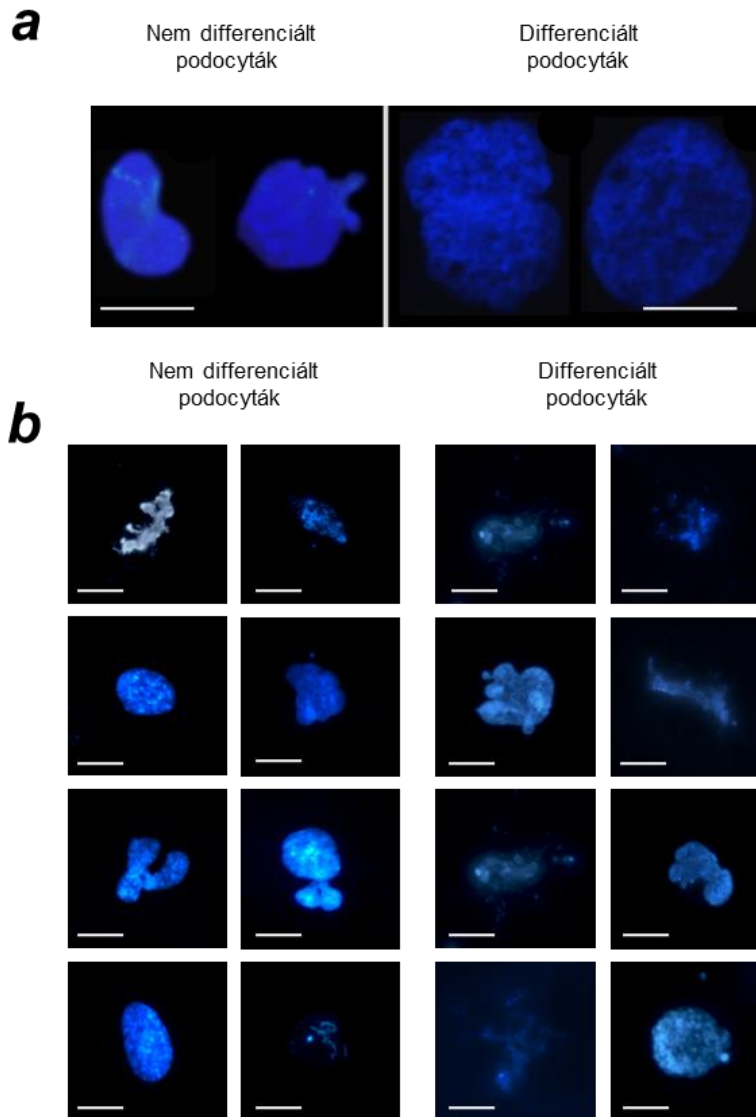
6. ábra A podocyták differenciálódása nem permisszív körülmények (37°C) között

(c) Különböző differenciáltsági fokú tenyészetek Giemsa-festése. A citoplazma (rózsaszín), és a mag festődése (kék) látható 100x-os nagyításban. (d) A fénymikroszkóppal és immunfluoreszcens mikroszkópiával készült felvételeken megfigyelhetők a nem differenciált és differenciált podocyták jellemzői. A bal oldali képeken nem differenciált sejtek láthatók permisszív körülmények között. A jobboldali képek 10 napja nem permisszív körülmények között tartott differenciált podocytákat ábrázolnak. (i) A fénymikroszkópos felvételeken a mérce 100 μm . A nem differenciált sejtek kisméretűek és utcakő rajzolatához hasonló a megjelenésük. Ezzel szemben a differenciált sejtek nagy sejtesttel és sejtmaggal, tömeges citoplazmával, emellett számos nyúlvánnyal rendelkeznek. (ii) A synaptopodin-Cy3 (piros) és a DNS (DAPI, kék) festődése együttesen csak a differenciált podocytáknál figyelhető meg (a mérce 100 μm -t jelöl). (iii) Az F-aktin (FITC-falloidin, zöld) és a DNS (DAPI, kék) festődését mutatják a képek (a mérce 100 μm -t jelöl). A képeken három kísérlet reprezentatív eredménye látható.

Mivel szeretnénk volna megtudni, hogy 14 nap alatt teljes mértékben lezajlott-e a podocyták differenciálódásának folyamata, megvizsgáltuk a sejtek synaptopodin expresszióját immunfestés segítségével. Nem differenciált és differenciált sejteket is megvizsgáltunk (6.d ábra, ii panel). A synaptopodin egy podocyta-specifikus fehérje, melynek fontos szerepe van a citoszkeleton integritásának megőrzésében⁸¹, lehetővé teszi a lábnyúlványok dinamikus plaszticitásának fenntartását, ezáltal pedig védelmi szerepet tölt be a vesében a proteinuria kialakulásával szemben. A nem differenciált podocytákban nem volt megfigyelhető synaptopodin-festődés, míg a differenciált sejtek jól látható módon expresszálták a synaptopodint (6.d ábra, ii panel, piros: synaptopodin, kék: mag). A citoszkeleton átalakulását a differenciálódás folyamata alatt az aktinhoz kötődni képes falloidin segítségével tettük láthatóvá (6.d ábra, iii panel, zöld: aktin, kék: mag).

7.2.2. A sejtmag növekedése és a kromatin szerkezet változása a differenciálódás folyamata alatt

A differenciálódás folyamata során nem csak a sejtek mérete, hanem a sejtmag átmérője is jelentősen nőtt. A 7.a ábra mutatja a DAPI-val megfestett sejtmagokat. Látható, hogy a jobb oldali ábrán a differenciált sejtmagok nagyméretűek, míg a bal oldali ábrán a nem differenciált sejtmagok kisméretűek. Szerettük volna megtudni, hogy a sejtmag méretének növekedése együtt jár-e a kromatin szerkezet változásával. Nem differenciált és a differenciált sejtmagokat lizáltunk, majd a kromatin szerkezetet megfestettük DAPI-val. A nem differenciált sejtek nukleoplazmájában számos területen láthatunk heterokromatint, ahol a géntranszkripció többnyire inaktív (7.b ábra). A képeken kromoszómák is megfigyelhetők, melyek a kromatin szerkezetnek egy kondenzáltabb állapotát mutatják. Ezekben a régiókban magas fokú mitotikus aktivitás észlelhető. Ezzel szemben, a differenciált podocyták nukleoplazmájában a kromatin szerkezet sokkal homogénebb elrendeződést mutat. Kevesebb heterokromatin található, mivel az aktívan átíródó gének lazább szerkezetbe rendeződnek.



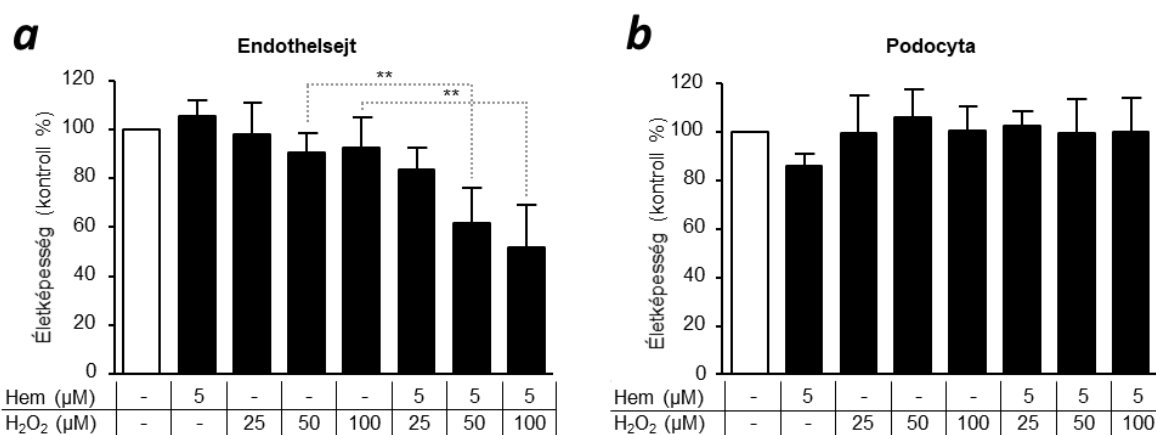
7. ábra A sejtmag növekedése és a kromatin szerkezet változása a podocyták differenciálódása során

(a) A bal oldali reprezentatív ábrason a 33°C-on (permisszív körülmények között) tenyésztett, nem differenciált podocyták sejtmagjai, míg a jobb oldali ábrason a 14 napig 37°C-on (nem permisszív körülmények között) tenyésztett, differenciált podocyták sejtmagjai láthatók DAPI magfestéssel megjelenítve (a mérce 5 μm -t jelöl). A differenciálódás során a mag mérete megnőtt. (b) Az érett és a még éretlen podocyták kromatin szerkezetének összehasonlítása. A nem differenciált sejtek sejtmag-preparátumai látható kromoszómákat tartalmaznak, a kromatin szerkezetük jóval kondenzáltabb és sok a heterokromatin régió. Ezzel szemben a differenciált sejtek kromatinszerkezete lazábban szerveződik (a mérce 5 μm -t jelöl).

7.3. Hem hatása az endothelsejtek és a podocyták oxidatív stressztűrő képességére és ROS termelésére

7.3.1. Hem hatása az endothelsejtek és a podocyták oxidatív stressztűrő képességére

A hem önmagában nem citotoxikus az endothelsejtek számára, azonban már alacsony koncentrációban is jelentősen fokozza a különféle ROS-ok sejthalált indukáló hatását^{34,41,43,61,62,82}. A már ismert modellt alkalmazva megvizsgáltuk a hem és a H₂O₂ által elindított oxidatív stresszválaszt podocytákon, melyet összevetettünk az endothelsejteknél tapasztalt válaszokkal (8. ábra).



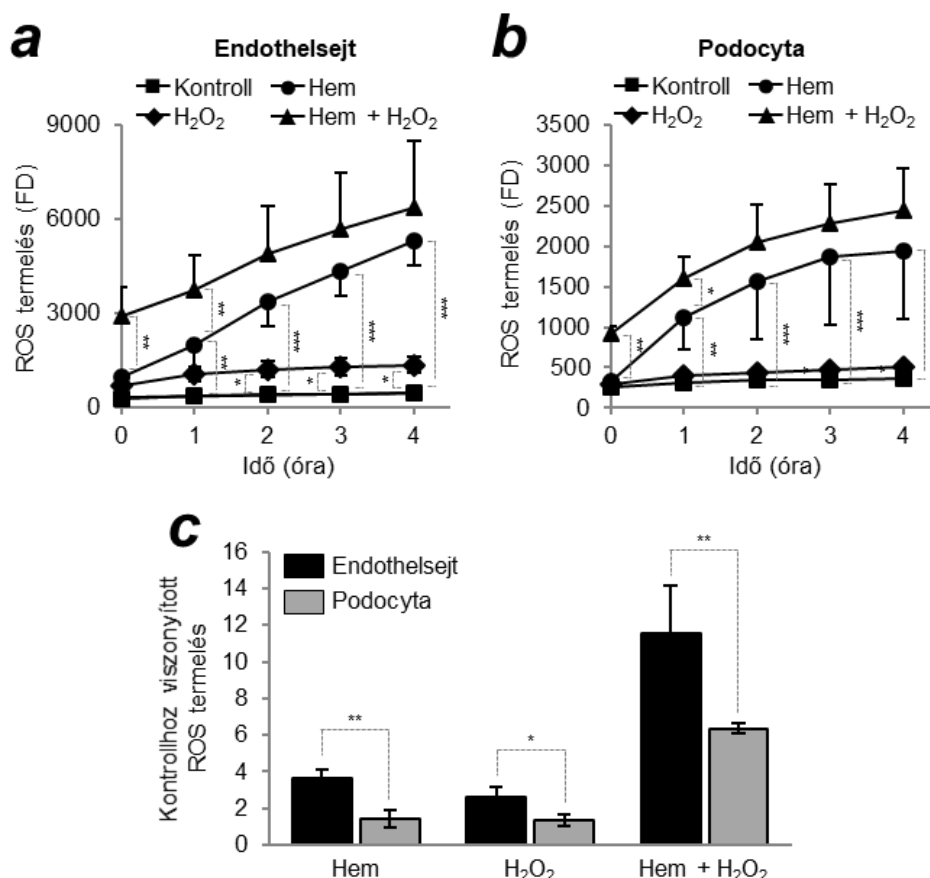
8. ábra Hem és H₂O₂ hatása endothelsejtek és podocyták életképességére

Endothelsejteket (a) és differenciált podocytákat (b) tenyésztettünk 96-lyukú tenyésztőedényben. A sejteket hem (5 μmol/L), növekvő dózisú H₂O₂ (25-100 μmol/L), illetve hem-előkezelést (5 μmol/L, 1 óra) követően alkalmazott H₂O₂ növekvő dózisaival kezeltük 4 órán keresztül. A sejtek életképességét ezután MTT-teszt segítségével határoztuk meg. A grafikonokon 3 kísérlet triplikátumban kivitelezett mérések átlaga ± SD van feltüntetve. **p < 0,01.

