

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A KÉNHYDROGÉN HATÁSA AZ ÉRELMESESEDÉSES
PLAKKOK HEMOGLOBIN-LIPID INTERAKCIÓIRA**

Potor László

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A KÉNHDROGÉN HATÁSA AZ ÉRELMESESEDÉSES
PLAKKOK HEMOGLOBIN-LIPID INTERAKCIÓIRA**

Potor László

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

A KÉNHDROGÉN HATÁSA AZ ÉRELMESESEDÉSES PLAKKOK HEMOGLOBIN-LIPID INTERAKCIÓIRA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Potor László** okleveles biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Balla József

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Forster Tamás, MTA doktora
Prof. Dr. Reusz György, MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2023. június 06. 10:00
DE ÁOK, Nephrológia Tanszék könyvtára

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Somogyi Anikó, MTA doktora
Dr. Bhattoa Harjit Pal, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Forster Tamás, MTA doktora
Prof. Dr. Reusz György, MTA doktora
Prof. Dr. Somogyi Anikó, MTA doktora
Dr. Bhattoa Harjit Pal, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2023. július 06. 13:00
DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. BEVEZETÉS

A szív- és érrendszeri betegségek évente megközelítőleg 18 millió halálesetet okoznak, ezzel világszerte vezető haláloknak számít az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) kimutatása alapján. Ez a szám az összes éves elhalálozásoknak a 32 %-a. Magyarországon minden 2-ik elhalálozást okozzák a szív- és érrendszeri betegségek. E betegség csoport kialakulásának hátterében jelentős mértékben az érlemezsedés vesz részt. Az érlemezsedés során az erek falán zsíros lerakódások úgynevezett plakkok jönnek létre. A folyamat során a plakkok bevérznek, destabilizálódnak, ami a felszakadásukhoz és a bennük lévő zsíros anyag véráramba történő jutását eredményezi. Az érlemezsedés szívinfarktus, agyvérzés, embólia és trombózis kialakulását is eredményezi.

A témaválasztásom alapját a plakkok belsejében megfigyelhető bevérzések patogenezisének a kutatása, illetve a bevérzés progressziójának farmakológiai úton történő vizsgálata képezi. A bevérzés kialakulása a mortalitást nagymértékben megnöveli, illetve az alkalmazott gyógyszeres terápiák csak lassítják e folyamatot, de nem akadályozzák meg. Emiatt a kutatási témából származó eredmények társadalmi hasznosíthatósága jelentős.

A kutatás célja a humán bevérzett plakkokban végbemenő folyamatok részletes feltárása, illetve gyógyszeres támadáspontok tesztelése, mellyel az érlemezsedés patogenezise megállítható és vagy visszafordítható.

A hipotézisek tesztelésére egészséges donoroktól származó vérből tisztítottam hemoglobint. A hemoglobin oxidációs vizsgálatoknál egészséges donoroktól származó teljes vérből izoláltam és tisztítottam ki az alacsony sűrűségű lipoproteint (LDL). A plakk lipideket endarterektómián átesett betegek atheromájából szeparáltam. A sejtes kísérleteknél humán véna endotél sejteken teszteltem az érlemezsedésben zajló molekuláris biológiai folyamatokat. Az egészséges humán karotisz artériákat a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézete biztosította számunkra. A humán ateróma és bevérzett plakkokat a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézet Érsebészeti Osztályára biztosította számunkra. A PhD tézisem alapját szolgáló kutatásomhoz 54 db humán karotisz mintát használtam fel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 ÉRELMEZESSEDÉS

2.1.1 AZ ÉRELMEZESSEDÉS EPIDEMIOLÓGIÁJA ÉS RIZIKÓFAKTORAI

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) jelentése alapján a világ vezető halálokat a szív- és érrendszeri betegségek adják (32 % mortalitás; 17,9 millió elhalálozás/év). Az esetek háttérében az érelmeszesedés (atherosclerosis) következtében fellépő szívinfarktus és agyvérzés áll (85%). Az érelmeszesedés életmódhoz kapcsolódó rizikófaktorai a dohányzás, egészségtelen étrend, mozgásszegény életmód, túlzott alkoholfogyasztás. Élettani rizikófaktorai a magas vérnyomás, magas vér koleszterin és glükóz szint, krónikus vese megbetegedés, diabétesz, túlsúly, öregedés (lásd. https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1).

2.1.2 AZ AORTA ÉS AZ ARTÉRIÁK ÁLTALÁNOS SZERKEZETE

A vérerek olyan zárt rendszert alkotnak, amiben a vér folyékony kötőszövetként áramlik. Az erek intersticiális részét, ahol a vér áramlik, lumennek nevezik. Az aorta és az artériák három rétegre különíthetők el. A lumen közvetlenül érintkezik az érrendszer belső rétegével az intimával (*tunica intima*). Ez a réteg a lumen felé egyrétegű laphámsejtekből, úgynevezett endotél sejtekből és az alatta található proteoglikán rétegből épül fel. A középső réteget (*tunica media*) főleg rugalmas rostok és simaizomsejtek alkotják. Az érfal külső kötőszöveti rétege (*tunica adventitia*) tartalmazza az érfalatat tápláló ereket (*vasa vasorum*) és az érfalat ellátó idegeket (*nervi vasculares*). Az artériák szerkezete típustól függően (elasztikus artériák, muszkuláris artériák, arteriolák) eltérnek egymástól. Az aorta torakális és abdominális része között szerkezetbeli különbségek vannak.

2.1.3 AZ ÉRELMEZESSEDÉS PATOGENEZISE

Az érelmeszesedés az aorta és a nagy artériák gyulladásos megbetegedése, melynek során az ér lumene beszűkül az intima megvastagodása miatt. Az AHA (American Heart Association) ajánlása szerint az alábbi kategóriákra csoportosítható a betegség lefolyása.

I-es típusú lézió – kezdeti lézió.

A léziók kialakulása már csecsemőkorban elkezdődik. A vérrendszerből kilépő LDL a szubendoteliális térbe jutva a proteoglikánokkal reakcióba lépve modifikálódik, úgynevezett minimálisan módosított LDL jön létre, ami további oxidációs lépések után oxidált LDL-lé (oxLDL) alakul. Az oxLDL kialakulása során keletkező termékek közül kiemelendő a lipid-hidroperoxid (LOOH) és a 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), melyek toxikusak az endotél sejtekre nézve. Hatásukra az endotél sejtek aktiválódnak, az adhézis fehérjék expressziója megemelkedik. Az érrendszerben keringő monociták a selectinek hatására (pl. E-selectin; P-selectin) a gyulladásos területre gördülnek, majd az adhézis fehérjék (pl. intracelluláris adhézis molekula-1: ICAM-1; ér eredetű sejt adhézis molekula-1: VCAM-1) hatására kitapadnak az endotél sejtek felszínén. A monociták a szubendoteliális térbe penetrálódnak. Ezt követően az endotél sejtek makrofág kolónia stimuláló faktort termelnek az oxLDL jelenlétében, amittől a monociták makrofágokká differenciálódnak. Az oxLDL a makrofágokat polarizálja, melynek következtében a szkevendzser receptorok (CD36; SRA) megemelkedett expressziója hatására a lipidek felvételre kerülnek. A lipid cseppekkel telítődött makrofágokat habos sejteknek nevezzük. Az egyes típusú lézióknál mikroszkóposan megfigyelhető kicsi kiterjedésű sárga pontok láthatóak az aorta felületén, illetve lipideket tartalmazó habos sejtek csoportjai láthatóak a szövetben.

II-es típusú lézió – zsíros csíkok.

A lipidek akkumulációja az intimában már szabad szemmel is látható, a lipidcseppek már a simaizomsejtekben is megjelennek. Az egyes és a kettes típusú léziót gyakran együtt nevezik korai lézióknak.

III-as típusú lézió – elő atheróma.

Az elhalt habos sejtekből kiszabaduló lipidek extracellulárisan megjelennek.

VI-es típusú lézió – atheróma.

Az atheróma nagyfokú extracelluláris lipideket tartalmaz, melyek összeállva úgynevezett lipid magot alkotnak. Ebben a szakaszban már néhány simaizomsejt kalcifikációja is megfigyelhető. A lipid magon belül koleszterol kristályok találhatók.

V-ös típusú lézió – előrehaladott plakk.

Jellemzője, hogy fibrózus kötőszövet alakul ki a plakk felszíne alatt, amit fibrózus sapkának hívnak. Ez a kötőszövet emelkedett mennyiségű kollagént, illetve érdes felszínű endoplazmatikus retikulumot tartalmazó simaizomsejtekből áll. Az V-ös típusú lézió három alcsoportra osztható. Az V/a lézió a fibroatheróma, ami számos lipid magot tartalmaz, amik vékony fibrózus kötőszövettel szeparálódnak el egymástól. Az V/b lézió a kalcifikált lézió, ami nagy mennyiségű extracelluláris hidroxipatit kristályokat tartalmaz, a kalcifikáció kialakulása egy jól szabályozott folyamat. Az V/c lézió a fibrotikus lézió, melynek jellemzője, hogy az intima kicserélődött egy vékony fibrózus kötőszöveti rétegre. Lipidek ebben a lézióban nincsenek vagy mennyiségük minimális.

VI-os típusú lézió – komplikált lézió.

Az érlelmeszedés okozta mortalitás legnagyobb részben a komplikált lézió kialakulása miatt következik be. Kialakulhat a plakk felszínén, illetve magában a plakk belsejében történő bevérzéssel. A bevérzés következtében a plakk instabillá válik, a beszűkült lumen, megnövekedett nyíróerők és a főleg makrofágok által termelt proteolitikus enzimek miatt. Az instabil plakk felszakadását követően a benne található zsíros anyagok a véráramlatba jutva szívinfarktust, agyvérzést, trombózist és embóliát is okozhatnak.

2.2 PLAKKON BELÜLI BEVÉRZÉS

A lipidperoxidációs termékek (LOOH, aldehidek, ketonok, endoperoxidok, malondialdehid, 4-HNE) kialakulása miatt a komplikált léziókban erősen oxidatív körülmények találhatók. Ezek a lipidperoxidációs köztes és végtermékek toxikusak a sejtekre nézve, legfőképpen a penetrálódott, monocitákból differenciálódott makrofágokra. Az elhalt makrofágok hozzájárulnak a plakk stabilitásának a felbomlásához, így a bevérzések kialakulásához is. A plakkokban végbemenő peroxidáció miatt hipoxiás körülmények alakulnak ki, ennek hatására neovaszkularizált erek nőnek a plakkban a *vasa vasorum* felől. Michel JB és társai leírták, hogy az oxLDL hatására az érfal *tunica media* rétegében található simaizomsejtek a peroxisome proliferátor aktiválta receptoron ((PPAR)- γ) keresztül a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) expressziója megemelkedik, ami szintén a *vasa vasorum* felőli neovaszkularizációt eredményez. Ezek a kis erek endotél sejtjei az erősen toxikus környezet miatt elhalnak, így létrejöhét a plakkon belüli bevérzés.

2.3 AZ OXIDÁLT HEMOGLOBIN KIALAKULÁSA ÉS ÉLETTANI HATÁSAI

A komplikált plakk kialakulása során a vörösvértestek (VVT) megjelennek a plakk belsejében. Nagy E. és munkatársai bizonyították, hogy az oxLDL és a lipid extraktum humán atheromás plakkban (PL) a VVT-ék hemolízisét okozzák és a kiszabaduló hemoglobin (Hb) is eloxidálódik. Továbbá kimutatták, hogy a lipid-hidroperoxid (LOOH) analógja a kumin hidroperoxid is lizálja a VVT-et, illetve oxidálja a Hb-t. Igazolták azt is, hogy a glutathion /glutathion-peroxidáz (GSH/GPx) gátolja az oxLDL és a PL indukálta VVT-ék lízisét és a Hb oxidációját azáltal, hogy a LOOH-t alkohollá alakítja át.

A Hb és a peroxidok közötti kölcsönhatás során ferrylHb (Fe^{4+}) és oxoferrylHb ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$) alakul ki (14, 15). Az oxidáció során a Hb α globin (α Tyr-24, α Tyr-42, α His-20) és β globin (β Tyr-36, β Tyr-130, β Cys-93) láncának különböző aminosavjain gyökök alakulnak ki. Ezek a gyökök kovalens kötéssel képesek létrehozni Hb dimert, tetramert és multimereket. OxLDL és oxPL hatására a Hb kételektronos oxidációja megy végbe, ami ferrylHb kialakulását eredményezi. A humán komplikált léziókban mért emelkedett ditirozin szintek bizonyítják a ferrylHb jelenlétét.

Korábban leírták, hogy az oxidált Hb forma, a metHb (Fe^{3+}) citotoxikus hatással bír, azáltal, hogy hem csoportjukat elengedve képes szenzitálni a humán köldökvéna endotél sejteket (EC), aminek hatására a H_2O_2 kezelésre azok elpusztultak. A hemoglobin kételektronos oxidációja során keletkező ferrylHb-nak egyedülálló patofiziológiás hatása van. Képes az EC rétegét felszakítani, melynek során lyukak keletkeznek a sejtek között. Ezzel párhuzamosan az adhézións molekulák expressziója is megemelkedik (VCAM-1, ICAM-1, E-szelektin) a EC-ben. Ezek a folyamatok arra utalnak, hogy a ferrylHb pro-inflammatórikus tulajdonsággal rendelkezik, s szerepet játszhat a plakkok progressziójában, ugyanis sem a Hb sem a metHb nem okozza a fentebb említett hatásokat.

2.4 AZ ENDOGÉN KÉNHIIDROGÉN TERMELŐDÉSE

A kénhidrogén (H_2S) az endogén gáztranszmitterek legújabb tagja a nitrogén-monoxid (NO) és a szén-monoxid (CO) mellett. A három fő H_2S -t termelő enzim a cisztation- γ -liáz (CSE), cisztation- β -szintetáz (CBS) és a 3-merkaptopiruvát (3-MST). Az étkezés során bevitt metionin és cisztein a szubsztrátja a transzulfurációs útvonalnak. A metionin-homocisztein ciklus során keletkező homociszteint a CBS cisztationná alakítja, amit a CSE L-ciszteinné konvertál. A keletkező L-ciszteint a CSE és a CBS is H_2S -é képes alakítani. Az L-ciszteinből a 3-MST egy köztes reakcióval együtt H_2S termelést eredményez.

2.5 A KÉNHDROGÉN SZEREPE AZ ÉRELMESESZESÉDÉS PROGRESSZIÓJÁBAN

A H₂S érrelmeszesedést befolyásoló hatásáról számos publikáció jelent meg a 2000-es évek elején. Az érrelmeszesedés egyik fő kezdeti lépése az LDL szubendoteliális térben történő oxidációja. Kimutatták, hogy a kénhidrogén képes gátolni az LDL hem indukálta oxidatív módosulását *in vitro* körülmények között. Leírták, hogy a H₂S lelassítja az érrelmeszesedés folyamatát, amit különböző állatmodelleken is demonstráltak, de a védelem pontos mechanizmusa, a sejtes válasz, illetve klinikai tesztek hiánya miatt ezen terület intenzív kutatása szükséges. Wang és munkatársai bemutatták, hogy a nátrium-hidroszulfid (NaSH) az Apolipoprotein E deficiens egerekben (ApoE^{-/-}) gátolta az aterogén diéta nélkül létrejött érrelmeszesedéses plakkok kialakulását. Továbbá bebizonyították, hogy a CSE gátlószer alkalmazása esetén az ApoE^{-/-} egerekben az érrelmeszesedés progressziója előrehaladottabb volt a kontroll ApoE^{-/-} egerekhez hasonlítva. Mani és munkatársai CSE deficiens egereket használva a kísérletekhez kimutatták, hogy a CSE fehérje hiánya megnövekedett érrelmeszesedést okoz, és ezzel párhuzamosan csökkent H₂S termelődéssel jár.