Endothelsejtekben a hem és a H₂O₂ önmagában nem okozott sejthalált, azonban hem előkezelést követően a H₂O₂ 50 μmol/L koncentrációban mintegy 40%-os, 100 μmol/L koncentrációban pedig mintegy 50%-os sejtpusztulást eredményezett (8.a ábra). Ezzel szemben a podocytákra nézve sem az önmagában alkalmazott hem vagy H₂O₂, sem pedig a hem előkezelést követően adott H₂O₂ nem volt toxikus hatással (8.b ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a podocyták nagymértékben ellenállóak az oxidatív stresszel szemben.

7.3.2. Hem hatása endothelsejtek és podocyta ROS termelésére

Az endothelsejteknel hem-szenzitizálást követően az oxidatív sejthalál kialakulásában jelentős szerepe van a sejtek fokozott ROS termelésének. Megvizsgáltuk, hogy a podocytaiban hogyan alakul a ROS-termelődése hem, H_2O_2 , illetve hem-előkezelést követően adott H_2O_2 hatására. A kapott eredményt összehasonlítottuk az endothelsejteknel észleltekkal.



9. ábra Hem és H_2O_2 hatása endothelsejtek és podocyta ROS termelésére

Endothelsejteket (a) és differenciált podocytaikat (b) tenyésztettünk 96-lyukú tenyésztőedényben. A sejteket hem előkezelés ($5 \mu\text{mol/L}$, 30 perc) nélkül vagy azt követően H_2O_2 -dal ($100 \mu\text{mol/L}$) kezeltük. A ROS szintjét a H_2O_2 -kezelés mellett mértük 4 órán keresztül. (c) Endothelsejtek és podocytaik kontrollhoz viszonyított ROS-termelése 1 óra elteltével. A diagrammok 3 kísérlet triplikátumban kivitelezett átlagát $\pm$ SD mutatják. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

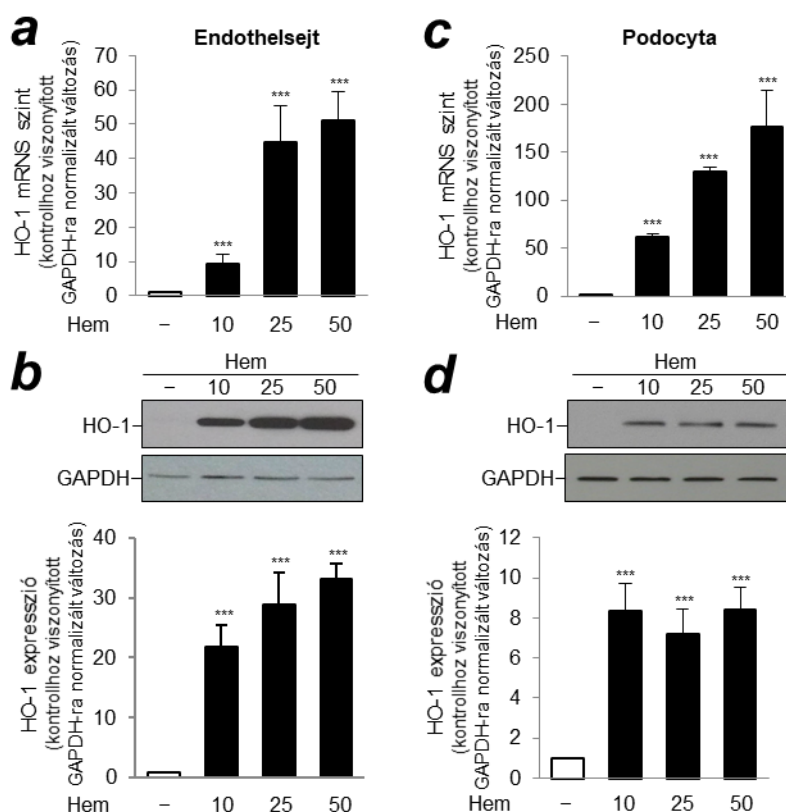
Az endothelsejtekben H_2O_2 hatására kis mértékben, hem hatására viszont jelentős mértékben fokozódott a ROS termelődése. Abban az esetben, amikor az endothelsejteket hem előkezelés után kezeltük H_2O_2 -dal, a hemmel kezelt sejtekhez hasonló mértékű ROS-termelést észleltünk. A kontrollhoz viszonyítva a hem, illetve a hem kezelést követően alkalmazott H_2O_2

endothelsejtek esetén már a detektálás első órájában jelentősen növelte a ROS termelést, az önmagában alkalmazott H_2O_2 viszont csak a második órától fokozta azt. (9.a ábra). Ezzel szemben podocytákban a hem fokozta a ROS-termelést, de a H_2O_2 egyik időpontban sem (9.b ábra). A hem előkezelést követően adott H_2O_2 nagyobb mértékű ROS-képződést eredményezett. A podocytákat az endothelsejtekkel összehasonlítva megállapítottuk, hogy a podocyták az általunk vizsgált összes körülmény hatására kevesebb ROS-t termelnek, mint az endothelsejtek, vagyis a podocyták ROS-termelésének fokozódása minden esetben elmarad az endothelsejtekétől (9.c ábra).

7.3.3. A hem indukálja a HO-1 mRNS és fehérje expresszióját endothelsejtekben és podocytákban

A hem-stressz elleni védekezésben fontos szerepet tölt be a HO-enzim, mely a hem sejten belüli degradációját végzi. Megvizsgáltuk a HO-1 mRNS és fehérje szintű indukcióját podocytákban és azt összevetettük az endothelsejtekben tapasztalt HO-1 indukciókkal.

A hem a podocyták HO-1 mRNS és fehérje expresszióját is fokozta az endothelsejtekhez hasonló módon (10. c-d ábra). A szakirodalommal összhangban endothelsejtekben hem hatására dózisfüggő módon fokozódott a HO-1 mRNS és fehérje expressziója (10. a-b ábra). Különbséget találtunk azonban a HO-1 fehérje expressziójának dózisfüggésében a két sejt között. A podocytákban 10 μ M hem már maximális HO-1 fehérje expressziót váltott ki, dózisfüggést nem tapasztaltunk. Ezzel szemben endothelsejtekben dózisfüggő választ kaptunk mRNS és fehérjeszinten egyaránt.



10. ábra Hem hatása az endothelsejtek és a podocyták HO-1 mRNS szintjére és fehérje expressziójára

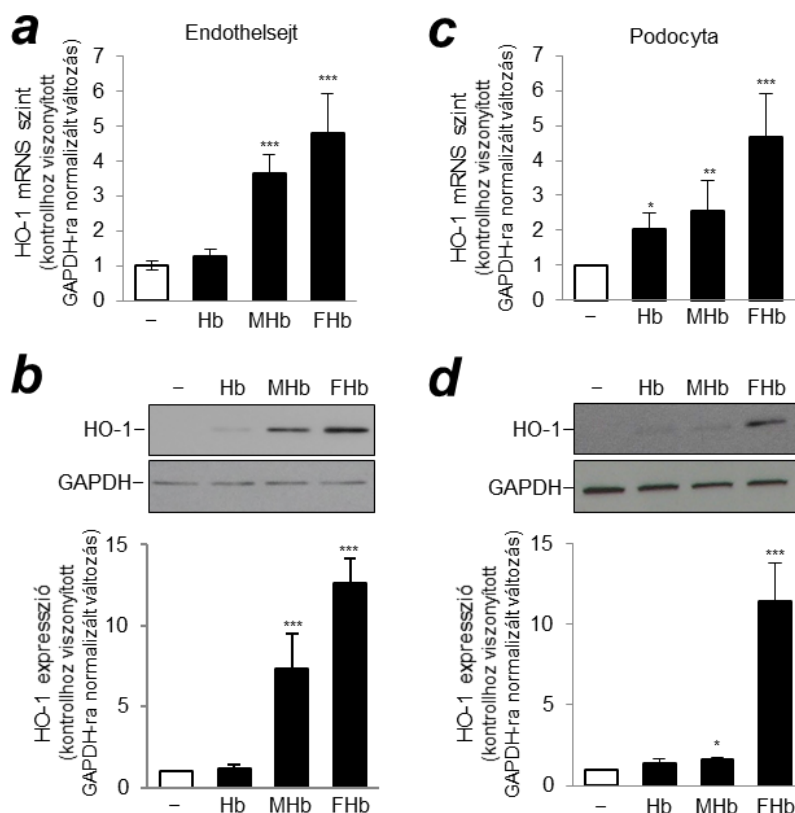
Endothelsejteket (a-b) és differenciált podocytákat (c-d) kezeltünk hemmel (10, 25, 50 μmol/L). 4 óra elteltével (a) az endothelsejtekben és (c) a podocytákban is meghatároztuk a HO-1 mRNS szinteket qRT-PCR módszerrel. Az oszlopok 3 triplikátumban kivitelezett kísérlet kontrollhoz viszonyított, GAPDH-ra normalizált átlagát ± SD mutatják. *** $p < 0,005$. (b) Az endothelsejtek és a (d) podocyták HO-1 fehérje expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok (n=3). A HO-1 expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. Az oszlopok 3 kísérlet kontrollhoz viszonyított, GAPDH-ra normalizált átlagát ± SD mutatják. *** $p < 0,005$.

7.3.4. A különféle oxidáltsági állapotú Hb-formák hatása az endothelsejtek és a podocyták HO-1 mRNS és fehérje expressziójára

Egerekén végzett *in vivo* kísérleteink során azt a következtetést vontuk le, hogy intravaszkuláris hemolízist követően a hem a plazmában elsősorban különféle oxidáltsági állapotú Hb-hoz kötött formában van jelen. Ezért megvizsgáltuk, hogy vajon ezek a Hb-formák képesek-e hem forrásként szolgálni endothelsejtek és podocyták számára.

A két sejt Hb-formákkal indukált HO-1 mRNS és fehérje indukciójában apró különbségeket tapasztaltunk (11. ábra). Például a Hb az endothelsejtekben nem, ezzel szemben a podocytákban kismértékben emelte a HO-1 mRNS szintjét. Az oxidált Hb-formák, a metHb és a ferrilHb mindkét sejtben indukálták a HO-1 mRNS-t, és közülük a ferrilHb volt az erősebb

induktor. A HO-1 fehérje expresszióját podocytákban és endothelsejtekben leginkább a ferrilHb fokozza.



11. ábra Különböző oxidációs állapotú Hb-formák hatása endothelsejtek és podocyták HO-1 mRNS- és fehérje-expressziójára

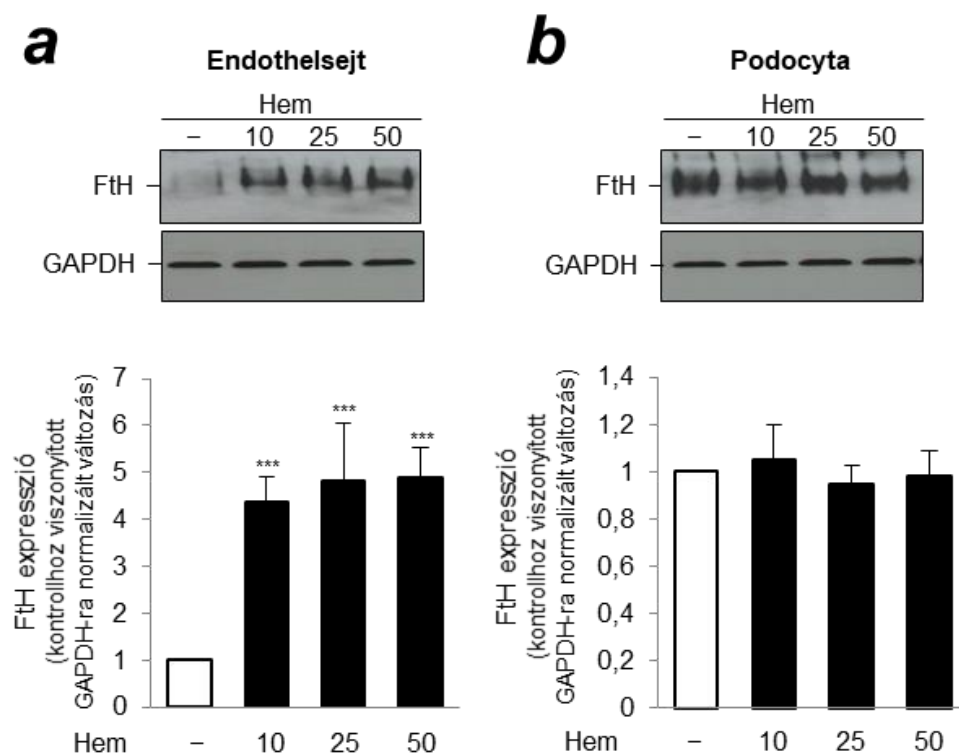
Endothelsejteket (a-b) és differenciált podocytaikat (c-d) Hb, metHb, illetve ferrilHb-nal kezeltünk (40 μ mol/L, 1 óra, szérumentes körülmények). 4 órával a kezelés után qRT-PCR módszerrel határoztuk meg a HO-1 mRNS szintjét (a) endothelsejtekben és (c) podocytaikban. Az oszlopok 3 triplikátumban kivitelezett kísérlet kontrollhoz viszonyított, GAPDH-ra normalizált átlagát $\pm$ SD mutatják. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. 8 órával a kezelést követően a HO-1 fehérje expresszióját Western blot technikával határoztuk meg (b) endothelsejtekben és (d) podocytaikban. A HO-1 expresszióját a GAPDH fehérje expressziójára normalizáltuk. Reprezentatív Western blotok három független kísérletből kiválasztva. A grafikonon 3 kísérlet kontrollhoz viszonyított, GAPDH-ra normalizált átlagát $\pm$ SD tüntettük fel. * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$.