2.6 A KÉNHDROGÉN ÉS A GYULLADÁS KAPCSOLATA

Az érrelmeszesedés során expresszáldó, gyulladást előidéző pro-inflammatórikus citokinek és proteázok hozzájárulnak a plakkok bevézéséhez és trombus kialakulásához. Megállapították, hogy a kénhidrogén termeléséért felelős fő enzim, a CSE expressziója megemelkedik lipopoliszachariddal (LPS) gyulladást előidézett egerekben. Az eredményeiből azt a következtetést vonták le, hogy szeptikus sokk esetén a H₂S pro-inflammatórikus hatású. Más kutatócsoport pro-inflammatórikus citokinekkal (TNF- α , IL-1 β , IL-6) és LPS-el kezelt kondrocitákban és mesenchymális őssejtekben is emelkedett CSE expressziót detektált. CSE és CBS farmakológiai és kis interferáló RNS-el történő gátlása során sejtpusztulást detektáltak a pro-inflammatórikus citokinekkal és LPS-el kezelt sejtekben. Az eredményeiből azt a következtetést vonták le, hogy a H₂S védelmi funkciót lát el gyulladás során a sejtekben. Továbbá kimutatták, hogy a hidrogénperoxid (H₂O₂) indukálta oxidatív stressz a CSE expresszióját megemeli embrionális vese és a vese fibroblaszt sejtekben. Eredményeik azt mutatják, hogy a CSE expressziója miatt megemelkedett endogén H₂S gyökkfogó hatása protektív funkciót lát el.

Az ellentmondásos cikkek egyre növekvő száma miatt a kénhidrogén és gyulladás kapcsolatának vizsgálata fontos és sürgető kihívás a tudományos világ számára.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A tanulmány célja a humán bevezetett plakkokban végbemenő folyamatok részletes feltárása, illetve gyógyszeres támadáspontok tesztelése, mellyel az érlelmeszesedés patogenezise megállítható és vagy visszafordítható.

1. Megvizsgálom, hogy a ferrylHb, hasonlóan a hemhez, indukálja az LDL oxidatív modifikációját, ezáltal az EC sejtek pusztulását is előidézi.
2. A hem katabolizmus fehérjéinek – hemoxigenáz-1 (HO-1) és H-ferritin (HFT) – expressziója megemelkedik hem kezelés hatására az EC sejteken, ezért úgy gondoltam, hogy a ferrylHb is megemeli ezeknek a fehérjéknek a szintjét.
3. Az oxLDL és reaktív lipidek az érlelmeszesedéses plakkok bizonyított alkotói. Feltételeztem, hogy a plakkok bevezése során az oxLDL-el és reaktív lipidekkel érintkezve a hemoglobinnal ferrylHb-á oxidálódik.
4. Feltételeztem, hogy a haptoglobin (Hp) a hemoglobin kötő képessége miatt, illetve az antioxidáns glutathion (GSH)/glutathion-peroxidáz (GPx) rendszer képes gátolni a H_2O_2 , illetve az oxidált plakk lipidek indukálta ferrylHb képződést.
5. A ferrylHb (de nem a hem, sem a Hb) felszakítja az EC sejtek rétegét. Emiatt azt feltételeztem, hogy a kialakult lyukak triggerelik a monociták adhézioját az EC-hez.
6. A CSE szint expressziója megemelkedik az érlelmeszesedéses állat modellekben. Ezért megvizsgáltam, a CSE expresszióját humán egészséges, atheroma és komplikált léziókban, illetve magas zsír és koleszterin diétán tartott ApoE^{-/-} egerekben.
7. A kénhidrogén gátolja a lipidperoxidációt. Ennek ismeretében in vitro körülmények között teszteltem különböző H_2S -t kibocsátó molekulák hatását a lipidperoxidáció gátlására. Megvizsgáltam az atheroszklerotikus egér modellünkben a H_2S hatását.
8. Feltételezem, hogy a H_2S képes gátolni a humán komplikált léziókban is zajló lipidperoxidációt.
9. Mivel tudjuk, hogy a H_2S gyorsan képes hozzákötődni a hemfehérjékhez, ezért úgy gondoltam, hogy a H_2S a ferrylHb kialakulását is képes gátolni.

10. A ferrylHb EC-re nézve pro-inflammatorikus hatású, indukálja az adhéziós molekulák expresszióját és felszakítja az endotél sejtek rétegét. Megvizsgáltam, hogy a Hb-lipid interakció során kialakuló ferrylHb hatása az endotélsejtekre nézve eliminálható-e H₂S-el.

11. Egyes citokinekről, LPS-ről és a H₂O₂-ről is kimutatták, hogy indukálják a H₂S termelődésért felelős fő enzim, a CSE expresszióját. Ebből adódóan én is megvizsgáltam, hogy az IL-1 β , TNF- α , H₂O₂, oxidált és nem oxidált LDL, illetve humán karotiszból származó nem oxidált és oxidált lipidek CSE expresszióra gyakorolt hatását humán aorta endotél sejten (HAoEC), RAW264.7 makrofágon és humán aorta simaizomsejten (HAOSMC).

4. MÓDSZEREK

4.1 A KÍSÉRLETEKBEN FELHASZNÁLT VEGYSZEREK BESZERZÉSE

A reagensek többsége a Sigma-Aldrich (Darmstadt, Németország) cégtől származik, minimum ACS vagy jobb minőségben. A máshonnan rendelt, kutatáshoz használt anyagokat alább specifikálom. A kutatásban használt szulfid donor molekulákat Matthew Whiteman és Roberta Torregrossa szintetizálták nekem. A kísérletekhez az alábbi, kénhidrogént lassan kibocsátó vegyszereket használtam:

1. GYY4137: (P-(4- Methoxyphenyl)-P-4-morpholinylphosphinodithioic acid morpholine salt
2. AP67: (4-methoxyphenyl)(pyrrolidin-1-yl) phosphinodithioc acid)
3. AP72 (4 methoxyphenyl) (piperidin-1-yl) phosphinodithioc acid).

A szulfid törzsoldatokat naponta, frissen készítettem el és azonnal használtam a kísérletek során.

4.2 ETIKAI ENGEDÉLYEK

4.2.1 HUMÁN ETIKAI ENGEDÉLY

A karotisz érdarabokat a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézetétől Érsebészeti Osztályától kaptuk. A betegek karotisz endarterektómián estek át. A kutatáshoz 54 db karotisz mintát gyűjtöttem 2012 októberétől. 15 mintán immunhisztokémia (IHC) festéseket végeztem, 39 minta *in vitro* kísérletekhez lett felhasználva. A Helsinki Nyilatkozatot figyelembe véve, a betegek beleegyező nyilatkozatot írtak alá a szóbeli tájékoztatás után. A karotisz minták gyűjtését a Magyar Kormány Egészségügyi Tudományos Tanácsának tudományos és kutatási etikai bizottsága (ETT-TUKEB) az alábbi regisztrációs számon hagyta jóvá: RKEB/IKEB 3712-2012. A karotisz mintákat patológus vizsgálta meg és az AHA ajánlása alapján egyes típusú (egészséges), négyes típusú (atheroma) és hatos típusú (komplikált) léziók szerint válogatta azokat szét a kutatáshoz. Ezen felül kontrollcsoportként egészséges karotisz mintákat szereztünk be a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetétől. A minták *suicidium* vagy baleset során elhunyt személyektől származtak. Kizáró kritérium volt a minták gyűjtése során a kardiovaszkuláris betegség jelenléte. A gyűjtést a Regionális Kutatási Etikai Bizottság az alábbi projekt számon hagyta jóvá: 5038-2018.

4.2.2 KISÁLLAT ETIKAI ENGEDÉLY

Az állatkísérletek az Európai Parlament tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU irányelvek alapján lettek kivitelezve. Az állatkísérleteket a Magyar Kormány Egészségügyi Tudományos Tanácsának tudományos és kutatási etikai bizottsága (ETT-TUKEB) az alábbi regisztrációs számon hagyta jóvá: DE MÁB/157-5/2010 az ARRIVE irányelveinek megfelelően. A C57BL/6 ApoE^{-/-} egereket a Charles River Laboratories International Inc. cégtől vettük. Az egerek tartása a Debreceni Egyetemen történik, betartva az Intézményi Etikai Bizottság irányelveit. Az érlelmeszesedés indukálásához az egerek standard rágszáló ételét 8 hetes korukban kicseréltük atherogén diétára (15% zsír, 1,25% koleszterol, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország. Az egereket véletlenszerűen három csoportra osztottam, párhuzamosan az atherogén diétával az egerek egy része intraperitoneálisan nátrium-szulfidot (NaSH; 56 µmol/kg; N=9; Fisher Scientific; CAS 207683-19-0) kapott, másik részüket DL-propargylglycinnel (PPG; 50 mg/kg; N=5) oltottam, míg a harmadik csoport egereibe foszfáttal puffertolt sóoldatot injektáltam (PBS; N=21). A kezeléseket kétnaponta végeztem 8 héten keresztül. 8 hét elteltével az egereket lassan emelkedő CO₂ inhalációs módszerrel elpusztítottam. Ezt követően vért vettem közvetlenül az egerek szívéből, végül kipreparáltam az aortát. Az aorták egy részéből hisztológiai festéseket végeztem, másik részéből Oil Red O festéssel láthatóvá tettem a teljes aortában lévő lipideket. Ezen felül az aortákat fehérje és RNS szintű vizsgálatokra is eltettem. Az állatok szerveit (máj, lép, tüdő, szív, vese) eltávolítottam és folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottam, -70°C-on tárolom. Az eljárás során műtétet nem végeztem és az állatoknak fájdalmat nem okoztam. A választott dózisokat az állatok jól tolerálták. Az intraperitoneális injektálással fájdalmat nem okoztam az állatoknak. Az egerek a kísérlet során kézhez szoktak, így semmiféle stresszt nem éltek át. Az állatokat kontrollált hőmérséklet mellett (24°C) helyeztem el az állatházban, ahol 12 órás nappali/éjszakai ciklust biztosítottunk. A táplálékhoz és vízhez szabadon hozzáférhettek az egerek.

4.3 IMMUNOHISZTOKÉMIA

A IHC festések a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ Patológia Intézetében készültek. A karotisz mintákat formalinban (10%) fixálták, majd paraffinba ágyazást követően 4 µm-es vastagságú metszeteket vágtak. A mintákat paraffin-mentesítették xylollal és etanollal, majd antigén feltárást hajtottak végre rajtuk. A karotisz minták metszeteit Hematoxilin és Eozin-nal (H&E) festették meg. A Hb detektálására humán ellenes kecskébe termeltetett HRP konjugált

poliklonális antitestet használtak (Cat no. ab19362-1, Abcam Plc., Cambridge, UK) 1:100-as hígításban. A megfestett metszeteket Mirax Midi szkennelrel digitalizálták (3D Histech, Budapest, Magyarország). A makroszkópos képeket a karotiszokról Nikon D3200 kamera segítségével fényképeztem (Nikon Corp.; Minato, Tokyo, Japán).

4.4 SEJTTENYÉSZTÉS

Az EC sejteket köldökzsinórból szeparáltuk. A véna kanülálása után 0,2%-os diszpáz oldattal 45 percig inkubáltuk a köldökzsinórt 37°C-os inkubátorban. Ezek után a leemésztődött sejteket medium 199-es tenyésztőfolyadékban centrifugáltuk (2000 G, 24 °C, 15 perc). A centrifuga alján lévő sejteket medium 199-es tenyésztőfolyadékban felszuszpendáltuk majd T-75-ös tenyésztőedénybe rakva 37°C-os inkubátorban növesztettük. A HaOEC sejteket (PromoCell, Heidelberg, Németország) 15%-os fetál szarvasmarha szérumot (FBS), penicillint (100 U/mL), streptomycint (100 U/mL), heparint (5 U/mL), L-glutamint, nátrium piruvátot, endotél növekedési faktort tartalmazó medium 199-es tenyésztőfolyadékban növesztettük. Az endotél sejteket 3-as passzásnál kezeltük 100%-os konfluencia elérése után két nappal. HAOSMC (PromoCell, Heidelberg, Germany) sejteket Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tenyésztőfolyadékban növesztettük 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL), heparin (5 U/mL), L-glutamin, nátrium piruvát tartalom mellett. A RAW264.7 egér makrofágokat (ATCC) Roswell Park Memorial Institute tenyésztőfolyadékban (RPMI) növesztettük 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL), heparin (5 U/mL), L-glutamin, nátrium piruvát tartalom mellett.

4.5 HEMOGLOBIN PREPARÁCIÓ

A Hb-t egészséges önkéntesektől levett perifériás vérből szeparáltuk ion-cserélő kromatográfiával DEAE Sepharose CL-6B oszloptöltet segítségével. A VVT-et centrifugálással (2500 G, 15 perc, 4°C) választjuk el a plazmától. A plazma teljes eltávolításához a VVT masszát háromszor mossuk fiziológiás sóoldattal. A VVT masszához 6-szoros mennyiségű 5 mmol/L-es koncentrációjú nátrium-foszfát oldatot (7.4 pH) adunk, majd jégen inkubáljuk őket 1 órán át. A hemolízis végbemenetele után eltávolítjuk a Hb-t a VVT membrántól centrifugálással (16800 G, 1 óra, 4 °C). A Hb-hoz 1/20-ad mennyiségű 1 mol/L-es koncentrációjú nem titrált Tris bázist adunk. DEAE Sepharose CL-6B oszloptöltet segítségével tisztítjuk meg a Hb-t. 50 mmol/L-es koncentrációjú Tris bázissal (7.4 pH) végezzük el az eluálást. A hemoglobin tisztaságát ProteSilverPlus Silver Stainng Kit

segítségével ellenőriztük. A Hb tisztasága mindig 99% felett volt. A Hb koncentrációját Winterbourn-egyenlettel számítottuk ki. A tisztított Hb-t hemre számítva 1,5-szeres moláris koncentrációjú kálium-ferricianiddal 45 percig inkubálva állítjuk elő a metHb-t. FerrylHb előállításához hemre számítva 10-szeres moláris koncentrációjú H_2O_2 -al inkubáltuk a Hb-t, a ferrylHb átalakulást spektrofotométer (Beckman DU-800) segítségével monitoroztuk 90% feletti átalakulásig. A hemoglobint AMICON Ultra centrifugacső segítségével tömörítettük be (10,000 MWCO, Millipore Corp., Billerica, MA, USA). A Hb-t, metHb-t és a ferrylHb-t 3-szor 3 órán át, majd 16 órán át dialízis membrán segítségével 500-szoros mennyiségű fiziológias sóoldatban dializáltuk. A hemoglobinformákat folyékony nitrogén alatt lefagyasztottuk, majd -70°C -on tároltuk.

4.6 ALACSONY SŰRŰSÉGŰ LIPOPROTEIN PREPARÁCIÓ

A Hb-t egészséges önkéntesektől levett Etilén-Diamin-Tetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt perifériás vérből szeparáltuk gradiens ultracentrifugálással (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) végeztük. A plazma sűrűségét 1,3 g/mL-re kálium-bromiddal (KBr) állítottuk be. Két réteg grádiens (1,3 g/mL-es sűrűségű plazma és fiziológias sóoldat) Quick-SEAL (Beckman) ultracentrifugacsőbe rétegeztünk. Az ultracentrifugálást 302,000 G-en 2 órán át 4°C -on végeztük VTi 50.2. rotorral (Beckman). A kigyűjtött LDL mintákból fehérjemérést hajtottunk végre (Pierce BCA protein assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Az LDL mintákat 4°C -os hűtőben maximum egy hónapig használtuk.

4.7 ALACSONY SŰRŰSÉGŰ LIPOPROTEIN OXIDÁLÁSA

Az LDL oxidálásához szükséges hem törzsoldatot 20 mmol/L-es koncentrációjú nátrium-hidroxiddal (NaOH) készült, hem dimetil-szulfoxiddal (DMSO) állítottuk elő, a 100-szorosára hígított pontos koncentrációt spektrofotométerrel (Beckman DU-800) határoztuk meg. A hem extinciókoefficiense $85820 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Az LDL oxidálását 5 $\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációjú hemmel és 75 $\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációjú H_2O_2 -val végeztük. Más kísérletben hemet, Hb-t, metHb-t és ferrylHb-t inkubáltunk EDTA alvadásgátolt plazmával egy órán át 37°C -on. A hemoglobin formák koncentrációja 100 $\mu\text{mol/L}$ -es volt Hb csoportra számítva. Az inkubálási idő után LDL szeparálást végeztünk.

4.8 LIPIDPEROXIDÁCIÓS TERMÉKEK MÉRÉSE

A lipidperoxidációs termékek közül a konjugált diének, LOOH és a tiobarbitursav-reaktív anyagok (TBARS) mennyiségét mértük. Konjugált diének mérésénél az LDL-t felhígítottuk 200 µg/mL-es koncentrációra és az optikai denzitását (OD) 234 nm-en mértük spektrofotométerrel (Bechman DU-800). A 0,5-nél nagyobb abszorbancia felett beszélhetünk oxLDL-ről. Az LOOH tartalmat Simon-Wolf reagens segítségével mértük. TBARS mérésénél 50 µL 200 µg/mL-es koncentrációjú LDL-t kevertünk össze 100 µL tiobarbitursav-reaktív reagenssel (0,375 g 2-tiobarbitur sav, 2,08 mL sósav, 15 mL 10%-os triklórecetsav 100 mL-es végtérfogatban desztillált vízzel). A mintákat 90 °C-on 20 percig melegítettük. A minták lehűtése után 200 µL n-butanollal extraháltuk a TBARS-t. A felső fázist spektrofotométerrel 532 nm-en mértük. Az extinciókoefficiens $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, az eredmények nmol TBARS/mg fehérjében vannak kifejezve.

4.9 LIPID-MEDIÁLTA HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓ

A tisztított Hb-t (20 µmol/L, hem csoportra számítva) H₂O₂-al (200 µmol/L), LDL-el (50-500 µg fehérje/mL), oxLDL-el (50-500 µg fehérje/mL), PL-el (500 µg fehérje/mL) inkubáltuk. A Hb redox állapotának a változását spektrofotométerrel követtük nyomon (Bechman DU-800).

4.10 SEJTTOXICITÁSI VIZSGÁLAT

Az endotél sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük. Kezelés előtt a sejteket Hank féle kiegyenlített sóoldattal mostuk, ami tartalmazott Ca²⁺-ot és Mg²⁺-ot (HBSS+). A konfluens endotél sejteket megkezeltük hemmel (10 µmol/L), Hb-al (10 µmol/L, hem csoportra számítva), metHb-al (10 µmol/L, hem csoportra számítva) és ferrylHb-al (10 µmol/L, hem csoportra számítva) HBSS+-ban hígítva. 1 óra kezelés elteltével a sejteket egyszer mostuk HBSS+-al, majd 3 órán át H₂O₂-al (75 µmol/L) inkubáltuk őket. Más kísérletben LDL-t (250 µg fehérje/mL) inkubáltunk hemmel (10 µmol/L), Hb-al (10 µmol/L, hem csoportra számítva), metHb-al (10 µmol/L, hem csoportra számítva) és ferrylHb-al (10 µmol/L, hem csoportra számítva) 1 órán át majd endotél sejteket kezeltünk velük.

A kénhidrogén kísérletek során 200 µg/mL-es koncentrációjú LDL-t hemmel (5 µmol/L) és H₂O₂-el (75 µmol/L) oxidáltunk. Az így létrejött oxLDL-t inkubáltuk 16 órán át 37°C-on önmagában és/vagy 20, illetve 200 µg/mL-es koncentrációjú szulfid donorok jelenlétében (NaSH, GYY4137, AP67, AP72). Ezt követően 96 lyukú tenyésztőedényben növesztett konfluens EC sejteket mostuk kétszer HBSS+-al. Végül a sejteket 6 órán át kezeltük 37°C-on

az oxLDL és kénhidrogén donorokkal kezelt oxLDL mintákkal. 6 óra elteltével MTT sejttotoxicitási vizsgálatot végeztünk.

4.11 ENDOTÉL SEJT PERMEABILITÁSI VIZSGÁLATA

Az EC sejteket zselatinnal bélelt függő sejtenyésző betétben 100%-os konfluencia eléréséig növesztettük (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Ezt követően hemmel (10 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (10 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva), metHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) és ferrylHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) kezeltük 12 órán át. A kísérleti idő lejártá után fluoreszens nátriumsót (1 $\mu\text{mol/L}$) adtunk a sejtenyésző folyadékhoz. A kísérleti apikális edényben lévő HBBS+-ból 1 óra elteltével mintát vettünk, amit fluoreszcens mikroplate olvasóval 488/525 nm-en mértünk le (Synergy4, BioTek, Winooski, USA).

4.12 MONOCITA ADHÉZIÓS VIZSGÁLAT

EC sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben konfluenciáig növesztettem, majd hemmel (10 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (10 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva), metHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) és ferrylHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) kezeltük őket 12 órán át. Perifériális mononukleáris sejteket (PBMC) Histopaque-1077 segítségével szeparáltam. Mágneses izolációs módszerrel nyertük ki a CD14+ monocitákat (MACS CD14 microbeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Németország). A monocitákat serum mentes DMEM-ben szuszpendáltuk fel 5×10^6 -on sejt/mL-es koncentrációban. Ezt követően a sejteket Calcein AM-el (5 $\mu\text{mol/L}$) inkubáltuk 30 percig 37°C-on. A megjelölt monocitákat hozzáadtuk a megkezelt EC sejtekhez 30 percig 37°C-on. Az endotélsejtek felszínére be nem kötődött monociták eltávolítása miatt 2-szer mostuk HBSS+-al az EC-ket. Végül formaldehiddel (3,7 %; Merck) fixáltuk a sejteket. A sejtek blokkolása 5%-os szarummal történt 30 percig (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK). Ezt követően a sejtek aktinját TRITC (25 $\mu\text{g/mL}$) konjugált falloidinnel, a sejtek DNS-ét Hoechst-el (0.5 $\mu\text{g/mL}$) festettük. A sejtekről a fényképeket fluoreszcens mikroszkóppal fényképeztük le (DM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország).

4.13 VALÓS IDEJŰ KVANTITATÍV POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

A konfluens HUVEs sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben növesztettük, majd kezeltük hemmel (100 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (100 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva), metHb-al (100 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) és ferrylHb-al (100 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) CM199

komplett tenyésztő folyadékban. 6 óra elteltével a kezelt sejteket egyszer mostuk HBSS+-al, majd ribonukleinsavat (RNS) izoláltunk RNazol STAT-60-al a gyártói instrukció szerint (TEL-TEST Inc., Friendswood, TX, USA). Az RNS koncentrációját spektrofotométer segítségével mértük le (Beckman DU-800). A HO-1 gén és a cyclophilin háztartási gén hírvivő RNS (mRNS) expresszióját valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) mértük. Az RNS Superscript II reverz transzkriptáz (Invitrogen, Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) segítségével klón DNS-é lett alakítva. A transzláció iCycler iQ Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével hajtottuk végre. A 25 µL-es reakció mix 0,3 nmol/L-es koncentrációjú primereket (HO-1: + GGT-GAT-AGA-AGA-GGC-CAA-GAC-TG és – GGT-GTC-ATG-GGT-CAG-CAG-CT, cyclophilin + ACG-GCG-AGC-CCT-TGG és – TTT-CTG-CTG-TCTTTG- GGA-CCT), 0,13 nmol/L-es koncentrációjú fluoreszcens próbát (HO-1 CTC-AAC-ATC-CAG-CTC-TTT-GAG-GAG-TTG-CAG, cyclophilin CGC-GTC-TCC-TTT-GAG-CTG-TTTGCA), 3 mmol/L-es koncentrációjú MgCl₂-ot, 0,2 mmol/L-es koncentrációjú dezoxiribonukleotid-trifoszfátok (dNTP) mixet és 0,05 U/mL-es koncentrációjú Taq DNA polimerázt (Invitrogen, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) tartalmazott. Az eredmények ábrázolásánál a cyclophilin génre normalizált HO-1 gén expressziós szintváltozását hasonlítottuk össze a kezeletlen sejtekkel.

Más kísérletekben ApoE^{-/-} deficiens egereket intraperitoneálisan injektáltuk NaSH-al (56 µmol/kg) vagy pozitív kontrollként használt egereket PBS-el minden második nap 8 héten keresztül. Párhuzamosan a kezelésekkel az egerek atherogén diétát kaptak, míg a kontroll egerek standard rágcsáló ételt kaptak. A kísérlet végén az egereket leöltük, az aortájukat kipreparáltuk. RNS-t izoláltunk RNazol STAT-60-al. Az RNS koncentrációját NanoDropTM 2000c spektrofotométerrel mértük le (Cat. No. S06497c, Thermo Scientific Inc. Waltham, MA, USA). A cDNS szintézisét high capacity cDNA kittel végeztük el (Cat. No. 43-688-13, Applied Biosystems, Foster City, CA). A HO-1 (Mm00516005_m1, Thermo Fisher Scientific Inc.) és Beta-actin (Mm02619580_g1, Thermo Fisher Scientific Inc.) mRNS szintű expresszióját RT-qPCR-al quantifikáltuk TaqMan Universal PCR Master Mix segítségével (Cat. No. 4269510, Applied Biosystems, Foster City, CA). A 40 ciklusú amplifikálás 96 lyukú Bio-rad pléteken történt Bio-rad CFX96 detekciós rendszer segítségével (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, California, USA). Az mRNS expressziókat beta-actinra normalizáltuk.

4.14 WESTERN BLOT ALAPÚ FEHÉRJE ANALÍZIS

EC sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben 100 %-os konfluenciáig tenyésztettük, majd a sejteket hemmel (100 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (100 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva), metHb-al (100 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) és ferrylHb-al (100 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) CM199 komplett tenyésztő folyadékban kezeltük 8 órán át. Ezt követően a sejteket szolubilizáltuk 10 mmol/L-es koncentrációjú Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TrisHCl), 5 mmol/L-es koncentrációjú EDTA, 150 mmol/L-es koncentrációjú nátrium-klorid (NaCl; pH 7,2), 1 % Triton X-100, 0,5 % Nonidet P-40 és proteáz gátló (Complete Mini, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) mixet tartalmazó szolubilizáló oldatban 45 percig 4 °C-on. 20 μg fehérjét (ettől történő eltérést az ábraalírásban specifikáltam) 12,5%-os nátrium dodecil sulfát (SDS)- poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) gélre injektáltuk. Az elektroforézis befejeztével a gélben lévő fehérjéket nirocellulóz membránba (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) transzferáltuk. Más kísérletekben humán karotisz érdarabokat homogenizáltunk folyékony nitrogén alatt, és szolubilizáltuk fehérje lízis pufferben. Fehérjetartalom mérést követően az egyes western blottól függően 10-20 μg fehérje mintát 12,5 %-os nátrium dodecil szulfát-poliacrilamid gélbe (SDS-PAGE) injektálunk. Egérben termeltetett humán ellenes HO-1 (Cat no. 374087, Calbiochem, MerckKGaA, Darmstadt, Németország) monoklonális antitestet 1:2500-as hígításban inkubáltuk, a blottokat 16 órán át a HO-1 fehérje kimutatására. Nyúlban termeltetett humán ellenes Hemoxigenáz-2 (HO-2) (Proteintech, Chicago, IL, USA, 14817-1-AP) antitestet 1:1000-es hígításban inkubáltuk, a blottokat 16 órán át. Nyúlban termeltetett humán ellenes CSE antitestet (Proteintech, Chicago, IL, USA, 12217-1-AP) 1:1000-es hígításban inkubáltuk, a blottokat 16 órán át. Nyúlban termeltetett humán ellenes VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA, sc8304) antitestet 1:200-as hígításban inkubáltuk, a blottokat 16 órán át. A ferritin fehérjék detektálására egérben termeltetett humán ellenes H-ferritin és L-ferritin antitesteket használtunk, amit a kutatáshoz ajándékba kaptunk Paolo Arosiotól. Az elektroforézist natív géleken végeztük. A blottokat 16 órán át 4°C-on inkubáltuk az antitestekkel. 16 óra letelte után a blottokat 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk nyúlban termeltetett HRP-vel konjugált IgG másodlagos antitesttel (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA, NA934, hígítás 1:15000) vagy egérben termeltett HRP-vel konjugált IgG másodlagos antitesttel (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA, NA931, hígítás 1:15000). Egérben termeltetett humán ellenes glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) antitestet (Cat no. N13300-221, Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO, USA) 1:1000-es

hígításban használtuk a GAPDH fehérje kimutatására. A blottokat 16 órán át inkubáltuk az antitesttel. E háztartási fehérje segítségével bizonyítottam, hogy a western blot során egyforma mennyiségű mintát adtam az SDS-PAGE zsebeibe. Az antigén-antitest komplex detektálására kemilumineszcens rendszert használtunk a gyári instrukciók figyelembe vételével (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). AlphaDigiDoc (AlphaDigiDoc RT, Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA) rendszer segítségével digitalizáltuk a röntgen filmre előhívott fehérje expressziókat. A fehérjék expressziójának változását normalizálva GAPDH-ra, illetve összehasonlítva a nem kezelt sejtekkel ImageJ Fiji szoftver segítségével elemeztük.

4.15 FERRYLHEMOGLOBIN MULTIMEREK DETEKTÁLÁS

A hemoglobint tartalmazó mintákat (1-4 μ g) 12,5 %-os SDS-PAGE-re injektáltuk. Az elektroforézis befejeztével a gélben lévő hemoglobint nirocellulóz membránba (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) transzferáltuk. A Hb detektálására HRP konjugált kecskébe termeltetett humán ellenes poliklonális antitestet használtunk (Cat no. ab19362-1, Abcam Plc., Cambridge, UK) 1:15000-es hígításban, egész éjszaka inkubálva az antitestet a blottal. Az antigén-antitest komplex detektálására kemilumineszcens rendszert használtunk a gyári instrukciók figyelembe vételével (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). AlphaDigiDoc (AlphaDigiDoc RT, Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA) rendszer segítségével digitalizáltuk a röntgen filmre előhívott fehérje expressziókat. Más esetekben a gélen lévő Hb multimereket ezüstoffestés segítségével tettük láthatóvá.

4.16 HUMÁN ATHEROMÁBÓL SZÁRMAZÓ LIPID EXTRAKTUM

Humán atheromából származó lipid extraktum (PL) készítéséhez az atheroma darabokat folyékony nitrogén alatt porítottuk. Az így elkészült őrleményt fiziológiás sóoldat és kloroform (1:3) keverékében felvettük. Intenzív kevertetés után a mintákból a lipidek kinyerése nitrogén gázzal történt. Az így kapott lipidek tömegét lemértük. 0,5 mg/mL-es koncentrációjú PL-et inkubáltunk Hb-al (100 μ mol/L) önmagában, és vagy 200 μ mol/L-es koncentrációjú kénhidrogén donorokkal (NaSH, GYY4137, AP67, AP72) 4 napig 37°C-on. Más esetekben komplikált plakkot homogenizáltunk fiziológiás sóoldatban. 0,5 mg/mL-es koncentrációjú komplikált plakk mintát inkubáltunk 3 napig 37 °C-on NaSH, GYY4137, AP67 és AP72 kénhidrogén donorok jelenlétében. A lipidperoxidációs termékek közül a kísérletekben a LOOH és a TBARS tartalmakat mértük le.