7.3.5. A hem és a Hb-formák hatása a ferritin fehérje expressziójára endothelsejtekben és podocytaikban

Az endothelsejteknél a hem toxicitás kivédésében központi szerepe van a ferritinnek. A következő kísérleteinkben a hem (12.a ábra) és a különböző oxidáltsági fokú Hb-formák (12.b

12. ábra) hatását vizsgáltuk endothelsejtekben és podocytákban a ferritin kétféle alegységének expressziójára.

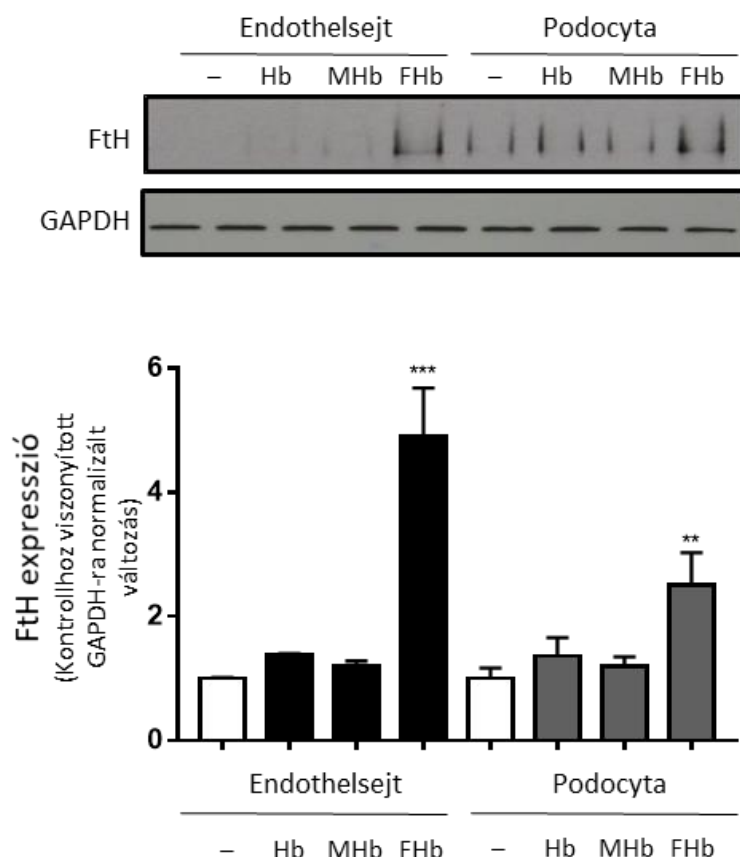
Az endothelsejtek kontroll körülmények között alacsony mértékben expresszálják a ferritin H-alegységét (FtH), azonban a hem jelentős mértékben fokozta az FtH expressziót (12.a ábra). A podocytákban kontroll körülmények között is magas a FtH expressziója, mely hem kezelésre nem fokozódik (12.b ábra).



12. ábra FtH fehérje expressziójának változása hem-kezelés hatására endothelsejtekben és podocytákban

Endothelsejteket (a) és differenciált podocytaikat (b) kezeltünk hemmel (10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$). A sejtek FtH-expresszióját 8 órával a kezelést követően Western blot technikával vizsgáltuk. (a) Az endothelsejtek és a (b) podocyta FtH fehérje expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok (n=3). A FtH-expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. Az oszlopok 3 kísérlet kontrollhoz viszonyított, GAPDH-ra normalizált átlagát $\pm$ SD mutatják. ***p < 0,005.

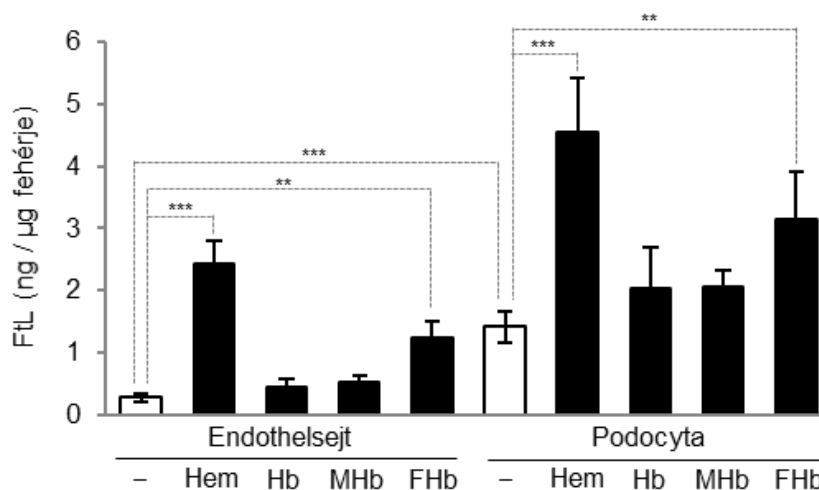
Ezt követően a Hb-formák FtH indukciót kiváltó hatását vizsgáltuk endothelsejtekben és podocytákban (13. ábra). Endothelsejtekben a FtH expresszióját a metHb kismértékben, a ferrilHb erőteljesebben fokozza. A podocyta FtH expressziója kontroll körülmények között meghaladja az endothelsejtek FtH expresszióját, és ferrilHb hatására további emelkedést tapasztaltunk.



13. ábra Különböző oxidációs állapotú Hb-formák hatása endothelsejtek és podocyták FtH expressziójára

Endothelsejteket és differenciált podocytákat Hb, methHb, illetve ferrilHb-nal kezeltünk (40 $\mu\text{mol/L}$, 1 óra, szérumentes körülmények). A sejtek FtH expresszióját 8 órával a kezelést követően Western blot technikával vizsgáltuk. Az endothelsejtek és a podocyták FtH fehérje expresszióját bemutató reprezentatív Western blot. A FtH expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. Az oszlopok 3 kísérlet kontrollhoz viszonyított, GAPDH-ra normalizált átlagát $\pm$ SD mutatják. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Következő kísérletünkben a ferritin molekula L-alegységének expresszióját vizsgáltuk endothelsejtekben és podocytákban ECLIA módszerrel (14. ábra). Endothelsejtekben az FtH alegységhez hasonló módon az FtL expresszióját a hem és a ferrilHb emelte meg szignifikánsan. Szintén összhangban az FtH expressziójával, a podocyták FtL expressziója kontroll körülmények között magasabb, mint az endothelsejtek FtL expressziója. Szemben az FtH expresszióval, az FtL alegység expresszióját a hem és a ferrilHb is indukálja podocytákban.



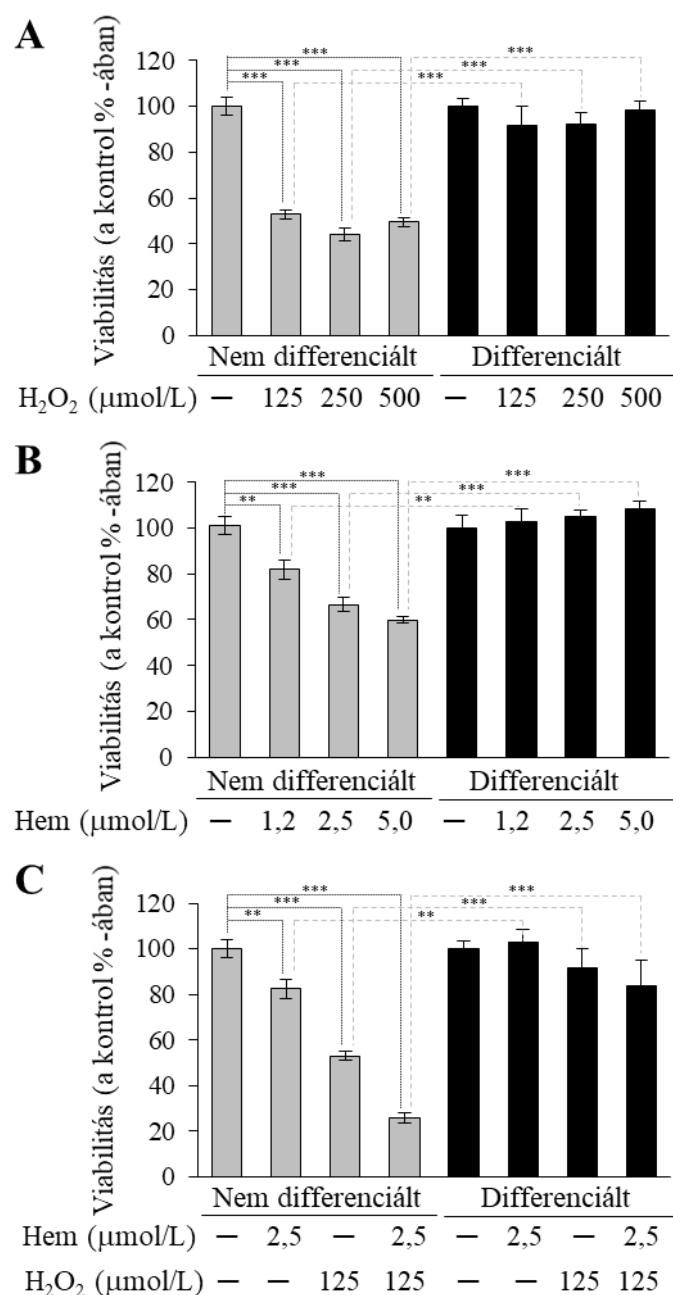
14. ábra Hem, illetve különböző oxidációs állapotú Hb-formák hatása endothelsejtek és podocyták FtL fehérje expressziójára

Differenciált podocytákat és endothelsejteket hem (5 µmol/L) Hb, metHb, illetve ferrilHb-nal kezeltünk (40 µmol/L, 1 óra, szérumentes körülmények). A sejtek összfehérjemennyiségre korrigált FtL expresszióját 8 órával a kezelést követően ECLIA módszerrel vizsgáltuk. Az oszlopok 3 kísérlet kontrollhoz viszonyított átlagát ± SD mutatják. **p <0,01, ***p <0,005.

7.3.6. Az oxidatív rezisztencia változása a podocyták differenciációja során

Felvetődött bennünk a kérdés, hogy a podocyták a differenciálódás során válnak-e rezisztenssé a hem-stresszel szemben, vagy ez a tulajdonság a még nem differenciált sejtekre is jellemző. Ennek tanulmányozására összehasonlítottuk az érett differenciált és a még nem differenciált sejtek oxidatív rezisztenciáját. Elsőként H₂O₂-kezelést követően vizsgáltuk a sejtek életképességét. A nem differenciált sejtek érzékenyek bizonyultak a H₂O₂-dal szemben. A 125-500 µmol/l koncentrációban alkalmazott H₂O₂ hatására a nem differenciált podocyták körülbelül 50%-nál tapasztaltunk sejthalált. Ezzel szemben ugyanezen H₂O₂ dózisok mellett a differenciált podocytáknál nem tapasztaltunk citotoxicitást (15.a ábra). A hem prooxidáns tulajdonságánál fogva érzékenyvé teszi a különböző sejteket az oxidatív stimulusokkal szemben, mint amilyen a H₂O₂⁵⁴. Önmagában és H₂O₂-dal kombinálva is megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a hem a sejtek életképességét. Ahogyan az a 15.b ábrán látható, a nem differenciált podocytákhoz önmagában hozzáadott hem dózis-függő módon sejthalált okozott. Az is látható, hogy ugyanazokban a dózisokban alkalmazva a differenciált podocytáknál semmilyen citotoxikus hatása nem volt a hemnek. Amikor nem differenciált sejtekhez adtunk hem előkezelést követően H₂O₂-t, még tovább csökkent a sejtek életképessége (53,3% vs.