4.17 HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓJÁNAK GÁTLÁSA KÉNHIDROGÉNNEL

A kísérletek során Hb-t (5 $\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) inkubáltunk H_2O_2 -al (25 $\mu\text{mol/L}$) illetve oxLDL-el (50 μg fehérje/mL) önmagukban vagy 200 $\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációjú kénhidrogén donorok jelenlétében (NaSH, GYY4137, AP67, AP72) 1 órán át 37 °C-on. A ferrylHb detektálását a 3.16-os pontban leírtak szerint végeztük el.

4.18 ENDOTÉL SEJT MONOLAYERÉNEK INTEGRITÁSI VIZSGÁLATA

A konfluens HAOEC sejtek integritását Electric Cell Substrate Impedance Sensing (ECIS, Zoinstrument, Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA) módszer segítségével mértük. A sejteket 8 lyukú elektródákat tartalmazó tenyésztőedényben növesztettük (8W10E, Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA). A konfluencia elérését ECIS segítségével monitoroztuk. 100%-os konfluencia elérése után a HAOEC sejteket 50 $\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációjú H_2O_2 -al oxidált Hb-al (10 $\mu\text{mol/L}$) kezeltük önmagában, vagy 200 $\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációjú szulfid donorok mellett (NaSH, GYY4137, AP67, AP72). A teljes impedancia spektrum monitorozásra került ECIS segítségével 3 órán át percenkénti időközönként. A sejtek közötti kapcsolat felbomlását a 0-ik időpontban és a 3-ik órában mért monolayer resistencia (4000 Hz) értékének a különbsége mutatja. Más kísérletekben 400 $\mu\text{g/mL}$ -es koncentrációjú PL-el kezelt Hb-al (20 $\mu\text{mol/L}$) kezeltem a HAOEC sejteket önmagában, illetve kénhidrogén donorok jelenlétében (NaSH, GYY4137, AP67, AP72). Az impedancia spektrumot 12 órán át monitoroztam. A sejtek közötti kapcsolat felbomlását a 0-ik időpontban és a 12-ik órában mért monolayer resistencia (4000 Hz) értékének a különbsége mutatja.

4.19 KÉNHIDROGÉN SZINT MEGHATÁROZÁSA SZÖVETBŐL

A Garber által elsőként leírt és A.D Ang és munkatársai által módosított cink precipitációs módszerre határoztuk meg a kénhidrogén szinteket szövetből. Humán karotisz ereket (egészséges, atheroma, komplikált léziók) folyékony nitrogén alatt homogenizáltuk majd 7.4-es pH-jú PBS-ben felvettük őket, amit a minták szonikálása követett 3-szor 5 másodpercig jégen. Ezek után a mintákat centrifugáltuk 12 000 G-én 15 percig. A lipidmentes középső fázist összegyűjtöttük (felső fázis–lipid réteg, középső fázis–fehérjék, alsó fázis–szöveti törmelékek). 200 μL mintákat 350 μL -nyi 1%-os zinc acetáttal és 50 μL 1,5 mol/L-es koncentrációjú NaOH-val inkubáltuk 60 percen át kevertetőn, szobahőmérsékleten. Az inkubálást követően a keletkezett cink szulfidot 2000 G-én 5 percig lecentrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, majd a pelletet 1 mL-nyi ultratiszta desztillált vízzel mostuk intenzív

kevertetéssel. Ezt követően a mintákat ismét 2000 G-en 5 percig lecentrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, a pellethez 160 μL desztillált vizet és 40 μL előre összekevert festéket (20 μL 20 mmol/L dimetil-p-phenilenediamine dihidrochlorid (NNDP) 7,2 mol/L-es koncentrációjú sósavban (HCl) oldva és 20 μL 30 mmol/L vas III klorid (FeCl_3) 1,2 mol/L-es koncentrációjú HCL-ben oldva) adtunk. 10 perc elteltével a keletkezett metilénkék abszorbanciáját spektrofotométerrel (Beckman DU-800) 667 nm-en mértük. A reakció során 1 mol/L metilénkék 1 mol/L szulfidból keletkezik. A koncentráció meghatározásához a metilénkék extinciókoefficiensével számoltunk ($30\,200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A keletkező kénhidrogén koncentrációkat a minták fehérje tartalmára normalizáltuk.

4.20 EZÜSTFESTÉS

Az ezüstoffestést az alábbi protokoll szerint végeztem 12 %-os SDS-PAGE-be injektált és elektroforézissel futtatott mintákon. Az elektroforézist követően a gél desztillált vízben (DW) mostam 10 percig. Ezt követően a gél fixáltam 12,5 mL etanol+5,37 mL formaldehid+32,125 mL DW oldatban 16 órán át 4°C-on. Ezután a gél 4-szer 10 percig mostam DW-ben. A mosási lépést követően a gél 50 mL DW-ben feloldott 0,025 g naftalin oldatban inkubáltam 1 napig billegtető rotoron 4°C-on. Másnap 4-szer 20 percig DW-ben mostam a gél, végül ezüst oldattal inkubáltam (30 mL DW+468,75 μL 1M-os NaOH+493,75 μL 5M-os ammónium-hidroxid+ 750 μL 1M-os AgNO_3) 20 percig fénytől védve 4°C-on. Az ezüst oldatban megfigyelhető barnás csapadékot néhány csepp ammónium-hidroxiddal fel lehet oldani. Az ezüst oldattal történt inkubálás után 20 percig mossuk DW-el a gél. A gélen lévő fehérjék előhívása 50 mL-es végtérfogatban lévő 50 μL formaldehid, 9 μL 2M-os citromsav és DW elegyből áll. Az előhívást követően a reakciót 50 mL-es végtérfogatban lévő 1 mL esetsav, 250 μL etanolamin és DW elegyből álló oldattal állítottuk le. 3-szor 5 perc mosás után a gél szárító oldatba helyeztem 2,5 óráig (17,5 mL etanol+1 mL glicerol+37,5 mL DW). A szárítást követően a géleket gél dokumentációs eszköz segítségével fényképeztem le.

4.21 LIPIDHIDROPEROXID MEGHATÁROZÁSA JODOMETRIÁS MÓDSZERREL

100 μL PL vagy bevérzett plakk szuszpenziót 1 μL 10 mmol/L-es EDTA és 200 μL kloroform és 100 μL metanol oldatban extraháltam. A kloroformos fázist eltávolítottam, s adtam hozzá 36 μL esetsavat, 24 μL kloroformot és 40 μL 1,2 mg/mL-es kálium-jodid oldatot. 5 perc inkubálási idő után 180 μL 20mmol/L-es kadmium-acetáttal leállítottam a reakciót. A szuszpenziót 120 000G-in 15 percig centrifugáltam, majd a felülúszóból a minták

OD értékét 353 nm-en és 700 nm-en spektrofotométerrel lemértem. A kapott 353 nm-es OD értékeket kivontam a 700 nm-en mért OD értékekből. Az LOOH számítása a trijodid (I_3^-) ionra megadott extinkciós moláris koefficienssel ($2,19 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) történt. A PL és a bevértett plakkból mért LOOH-t nmol LOOH/mg szövetre adtam meg.

4.22 NÁTRIUM-SZULFID KÉSZÍTÉSE

A használandó csöveket nitrogén gázzal kell telíteni, illetve minden anyagot vegyi fülke alatt jégen kell tartani. 3-4 nagyobb darab Nátrium-szulfid (Na_2S) kristályt DW-el 3-szor mostam a felületükön keletkezett poliszulfidok eltávolítása miatt. Ezt követően a kristályokat 4 mL DW-ben kevertetéssel oldottam fel alumíniumfóliával körbetekert centrifugacsőben. Az Na_2S oldatot 100-szorosára hígítottam fel DW-el. Az így kapott oldatot spektrofotométer segítségével 230 nm-en mértem. A törzsoldatot úgy hígítottam tovább, hogy a 100-szorosára hígított Na_2S oldat 1 mL-nek OD-ja 0,4-0,5 között legyen. Az Na_2S oldat koncentrációját 230 nm-en a HS^- -re megadott extinkciós moláris koefficiens ($7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) segítségével számoltam ki. Ezt követően a küvettába pipettáztam még 100 μL 10 mmol/L-es koncentrációjú 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic savat (DTNB), majd 412 nm-en mértem az OD értéket. Az így kapott abszorbancia értékből a $28\,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós moláris koefficienssel számolva megkaptam a kénhidrogén koncentrációját. A két extinkciós koefficienssel számolt Na_2S koncentrációját átlagoltam.

4.23 POLISZULFID (HSX^-) OLDAT KÉSZÍTÉSE

A tömény nátrium-hipoklorit oldatot 10-szeresére hígítottam 50 mmol/L-es PBS-el, majd az oldat abszorbanciáját 292 nm-en mértem. A hígított nátrium-hipoklorit oldat koncentrációját $350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós moláris koefficiens segítségével számoltam ki. 10 mmol/L-os koncentrációjú Na_2S oldatot cseppenként, kevertetés mellett összekevertem 2 mmol/L-es koncentrációjú nátrium-hipoklorit oldattal. A teljes folyamatot jégen és sötétben végeztem el, az elkészült poliszulfidot 30 percen belül elhasználtam.

4.24 SZULFID DONOROK KÉNHIIDROGÉN MENTESÍTÉSE

A szulfid donorokat PBS-ben feloldottam, majd hagytam, hogy a teljes kénhidrogén tartalmuk eltávozzon az alap vegyületből. Az oldat H_2S tartalmát spektrofotométer segítségével monitoroztam 620 nm-en. A teljes H_2S eltávozásához egy hónapon át kellett mérnem a H_2S szintet.

4.25 KÍSÉRLETI EGYSÉG

Az ábraalírásoknál feltüntetett „N” a csoportonként felhasznált humán szövetek és vagy állatok számát jelöli. Az „n” mutatja az egymástól független kísérletek számát, amiből az eredményeket statisztikailag kiértékeltem.

4.26 STATISZTIKA

Az adatokat GraphPad Prism 5.02 szoftver segítségével elemeztem ki. Az ábrákon szereplő statisztikai elemzés minimum három, egymástól független kísérletből származó adatok átlagának a standard hibáját mutatja. A szignifikancia szinteket két csoport összehasonlítása esetén Student t-tesztel határoztam meg. Számos, egyező szórású, normális eloszlású csoport átlagának összevetése esetén egyszempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA) használtam Dunett-féle utó tesztel kombinálva. Az alábbi szignifikancia szinteket jelöltem: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

5. EREDMÉNYEK

5.1 ELSŐ RÉSZ

Az érlelmeszesedés folyamatában a komplikált léziók kialakulása életet veszélyeztető eseménynek számít. A plakkon belüli bevérzés olyan folyamatokat indít be, ami a plakk stabilitásának elvesztésével jár. A folyamat során a plakk felszíne felszakad, a benne található zsíros, véres massa a véráramba kerülve szívinfarktus, sztrók, embólia kialakulásához vezet. A kutatásom első részében a bevérzést követő eseményeket modelleztem. Megvizsgáltam a plakkban található lipidek és a Hb interakciója során létrejövő ferrylHb élettani hatásait.

5.1.1. AZ OXIDÁLT HEMOGLOBIN FORMÁK AZ LDL OXIDATÍV MÓDOSULÁSÁT OKOZZÁK

Ahhoz, hogy modellezhessük a komplikált léziókban megtalálható lipidek és a hemoglobinformák lehetséges interakcióit, humán perifériás vérből Hb-t tisztítottam, majd metHb-t és ferrylHb-t állítottam elő. EDTA-val alvadásgátolt humán plazmát inkubáltam hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb-al (100 $\mu\text{mol/L}$) 1 órán át 37°C-on. Ezt követően LDL-t izoláltam a kezelt plazmamintákból ultracentrifugálással. Az így nyert LDL mintákból konjugált diének, LOOH és a TBARS szinteket mértem 15 napon keresztül. Azt tapasztaltam, hogy a Hb-al kezelt plazmákban a lipidperoxidációs termékek mennyisége nem emelkedett meg a kísérlet során. Ezzel szemben, a hemmel kezelt mintákban a lipidperoxidációs termékek szintje már a második napon megemelkedett. A metHb és a ferrylHb is képes volt az LDL oxidatív modifikációjára, a lipidperoxidációs termékek mennyisége az LDL izolálását követő 7-ik (metHb) és 10-ik (ferrylHb) napokon emelkedett meg. A lipidperoxidációs termékek szintjének megemelkedése a ferrylHb dózis emelkedésével fordított arányban, hamarabb kezdődött meg. A hem a plazmában gyorsan asszociálódik az LDL-hez, ezzel párhuzamosan a hem degradálódik. Ebből kifolyólag azt feltételeztük, hogy a ferrylHb koncentráció emelésével az LDL-hez asszociálódott hem mennyisége is megnő. Azt tapasztaltuk, hogy dózisfüggő módon emelkedik az LDL-hez kapcsolódott hem mennyisége a nagyobb koncentrációkkal kezelt LDL-ben. Továbbá megvizsgáltuk azt is, hogy a ferrylHb okozta LDL oxidációja végbe megy-e humán plazmában is? Ennek vizsgálatához frissen levett teljes vérből plazmát különítettünk el centrifugálással, majd ezt követően a plazma mintát inkubáltuk hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb-al 15 napon keresztül. 15 nap letele után LDL asszociálta hem mérés segítségével megvizsgáltuk, hogy a hemhez és a ferrylHb-

hoz hasonlóan a Hb, metHb is képes-e kibocsátani hemet, ami hozzákötődve az LDL-hez annak oxidációja során degradálódik. Azt tapasztaltuk, hogy a Hb-ből nem, de metHb-ből képes hem kiszabadulni, ami az LDL-hez asszociálódik. Ezt a kezelt LDL mintákból mért megemelkedett hem szintek bizonyították. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a ferrylHb, hasonlóan a metHb-hoz, képes a hem csoportját elengedni, ezáltal a lipidperoxidáció folyamatát beindítani.

5.1.2 AZ OXIDÁLT HEMOGLOBIN FORMÁK OXIDATÍV STRESSZEN KERESZTÜL AZ ENDOTÉL SEJTEK PUSZTULÁSÁT OKOZZÁK

Korábban kimutatták, hogy a hem és a metHb oxidatív stresszt okoz az endotél sejtekben azáltal, hogy a kibocsátott hem csoportjukból H_2O_2 hatására felszabaduló redox aktív vas elősegíti a reaktív oxigén gyökök kialakulását. Ebből kifolyólag leteszteltük, hogy a ferrylHb, hasonlóan a metHb-hoz érzékenyíti-e az endotél sejteket oxidatív stresszen keresztül? Ennek bizonyítására konfluens EC sejteket kezeltem elő hemmel (5 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (5 $\mu\text{mol/L}$), metHb-al (5 $\mu\text{mol/L}$) és ferrylHb-al (5 $\mu\text{mol/L}$) 1 órán át HBSS+ oldatban. Az egy óra letelte után a hemet, Hb-t, metHb-t és ferrylHb-t tartalmazó oldatokat lecseréltem H_2O_2 -ot (75 $\mu\text{mol/L}$) tartalmazó oldatra. További 4 óra inkubáció után sejt túlélési tesztet végeztem. A belső kontrollként használt hem, Hb, metHb, ferrylHb és H_2O_2 önmagukban nem változtatták meg az EC életképességét. Ezzel szemben a hem előkezelést követő H_2O_2 -os kezelés során az EC életképessége 18%-ra ($\pm 2\%$) csökkent. A metHb előkezelést követő H_2O_2 -os kezelés során az EC életképessége 62%-ra ($\pm 4\%$) csökkent. A ferrylHb előkezelést követő H_2O_2 -os kezelés során az EC életképessége 78%-ra ($\pm 3\%$) csökkent.

Korábban kimutatták, hogy a hem és a metHb toxikus az EC-re azáltal, hogy az LDL oxidatív modifikációja során mérgező lipidperoxidációs termékek keletkeznek. Következésképpen megvizsgáltam, hogy a ferrylHb is toxikus-e az EC-re nézve az LDL oxidációján keresztül. A kísérletek során LDL-t (250 μg fehérje/mL) inkubáltam hemmel (10 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (10 $\mu\text{mol/L}$), metHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$) és ferrylHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 órán át HBSS+ oldatban. Ezt követően az EC-t kezeltem a kísérleti oldatokkal 24 órán át. Végül sejt túlélési tesztet végeztem. A túlélési teszt eredménye azt mutatta, hogy a hemmel, metHb-al és ferrylHb-al kezelt sejtek életképessége lecsökkent. Hem esetén az EC életképesség 5%-ra ($\pm 3\%$), metHb esetén 27%-ra ($\pm 5\%$) csökkent, míg a ferrylHb esetén az EC életképessége 9%-ra ($\pm 2\%$) csökkent. Az LDL-el és a Hb-al kezelt EC sejtek esetén az életképességben nem mértem szignifikáns változást.

5.1.3 AZ OXIDÁLT HEMOGLOBINFORMÁK INDUKÁLJÁK A HEMOXIGENÁZ-1 ÉS A FERRITIN EXPRESSZIÓJÁT ENDOTÉL SEJTEKBEN

A HO-1 a hem pirol vázát megbontva azt biliverdinné alakítja, miközben a felszabaduló vasat a ferritin raktározza. Kimutatták, hogy a hem katabolizmus fehérjéinek, HO-1 és HFT expressziója megemelkedik hem kezelés hatására EC sejteken. Továbbá bebizonyították azt is, hogy a natív Hb nem indukálja a HO-1 és HFT expresszióját EC sejtekben, mivel a Hb nem képes elengedni a hem csoportjait. Emiatt leteszteltem ferrylHb hatását a HO-1 és HFT expressziójára EC sejteken. Konfluens EC sejteket emelkedő koncentrációjú hemmel (25-50-100 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (100 $\mu\text{mol/L}$), metHb-al (100 $\mu\text{mol/L}$) és emelkedő koncentrációjú ferrylHb-al (25-50-100 $\mu\text{mol/L}$) kezeltem 15% FBS tartalmú CM199 tenyésztőfolyadékban. A qRT-PCR kísérleteknél a sejteket 4 óráig, a fehérje analízishez és az felülúszó L-ferritin szintjének a méréséhez 8 óráig kezeltem. Kimutattam, hogy a hemhez hasonlóan a metHb és a ferrylHb is megemeli a HO-1 és HFT mRNS gén expresszióját, illetve a HO-1, HFT és L-ferritin (LFT) fehérje expresszióját. A Hb sem RNS, sem fehérje szinten nem emelte meg a HO-1 és HFT szinteket. Továbbá a hem, metHb és a ferrylHb kezelés hatására a felülúszóban emelkedett LFT szintet mértem, míg a Hb szignifikánsan nem emelte meg az LFT-t. A hemhez hasonlóan a ferrylHb is dózisfüggően befolyásolta a HO-1 RNS expresszióját, illetve a HO-1, HFT és LFT fehérje expresszióját.

5.1.4 OXIDÁLT LDL ÉS ATHEROMA LIPIDEK A HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓJÁT OKOZZÁK

Az LDL oxidációja során keletkező LOOH, illetve az atheromából izolált lipidek a Hb oxidációját okozzák. A folyamat során keletkező metHb a hem csoportjait képes elengedni. Kimutatták, hogy az oxidált lipidek és a ferrylHb jelen van a komplikált léziókban, de a reaktív lipidek ferrylHb létrejöttének szerepéről keveset tudunk. Emiatt leteszteltem, hogy a natív LDL, oxLDL és a PL, amit humán IV-es típusú atheromából izoláltam a ferrylHb kialakulását eredményezi-e? A vizsgálatoknál Hb-t (20 $\mu\text{mol/L}$) inkubáltam H_2O_2 -al (200 $\mu\text{mol/L}$), natív LDL-el (500 $\mu\text{g/mL}$), oxLDL-el (500 $\mu\text{g/mL}$), illetve PL-el (500 $\mu\text{g/mL}$) két órán át 37 °C-on. Az inkubációs idő letelte után 4 μg Hb mintákat 12 %-os SDS-PAGE-be injektáltam és elektroforézis kádban lefuttattam és ezüstfestéssel láthatóvá tettem a Hb keresztkötéseket. Az ezüstfestés kimutatta, hogy a H_2O_2 -al, oxLDL-el és PL-el inkubált Hb mintákban megjelentek a keresztkötött Hb-k, ami a ferrylHb létrejöttét bizonyítja. A natív Hb-ban és a natív LDL-el Hb mintában nem detektáltam keresztkötött Hb-t. A mintákban lezajló

változásokat spektrofotométer segítségével is nyomon követtem. A natív Hb-ra jellemző 560 nm-en és 577 nm-en jellemző csúcsok az oxidáció során lecsökkennek, ezzel párhuzamosan az oxidált Hb-ra jellemző új csúcs jelenik meg 630 nm-en. Pozitív kontrollként metHb-t (20 $\mu\text{mol/L}$) használtam. Bebizonyítottam, hogy a növekvő koncentrációjú oxLDL (50-100-200-400 $\mu\text{g/mL}$) dóziszfüggően csökkentette le a Hb (20 $\mu\text{mol/L}$) 560 nm-en és 577 nm-en megfigyelhető csúcsokat, míg 630 nm-en dóziszfüggően emelkedett meg az oxidált hemoglobinra jellemző csúcs. A spektrofotométerrel történt minták analízisét Winternbourn-féle egyenlet segítségével elemeztem. Kimutattam, hogy a növekvő koncentrációjú oxLDL-el (50-100-200-400 $\mu\text{g/mL}$) kezelt Hb (20 $\mu\text{mol/L}$) mintákban dóziszfüggően és szignifikánsan megnőtt a ferriHb-ra jellemző Fe^{3+} mértéke, ezzel párhuzamosan a ferroHb-ra jellemző Fe^{2+} mennyisége dóziszfüggően és szignifikánsan lecsökkent. A spektrofotometriás mérésnél kapott eredményt ezüstfestéssel is konfirmáltam. A növekvő koncentrációjú oxLDL-el (50-100-200-400 $\mu\text{g/mL}$) kezelt Hb (20 $\mu\text{mol/L}$) mintákban a keresztkötött Hb mennyisége dóziszfüggően megemelkedett.

5.1.5 A HIDROGÉNPEROXID ÉS REAKTÍV LIPIDEK INDUKÁLTA HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓT A HAPTOGLOBIN ÉS A GLUTATION/GLUTATIONPEROXIDÁZ GÁTOLJA

A VVT-ből kiszabaduló szabad Hb az akut-fázisú plazma fehérjéhez a Haptoglobinhoz (Hp) kötődik, ami ezután endocitózissal a CD163 Hp receptoron keresztül a makrofágok által felvételre kerül. Ez a folyamat segít kivédeni a Hb plazmában történő felhalmozódását. A glutationperoxidáz (GPx) sejten belüli antioxidáns enzim, ami enzimatikus úton bontja a reaktív oxigén gyököket. Előzőleg kimutattam, hogy a H_2O_2 , illetve a lipidperoxidáció során keletkező reaktív lipid mediátorok képesek a Hb-t oxidálni ferriHb-á oxidálni. Ebből adódóan felmerült az a hipotézis, hogy a Hp és glutation/glutationperoxidáz rendszer képes gátolni a Hb oxidációját. A Hb (20 $\mu\text{mol/L}$) oxidációját H_2O_2 -al (200 $\mu\text{mol/L}$), illetve oxLDL-el (400 $\mu\text{g/mL}$) végeztem el önmagában, illetve Hp (50 $\mu\text{mol/L}$) és GPx (200 $\mu\text{mol/L}$) előkezeléssel. Az oxidáció ideje 90 perc, míg a Hb és a GPx előkezelés ideje 10 perc volt. Az oxidációt és az esetleges gátlást spektrofotometriás méréssel és western blot analízissel követtem nyomon. Kimutattam, hogy a H_2O_2 -al és oxLDL kezelt Hb mintákban a Fe^{3+} mennyisége megemelkedett, míg a Hp és a GPx előkezelt mintákban szignifikánsan alacsonyabb Fe^{3+} szinteket mértem. Western blot analízissel alátámasztottam a spektrofotometriás mérés eredményeit. A Hp kisebb mértékben, míg a GPx nagyobb mértékben gátolta a ferriHb kialakulását. Ez az eredmény arra utal, hogy a Hp megkötve a

szabad Hb-t képes megakadályozni annak oxidálását, míg a glutathion (GSH)/GPx rendszer a reaktív gyökök ártalmatlanításával gátolja az oxidációt.

5.1.6 A FERRYHb FELSZAKÍTJA AZ ENDOTÉL SEJTEK KONFLUENCIÁJÁT ÉS MONOCITÁK ADHÉZIÓJÁT INDUKÁLJA

Korábban kimutatták, hogy a ferrylHb aktiválja az EC sejteket, melynek során a sejt-sejt közötti kapcsolat megszűnik. A sejtaktiváció során adhéziós molekulák (VCAM-1; ICAM-1; E-selectin) expresszálódnak az EC sejtekben. Az expresszált adhéziós molekulák az érpályában keringő monociták adhézióját okozzák az EC sejtek felszínére. Az említett megfigyelések alapján feltételeztem, hogy a ferrylHb-al kezelt EC sejtek konfluenciája felbomlik, illetve bekövetkezhet a monociták adhéziója. Ennek bizonyítására EC sejteket növekvő koncentrációjú ferrylHb-al (1-2,5-5-10-20 $\mu\text{mol/L}$), illetve Hb-al kezelttem (1-2,5-5-10-20 $\mu\text{mol/L}$) 16 órán át. A kezelés végén fénymikroszkóp segítségével lefényképeztem a sejteket. Azt tapasztaltam, hogy a ferrylHb kezelés hatására dóziszfüggően nőttek a sejtek közötti lyukak. A Hb-al kezelt EC sejtek között szignifikáns mértékű konfluencia felszakadást nem detektáltam. Ez a hatása a ferrylHb-nak egyedülálló. Sem a Hb, sem a metHb nem képes a sejt-sejt közötti kapcsolatokat felszakítani. Más kísérletben EC sejteket lógó sejttenyésztő edényben konfluencia eléréséig tenyésztettem. A sejteket hemmel (10 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (10 $\mu\text{mol/L}$), metHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$) és ferrylHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$) kezelttem 12 órán át. A kezelési idő letelte után a kezelőoldatot lecseréltem Fluorescein oldatra (1 $\mu\text{mol/L}$). 1 órás inkubálás után a lógó sejttenyésztő edényt eltávolítottam. Az alatta található HBSS+-t tartalmazó tenyésztő edényből mintát vettem, amiben fluoreszcens tenyésztő edényolvasó segítségével a Fluorescein fluoreszcens intenzitását mértem. A mérésekből kiderült, hogy egyedül a ferrylHb-al kezelt tenyésztő edényből vett mintákból tudtam fluoreszcens intenzitást mérni. A kísérlet alátámasztja a mikroszkópos kísérlet eredményét, miszerint a ferrylHb képes az EC sejtek konfluenciáját felszakítani, így a Fluorescein képes volt penetrálódni az apikális tenyésztőedényből az alsó tenyésztőedénybe. A ferrylHb EC sejt aktivációjában betöltött szerepének további vizsgálatához ismét konfluens EC sejteket kezelttem hemmel (10 $\mu\text{mol/L}$), Hb-al (10 $\mu\text{mol/L}$), metHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$) és ferrylHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$) 12 órán át. A kezelés végén Calcein-AM-el jelölt, teljes vérből izolált monocitákkal inkubáltam az EC sejteket 30 percig. Az inkubáció után a sejteket többször mostam HBSS+-al a sejtek felszínére le nem tapadt monociták eltávolítása miatt. A sejtek fixálása után a sejt-sejt közötti kapcsolatokat bemutatása miatt a sejtek sejtvezét megfestettem. A kísérletből kiderült, hogy egyedül a ferrylHb-al kezelt sejtek konfluenciája szakadt fel, amit a sejtvezét festés támasztott alá.

Emellett egyedül a ferrylHb kezelés esetében tapasztaltam a monociták szignifikáns adhézióját az EC sejtekre. Az eredmények az bizonyítják, hogy a ferrylHb-nak fontos szerepe van az EC sejtek aktivációjában, illetve a gyulladásos folyamatok iniciációjában, ami az érlemezés folyamatában betöltött szerepére is utal.

5.2 MÁSODIK RÉSZ

A kénhidrogén az endogén gáztranszmitterek legújabb tagja. A kénhidrogénnek az érlemezés folyamatában játszott élettani hatásairól (jelen disszertáció írásakor) széles körű szakirodalom még nem áll rendelkezésre. A kutatásom második részében megvizsgáltam a kénhidrogénnek a hatását a komplikált léziókban megfigyelhető Hb-lipid interakciókra.

5.2.1 CSE EXPRESSZIÓJA MEGNŐ HUMÁN ÉS EGÉR ATHEROMÁBAN

Az endogén kénhidrogén termelésért felelős egyik fő enzim a CSE. A kénhidrogén érlemezés folyamatában betöltött szerepének vizsgálatához megvizsgáltam a CSE enzim expresszióját humán egészséges, atheroma és komplikált karotisz mintákban, illetve normál és atherogén diétán tartott ApoE^{-/-} egerek aortáiban is. Western blot alapú fehérje analízis segítségével kimutattam, hogy a humán atheromában a CSE expressziója szignifikánsan megnő, míg a komplikált léziókban ez az emelkedés szignifikáns, de jelentősen kevesebb volt az atheromához viszonyítva. Hasonló fenotípusos változást észleltünk atherogén diétán tartott ApoE^{-/-} egerek aortáiban is. A magas zsír és koleszterin tartalmú étrenden tartott egerekben a CSE expressziója megnőtt a normál diétán tartott egerekhez viszonyítva. A megemelkedett CSE expresszió megnövekedett kénhidrogén termeléssel jár. Ennek bizonyítására megmértem az endogén módon termelődő kénhidrogén szinteket humán egészséges, atheroma és komplikált karotisz mintákban. Azt tapasztaltam, hogy a megemelkedett CSE fehérje expresszió együtt járt a megemelkedett endogén kénhidrogén szinttel. A komplikált léziókban az endogén kénhidrogén szint szignifikánsan nem változott. Az így kapott eredmények alapján nem dönthető el, hogy a CSE által termelt H₂S az atheroma kialakulásának a gátlását, vagy esetleg annak progresszióját segíti elő. Emellett felmerül a kérdés, hogy az atheromához viszonyítva a komplikált léziókban lecsökkent CSE és endogén H₂S szint miként befolyásolja az érlemezés kimenetelét.