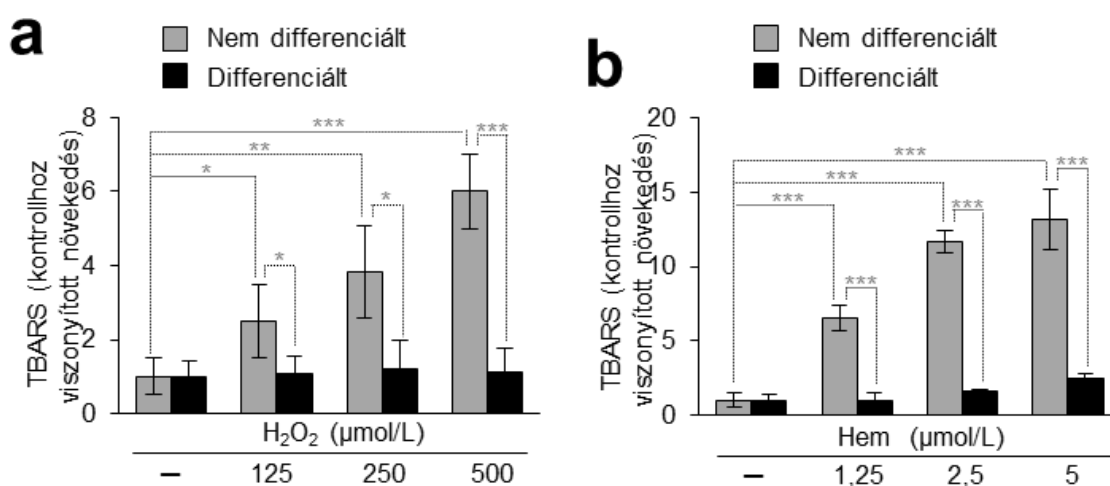
25,3%) (15.c ábra). Ugyanakkor a differenciált sejtek túlélték a halálos stimulust jelentő kombinált hem- és a H₂O₂-kezelést.



15. ábra Az érett podocyták nagymértékben ellenállóak az oxidatív stresszel szemben
 Nem differenciált és differenciált podocytaikat H₂O₂-dal (A) (0-500 μmol/L), (B) hemmel (0-5 μmol/L), (C) hem-előkezelést (2,5 μmol/L, 1 óra) követően H₂O₂-dal (125 μmol/L) kezeltük. A sejtek életképességét 4 órás kezelést követően MTT módszerrel határoztuk meg. Az ábrán három független, kvadruplikátumban készült kísérlet eredményeinek átlaga ± SEM van feltüntetve. **p<0,01, ***p<0,001.

7.3.7. Az antioxidáns védelmi mechanizmusok változása a podocyták érése során

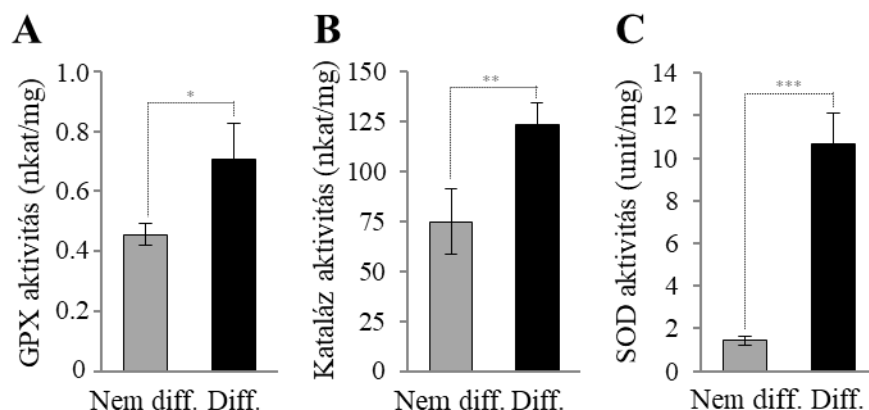
Amikor hem- vagy H_2O_2 -kezelésnek vetettük alá a podocytákat, a kezelés következtében a nem differenciált tenyészetnél sejthalált tapasztaltunk, míg a differenciált sejtek igen rezisztensnek bizonyultak. Kíváncsiak voltunk arra, hogy ennek a jelenségnek mi a magyarázata. Megvizsgáltuk, hogy a kétféle sejtípusnál eltérően zajlik-e a különböző stimulusok hatására kialakuló oxidatív stressz. Az oxidatív metabolitok közül a TBARS koncentrációját mértük meg differenciált és nem differenciált sejtekben normál körülmények között és stressz hatás alatt (16.a és b ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a nem differenciált podocytáknál dózisfüggően megemelkedett a TBARS szintje hem- és H_2O_2 -kezelés hatására egyaránt. Ezzel szemben ugyanazon mértékű stimulus a differenciált sejteknél nem okozott szignifikáns TBARS-szint emelkedést.



16. ábra H_2O_2 illetve hem hatása nem differenciált és differenciált podocyták TBARS szintjére

Nem differenciált és differenciált podocytákat kezeltünk (A) H_2O_2 -dal (0-500 $\mu\text{mol/L}$) illetve (B) hemmel (0-5 $\mu\text{mol/L}$) 4 órán keresztül, majd TBARS koncentrációt mértünk a sejtekből. Az ábrákon a TBARS-koncentráció kontrollhoz viszonyított változását ábrázoltuk. Az ábrákon két különálló, triplikátumban készült kísérlet eredményeinek átlaga $\pm$ SEM van feltüntetve (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Ezek után azt is megvizsgáltuk, hogy a differenciált podocyták fokozott oxidatív stresszel szembeni rezisztenciájának része-e a védelmi mechanizmusok fokozott aktivitása. Megmértük a sejtekben a jelentősebb antioxidáns enzimek, a GPX, a kataláz és a SOD aktivitását (17.a–c ábra). Azt találtuk, hogy mindegyik antioxidáns enzim aktivitása jelentősen magasabb volt az érett podocytákban, mint a nem differenciált sejtekben.



17. ábra A jelentősebb antioxidáns enzimek aktivitása nem differenciált és érett podocytaiban

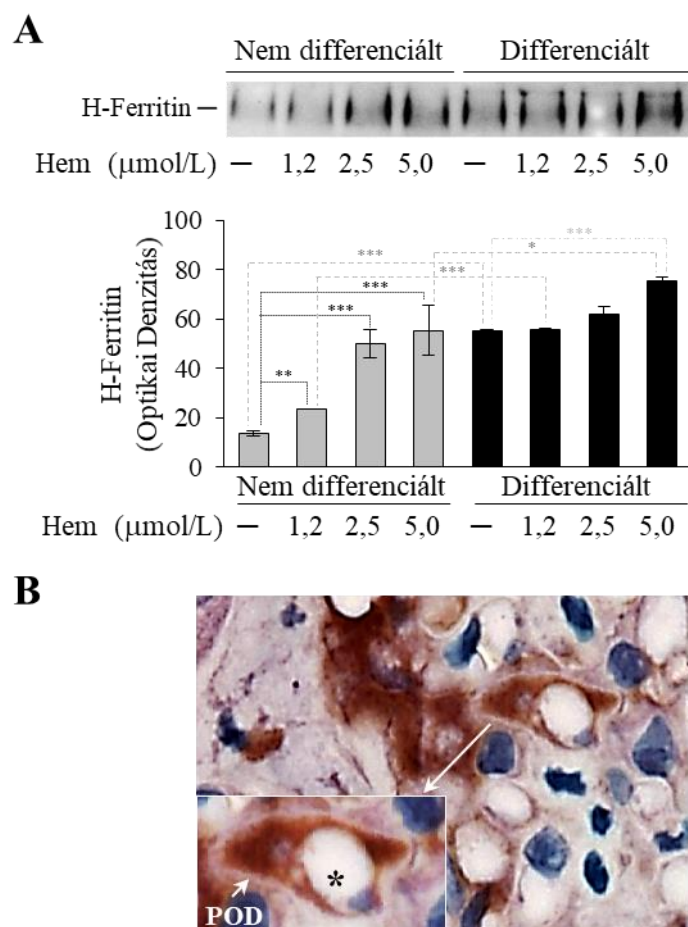
(A-C) Nem differenciált és differenciált podocytaiban megmértük a GPX, a kataláz és a SOD enzimek aktivitását. A diagrammokon két, triplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD van ábrázolva. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

7.3.8. A FtH expressziójának változása a podocyta differenciációja során

Az érett podocytaikon végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy a differenciált podocyta FtH expressziója kontroll körülmények között magasabb, mint az endothelsejtek FtH expressziója. A következő kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy a magas FtH expresszió az éretlen podocytaakra is jellemző-e, vagy az antioxidáns enzimek aktivitásához hasonlóan a differenciáció során emelkedik meg.

A kérdés megválaszolása céljából összehasonlítottuk a nem differenciált és a differenciált podocyta FtH expresszióját kontroll körülmények között, illetve hem jelenlétében. Kontroll körülmények között a differenciált podocyta FtH expressziója mintegy négyszerese volt a nem differenciált sejtek FtH expressziójának (18.a ábra). A nem differenciált sejtek FtH expressziója hem hatására dóziszfüggő módon emelkedett, ugyanakkor a differenciált podocytaiban csak a legmagasabb hem dózison tapasztaltuk a FtH expressziójának kismértékű fokozódását. Humán veséből származó szövettani metszeteken is megvizsgáltuk a podocyta FtH expresszióját. A felnőtt veséből készült metszeteken WT-1-elleni antitesttel jelöltük meg a podocytaikat, hogy láthatóvá tegyük az elhelyezkedésüket a glomeruluson belül (18.b ábrán lila színben ábrázolódnak a képen). A metszeteket ezzel párhuzamosan FtH-elleni antitesttel is megfestettük. Azt láttuk, hogy a cortexben elhelyezkedő glomerulusokban számos podocyta erős FtH festődést mutatott (barna). Ez a felfedezés összhangban áll az általunk észlelt *in vitro* kísérleti eredményekkel, miszerint a podocytaiban

nagy mennyiségben található meg az FtH és ezeknek a sejteknek a vas-szekvesztráló kapacitása is jelentős.



18. ábra Podocyták FtH expressziója *in vitro* és *in vivo* körülmények között

(A) Nem differenciált és differenciált podocytákat kezeltünk hemmel (0-5 μmol/L, 4 óra). A sejtek FtH expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk. Három kísérletből kiválasztott reprezentatív Western blot. (B) A képen az FtH (barna) és a WT-1 (lila) fehérjék immunhisztokémiai festődése látható natív vese-szövetből készült metszeten. A kinagyított képrészleten jól látható egy glomeruláris kapilláris szakasz keresztmetszeti képe (*), valamint az azt körülvevő podocytá (POD) sejttestje és lábnyúlványai. Az erős barna színű festődést a podocyták citoplazmájában jelenlévő FtH adja.

8. Diszkusszió

Munkánk során elsőként azt tanulmányoztuk, hogy intravaszkuláris hemolízis során a plazmában megjelenő Hb milyen oxidációs állapotban van jelen, meghatároztuk a Hb-formák plazma koncentrációját és a Hb-ról disszociált hem-csoportok mennyiségét. Az intravaszkuláris hemolízis modellezéséhez C57BL/6 egerekben indukáltunk steril hemolízist PHZ intraperitoneális injektálásával. Ezenél az egereknél már 4 óra elteltével jelentős mértékben megnőtt a plazmában az extracelluláris Hb, a metHb, a hemikróm, valamint a szabad hem mennyisége. Az oxidált Hb-formák közül a metHb és a hemikrómok koncentrációja szintén magasabb volt a PHZ-nak kezelt egerek vizeletében a kontrollhoz képest 20 óra elteltével. 16 óra elteltével a Hb monomerek mellett keresztkötött Hb-formák is megjelentek a PHZ-val kezelt egerek vizeletében.

Intravaszkuláris hemolízissel járó betegségekben az akut vesekárosodás a hemolízist követően pár órán belül kialakul, a krónikus vesekárosodás viszont csak hónapok vagy évek múltán válik nyilvánvalóvá⁸³. Az intravaszkuláris hemolízissel járó epizódok tovább ronthatják a károsodott vesefunkciót, melyre kiemelt figyelmet kell fordítani a krónikus veseelégtelenség (CKD) globális epidémiája miatt. A CKD-ban megfigyelhető irreverzibilis podocyta-károsodás pontos mechanizmusa egyelőre nem ismert.