5.2.2 A H₂S GÁTOLJA AZ ÉRELMESZESÉDÉS FOLYAMATÁT EGEREKBEN

Korábban kimutatták állatkísérletben, hogy a kénhidrogén gátolja az ApoE^{-/-} egerekben kialakuló spontán érlemezéskedést. Ebből adódóan megvizsgáltam atherogén diétán tartott ApoE^{-/-} egerekben a kénhidrogén érlemezéskedést gátló hatását. Az egerek 8 hetes koruktól 8 héten át kapták az atherogén diétát. Ezzel párhuzamosan kétnaponta frissen feloldott NaSH-val intraperitoneálisan injektáltam az egerek egy részét (N=9). A kontroll egereket atherogén diéta mellett kétnaponta PBS-el injektáltam (N=21). Annak érdekében, hogy megállapíthassam azt, hogy a megemelkedett CSE/H₂S szint az atheromában érlemezéskedést gátló vagy elősegítő hatású, egerek egy csoportját atherogén diéta mellett kétnaponta CSE gátlószerrel, PPG-vel injektáltam (N=5). A kísérlet végén az egerek aortájában kialakult zsíros plakkokat Oil Red-O festéssel megfestettem. A plakkok területét az egész aorta területéhez viszonyítva ImageJ szoftver segítségével számoltam ki. Az eredmények azt mutatták, hogy az NaSH-val kezelt egerekben szignifikánsan kevesebb volt a plakkok kiterjedése. Ez az eredmény azt igazolja, hogy a kénhidrogén gátolja az érlemezéskedés folyamatát. Továbbá, a CSE gátlószer, PPG alkalmazása során a plakkok kiterjedése szignifikánsan megnőtt a kontroll atherogén diétán lévő egerekhez képest, ami azt bizonyítja, hogy a humán és egér atheromában megemelkedett CSE fehérje szint az atheroszklerózis progressziójának csökkenése miatt emelkedik meg. Kimutatták, hogy a lipidperoxidációs végtermékek közül a 4-hirdoxinonénál (4-HNE) kulcsfontosságú szereppel bír az atherogenezis folyamatában. Képes a gyulladásos folyamatokat tovább gerjeszteni, illetve sejthalált iniciálni. Emiatt megvizsgáltam, hogy a H₂S-el kezelt egerekben a 4-HNE mennyisége is lecsökken-e. Az egerek aorta gyöker régiójából fagyasztva töréses módszerrel metszeteket készítettem, majd fluoreszcens módszerrel azokat 4-HNE-ra megfestettem. A festéseket fluoreszcens mikroszkóp segítségével dokumentáltam. Kimutattam, hogy az NaSH-val kezelt egerekben a 4-HNE lipidperoxidációs végtermék festődése jelentős mértékben lecsökkent a kontroll, atherogén diétán tartott egerekhez viszonyítva. A H₂S lipidperoxidációban betöltött szerepének vizsgálatához NaSH-val kezelt egerek és atherogén diétán lévő kontroll egerek aortájából TBARS tartalmat mértem. Kimutattam, hogy a kénhidrogénnel kezelt egerek aortájában a TBARS mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll egerekhez viszonyítva. A lipidek peroxidációja során keletkező LOOH az oxidatív stressz marker, HO-1 szintjét megemeli. Mivel a kénhidrogén gátolta a kísérleteimben a lipidperoxidációt, így feltételeztem, hogy a HO-1 szint sem emelkedik meg NaSH kezelés hatására az egerekben. Atherogén diétán tartott PBS-el, illetve NaSH-val kezelt

egerek aortájából RNS-t nyertem ki, amiből RT-qPCR segítségével a HO-1 mRNS szinteket megmértem. Az eredmények alátámasztották a hipotézisemet, az HO-1 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a H₂S-el kezelt egerekben.

5.2.3 A KÉNHIIDROGÉNT KIBOCSÁTÓ MOLEKULÁK GÁTOLJÁK AZ LDL ÉS AZ ATHEROMA LIPIDEK OXIDÁCIÓJÁT

Az állatkísérletekben használt NaSH vegyszer a feloldást követően a kénhidrogént gyorsan bocsátja ki magából. A kutatásom során lehetőséget kaptam újfajta potenciális gyógyszermolekulák tesztelésére, amik a kénhidrogént lassan, akár hetekig is képesek kibocsátani. A kutatásban használt szulfid donor molekulákat Matthew Whiteman és Roberta Torregrossa szintetizálták számomra. A lipidperoxidációt gátló kísérletekben az alábbi kénhidrogént lassan kibocsátó vegyszereket használtam: GYY4137, AP67, AP72. A kísérlet során PL-et inkubáltam hemmel és Hb-al, ezzel modellezve a komplikált plakkokban kialakuló körülményeket. A minták másik csoportját előkezelttem NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al. A mintákból meghatároztam a LOOH és TBARS tartalmat. Mivel a PL nem átlátszó tiszta folyadék, ezért ezeknél a méréseknél nem alkalmazható a LOOH koncentráció spektrofotometriás meghatározása. Ilyen esetben a LOOH méréseknél jodometriás módszert alkalmaztam. PL inkubációja hemmel és vagy Hb-al megemeli a minták LOOH és TBARS tartalmát, a kénhidrogén donor molekulák eltérő mértékben képesek voltak a lipidperoxidációs markerek szintjének megemelkedését gátolni. Más kísérleteknél humán LDL-t oxidáltam hemmel és H₂O₂-al, illetve NaSH, GYY4137, AP67, AP72 kénhidrogén donorok jelenlétében. A lipidperoxidáció kénhidrogén donorok általi gátlását LOOH és TBARS tartalmak méréséből végeztem el. Azt találtam, hogy a donorok eltérő mértékben és dóziszfüggő módon gátolták az LDL oxidációját. A lassú donorok közül az AP67 és AP72-es molekula bizonyult a leghatékonyabbnak. A kutatás e pontján felmerült az a kérdés, hogy a lipidperoxidációban bekövetkezett gátlást nem a kénhidrogént kibocsátó alapváz okozza-e? Továbbá tudjuk, hogy a kénhidrogén képes átalakulni poliszulfiddá. Ebből következően felmerült az a kérdés is, hogy nem a kialakuló poliszulfidok okozzák-e a lipidperoxidációban bekövetkező gátlást? Ezekből kifolyólag a kísérleteket megismételttem poliszulfiddal, illetve a kiszellőztetett kénhidrogén donor molekulákkal is, annak bizonyítására, hogy a tapasztalt hatást nem a kénhidrogénből keletkező poliszulfid, illetve nem a donor molekulák alapváza okozza. Azt tapasztaltam, hogy sem a poliszulfid, sem a kiszellőztetett H₂S donor molekulák nem voltak képesek gátolni a hem indukálta LDL, a hem és Hb indukálta PL oxidációját.

5.2.4 A KÉNHDROGÉN GÁTOLJA A LIPIDPEROXIDÁCIÓS TERMÉKEK KIALAKULÁSÁT HUMÁN KOMPLIKÁLT LÉZIÓKBAN

Következő lépésként megvizsgáltam, hogy a bevértett plakkokban megjelenő ferrylHb indukálta lipidek peroxidációját a különböző kénhidrogént kibocsátó molekulák képesek-e gátolni? A kísérlet során endarterectómiából származó humán bevértett karotisz plakkokat homogenizáltam, majd a mintákat (5 mg/mL) 37 °C-on inkubáltam NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al (200 µmol/L). A mintákból LOOH és TBARS tartalmakat mértem le a 0-ik és a 4-ik napon. Azt tapasztaltam, hogy a 0-ik napon mért LOOH és TBARS tartalmak szignifikánsan megemelkedtek a 4-ik napra. A kénhidrogén donorokat tartalmazó mintákból mért LOOH és TBARS tartalmak szignifikánsan alacsonyabbak voltak. Meglepő módon az AP67 és az AP72-es donor molekulákkal inkubált minták 4-ik napon mért LOOH tartalma alacsonyabb volt a 0-ik napon mért LOOH szintektől.

5.2.5 A KOVALENSEN KERESZTKÖTÖTT HEMOGLOBIN MULTIMEREK KIALAKULÁSÁT GÁTOLJA A KÉNHDROGÉN

Korábban bebizonyítottam, hogy a kovalensen keresztkötött Hb (ferrylHb) megtalálható a bevértett atheroszklerotikus léziókban, illetve, hogy a kénhidrogén képes a lipidperoxidációt gátolni. Ahhoz, hogy modellezhessem a bevértett atheroszklerotikus léziókban megfigyelhető ferrylHb kialakulását *in vitro*, Hb-t (5 µmol/L) inkubáltam H₂O₂-al (75 µmol/L) és oxLDL-el (50 µg/mL) 37°C-on 90 percig. Ezt követően azt vizsgáltam meg, hogy a kénhidrogén képes-e a Hb oxidációját, és ezáltal a ferrylHb kialakulását gátolni. Ehhez a fentebb említett mintákat NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al (200 µmol/L) donor molekulák jelenlétében inkubáltam. A mintákból 0,5 µg-it Hb-ra számolva SDS-PAGE gélen megfuttattam és Hb ellenes antitesttel detektáltam a Hb multimerek kialakulását. Western blot segítségével a H₂O₂-al és oxLDL-el inkubált mintákban a Hb dimert, tetramert és multimereket detektáltam. A kénhidrogén donorok eltérő mértékben, szignifikánsan akadályozták meg a Hb kovalens keresztkötések kialakulását. A kísérletekben az AP67 és AP72-es donor molekulák voltak a leghatékonyabbak.

5.2.6 A KÉNHDROGÉN GÁTOLJA A HEMOBLOBIN-LIPID INTERAKCIÓT ÉS EZÁLTAL AZ ENDOTÉL SEJTEKRE GYAKOROLT HATÁSUKAT

Az eddigi eredményeim bizonyítják, hogy a bevértett atheroszklerotikus plakkokban a Hb és lipidek egymással reakcióba lépve a lipidek további oxidációját és a pro-oxidatív ferrylHb

kialakulását eredményezik. Ezek az oxidált lipidek és a ferrylHb az endotél sejtek aktivációján keresztül azokban oxidatív stresszt vált ki. A kénhidrogénnek az endotél sejtek diszfunkciójában betöltött védő szerepének a vizsgálatához letális dózisú oxLDL-t (200 µg/mL) inkubáltam NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al (20 és 200 µmol/L) 24 órán át. Ezt követően a sejttöxicitási vizsgálatokhoz a mintákat inkubáltam HAoEC-el 4 órán át. Az oxLDL-el kezelt sejtek 97%-a elpusztult a kezelés végén. Az NaSH 20 µmol/L-os koncentrációban nem, de 20 µmol/L-os koncentrációban már szignifikánsan gátolta az oxLDL az indukált sejthalált. A GYY4137, AP67, AP72-al dózisfüggő módon megvédték a sejtek túlélését. Az AP67 és AP72-es donor molekulák 200 µmol/L-os koncentrációban a sejttöxicitást teljes mértékben megakadályozták. Az oxidatív stressz kísérletekben oxLDL-t (200 µg/mL) inkubáltam NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al (20 és 200 µmol/L) 24 órán át. Ezt követően a HAoEC sejteket inkubáltam szub-letális dózisú LDL mintákkal (50 µg/mL) 8 órán át. A sejteket lizálás után western blot technika segítségével megfuttattam. A mintákból a HO-1 stresszfehérje, a konstitutívan expresszálódó HO-2 fehérje és a fehérje normalizálásra használt GAPDH fehérje expressziós változásait követtem nyomon. A szubletális dózisú oxLDL (50 µg/mL) megemelte a HO-1 expresszióját. A GYY4137 nem, míg az NaSH kismértékben gátolta az oxidatív stressz kialakulását HAoEC-ben. Ezzel szemben az AP67 és AP72-es molekulák nagymértékben gátolták az oxidatív stressz kialakulását a sejtekben. A HO-2 és a GAPDH fehérjék expressziója a kísérletek során nem változott. Önmagában a 200 µmol/L-os koncentrációjú donorok nem emelték meg a HO-1 expresszióját. A ferrylHb egyedülálló pro-inflammatorikus tulajdonsággal bíró oxidált hemoglobinforma, amely az endotél sejtek aktivációját okozza. A ferrylHb megemeli a sejtek adhéziónak expresszióját, illetve felszakítja a sejt-sejt kapcsolatot. Ebből kifolyólag megvizsgáltam, hogy a kénhidrogén képes-e megakadályozni az endotél sejtek aktivációját azáltal, hogy megakadályozza a ferrylHb kialakulását. A kísérletek során Hb-t (10 µmol/L) inkubáltam H₂O₂-al (50 µmol/L) NaSH, GYY4137, AP67, AP72 (200 µmol/L) jelenlétében, illetve a donorok nélkül 37°C-on 90 percig. Az inkubációs idő letelte után konfluens HAoEC sejteket kezeltem a mintákkal 8 órán át. A kezelt sejtek egy részéből western blot technika segítségével a VCAM-1 adhéziónak expressziójának változását detektáltam, a sejtek másik részéből a ferrylHb indukálta sejt-sejt kapcsolat felszakadását vizsgáltam immunofluoreszcens módszerrel. Kimutattam, hogy a ferrylHb megemeli a VCAM-1 fehérje expresszióját, amit az AP67 és AP72 meggátolt, míg a gyors kénhidrogént kibocsátó NaSH gátlásra nem volt képes. Immunofluoreszcens technika segítségével kimutattam, hogy a ferrylHb a HAoEC sejtek konfluenciáját felbontja, ezt a hatást az NaSH, GYY4137 és az

AP67 is gátolta. Az immunofluoreszcens festés eredményeinek alátámasztásához az endotél sejtek monolayerének integritási vizsgálatát is elvégeztem ECIS műszer segítségével. A konfluens HAoEC sejteket megkezeltem a VCAM-1 fehérje kimutatásnál és az immunofluoreszcens vizsgálatnál használt oldatokkal. A sejtek közötti monolayer rezisztenciájának a csökkenését 3 órán át monitoroztam. Kimutattam, hogy a Hb nem változtatja meg a HAoEC sejtek konfluenciáját, ezzel szemben a H₂O₂-al inkubált Hb szignifikáns rezisztencia csökkenést okoz. A kénhidrogén donorok a sejtek konfluenciájának felszakadását megakadályozták, ezek közül az AP67 és AP72 a sejt-sejt közötti kapcsolatot jelentősen, a kezeletlen kontrollhoz képest is javította. Az eredmények azt bizonyítják, hogy a kénhidrogén képes meggátolni a ferrylHb indukálta endotél sejtek aktivációját azáltal, hogy magát a ferrylHb kialakulását gátolja. Végül a poliszulfidok és a kiszellőztetett donor molekulák hatását is megvizsgáltam a ferrylHb indukálta endotél sejtek aktivációjában. Meglepő módon kimutattam, hogy a poliszulfid képes volt meggátolni az oxLDL toxikus hatását. Ennek hátterében úgy vélem, hogy a poliszulfid gyökfogó hatásán keresztül az oxLDL szabadgyök tartalmát lecsökkentette, így az az endotél sejtekre nézve már nem volt toxikus. A kiszellőztetett donor molekulák nem tudták kivédeni az oxLDL toxikus hatását az endotél sejteken, ami azt bizonyítja, hogy a donor molekulákból kiszabadult kénhidrogén az, ami gátolja a lipidek peroxidációját. Továbbá se a poliszulfid se a kiszellőztetett donor molekulák nem voltak képesek meggátolni az endotél sejtek szubletális dózisú oxLDL indukálta HO-1 és VCAM-1 expresszióit.

5.2.7 ATHEROGÉN LIPIDEK ÉS A PRO-INFLAMMATORIKUS CITOKINEK NÖVELIK A CISZTATION- γ -LIÁZ EXPRESSZIÓJÁT AZ ATHEROSZKLEROTIKUS ÉRFALBAN

Az érlelmeszesedés folyamatában központi szerepet játszanak a makrofágok, simaizomsejtek és az endotél sejtek is. Emiatt megvizsgáltam, hogy e sejtekben a kénhidrogén termelésért felelős CSE enzim milyen stimulusokra emelkedik meg az atheroszklerotikus plakkokban? A kísérletekhez olyan stimulánsokat használtam, amik az érlelmeszesedéses plakokban megtalálhatóak. Ezek három csoportra oszthatóak: lipidek (LDL, oxLDL, PL, oxPL), a bevezréses plakokban megtalálható: Hb, ferrylHb, hemek, vas, illetve citokinek: TNF- α és IL-1 β . A kezelések során a H₂O₂-öt mint pozitív kontroll használtam, a szakirodalom alapján a H₂O₂ megemeli a CSE fehérje expresszióját. Azt tapasztaltam, hogy a H₂O₂, oxLDL, PL és az oxPL megemelte a simaizomsejtek és a makrofágok CSE expresszióját, de szignifikánsan

nem emelte meg a HAoEC sejtekben. Továbbá, a Hb és heme megemeli a CSE expresszióját simaizomsejtekben és makrofágokban. A vas kezelés hatására a CSE szintje lecsökken a simaizomsejtekben. HAoEC sejtekben a Hb, ferrylHb, heme és vaskezelés nem befolyásolta szignifikánsan a CSE expresszióját. Végül megvizsgáltam a TNF- α és IL-1 β citokinek CSE-re gyakorolt hatását is. E citokinek megemelték a CSE szinteket a simaizomsejtekben és makrofágokban, míg HAoEC sejtekben csak a TNF- α hatására emelkedett meg a CSE expressziója.