Munkánk további részében a podocyta hemolízisre, illetve hem-stressz hatására bekövetkező változását vizsgáltuk *in vitro* körülmények között egy humán immortalizált podocyta sejtvonal segítségével. Elsőként célunk volt a podocyta differenciálódási folyamatának különböző aspektusokból történő bemutatása. Megvizsgáltuk a sejtek morfológiai változásait, a kromatinszerkezet, a sejtmotilitás és az oxidatív rezisztencia változását a differenciálódás során. Arra kerestük a választ, hogy miért olyan hosszúéletűek a vese glomerulusainak szerves részét alkotó podocyta. A podocyta igen fejlett, speciális képességekkel rendelkező sejt, egyedi sejtfelépítésük magyarázata a vesében betöltött különleges szerepük⁸⁴. Az emberi vese embrionális időszakban lezajló fejlődése alatt a podocyta közötti laterális összeköttetések megszakadnak és a sejtek lábnyúlványokat fejlesztenek, melyek a sejtesttől jelentős távolságokat képesek elérni. Ezek a lábnyúlványok résdiafragmát alkotva körülveszik a glomeruláris kapillárisokat⁸⁵. Az egymással fésűszerűen összefonódó lábnyúlványok alakítják a résmembrán filtrációs pórusait, melyek a glomeruláris filtrációs barrier szelektív permeabilitását biztosítják⁸⁴. A podocyta károsodása fehérjevesztéshez, proteinuriához vezet, mely a legtöbb glomeruláris eredetű betegségben megfigyelhető⁸⁶. A podocyta differenciálódásának folyamatáról főként fixált sejtek és

sejtextraktumok molekuláris és biokémiai vizsgálatából származó információk állnak rendelkezésre. A time-lapse videomikroszkópia fejlődésével lehetővé vált számunkra, hogy speciális körülmények között vizsgálni tudjuk az élő sejtek közötti dinamikus kölcsönhatásokat⁷⁷. Moin Saleem és mtsi. létrehoztak egy immortalizált podocytá sejt vonalat¹¹, mely lehetőséget teremtett azoknak a mechanizmusoknak a kutatására, melyek azért felelősek, hogy ezek a sejtek mégoly kedvezőtlen körülmények között is képesek egy emberi életet át fennmaradni és funkcióikat ellátni⁸⁷. Miután számos mitózison és egy teljes differenciálódási folyamaton átesetek a podocyták, egy teljes egészében új fenotípust kaptak, melyre jellemző a nagy sejttest és a hosszú lamellipodiumok⁸⁸. A sejtek citoskeletális felépítése még szembetűnőbb lett, fénymikroszkóppal is jól láthatóvá vált: a sejttestben és a podocyták lábnyúlványaiban az aktin filamentumok longitudinálisan nagy kötegekbe rendeződtek. A sejteket a differenciálódás lezajlását követően is fokozott motilitás jellemezte, és a sejtek mindaddig változtatták helyzetüket, amíg a tenyésztőedény felületét teljes egészében lefedték. Egy közlemény – melyben négyféle podocytá sejt vonal tulajdonságait vetették össze a szerzők –, szintén arról számolt be, hogy a humán podocyták migrációs aktivitása és motilitása igen magas⁸⁸. A sejttenyészetben élő podocyták progresszív módon kilépnek a sejt ciklusból és ezzel párhuzamosan elveszítik azt a képességüket, hogy önmagukat megsokszorozzák, azaz pótolják a károsodott funkciójú vagy elpusztult sejteket. Liapis és mtsi.⁸⁹ által korábban leírtakkal összhangban mi is azt láttuk, hogy a podocyták terminális differenciálódása együtt jár azzal, hogy a sejtek véglegesen kilépnek a sejt ciklusból. Az érési folyamat során a sejtek elveszítették mitotikus aktivitásukat, így a podocyták többé már nem voltak képesek az osztódásra. Mindezek magyarázzák azt a megfigyelésünket, miszerint a nem differenciált sejt kultúra proliferációs rátája magasabb, mint a differenciált sejttenyészeté. Jóllehet a podocyták progenitor sejtjei (egyes osztódásra képes parietális epithelsejtek)⁹⁰⁻⁹² hozzájárulhatnak a résdiafragma helyreállításához, a podocyták kiterjedt károsodása és leválása lehetetlenné teszi a vesefunkció helyreállítását, mivel a differenciált sejtek élettartama korlátozott⁹². Time-lapse videomikroszkópia segítségével előben figyelhettük meg a podocyták lábnyúlványainak fokozatos megjelenését. Megfigyeléseink egybehangzóak azon korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint a podocyták hosszú lábnyúlványai úgy alakulnak ki, hogy a lamellipodiumok megnyúlását részleges visszahúzódás követi, majd több kisebb, tüskeszerű nyúlvány jelenik meg⁸⁸.

Kutatásainkat megelőzően kevés információ állt rendelkezésre a glomeruláris podocyták sejt magjainak tulajdonságairól. A sejt mag elsődleges szerepe az információ tárolása, emellett pedig a sejt mag irányítja a sejtek osztódását és megújulását⁹³. Megvizsgáltuk, hogy

miben különbözik a nem differenciált és a differenciált podocyták sejtmagja, illetve a sejtmagban található kromatin szerkezete, az eltéréseknek milyen szerepe van a génexpresszió szabályozásában és kutattuk azokat a jellemzőket, melyek magyarázatot adhatnak arra, hogy a differenciált sejtek miért képtelenek az osztódásra. A szakirodalomban leírtaknak megfelelően mi is azt találtuk, hogy a nem differenciált sejtek magszerkezete, illetve kromatin szerkezete különbözik a differenciált sejtektől. A korábban leírtakkal összhangban⁹⁴ azt láttuk, hogy a nem differenciált sejtek magjában elszórtan és több helyen volt heterokromatin állomány. A fejlődés során bizonyos jelátviteli szignálok hatására a kondenzált heterokromatin szerkezet fellazul és transzkripciósnak aktív válik. Mielőtt a podocyták a terminális differenciálódás stádiumába lépnek és elhagyják a sejtciklust, van egy átmeneti időszak, amikor ezeknek a heterokromatin régióknak a száma növekszik, csoportokba azonban csak a későbbiek folyamán rendeződnek⁹⁵. A nem differenciált sejteknél jellemző a kromatin fehérjéinek hiperdinamikus plaszticitása, a folyékony sejtmagállomány, a sejtmag fizikai plaszticitása és a sejtmag globális dinamikája. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a nem differenciált sejtekre a nyitott kromatin konformációs modell jellemzői érvényesek⁹⁴. A sejtciklusban a mitózis fázisán belül a profázisban megtörténik a DNS részleges kondenzációja, így a mitotikus kromoszómák a sejtmagnak csupán egy kis részét foglalják el. A telofázisban a kromoszómák újból megduzzadnak és kitöltik az egész magot. Azt láttuk, hogy a nem differenciált podocyták sejtmagjában számos heterokromatin régió található, emellett szabad szemmel jól látható kromoszómákat is tartalmaznak a sejtmagok, mely a sejt magas mitotikus aktivitására utal. Ezzel szemben, az érett, differenciált podocytáknál sokkal homogénebb kromatinszerkezetet találtunk: kevesebb volt a heterokromatikus régió, az aktívan átíródó gének lazábban szerveződtek. Ezek az észlelések is azt támasztják alá, hogy a differenciált podocyták magjában nagyon aktív géntranszkripció és fehérje szintézis folyik. Kondenzált kromatinrégiók és mikroszkópban szemmel látható kromoszómák ritkán észlelhetők az érett sejteknél, mivel a differenciált podocyták nem mennek végig a sejtcikluson. Ritkán, de bizonyos körülmények között ezek az érett podocyták is képesek mitózissal osztódni, az utódsejtek azonban nem válnak szét. Ez lehet a magyarázata annak a jelenségnek, hogy egyes podocyták kettő vagy több sejtmaggal is rendelkeznek.

A podocytákat a glomeruláris filtrátum készítése közben sokféle káros és ártalmas inger éri, ilyenek például az oxidatív stresszfaktorok. A sejtek oxidatív stresszel szembeni rezisztenciáját, illetve azokat a pontos mechanizmusokat, melyek a sejtek túlélését segítik ezidáig nem sokan vizsgálták.

Balla és mtsi. korábban ismertették az endothelsejtek hem-stresszre adott válaszát, miszerint a hem önmagában nem citotoxikus az endothelsejtek számára, azonban már alacsony koncentrációban is jelentősen fokozza a reaktív oxigéngyökök citotoxikus hatását^{34,41,43,61,62,82}. A glomerulusban szoros kontaktusban élő és együttműködő kétféle sejttypusnál, az endotheleknél és a podocytaáknál vizsgáltuk összehasonlításban a hem és a H₂O₂ által elindított oxidatív stresszválaszt. A várákózásainknak megfelelően az endothelsejtekben a hem és a H₂O₂ önmagában nem okozott sejthalált, azonban hem-előkezelést követően a H₂O₂ már 50 µmol/L koncentrációban mintegy 40%-os sejtpusztulást eredményezett. Ezzel szemben a podocytaáknál sem az önmagában alkalmazott hem vagy H₂O₂, sem pedig a hem-előkezelést követően adott H₂O₂ nem volt toxikus. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a podocytaák nagymértékben ellenállóak az oxidatív stresszel szemben.

Az endothelsejteknel a hemmel végzett szenzitizálást követően kialakuló oxidatív sejthalál lezajlásában kiemelt szerepe van a fokozott ROS termelésnek⁹⁶. Kísérleteink során azt láttuk, hogy az endothelsejtekben H₂O₂ hatására kis mértékben, hem hatására viszont jelentős mértékben fokozódott a ROS termelődése. Amikor az endothelsejtek hem előkezelést követően H₂O₂-dal kezeltünk, a hemmel kezelt sejtekéhez hasonló, vagy még annál is nagyobb mértékű ROS-termelést mértünk. Tendenciájában mindenhol fokozódott a sejtek ROS-termelése, de szignifikánsan magasabb ROS-képződést csak az első órákban mértünk. Ezzel szemben podocytaákban csak a hem fokozta a ROS-termelést, a H₂O₂-kezelés nem. A hem előkezelést követően adott H₂O₂ tendenciájában növekvő ROS-képződést eredményezett. A két sejtet összehasonlítva megállapítottuk, hogy a podocytaák ROS-termelésének fokozódása minden általunk vizsgált körülmény mellett elmarad az endothelsejtekétől.

A hem sejten belüli degradációját a HO-enzim végzi, melynek során biliverdin, CO és vas-ion keletkezik. Az oxidatív stresszel szembeni védelemben ezért kitüntetett szerepe van a HO-enzimcsalád indukálható izoformájának, a HO-1-nek. Szakirodalomból ismert, hogy a hem endothelsejtekben mRNS és fehérje szinten is indukálja a HO-1-et⁴³, azonban a podocytaák tekintetében nem állt rendelkezésre ilyen adat. Ezért a következő kísérletünkben megvizsgáltuk a HO-1 mRNS és fehérje szintű indukcióját podocytaákban és azt összevetettük az endothelsejtekben tapasztalt HO-1 indukciókkal. A szakirodalomban leírtakkal összhangban endothelsejtekben hem hatására dózisfüggő módon fokozódott a HO-1 mRNS és fehérje expressziója⁴³. Az endothelsejtekhez hasonló módon a hem a podocytaák HO-1 mRNS és fehérje expresszióját is fokozta. Azonban különbséget találtunk a kétféle glomeruláris sejttypus között a HO-1 fehérje expressziójának dózisfüggésében, ugyanis endothelsejtekben dózisfüggő

választ váltott ki a hem mRNS és fehérjeszinten egyaránt, a podocytáknál viszont 10 μ M hem már maximális HO-1 fehérje expressziót indukált és dózisfüggést nem tapasztaltunk.

Ezen eredmények alapján a HO-1 mRNS transzlációja fehérjévé szabályozott lehet. Elképzelhető, hogy microRNS jelenléte korlátozza az endothelsejtekhez képest is jelentősen megnövekedett HO-1 mRNS fehérjévé történő átíródását podocytákban. Beckman és mtsi. közleményükben leírták, hogy a miR-377 és a miR-217 microRNS-ek együttes jelenléte jelentősen képes csökkenteni a HO-1 fehérje expresszióját, ugyanakkor nem csökkentik a HO-1 mRNS szintjét⁹⁷. Eredményeink összhangban állnak ezzel a felfedezéssel, azonban további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy valóban ez a mechanizmus áll-e az általunk megfigyelt jelenség hátterében.

Az endothelsejteknel a hem toxicitás kivédésében központi szerepe van a ferritinnek^{43,60,62,96,98}. A ferritin molekula a hem degradációja során a hemből kiszabaduló vasat szekvesztrálja, és biológiailag inaktív módon tárolja a citoszolban. Hemolízis során a vörösvértestekből szabaddá váló hemoglobin főként dimer formában van jelen a plazmában, mely kisebb méreténél fogva könnyen átjut a glomerulusokon és a reaktív környezetben oxidálódva nephrotoxikus hatást fejt ki. Ennek fontosságát szem előtt tartva következő kísérleteinkben a hem és a különböző oxidáltsági fokú Hb-formák hatását vizsgáltuk endothelsejteknel és podocytáknál a ferritin kétféle alegységének expressziójára. Azt láttuk, hogy az endothelsejtek alapállapotban csupán kis mértékben expresszálják a ferritin H-alegységét, a hem azonban jelentős mértékben képes fokozni az FtH expresszióját. Ezzel szemben a podocytákban mindenféle behatás nélkül, kontroll körülmények között is magas az FtH expressziója, mely hem-kezelés hatására nem fokozódik. A szakirodalom nem közöl pontos adatokat arra vonatkozóan, hogy mi lehet a magyarázata a podocytákban észlelt magas H- és L-ferritin szinteknek. Egyik lehetséges magyarázata a ferritin lizoszómális degradációjának csökkent mértéke, a lizoszómális degradációért felelős jelátviteli útvonalak csökkent aktivitása, mely egy bonyolult szabályozási folyamat függvénye⁹⁹.

Ezt követően a Hb-formák FtH indukciót kiváltó hatását vizsgálva azt észleltük, hogy az endothelsejtekben az FtH expresszióját a metHb kismértékben, a ferrilHb erőteljesebben fokozza. A podocyták FtH expressziója kontroll körülmények között meghaladja az endothelsejtek FtH expressziójának mértékét, és ferrilHb hatására további emelkedést tapasztaltunk. Endothelsejtekben az FtH alegységhez hasonló módon az FtL expresszióját a hem és a ferrilHb is szignifikánsan megemelte. Szintén összhangban az FtH expressziójával, a podocyták FtL expressziója kontroll körülmények között magasabb, mint az endothelsejtek FtL expressziója. Szemben az FtH expresszióval, az FtL alegység expresszióját a hem és a ferrilHb

is indukálja podocyta'ban. A podocyta' magas FtH koncentraci'ja és ebb'l kifoly'lag magas oxidativ stresszt'ro' ke'pessege hozzaj'arulhat a podocyta' hosszú élettartamának az oxidativ k'ornyezetben.

A dolgozatban bemutatott endothelsejtes k'isérleteket saját magam végeztem, melyek eredménye összhangban van az irodalomban már korábban közöltekkel. Az endothelsejtekkel végzett k'isérletek többsége nem tekinthet' újnak, csupán a podocyta'kkal kapott eredmények értékét és relevanciáját növelend' végeztünk összehasonlítást a két sejttípus között, referenciasejtként használva az endotheleket. Ez alól kivételt képez az oxidált Hb formák által kiváltott HO-1 és ferritin indukció, mely új eredménynek min'ösül.

K'isérleteink eredménye alapján beszámoltunk arról, hogy a differenciált podocyta' oxidativ rezisztenciája a H₂O₂ indukálta oxidativ stresszel szemben jóval nagyobb, mint a még nem differenciált sejteké. A Fenton-reakció értelmében a ROS-mediált oxidativ stressz mértéke redox aktív vas jelenlétében megsokszorozódik. Ez az oka annak, hogy a differenciált és nem differenciált podocyta' oxidativ rezisztenciáját a Fenton-reakciót katalizáló hem jelenlétében vizsgáltuk^{34,61}. Megvizsgáltuk, hogy az önmagában, illetve a H₂O₂-dal kombináltan alkalmazott hem hogyan befolyásolja a sejtek életképessegét. Azt találtuk, hogy a nem differenciált és a differenciált sejtek oxidativ rezisztenciája jelent'osen különbözik egymástól. A hem önmagában dózisfügg' módon és erősen szignifikáns mértékben csökkentette a nem differenciált podocyta' életképessegét, míg ugyanazon dózisban alkalmazva semmilyen citotoxikus hatást nem fejtett ki a differenciált sejteknél. Amennyiben a nem differenciált podocyta'kat hem-el'őkezelésben is részesítettük a H₂O₂-kezelést megelőzően, azt láttuk, hogy a sejtek életképessege még inkább lecsökkent. Ezzel szemben az érett differenciált sejtek ezt a halálos kombinációt is túléltek.

A H₂O₂ és a hem által okozott sejthalál a nem differenciált podocyta'knál együtt járt a TBARS-szint növekedésével, míg ugyanezek a triggererek a differenciált podocyta'knál nem eredményeztek szignifikáns TBARS-szint emelkedést. A differenciált sejteknél a fokozott oxidativ rezisztencia mellett az antioxidáns GPX, kataláz és SOD enzimek aktivitását is magasabbnak találtuk, mint a nem differenciált sejteknél.

A FtH hatékony védelmet jelent az oxidativ sejtkárosodással szemben^{54,100}, mivel képes szekvesztrálni a Fenton-reakciót katalizáló vas-ionokat. A FtH génben kialakuló deléció egereknél már az embrionális időszakban halálhoz vezet. Kutatók létrehoztak egy kondicionált FtH deficiens egér modellt¹⁰¹, hogy tanulmányozni tudják a FtH szerepét a különböz' betegségekben. Ennek az egér modellnek a tanulmányozása egyre több *in vivo* bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a FtH védelmet nyújt a szöveti károsodás ellen. Zarjou és

mtsi. kimutatták, hogy a FtH kondicionális deléciója a vese proximális tubulusokban fokozza a nephrotoxicitást az akut vesekárosodás különböző kísérletes modelljeiben⁶⁰. Gozzellino és mtsi. leírták, hogy a FtH kondicionális deléciója a májban fokozza a szöveti károsodás mértékét és növeli a súlyos malária fertőzés egér modelljében a mortalitást¹⁰². Mindezek mellett azt is bizonyították, hogy a FtH expresszió csökkenti a szöveti károsodást a Plasmodium-fertőzött embereknél¹⁰².

Ezek a felfedezések összhangban vannak a mi hipotézisünkkel, miszerint a FtH kiemelt szerepet játszhat a podocyták káros hatásokkal szembeni védelmében. A differenciált podocyták ellenállóbbak az oxidatív stresszhatásokkal szemben és több FtH-t expresszálnak, mint a nem differenciált podocyták.

Szerettük volna megvizsgálni, hogy kísérleti eredményeink mennyiben relevánsak *in vivo*, ezért humán vese cortexből nyert szövettani mintából metszeteket készítettünk és immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá a FtH expresszióját. A szövettani minta bőségesen tartalmazott glomerulusokat. A látottak igazolták azt a feltevésünket, miszerint a glomeruláris kapillárisokat körülvevő podocyták cytoplazmájában jelentős mennyiségű FtH tárolódik, mely megmagyarázhatja azt a jelenséget, hogy a podocyták hogyan képesek hosszú távon életben maradni.

9. Konklúziók

1. **Munkánk első felében a vese glomerulusaiban élő podocyták élettanát vizsgáltuk.**
 - 1.1. Megállapítottuk, hogy a podocyták az embrionális fejlődés során számos fenotípusos változáson mennek keresztül, melyek nélkülözhetetlenek későbbi funkcióik betöltéséhez. A differenciálódás során megnő a podocyták sejttestje, citoplazma nyúlványokat képeznek.
 - 1.2. A differenciálódás során a podocyták kromatin állománya dekonzenzálódik, mely lehetővé teszi az aktív géntranszkripciót és ennek következtében az aktív fehérjeszintézist.
 - 1.3. Az érett podocyták a differenciálódás során elvesztik mitotikus képességüket.
2. **A munka második részében megvizsgáltuk a szabad hem, a hemoglobin és az oxidált hemoglobinok megjelenését a plazmában és a vizeletben, továbbá összehasonlítottuk a podocytákban a szervezetben kialakuló oxidatív stressz hatásokkal szembeni rezisztenciáját az endothelsejtekkel nyert vizsgálati eredményeinkkel.**

Ezen belül az alábbi megállapításokat tettük:

- 2.1. Steril hemolízis egér modelljének vizsgálata során megállapítottuk, hogy hemolízis során szabad hem és oxidált hemoglobinok jelennek meg a plazmában. Az oxidált hemoglobinok jelenléte a vizeletben is megfigyelhető.
- 2.2. A podocyták életképességét nem befolyásolja a hem és a hidrogén-peroxid azokban a dózisokban, melyek az endothelsejtekre nézve már toxikusak. Ebből arra következtettünk, hogy a podocyták oxidatív rezisztenciája jóval felülmúlja az endothelsejtekét.
- 2.3. A podocyták ROS termelését a hem fokozta, de a H_2O_2 nem. Megállapítottuk, hogy podocyták ROS-termelésének fokozódása minden esetben elmarad az endothelsejtekétől.
- 2.4. A hem az endothelsejtekénél látottakhoz hasonlóan képes a podocytákban indukálni a HO-1 mRNS és fehérje szintézisét. De amíg az endothelsejtekénél dóziszfüggés észlelhető, a podocytákban 10 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a hem már maximális hatást váltott ki.
- 2.5. Endothelsejtekben a metHb és a ferrilHb indukálja a HO-1 mRNS és fehérje expresszióját. Podocytákban már a Hb is képes kismértékű mRNS expressziónövekedést okozni, ettől nagyobb mértékű indukciót látunk a metHb

mellett, legnagyobb mértékben viszont a ferrilHb képes fokozni a podocytákban a HO-1 mRNS-szintézisét. Fehérje szinten csak a ferrilHb hatására láttunk fehérjeszintézis-növekedést a HO-1 fehérjét illetően.

- 2.6. A hem endothelsejtekben jelentős mértékben fokozta a FtH fehérjeexpresszióját. A podocytákban alapszinten is magas a FtH expressziója.
- 2.7. A hem és a ferrilHb szignifikánsan növelte az L-ferritin fehérjeexpresszióját mind az endothelsejtekben, mind a podocytákban.

Eredményeink igazolták azt a hipotézisünket, miszerint a podocytákban az endothelsejtekhez hasonlóan indukálható védelmet jelent a hem és szabadgyökök okozta károsodással szemben a hem-oxigenáz-1/ferritin rendszer jelenléte.

3. A munka további részében megvizsgáltuk a nem differenciált és a differenciált podocyták oxidatív rezisztenciáját és az antioxidáns rendszer aktivitását.

- 3.1. Azt találtuk, hogy a GPX, a SOD és a kataláz antioxidáns enzimek aktivitása jelentősen magasabb az érett podocytákban, mint a nem differenciált sejtekben.
- 3.2. Az érett podocytákban a FtH expressziója jóval meghaladja a nem differenciált sejtek FtH expresszióját.

A fentebb részletesen bemutatott eredmények igazolták a hipotézisünket, miszerint a differenciált, érett podocyták nagymértékben rezisztensek ROS okozta oxidatív károsodással szemben, mely feltételezhetően magas szintű ferritin expressziójuknak és magas antioxidáns enzimaktivitásuknak köszönhető.

10. Összefoglalás

A podocyták a vese glomerulusaiban található egyedi fenotípussal és funkcióval bíró, rendkívül differenciált sejtek, melyekről igen keveset tud még az irodalom. Csillag alakú sejttestjükből polipoid lábnyúlványok nőnek ki, melyek faágszerűen elágaznak és egymáshoz fésűfogszerűen illeszkedve beborítják a glomeruláris kapillárisok felszínét. A szomszédos podocyták egymással érintkező másodlagos lábnyúlványai között jön létre a résdiafragma, mely, egy szerkezetileg porózus terület, ami szelektíven képes visszatartani a nagy molekulatömegű plazmafehérjéket a képződő ultrafiltrátumból.

A podocyták az embrionális fejlődés során elveszítik osztódási képességüket, sejtciklusuk leáll és posztmitotikus állapotba kerülnek. A podocyák élettartama meglehetősen hosszú, a károsodott sejtek pótlására mai ismereteink szerint nincs, vagy csak meglehetősen korlátozott mértékben van lehetőség. A lábnyúlványok leválása a kapillárisok felszínéről egyértelmű jele a podocyták károsodásának és szorosan összefügg az albuminuria és a proteinuria megjelenésével². De vajon hogyan képesek ezek a sokrétű sejtek fennmaradni és hosszú időn át védekezni az őket érő citotoxikus behatásokkal szemben?

Az irodalomban már régóta jól ismert hogy a hemolízissel járó betegségekből (PNH, HUS, malária, hemoglobinopathiák stb.) a Hb-ből szabaddá váló hem proinflammatorikus és prooxidatív tulajdonságai révén érkárosodást és vesekárosodást képes előidézni⁷¹. A hem mellett az oxidált Hb-formákról is leírták, hogy akután képesek szenzitizálni az endothelsejteket az oxidatív ágensekkel szemben és citotoxicitást kiváltani⁶². Ugyanakkor az endothelsejtek krónikus vagy ismételt hem expozíciója kiválthatja a HO-1/ferritin rendszer indukcióját, mely védi a sejteket az oxidatív károsodással szemben^{34,41–43,54–56,61,62,71,73}.