6. MEGBESZÉLÉS

Az antioxidáns tulajdonsággal bíró enzimek és molekulák jelenléte a VVT-ben megvédi a benne lévő Hb-t az oxidációtól. Normál körülmények között a sérült VVT-ek a hemofagocitáló makrofágok segítségével a keringési rendszerből eltávolításra kerülnek a jól szabályozott reticuloendoteliális útvonal segítségével. Számos olyan patológiás körülmény létezik, amikor a VVT-ből Hb szabadul ki, ami oxidatív stresszt okoz a szervezetben. A Hb oxidációja során különböző Hb oxidációs termékek keletkeznek, mint például a ferryl állapotú vasat (Fe^{+4}) tartalmazó hem, globin és hem gyökök, kovalensen keresztkötött hem-globin formák, illetve kovalensen keresztkötött globin-globin multimerek. A szakirodalomban ezeket a ferryl vasat tartalmazó oxidált Hb formákat ferrylHb-nak nevezik. A ferrylHb normál körülmények, illetve patológiás körülmények között is megtalálható az emberi vérben. Korábban kimutatták, hogy a kovalensen keresztkötött ferrylHb megtalálható az emberi bevérzett érelmeszesedéses lézióban. Habár a ferrylHb ki lett mutatva az érelmeszesedéses léziókban, annak szerepéről, illetve az érelmeszesedés folyamatában betöltött szerepéről még keveset tudunk. A kutatásom első felének a célja a ferrylHb létrejöttének és szerepének vizsgálata volt az érelmeszesedéses léziókban.

Az LDL szubendoteliális térben történő felhalmozódása, annak oxidációja során kialakuló oxLDL hatására kialakuló immunválasz az érelmeszesedés kiindulásának kezdeti lépése. Kimutatták, hogy az érfalban felhalmozódó oxLDL, apoptotikus sejtek és a módosult fehérjék a miokardiális infarktus és az agyvérzés kialakulásához vezetnek. Figyelembe véve azt, hogy szoros kapcsolat van a szív és érrendszeri megbetegedések kialakulása és az oxidatív módosulások jelenléte között az atheroszklerotikus érfalban, emiatt fontos tanulmányozni a potencionális oxidatív anyagokat. A Hb erős oxidatív károsodást képes előidézni az atheroszklerotikus léziókban. Kétféle mechanizmust írtak le, ami alapján a Hb megjelenhet az érelmeszesedéses plakkokban. Az egyik a plakk intima felőli részén történő ruptúra miatt, a másik a plakkon belüli bevérzés létrejötté végett. A plakkon belüli bevérzés elsősorban a kicsi neovaszkularizált erek felszakadásából ered, ezek az erek adventitia része felől nőnek be a plakk belseje felé a plakkból bekövetkező oxidációs folyamatok során fellépő hypoxia és a hypoxia következtében szekretálódó vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) miatt. Továbbá kimutatták, hogy a plakkon belüli bevérzés hozzájárul a plakk meggyengüléséhez, annak felszakadásához, ami így közvetlenül hozzájárul az érelmeszesedéshez kapcsolható akut klinikai tünetek megjelenéséhez. Plakkon belüli bevérzést követően a VVT eredetű membrán fehérjék és vas akkumuláció figyelhető meg, ami

arra utal, hogy a léziókban megjelenő VVT-ék lizálnak, a bennük található Hb kiszabadul, ami gyorsan eloxidálódik a plakokban található oxidatív anyagok, mint például az oxLDL hatására. A Hb oxidációja során a globin felszakadása miatt a benne található hem is kiszabadul és degradálódik. Korábban kimutatták, hogy mind a humán atheromatous léziókból extrahált lipidek, mind az oxLDL a VVT-ket lizálja, illetve a Hb képesek oxidálni. Elméletileg az oxidált Hb formák is képesek elindítani az LDL modifikációját két különböző módon. Az egyik ilyen mechanizmus a globin gyökök indukálta LDL oxidáció, a másik a heme-vas indukálta LDL oxidációja. Kísérleteimben bebizonyítottam, hogy ezek a mechanizmusok előidézik az LDL oxidációját. Az *in vitro* kísérletek során hemet (5 $\mu\text{mol/L}$), H_2O_2 -ot (75 $\mu\text{mol/L}$) és LDL-t (200 $\mu\text{g/mL}$) inkubáltam, melynek során a reakcióelegyekben kevesebb, mint egy órán belül megemelkedtek a lipidperoxidációs termékek (konjugált dién, LOOH, TBARS). Hb és H_2O_2 inkubálása során a keletkező globin gyökök iniciálják az LDL oxidációját. Másrészt a Hb oxidációja során hem szabadul ki a globin gyűrűből, ami szintén az LDL oxidációját eredményezi. A metHb az olyan oxidált Hb forma, ami nem tartalmaz globin gyököket, de hemet képes elengedni, ezzel az LDL oxidációját okozva. Ez a megfigyelés alátámasztja az a tényt, hogy a heme önmagában egy erős induktora az LDL oxidációjának. Továbbá ha hemet vagy metHb-t inkubálunk Hpx-en, ami a hemet képes megkötni, akkor az LDL oxidációja gátolódik. Korábban kimutatták és mi is alátámasztottuk, hogy a ferrylHb-ből kiszabaduló hem képes a plazmában lévő LDL-hez asszociálódni, melynek során megtörténik az LDL lassú oxidációja. Ezen időszak alatt az LDL-hez kötődött ferrylHb-ből kiszabadult hem degradálódik. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a ferrylHb két különböző úton képes az LDL oxidációjára, az egyik a ferrylHb-ban megtalálható globin gyökök miatt, a másik mechanizmus a ferrylHb-ből eredő hem és LDL asszociációja lévén történik meg. A H_2O_2 az egyik legjobban tanulmányozott reaktív oxigén metabolit, ami képes a Hb oxidációjára sejtmentes közegben, illetve az intact VVT-ékben. Ezekben a komplex reakciókban Hb formák keletkeznek, mint például a metHb és ferrylHb. A ferrylHb-ban lévő Fe^{4+} nem stabil, képes reakcióba lépni specifikus aminosavakkal a globin láncokon, melynek során globin gyökök keletkeznek. A keletkezett globin gyökök egymással képesek kovalensen összekötődni, így alkotva Hb dimereket, tetramereket és multimereket. Továbbá kimutatták, hogy a klasszikus reaktív oxigén metabolitok, organikus peroxidok is képesek a VVT-ék membránjának felszakítására, ezáltal a Hb kiszabadulását követően metHb generálására. Korábban kimutatták, hogy ferrylHb képes keletkezni a VVT-ék lizálása után LDL-el történő reakció során. Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy az oxLDL, de nem a native LDL a Hb oxidációja és a kovalensen kereszt kötött ferrylHb létrejöttéhez vezet.

Bebizonyítottuk, hogy a ferrylHb keresztkötések kialakulása oxLDL koncentrációtól függő módon történik. Továbbá kimutattuk, hogy oxLDL előkezelése GSH/GPx rendszerrel, ami a LOOH-t konvertálja lipidalkohollá gátolja a Hb oxidációját és a kovalensen keresztkötött ferrylHb kialakulását. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az oxLDL LOOH köztes lipidperoxidációs termék tartalma a felelős a Hb oxidációjáért.

Intravaszkuláris és extravaszkuláris hemolízis és bevérzés során a VVT-ékből kiszabaduló Hb képes nagy affinitással asszociálódni a Hp-hoz. A Hp-hoz kötött Hb-t a monociták és a rezidens makrofágok eltávolítják a reticuloendoteliális rendszeren át a CD163 szkevendzser receptoron keresztül. A CD163 receptor mediálta Hb-Hp complex endocitózisát gyors HO-1 indukció követi, melynek során a hem katabolizmusa történik meg szén-monoxiddá, biliverdinné és vassá. Ezzel párhuzamosan megnő a ferritin expressziója és a hemből kiszabaduló vasat elraktározza. CD163 receptor és HO-1 közötti kolokalizációt korábban kimutatták neovaszkularizált atheroszklerotikus léziókban megfigyelhető makrofágok szubpopulációiban, illetve bevérzett léziókban. A makrofágok ezen alcsoportja gyorsan képes degradálni a Hb-t, kevesebb reaktív gyököt termelve és nagyobb mennyiségben termel az anti-inflammatorikus IL-10 citokint. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a bevérzéshez kapcsolható makrofágok anti-inflammatorikus irányban polarizált makrofágok, ezáltal atheroprotektív hatásúak. Azt is kimutatták, hogy a ferrylHb affinitása a Hp-hoz kisebb, mint a nem oxidált Hb-é, ebből arra következtettek, hogy a Hp-CD163 receptor útvonal kevésbé hatékony a ferrylHb jelenlétében. Továbbá, mivel a Hp-CD163 receptor mediálta felvétele a ferrylHb-nak kis mértékű, ez azzal jár, hogy a makrofágok HO-1 fehérje expressziója nem nő meg, ami csökkent anti-inflammációs és alacsonyabb athero-protectív hatással társul a bevérzett plakkokban lévő makrofágokban. A ferrylHb felvételének a hiánya szabad hem jelenlétét okozza, ami programozott nekrozishoz és apoptotikus makrofágok és egyéb plakkban található rezidens sejtek apoptozisát okozza. Összeségében elmondható, hogy a Hp képes megakadályozni a Hb oxidációját, ezáltal gátolja a hem kiszabadulását a Hb-ból. Cooper és társai kimutatták a Hp protektív hatása mögött álló mechanizmust, mellyel képes megakadályozni a Hb oxidációját. Azt találták, hogy a Hp hozzákötődik a ferrylHb vas⁴⁺ ionhoz, így növelve a ferryl ion mennyiségét, ezzel párhuzamosan gátolva a lipidperoxidációt. Kimutatták, hogy a Hp stabilizálja a ferryl vasat, illetve hozzákötődik a Hb béta láncának 145-ös tirozin globin gyökéhez. Ezen megfigyelést mi is alátámasztottuk a kísérleteinkben. Kimutattuk, hogy az oxLDL mediálta Hb oxidációját és a kovalensen keresztkötött Hb multimerek kialakulását a Hp gátolta.

Az endotél sejtek aktivációja és károsodása összekapcsolható atheroszklerózis iniciációjával és progressziójával. A Hb oxidációja különböző módon képes károsítani az endotél sejteket. Az egyik ilyen mód, hogy a Hb oxidációja során kiszabaduló hem képes szenzitálni az endotél sejteket oxidálószer által közvetített sejtpusztulással, illetve a hem képes beindítani az LDL oxidatív modifikációját, melynek során citotoksikus LOOH és 4-HNE keletkezik. Munkám során kimutattam, hogy a ferrylHb citotoxikus hatású az endotél sejtekre nézve azáltal, hogy iniciálja az LDL oxidációját, és szenzitálja az endotél sejteket H_2O_2 mediálta módon. A hem kiszabadulása a metHb-ből sejtes választ triggerel. Ha endotél sejteket kezelünk metHb-val, akkor a sejtek HO-1 expressziója megnő, majd megtörténik a hem katabolizmusa és a vas tárolása a felregulálódott HFT-ben. A HFT a vasat Fe^{3+} ion formájában tartalmazza, ami redox folyamatokra nézve inaktív formája a vasnak. A sejteket kezelve ferrylHb-al azt tapasztaltam, hogy hasonlóan a metHb-hoz a ferrylHb is indukálja a HO-1 és a HFT fehérje expresszióját, ami arra utal, hogy a heme képes kiszabadulni a ferrylHb kovalensen keresztkötött globin láncából.

Kimutatták, hogy a Hb oxidációja során keletkező ferrylHb proinflammatorikus tulajdonságú az endotél sejtekre nézve. A ferrylHb hatására az endotél sejtek actin sejtváza átrendeződik, melynek során a sejtek konfluenciája felszakad és lyukak alakulnak ki közöttük. A kezelt sejtekben a pro-inflammatorikus gének, mint például az ICAM-1, E-selectin és VCAM-1 indukciója megnő. Munkám során kimutattam, hogy a ferrylHb-al kezelt endotél sejtekben a megemelkedett adhézios molekulákkal párhuzamosan a sejtek permeabilitása is megnő, ami az endotél sejtek felületére tapadó monocitákat eredményezi. Ezt a hatást sem hemre, sem metHb-ra nem tapasztaltam, ami azt sugallja, hogy a hem kibocsátása az oxidált Hb formákból nem befolyásolja a sejtekben kialakuló gyulladásos folyamatokat. Továbbá azt is kimutattam, hogy a nem oxidált Hb sem képes indukálni az endotél sejtekben a HO-1-t és HFT-t fehérje szinten, ami azt bizonyítja, hogy a ferrylHb egy unikális pro-inflammatorikus tulajdonsággal bíró kovalensen keresztkötött oxidált Hb forma.

Összegzésképpen, munkám első felében kimutattam, hogy a humán atheromában lévő lipidek interakcióba lépnek a bevérzés során megjelenő VVT-hez nem asszociálódott Hb-al, így provokálva egy ördögi kört, ahol a plakkból található lipidek és Hb oxidációja egymásra hatva idézik elő az endotél sejtek aktivációját, ami az endotél sejtek toxicitásához vezet.

A különböző biológiai rendszerekben a kénhidrogén nem csak antioxidáns (reaktív oxigén intermedierek megkötése) képességgel rendelkezik, hanem sejtes adaptációban, metabolikus szabályozásban, sejthalál szignalizációban, oxidatív stressz szabályozásban, enzim folyamatokban, illetve a fehérjék intramolekuláris szerkezetének változtatásában is

szerepet játszik. A kísérleteim során bemutattam a kénhidrogén sejt protektív hatásait, ezek az adatok összhangban állnak a szakirodalomban is egyre nagyobb számban megjelenő publikációkkal. Atheroszklerotikus plakkon belüli bevérzés során kialakuló ferrylHb oxidatív stressz lévén hozzájárul a kialakult komplikált léziók patofiziológiai változásához. Korábban kimutatták, hogy a ferrylHb proinflammatorikus hatású az EC sejtekre nézve. Kísérleteim során elvégeztem a Hb oxidációjának kénhidrogén donorokkal történő gátlását. Ez az oxidációban történő gátlás megakadályozta a ferrylHb indukálta EC sejtek összefüggő sejtrétegének felbomlását, a sejtek közötti lyukak kialakulását, illetve a VCAM-1 proinflammatorikus fehérje expressziójának megemelkedését és a monociták kitapadását az EC sejtek felszínére.

Az oxidált Hb formák képesek elengedni heme csoportjukat, ezáltal indukálják a lipidperoxidációt. Kutatásom során kimutattam, hogy a kénhidrogén donor molekulák gátolják a Hb, illetve a heme indukálta humán atheromából izolált plakk lipidek oxidációját. Továbbá azt is kimutattam, hogy a humán komplikált léziókban zajló lipidperoxidációs folyamatokat is képesek gátolni a kénhidrogént kibocsátó molekulák. Kémiaiailag a H_2S redukáló szer. Korábbi kutatás kimutatta, hogy a kénhidrogén a LOOH-t átalakítja lipid-alkohollá *in vitro*. Ezt a megfigyelést *ex vivo* kísérlettel is alá tudtam támasztani. A humán komplikált lézió LOOH tartalmát a kénhidrogén képes volt a kiinduláskor mért LOOH szint alá csökkenteni.