Munkánk célja volt feltárni, hogy a vese glomerulusainak podocytaí ugyanúgy reagálnak-e az őket érő oxidatív hatásokra, mint azt korábban az ér endothelsejtjeinél már leírták. Vajon a HO-1/ferritin rendszernek szerepe van-e a podocyta túlélésében?

Munkánk az irodalomban elsőként szolgáltatott bizonyítékokat arra, hogy a podocytaí az embrionális differenciálódás folyamata során alapvető morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül, melyek az oxidatív stresszel szemben segítik a sejtek védelmi mechanizmusainak megerősödését, ellenállóvá és hosszú életűvé teszik a podocytaíkat (19. ábra). Az antioxidáns enzimek és a FtH egyaránt részét képezik a humán podocytaí oxidatív stresszel szembeni védelmi mechanizmusainak és rávilágítanak ennek a fontos, de podocytaíban ezideig nem vizsgált védelmi rendszernek a szerepére.



szögletes, kicsi kicsi jól látható kromoszóma testecskék/kondenzált magas alacsony alacsony	<i>sejttest alakja</i> <i>mag mérete</i> <i>kromatin szerkezet</i> <i>osztódási ráta</i> <i>oxidatív rezisztencia</i> <i>H-ferritin expresszió</i>	lábnyúlványok, nagy nagy homogén/ laza nincs/alacsony magas magas

19. ábra A differenciált és a nem differenciált podocyták jellemzőinek összehasonlítása

Ez a sematikus ábra a podocyták fenotípusos átalakulását szemlélteti a differenciálódás során. Morfológiai (sejttest és a sejtmag növekedése, a kromatin állomány kondenzálódása) és fenotípusos (oxidatív rezisztencia és az FtH expresszió fokozódása) változások egyaránt megfigyelhetők a podocytáknál a folyamat során.

11. Summary

The podocyte is a representative cell type of the glomerulus displaying unique phenotype and functionality. There is a growing evidence about the cell biology of this highly differentiated cell type in the literature but it is still a lot to discover. Their arborizing, interdigitating foot processes outgrown from their stellated cell body cover the surface of the glomerular capillary network. Secondary foot processes of the neighbouring podocytes form the foot processes. The slit diaphragm has a porous structure and its high selectivity renders it to retain high molecular weight plasma proteins from the ultrafiltrate.

During embryonic development, podocytes lose their ability to divide, quit the cell cycle and permanently stay in a postmitotic state. The life duration of the glomerular podocyte is fairly long, but the replacement of damaged cells is not resolved or just quite limited. Detachment of foot processes from the surface of the glomerular capillary is an unambiguous sign of podocyte injury and is closely related to the development of albuminuria and proteinuria². How can these multicharacteristic cells survive and defend themselves from injuries in such a cytotoxic environment?

It is now well established in the literature, that in hemolytic diseases (PNH, HUS, malaria, hemoglobinopathies, etc.) hemoglobin outside the red blood cell releases heme. Heme, owing to its proinflammatory and prooxidative properties causes vascular and kidney injury⁷¹. Acutely, besides heme, oxidated forms of hemoglobin are also able to sensitize endothelial cells to oxidative injuries and cause cytotoxicity⁶². Chronically in the long term, when endothelial cells are regularly exposed to the prooxidant heme and the oxidated forms of hemoglobin, the heme oxygenase/ferritin system is induced. The heme oxygenase/ferritin system protects endothelial cells against oxidative injury^{34,41–43,54–56,61,62,71,73}.

The aim of our work was to investigate the response of the glomerular podocyte to oxidative stimuli and correlate it to response of the vascular endothelial cell. We investigated whether the heme oxygenase/ferritin system is responsible for the survival of podocytes.

Our work was the first to give evidence on podocytes going through fundamental morphological and functional changes during embryonal differentiation. These changes contribute to the reinforcement of defence mechanisms that make podocytes resistant against oxidative stress and assure them a long life. Antioxidant enzymes and FtH are integral part of the defence mechanisms of human podocytes against oxidative stress. They highlight the role of this important defence system, which has not yet been investigated in podocytes.

12. Tárgyszavak/Keywords

humán podocyta, podocyták differenciálódása, oxidatív stressz, vesekárosodás, oxidatív rezisztencia, H-ferritin, hemoxigenáz-1, endothelsejt

human podocyte, podocyte differentiation, oxidative stress, kidney injury, oxidative resistance, ferritin-H, heme oxygenase 1, endothelial cell

13. Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek szeretnék köszönetet mondani a munka magas színvonalú szakmai irányításáért, a folyamatos támogatásáért, végtelen türelméért és a nehezebb időszakokban sem sajnált biztató szavaiért. Mindig töretlen lelkesedésével, kitartó és pozitív hozzáállásával a tudomány szeretetének átadására törekedett. Hatalmas munkabíráásával és precizitásával példát mutatott. Megtanított a tudomány iránti alázatra, de azt is megtanította, hogy hiába való eredmény vagy rossz kísérlet nem létezik, csak legfeljebb az adott pillanatban még nem tudjuk, hogy a kirakós mely darabjára találtunk rá egy-egy „rossz” eredmény által. Sosem hagyta elveszni belőlem a mindig kíváncsi kutatót és mindig tudta, hogyan kell azt a megfelelő korlátok közé terelni. Mindig megérezte, hogy mikor kell egy-egy nehezebb ponton átlendíteni. Magas szintű szakmai tudása, emberséges hozzáállása és barátsága örökérvényű útravalóul szolgál azon az úton melynek kapuját megnyitotta előttem.

Köszönöm a támogatását Dr. Balla József professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy az egyetemi évek alatt megkezdett kutatási munkámat az általa vezetett laboratóriumban folytathassam, pénzügyi támogatást nyújtott a kísérletek megvalósításához, valamint kiterjedt szakmai kapcsolatait megmozgatva segítette az együttműködést más munkacsoportokkal és nagyszerű szakmai meglátásával segítette a projekt megvalósulását.

Köszönetet mondok Balogh Enikőnek a podocytákra készült time-lapse kísérletek kivitelezésében nyújtott hathatós közreműködéséért és barátságáért. Köszönöm a támogatást a labor összes dolgozójának, köztük Barna Erikának, akik hozzájárultak ahhoz, hogy ez a munka megszülethessen.

Külön köszönöm a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott segítségét és barátságát Dr. Becs Gergely kollégámnak, aki kiváló meglátásaival és mindig segítőkész természetével jelentősen hozzájárult, hogy e munka megszülethessen.

Legvégül, de a legnagyobb szeretettel mondok köszönetet férjemnek, Dr. Fagyas Miklósnak, aki nem csupán egy szeretetteljes nyugodt háttérrel biztosított számomra az elmélyült munkához, hanem mindvégig támogatott szakmailag és emberileg. Hitt a munka sikerében és bizakodásával erőt adott. Hálás vagyok gyermekeimnek, Lillának és Leventének, hogy időt és ihletet adtak az értekezés megírásához.

A kutatómunkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (NKFI, K116024), valamint az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával megvalósult GINOP-2.3.2-15-2016-00005 számú projektek támogatták.

14. Irodalomjegyzék

1. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20:7–15.
2. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015;209:199–210.
3. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006429.
4. Sarin H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogenes Res*. 2010;2:14.
5. Saleem MA. One hundred ways to kill a podocyte: FIGURE 1: *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:1266–1271.
6. Kikkawa Y, Virtanen I, Miner JH. Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin $\alpha 5$ in the glomerular basement membrane. *J Cell Biol*. 2003;161:187–196.
7. Kitching AR, Hutton HL. The Players: Cells Involved in Glomerular Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11:1664–1674.
8. Grahammer F. New structural insights into podocyte biology. *Cell Tissue Res*. 2017;369:5–10.
9. Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development*. 2008;135:609–20.
10. Schell C, Wanner N, Huber TB. Glomerular development – Shaping the multi-cellular filtration unit. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;36:39–49.
11. Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, Hsu H, Sanday J, Satchell SC, Lennon R, Ni L, Bottinger EP, Mundel P, Mathieson PW. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295:F959-70.
12. Hagen M, Pfister E, Kosel A, Shankland S, Pippin J, Amann K, Daniel C. Cell cycle re-entry sensitizes podocytes to injury induced death. *Cell Cycle*. 2016;15:1929–37.
13. Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Actin Filament Organization of Foot Processes in Rat Podocytes. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:1589–1600.
14. Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M. Plasma concentrations of

- hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood*. 1968;32:811–5.
15. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, Oliveira MF, Oliveira PL, Graça-Souza A V, Bozza MT. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2007;282:20221–9.
 16. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, Smith A, Nath KA, Hebbel RP, Vercellotti GM. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014;123:377–90.
 17. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013;121:1276–84.
 18. Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassú AM, Bonaparte D, Cavalcante MM, Chora A, Ferreira A, Marguti I, Cardoso S, Sepúlveda N, Smith A, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med*. 2010;2:51ra71.
 19. Lin T, Kwak YH, Sammy F, He P, Thundivalappil S, Sun G, Chao W, Warren HS. Synergistic inflammation is induced by blood degradation products with microbial Toll-like receptor agonists and is blocked by hemopexin. *J Infect Dis*. 2010;202:624–32.
 20. Lin T, Sammy F, Yang H, Thundivalappil S, Hellman J, Tracey KJ, Warren HS. Identification of hemopexin as an anti-inflammatory factor that inhibits synergy of hemoglobin with HMGB1 in sterile and infectious inflammation. *J Immunol*. 2012;189:2017–22.
 21. Liang X, Lin T, Sun G, Beasley-Topliffe L, Cavaillon J-M, Warren HS. Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *J Leukoc Biol*. 2009;86:229–35.
 22. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, Chora Â, Rodrigues CD, Gregoire IP, Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Soares MP, Mota MM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007;13:703–710.
 23. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med (Berl)*. 2008;86:1097–111.

24. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, Palha NR, Rebelo S, Henri A, Beuzard Y, Soares MP. Sick hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell*. 2011;145:398–409.
25. Jeney V, Ramos S, Bergman M-L, Bechmann I, Tischler J, Ferreira A, Oliveira-Marques V, Janse CJ, Rebelo S, Cardoso S, Soares MP. Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide. *Cell Rep*. 2014;8:126–36.
26. Jeney V, Eaton JW, Balla G, Balla J. Natural History of the Bruise: Formation, Elimination, and Biological Effects of Oxidized Hemoglobin. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–9.
27. Potor L, Bányai E, Becs G, Soares MP, Balla G, Balla J, Jeney V. Atherogenesis May Involve the Prooxidant and Proinflammatory Effects of Ferryl Hemoglobin. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–13.
28. Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklosi J, Mehes G, Csonka T, Smith A, Vercellotti GM, Balla G, Balla J. Red Cells, Hemoglobin, Heme, Iron, and Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1347–1353.
29. Giulivi C, Davies KJ. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome. *J Biol Chem*. 1993;268:8752–9.
30. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*. 2010;5:51–66.
31. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409:198–201.
32. Banerjee S, Jia Y, Siburt CJP, Abraham B, Wood F, Bonaventura C, Henkens R, Crumbliss AL, Alayash AI. Haptoglobin alters oxygenation and oxidation of hemoglobin and decreases propagation of peroxide-induced oxidative reactions. *Free Radic Biol Med*. 2012;53:1317–26.
33. MURRAY RK, CONNELL GE, PERT JH. The role of haptoglobin in the clearance and distribution of extracorporeal hemoglobin. *Blood*. 1961;17:45–53.
34. 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 U S A*. 1993;90:9285–9.
35. Lipiski M, Deuel JW, Baek JH, Engelsberger WR, Buehler PW, Schaer DJ. Human Hp1-1 and Hp2-2 phenotype-specific haptoglobin therapeutics are both effective in vitro and in guinea pigs to attenuate hemoglobin toxicity. *Antioxid Redox Signal*.

- 2013;19:1619–33.
36. Lioupis C, Barbatis C, Drougou A, Koliarakis V, Mamalaki A, Klonaris C, Georgopoulos S, Andrikopoulos V, Bastounis E. Association of haptoglobin genotype and common cardiovascular risk factors with the amount of iron in atherosclerotic carotid plaques. *Atherosclerosis*. 2011;216:131–8.
 37. Lioupis C, Barbatis C, Lazari P, Liasis N, Klonaris C, Georgopoulos S, Andrikopoulos V, Bastounis E. Macrophage infiltration and smooth muscle cells content associated with haptoglobin genotype in human atherosclerotic carotid plaques. *Angiology*. 2012;63:178–83.
 38. Brouwers A, Langlois M, Delanghe J, Billiet J, De Buyzere M, Vercaemst R, Rietzschel E, Bernard D, Blaton V. Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis*. 2004;176:189–95.
 39. Bamm V V, Tsemakhovich VA, Shaklai M, Shaklai N. Haptoglobin phenotypes differ in their ability to inhibit heme transfer from hemoglobin to LDL. *Biochemistry*. 2004;43:3899–906.
 40. Smith A, Morgan WT. Haem transport to the liver by haemopexin. Receptor-mediated uptake with recycling of the protein. *Biochem J*. 1979;182:47–54.
 41. Balla J, Balla G, Lakatos B, Jeney V, Szentmihályi K. Heme-iron in the human body. *Orv Hetil*. 2007;148:1699–1706.
 42. Vercellotti GM, Balla G, Balla J, Nath K, Eaton JW, Jacob HS. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1994;22:207–13.
 43. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Jacob HS, Eaton JW, Balla G. Heme, Heme Oxygenase, and Ferritin: How the Vascular Endothelium Survives (and Dies) in an Iron-Rich Environment. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:2119–2138.
 44. NAKAJIMA H, TAKEMURA T, NAKAJIMA O, YAMAOKA K. STUDIES ON HEME ALPHA-METHENYL OXYGENASE. I. THE ENZYMATIC CONVERSION OF PYRIDINE-HEMICHROMOGEN AND HEMOGLOBIN-HAPTOGLOBIN INTO A POSSIBLE PRECURSOR OF BILIVERDIN. *J Biol Chem*. 1963;238:3784–96.
 45. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338:558–567.
 46. Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem*. 2000;82:33–41.
 47. Zhu X, Fan W-G, Li D-P, Kung H, Lin MC. Heme oxygenase-1 system and

- gastrointestinal inflammation: a short review. *World J Gastroenterol*. 2011;17:4283–8.
48. Torti FM, Torti S V. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 2002;99:3505–16.
 49. Levi S, Santambrogio P, Cozzi A, Rovida E, Corsi B, Tamborini E, Spada S, Albertini A, Arosio P. The role of the L-chain in ferritin iron incorporation. Studies of homo and heteropolymers. *J Mol Biol*. 1994;238:649–54.
 50. Kakhlon O, Gruenbaum Y, Cabantchik ZI. Repression of the heavy ferritin chain increases the labile iron pool of human K562 cells. *Biochem J*. 2001;356:311–6.
 51. Picard V, Renaudie F, Porcher C, Hentze MW, Grandchamp B, Beaumont C. Overexpression of the ferritin H subunit in cultured erythroid cells changes the intracellular iron distribution. *Blood*. 1996;87:2057–64.
 52. Picard V, Epsztejn S, Santambrogio P, Cabantchik ZI, Beaumont C. Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem*. 1998;273:15382–6.
 53. Konijn AM, Glickstein H, Vaisman B, Meyron-Holtz EG, Slotki IN, Cabantchik ZI. The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. *Blood*. 1999;94:2128–34.
 54. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 1992;267:18148–53.
 55. Juckett MB, Balla J, Balla G, Jessurun J, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vitro. *Am J Pathol*. 1995;147:782–9.
 56. Cermak J, Balla J, Jacob HS, Balla G, Enright H, Nath K, Vercellotti GM. Tumor cell heme uptake induces ferritin synthesis resulting in altered oxidant sensitivity: possible role in chemotherapy efficacy. *Cancer Res*. 1993;53:5308–13.
 57. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med*. 2008;86:1097–1111.
 58. Qian Q, Nath KA, Wu Y, Daoud TM, Sethi S. Hemolysis and Acute Kidney Failure.
 59. Nath KA, Grande JP, Croatt AJ, Likely S, Hebbel RP, Enright H. Intracellular targets in heme protein-induced renal injury. *Kidney Int*. 1998;53:100–11.
 60. Zarjou A, Bolisetty S, Joseph R, Traylor A, Apostolov EO, Arosio P, Balla J, Verlander J, Darshan D, Kuhn LC, Agarwal A. Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2013;123:4423–34.
 61. Balla G, Vercellotti G, Eaton JW, Jacob HS. Heme uptake by endothelium synergizes

- polymorphonuclear granulocyte-mediated damage. *Trans Assoc Am Physicians*. 1990;103:174–9.
62. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Vercellotti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage. *Trans Assoc Am Physicians*. 1992;105:1–6.
 63. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol*. 2014;5:115.
 64. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2016;13:148–59.
 65. Silveira AA, Cunningham C, Corr E, Ferreira WA, Costa FF, Almeida CB, Conran N, Dunne A. Heme Induces NLRP3 Inflammasome Formation in Primary Human Macrophages and May Propagate Hemolytic Inflammatory Processes By Inducing S100A8 Expression. *Blood*. 2016;128.
 66. Lin S, Yin Q, Zhong Q, Lv F-L, Zhou Y, Li J-Q, Wang J-Z, Su B, Yang Q-W. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2012;9:46.
 67. Kwon MS, Woo SK, Kurland DB, Yoon SH, Palmer AF, Banerjee U, Iqbal S, Ivanova S, Gerzanich V, Simard JM. Methemoglobin is an endogenous toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage. *Int J Mol Sci*. 2015;16:5028–46.
 68. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, Zamboni DS, Bozza MT. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:E4110–E4118.
 69. Abais JM, Xia M, Li G, Gehr TWB, Boini KM, Li P-L. Contribution of endogenously produced reactive oxygen species to the activation of podocyte NLRP3 inflammasomes in hyperhomocysteinemia. *Free Radic Biol Med*. 2014;67:211–20.
 70. Zhang C, Boini KM, Xia M, Abais JM, Li X, Liu Q, Li P-L. Activation of Nod-like receptor protein 3 inflammasomes turns on podocyte injury and glomerular sclerosis in hyperhomocysteinemia. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2012;60:154–62.
 71. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest*. 1992;90:267–270.
 72. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*. 2002;100:879–87.
 73. Jeney V, Balla G, Balla J. Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of

- atherosclerosis. *Front Physiol.* 2014;5:379.
74. Fernandez PL, Dutra FF, Alves L, Figueiredo RT, Mourão-Sa D, Fortes GB, Bergstrand S, Lönn D, Cevallos RR, Pereira RMS, Lopes UG, Travassos LH, Paiva CN, Bozza MT. Heme amplifies the innate immune response to microbial molecules through spleen tyrosine kinase (Syk)-dependent reactive oxygen species generation. *J Biol Chem.* 2010;285:32844–51.
 75. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:630–8.
 76. O'Hare MJ, Bond J, Clarke C, Takeuchi Y, Atherton AJ, Berry C, Moody J, Silver AR, Davies DC, Alsop AE, Neville AM, Jat PS. Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:646–51.
 77. Nagy G, Pinter G, Kohut G, Adam AL, Trencsenyi G, Hornok L, Banfalvi G. Time-Lapse Analysis of Cell Death in Mammalian and Fungal Cells. *DNA Cell Biol.* 2010;29:249–259.
 78. Banfalvi G, Sooki-Toth A, Sarkar N, Csuzi S, Antoni F. Nascent DNA chains synthesized in reversibly permeable cells of mouse thymocytes. *Eur J Biochem.* 1984;139:553–9.
 79. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010;5:51–66.
 80. Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.* 1990;186:265–72.
 81. Yanagida-Asanuma E, Asanuma K, Kim K, Donnelly M, Young Choi H, Hyung Chang J, Suetsugu S, Tomino Y, Takenawa T, Faul C, Mundel P. Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes. *Am J Pathol.* 2007;171:415–27.
 82. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb a J Vasc Biol.* 11:1700–11.
 83. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya C V., Manivel JC, Haggard JJ, Croatt AJ, Payne WD, Alam J. Heme protein-induced chronic renal inflammation: Suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* 2001;59:106–117.
 84. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol*

- Rev. 2003;83:253–307.
85. Kreidberg JA. Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:806–14.
 86. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10:331–40.
 87. Kriz W. Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:1738–42.
 88. Chittiprol S, Chen P, Petrovic-Djergovic D, Eichler T, Ransom RF. Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301:F660-71.
 89. Liapis H, Romagnani P, Anders H-J. New insights into the pathology of podocyte loss: mitotic catastrophe. *Am J Pathol*. 2013;183:1364–1374.
 90. Zhang J, Pippin JW, Krofft RD, Naito S, Liu Z-H, Shankland SJ. Podocyte repopulation by renal progenitor cells following glucocorticoids treatment in experimental FSGS. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304:F1375-89.
 91. Shankland SJ, Anders H-J, Romagnani P. Glomerular parietal epithelial cells in kidney physiology, pathology, and repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22:302–309.
 92. Shankland SJ, Pippin JW, Duffield JS. Progenitor Cells and Podocyte Regeneration. *Semin Nephrol*. 2014;34:418–428.
 93. Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21:175–186.
 94. Meshorer E. Imaging chromatin in embryonic stem cells. 2008.
 95. Mayer R, Brero A, von Hase J, Schroeder T, Cremer T, Dietzel S. Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol*. 2005;6:44.
 96. Balla J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW, Balla G. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18 Suppl 5:v8-12.
 97. Beckman JD, Chen C, Nguyen J, Thayanithy V, Subramanian S, Steer CJ, Vercellotti GM. Regulation of heme oxygenase-1 protein expression by miR-377 in combination with miR-217. *J Biol Chem*. 2011;286:3194–202.
 98. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, Balla G. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res*.

- 2005;49:1030–1043.
99. Goralska M, Nagar S, Fleisher LN, McGahan MC. Differential degradation of ferritin H- and L-chains: accumulation of L-chain-rich ferritin in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:3521–9.
 100. Piwkowska A, Rogacka D, Audzeyenka I, Jankowski M, Angielski S. High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes. *J Cell Biochem*. 2011;112:1661–72.
 101. Darshan D, Vanoaica L, Richman L, Beermann F, Kühn LC. Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. *Hepatology*. 2009;50:852–60.
 102. Gozzelino R, Andrade BB, Larsen R, Luz NF, Vanoaica L, Seixas E, Coutinho A, Cardoso S, Rebelo S, Poli M, Barral-Netto M, Darshan D, Kühn LC, Soares MP. Metabolic adaptation to tissue iron overload confers tolerance to malaria. *Cell Host Microbe*. 2012;12:693–704.

15. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/88/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bányai Emese
Neptun kód: ITU3VF
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Erdei, J., Tóth, A., Balogh, E., Nyakundi, B. B., **Bányai, E.**, Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Induction Of NLRP3 Inflammasome Activation By Heme In Human Endothelial Cells.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-14, 2018.
IF: 4.593 (2016)
2. **Bányai, E.**, Balogh, E., Fagyas, M., Arosio, P., Hendrik, Z., Király, G., Szemán-Nagy, G., Tánczos, B., Pócsi, I., Balla, G., Balla, J., Bánfalvi, G., Jeney, V.: Novel functional changes during podocyte differentiation: increase of oxidative resistance and H-ferritin expression.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 1-10, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/976394>
IF: 3.516

További közlemények

3. Balogh, E., Tóth, A., Tolnai, E., Bodó, T., **Bányai, E.**, Szabó, D. J., Petrovski, G., Jeney, V.: Osteogenic differentiation of human lens epithelial cells might contribute to lens calcification.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1862, 1724-1731, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.06.012>
IF: 5.476
4. Becs, G., Zarjou, A., Agarwal, A., Sikura, K. É., Becs, Á., Nyitrai, M., Balogh, E., **Bányai, E.**, Eaton, J. W., Arosio, P., Poli, M., Jeney, V., Balla, J., Balla, G.: Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 20 (2), 217-230, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12682>
IF: 4.499





5. Fagyas, M., Úri, K., Mányiné Siket, I., Daragó, A., Boczán, J., **Bányai, E.**, Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition.
PLoS One. 9 (4), 1-29, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087843>
IF: 3.234
6. Fagyas, M., Úri, K., Mányiné Siket, I., Fülöp, G. Á., Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., **Bányai, E.**, Szentkirályi, I., Maros, T. M., Szerafin, T., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human.
PLoS One. 9 (4), 1-28, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>
IF: 3.234
7. Fagyas, M., Úri, K., Mányiné Siket, I., Daragó, A., Boczán, J., **Bányai, E.**, Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases.
PLoS One. 9 (4), 1-29, 2014.
IF: 3.234
8. Potor, L., **Bányai, E.**, Becs, G., Soares, M. P., Balla, G., Balla, J., Jeney, V.: Atherogenesis May Involve the Prooxidant and Proinflammatory Effects of Ferryl Hemoglobin.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2013, [1-13], 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/676425>
IF: 3.363

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,149

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,109

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, 2018.04.11.

16. Függelék