Az endogén kénhidrogén termelésért felelős fő enzimünk a kardiovaszkuláris szövetekben a CSE. Humán karotisz artériát, illetve ApoE^{-/-} egérből származó aortát vizsgálva megfigyeltem, hogy a CSE fehérje expressziója megnő mind a humán, mind az egér atheromában, illetve a humán komplikált léziókban. Érdekességgéppen a komplikált léziókban a CSE fehérje expressziója alacsonyabb az atheromában megfigyelhető expressziós szinthez képest. Továbbá a humán karotisz artériákból termelhető kénhidrogén szintje nem volt szignifikánsan magasabb az egészséges érszakaszhoz viszonyítva.

Az atheroszklerotikus plakk nagy mennyiségben tartalmaz reaktív oxigén mediátorokat, reaktív lipid mediátorokat, proinflammatorikus citokineket, illetve plakk bevérzése során keletkező Hb oxidációs termékeket. Az érlelmeszesedéses érfal fő rezidens sejtei az EC sejtek, simaizomsejtek és a makrofágok. Stressz válaszként ezeknek a sejteknek a CSE fehérje expressziója megnő. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a proinflammatorikus citokinek mint például az IL-1 β és a TNF- α , az oxLDL és a PL, illetve a ferrylHb megemeli a CSE expresszióját az érfalban megtalálható EC sejtekben, simaizomsejtekben és a makrofágokban. Mivel a humán atheromában és komplikált léziókban

ezek a mediátorok megtalálhatóak, így azok hozzájárulnak az általam is megfigyelt megemelkedett CSE expressziókhoz.

Korábban Wang, Mani és társaik bemutatták, hogy a kénhidrogén gátolja az ApoE^{-/-} egerekben az atheroszklerotikus léziók kialakulását. Ők a kísérleteket atherogén diéta nélkül végezték el. Én a kísérletek során ApoE^{-/-} egerekben az atheroszklerotikus léziók kialakulását magas zsír és koleszterin tartalmú étrenddel indukáltam. E körülmények között is sikerült kimutatnom a kénhidrogén atheroprotektív hatását. Wang, Mani és társaik azt is kimutatták, hogy a CSE enzim farmakológiai gátlása PPG-vel felgyorsítja az atheroszklerotikus plakkok kialakulását, ezzel bizonyítva azt, hogy a CSE által termelt kénhidrogén atheroprotektív hatású. *In vivo* kísérletben magas zsír és koleszterin tartalmú étrenden tartott ApoE^{-/-} egereket injektáltam PPG-vel intraperitoneálisan. Az eredményeim alátámasztották Wang és Mani megfigyeléseit, miszerint a CSE gátlása növeli az atheroszklerózis progresszióját.

Az emberben a komplikált léziók kialakulása makroszkópiusan látható bevérzéssel az érlelmeszesedés azon fő eseménye, ami a mortalitást okozza. Bemutattuk, hogy a komplikált léziókban a CSE fehérje expressziója alacsonyabb szintű, mint az atheromában. Ezek az eredmények a CSE/H₂S rendszer jótékony hatását mutatják az érlelmeszesedés progressziójában és nem azt, hogy a megemelkedett CSE fehérje expresszió az érlelmeszesedés folyamatát gyorsítaná. Ezt a PPG-vel kezelt állatkísérletek és a komplikált léziókon végzett *ex vivo* kísérletek is alátámasztják. Mivel ApoE^{-/-} állatmodellben nem alakul ki az emberben megfigyelhető komplikált lézió, ezért a kénhidrogén hatásának a komplikált léziók kialakulására kifejtett hatásáról nem tudunk információt szerezni. Egy komplikált lézióval rendelkező állatmodell lehetőséget nyújthatna a kénhidrogén hatásának a vizsgálatára a prooxidáns és proinflammatorikus tulajdonsággal bíró ferrylHb kialakulásnak a tesztelésére. A plakk ruptúra és a VVT-ék infiltrációjának a megakadályozása az atheromában egy újfajta megközelítést nyújthatna a humán atheroszklerotikus léziók progressziójának a gátlásában.

Összegzőképpen, a munkám második felében bebizonyítottam, hogy a humán és egér atheromák vaszkuláris sejtjeinek, illetve a humán komplikált lézióknak a megemelkedett CSE expressziója befolyásolja a atheroszklerózis kimenetét. Az *in vitro* kísérletek alapján elmondható, hogy a megemelkedett CSE expresszió egy kompenzációs atheroprotektív válasza a sejteknek, ahol a keletkezett kénhidrogén gátolja a prooxidáns és proinflammatorikus lipid mediátorok, illetve a ferrylHb kialakulását.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A lipidek akkumulációja és oxidációja az érfalban az érlelmeszesedés kialakulásának fő induktora. A lipidperoxidáció hatására az atheroszklerotikus érszakaszban a *vasa vasorum* felől kis erek nőnek be a zsíros plakkok belsejébe. Ezen kis erek endotél sejtrétege a citotoxikus lipidperoxidációs termékekkel érintkezve felszakad, az erekben lévő VVT-ék a plakk belsejébe jutnak, így hozva létre a komplikált érlelmeszesedéses léziókat. A vörösvértestek az oxidált lipidekkel érintkezve lizálnak, A kiszabaduló Hb ferrylHb-á oxidálódik. A ferrylHb mind az α , mind a β globin láncán gyököket tartalmaznak, amik egymással kovalensen összeködődve globin dimereket, tetramereket és multimereket alkotnak. A ferrylHb pro-inflammatórius hatása mellett az endotél sejtek monolayerének felszakadását is okozza.

Az H_2S az endogén gáztranszmitterek legújabbban felfedezett tagja. Számos, élettani szempontból jelentős folyamatok szabályozásában vesz részt. Gyógyászati szempontból nézve a kénhidrogént szabályozott körülmények között stabilan, hosszan és alacsony fiziológiai koncentrációban kibocsájtó gyógyszer-molekulák ígéretesnek tűnnek a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának megakadályozásában, illetve kezelésében.

A doktori disszertáció alapját képező tanulmány első felében modelleztük a ferrylHb kialakulásának körülményeit. Megállapítottuk, hogy a ferrylHb az LDL oxidációján keresztül képes oxidatív stresszt, illetve sejtpusztulást előidézni az EC sejteknek. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a ferrylHb az EC sejtek konfluens rétegét felszakítja.

Kutatásom második részében bemutattuk, hogy a kénhidrogén termelésért felelős CSE enzim expressziója megnő humán aterómában, illetve atherogén diétán tartott ApoE^{-/-} egerek aortájában. Kimutattuk, hogy a kénhidrogén *in vitro* és *in vivo* is gátolja a lipidek peroxidációját. Bemutattuk, hogy a kénhidrogén gátolja az érlelmeszesedést atherogén diétán tartott ApoE^{-/-} egerekben, míg a CSE enzim farmakológiai gátlása a plakk képződés progresszióját növeli. Bebizonyítottuk, hogy a ferrylHb képződését a H_2S gátolja. Továbbá, kimutattuk, hogy a H_2S megakadályozta a ferrylHb indukálta EC sejtek sejtrétegének felszakadását.

Összegzésképpen elmondható, hogy a ferrylHb az érlelmeszesedés progresszióját gyorsítja, míg a kénhidrogént kibocsájtó molekulák a ferrylHb hatásának és kialakulásának gátlásán keresztül atheroprotektív hatással bír.

8. AZ ÉRTEKEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Az LDL oxidációját okozzák az oxidált hemoglobinformák.
2. Az oxidált hemoglobinformák az endotél sejtek pusztulását okozzák oxidatív stresszen keresztül.
3. Az oxLDL és oxPL-ek a Hb-t képesek oxidálni ferrylHb-á.
4. A haptoglobin és a Glutation/glutationperoxidáz képesek gátolni a hidrogénperoxid és reaktív lipidek indukálta Hb oxidációját.
5. A ferrylHb felszakítja az endotél sejtek konfluenciáját és monociták adhézióját indukálja.
6. A CSE enzim expressziója megemelkedik humán és egér atheromában.
7. A kénhidrogén gátolja a atheroma kialakulását érlemeszesedéses állatmodellben.
8. AZ LDL és a PL-ek oxidációját eltérő mértékben képesek gátolni a kénhidrogént kibocsátó molekulák.
9. A kénhidrogén gátolja a lipidperoxidációs termékek kialakulását humán komplikált léziókban.
10. A ferrylHb kialakulását gátolja a kénhidrogén.
11. A kénhidrogén gátolja a hemoglobin-lipid interakciókat és ez által az endotél sejtekre gyakorolt káros hatásukat az érlemeszesedéses plakkokban.
12. Az atherogén lipidek és a pro-inflammatorikus citokinek növelik a CSE expresszióját az atheroszklerotikus érfal rezidens sejtjeiben.



**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/455/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

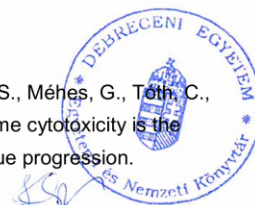
Jelölt: Potor László
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10043377

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Potor, L.**, Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Jeney, V., Pethő, D., Vasas, A., Pálkás, Z., Balogh, E., Gyetvai, Á., Whiteman, M., Torregrossa, R., Wood, M. E., Olvasztó, S., Nagy, P., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen Sulfide Abrogates Hemoglobin-Lipid Interaction In Atherosclerotic Lesion.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-16, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3812568>
IF: 4.868
2. **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

További közlemények

3. Balla, S., Zöld, E., **Potor, L.**, Lukucz, B., Vajas, A., Ujhelyi, B., Nagy, V.: Analysis of intravitreal bevacizumab treatment for macular oedema due to retinal vein occlusion.
Eur. J. Ophthalmol. 31 (5), 2528-2534, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1120672120962051>
IF: 1.922
4. Pethő, D., Hendrik, Z., Nagy, A., Beke, L., Patsalos, A., Nagy, L., Pólska, S., Méhes, G., Tóth, C., **Potor, L.**, Eaton, J. W., Jacob, H. S., Balla, G., Balla, J., Gáll, T.: Heme cytotoxicity is the consequence of endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaque progression.
Sci. Rep. 11 (1), 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-89713-3>
IF: 4.996





5. Fige, É., Szendrei, J., Sós, L., Kraszewska, I., **Potor, L.**, Balla, J., Szondy, Z.: Heme Oxygenase-1 Contributes to Both the Engulfment and the Anti-Inflammatory Program of Macrophages during Efferocytosis.
Cells. 10 (3), 652-669, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10030652>
IF: 7.666
6. Sikura, K. É., Combi, Z., **Potor, L.**, Szerafin, T., Hendrik, Z., Méhes, G., Gergely, P., Whiteman, M., Beke, L., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF-[kappa]B, a link between inflammation and mineralization.
J. Adv. Res. 27, 165-176, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.005>
IF: 12.822
7. **Potor, L.**, Hendrik, Z., Patsalos, A., Katona, É., Méhes, G., Pólska, S., Csősz, É., Kalló, G., Komáromi, I., Combi, Z., Posta, N., Sikura, K. É., Pethő, D., Oros, M., Vereb, G., Tóth, C., Gergely, P., Nagy, L., Balla, G., Balla, J.: Oxidation of hemoglobin drives a pro-atherogenic polarization of macrophages in human atherosclerosis.
Antioxid. Redox Signal. 35 (12), 917-950, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2020.8234>
IF: 7.468
8. Zavaczki, E., Gáll, T., Zarjou, A., Hendrik, Z., **Potor, L.**, Tóth, C., Méhes, G., Gyetvai, Á., Agarwal, A., Balla, G., Balla, J.: Ferryl Hemoglobin Inhibits Osteoclastic Differentiation of Macrophages in Hemorrhaged Atherosclerotic Plaques.
Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020, 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/3721383>
IF: 6.543
9. Posta, N., Csősz, É., Oros, M., Pethő, D., **Potor, L.**, Kalló, G., Hendrik, Z., Sikura, K. É., Méhes, G., Tóth, C., Posta, J., Balla, G., Balla, J.: Hemoglobin oxidation generates globin-derived peptides in atherosclerotic lesions and intraventricular hemorrhage of the brain, provoking endothelial dysfunction.
Lab. Invest. 100 (7), 986-1002, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41374-020-0403-x>
IF: 5.662
10. Sikura, K. É., **Potor, L.**, Szerafin, T., Oros, M., Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Zarjou, A., Agarwal, A., Posta, N., Torregrossa, R., Whiteman, M., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide inhibits calcification of heart valves; implications for calcific aortic valve disease.
Br. J. Pharmacol. 177 (4), 793-809, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14691>
IF: 8.739





11. **Potor, L.**, Sikura, K. É., Hegedűs, H., Pethő, D., Szabó, Z., Máthéné Szigeti, Z., Pócsi, I., Trencsényi, G., Szikra, D. P., Garai, I., Gáll, T., Combi, Z., Kappelmayer, J., Balla, G., Balla, J.: The Fungal Iron Chelator Desferricoprofen Inhibits Atherosclerotic Plaque Formation. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (13), 1-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21134746>
IF: 5.924
12. Sikura, K. É., **Potor, L.**, Szerafin, T., Zarjou, A., Agarwal, A., Arosio, P., Poli, M., Hendrik, Z., Méhes, G., Oros, M., Posta, N., Beke, L., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J.: Potential Role of H-Ferritin in Mitigating Valvular Mineralization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39 (3), 413-431, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312191>
IF: 6.604
13. Gáll, T., Pethő, D., Nagy, A., Hendrik, Z., Méhes, G., **Potor, L.**, Gram, M., Akerström, B., Smith, A., Nagy, P., Balla, G., Balla, J.: Heme Induces Endoplasmic Reticulum Stress (HIER Stress) in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Front. Physiol.* 9, 1-25, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01595>
IF: 3.201
14. Jeney, V., Silva, G., **Potor, L.**, Balla, G., Soares, M. P., Balla, J.: Ferryl hemoglobin is a proinflammatory agonist that activates endothelial cells and induces mouse peritonitis. *Am. J. Hematol.* 88 (5), E234-E235, 2013.
IF: 3.477

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 83,255

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
8,231**

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

Debrecen, 2022.10.20.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Balla Józsefnek, akivel öröm és megtiszteltetés volt együtt dolgozni az elmúlt évek során. Hálás vagyok neki a számtalan konzultációért, véleményezésért és különösen azért, hogy emberileg és szakmailag is támogatta a munkámat.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Balla Györgynek, aki folyamatosan figyelemmel kísérte a munkáimat. A kutatásaim során a tanácsai és útmutatásai végig segítségemre voltak.

Szeretnék köszönetet mondani minden munkatársamnak, akik segítségemre voltak a kutatómunkám során.

Külön szeretnék köszönetet mondani Hendrik Zoltánnak, Fürtös Ibolyának, Beke Líviának Czirják Tamásnak, Sikura Katalinnak, Combi Zsoltnak, Nemesdy Xéniának, Szabóné Dajka Editnek és Tóth Juditnak, akik önzetlen támogatásukkal nagyban hozzájárultak e disszertáció elkészüléséhez. Köszönöm a nyelvi lektorálást Dr. Nánási-Molnár Anitának és Nánási Antalnak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a folyamatos érdeklődést szeretett gyermekeimnek: Ádámnak, Ákosnak és Annának. Az ő tanácsaik és gyermeki figyelmük nélkül is másként alakult volna e tudományos munka. Végezetül szeretnék köszönetet mondani csodálatos feleségemnek az állandó biztatásért, a folyamatos támogatásért, hiszen nélküle ez az értekezés nem jöhetett volna létre. Ezt a disszertációt sok-sok szeretettel ajánlom nekik, a családomnak: feleségemnek és gyermekeimnek.

A kutatómunkát támogató pályázatok:

ELKH (11003), OTKA-K 132828, GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (IRONHEARTH), EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER), TKP2020-NKA-04, TKP2021-EGA-18, Laki Kálmán Doktori Iskola.