

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Potor László

**A kénhidrogén hatása az érlelmeszesedéses
plakkok hemoglobin-lipid interakcióira**

**Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A kénhidrogén hatása az érlelmeszesedéses
plakkok hemoglobin-lipid interakcióira**

Potor László

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



**Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

	<i>RÖVIDÍTÉSEK</i>	5
1.	<i>BEVEZETÉS</i>	8
2.	<i>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</i>	9
2.1	<i>ÉRELMEZSESEDÉS</i>	9
2.1.1	<i>AZ ÉRELMEZSESEDÉS EPIDEMIOLOGIÁJA ÉS RIZIKÓFAKTORAI</i>	9
2.1.2	<i>AZ AORTA ÉS AZ ARTÉRIÁK ÁLTALÁNOS SZERKEZETE</i>	9
2.1.3	<i>AZ ÉRELMEZSESEDÉS PATOGENEZISE</i>	10
2.2	<i>PLAKKON BELÜLI BEVÉRZÉS</i>	12
2.3	<i>AZ OXIDÁLT HEMOGLOBIN KIALAKULÁSA ÉS ÉLETTANI HATÁSAI</i>	13
2.4	<i>AZ ENDOGÉN KÉNHYDROGÉN TERMELŐDÉSE</i>	14
2.5	<i>A KÉNHYDROGÉN SZEREPE AZ ÉRELMEZSESEDÉS PROGRESSZIÓJÁBAN</i>	14
2.6	<i>A KÉNHYDROGÉN ÉS A GYULLADÁS KAPCSOLATA</i>	15
3.	<i>CÉLKITŰZÉSEK</i>	16
4.	<i>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</i>	18
4.1	<i>A KÍSÉRLETEKBEN FELHASZNÁLT VEGYSZEREK BESZERZÉSE</i>	18
4.2	<i>ETIKAI ENGEDÉLYEK</i>	18
4.2.1	<i>HUMÁN ETIKAI ENGEDÉLY</i>	18
4.2.2	<i>KISÁLLAT ETIKAI ENGEDÉLY</i>	19
4.3	<i>IMMUNOHISZTOKÉMIA</i>	20
4.4	<i>SEJT TENYÉSZTÉS</i>	20
4.5	<i>HEMOGLOBIN PREPARÁCIÓ</i>	21
4.6	<i>ALACSONY SŰRŰSÉGŰ LIPOPROTEIN PREPARÁCIÓ</i>	21
4.7	<i>ALACSONY SŰRŰSÉGŰ LIPOPROTEIN OXIDÁLÁSA</i>	22
4.8	<i>LIPIDPEROXIDÁCIÓS TERMÉKEK MÉRÉSE</i>	22
4.9	<i>LIPID-MEDIÁLTA HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓ</i>	22
4.10	<i>SEJTTOXICITÁSI VIZSGÁLAT</i>	23
4.11	<i>ENDOTÉL SEJT PERMEABILITÁSI VIZSGÁLATA</i>	23
4.12	<i>MONOCITA ADHÉZIÓS VIZSGÁLAT</i>	23
4.13	<i>VALÓS IDEJŰ KVANTITATÍV POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ</i>	24

4.14	<i>WESTERN BLOT ALAPÚ FEHÉRJE ANALÍZIS.....</i>	25
4.15	<i>FERRYLHEMOGLOBIN MULTIMEREK DETEKTÁLÁSA.....</i>	27
4.16	<i>HUMÁN ATHEROMÁBÓL SZÁRMAZÓ LIPID EXTRAKTUM.....</i>	27
4.17	<i>HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓJÁNAK GÁTLÁSA KÉNHIDROGÉNNEL.....</i>	27
4.18	<i>ENDOTÉL SEJT MONOLAYERÉNEK INTEGRITÁSI VIZSGÁLATA.....</i>	28
4.19	<i>KÉNHIDROGÉN SZINT MEGHATÁROZÁSA SZÖVETBŐL.....</i>	28
4.20	<i>EZÜSTFESTÉS.....</i>	29
4.21	<i>LIPIDHIDROPEROXID MEGHATÁROZÁSA JODOMETRIÁS MÓDSZERREL....</i>	29
4.22	<i>NÁTRIUM-SZULFID KÉSZÍTÉSE.....</i>	30
4.23	<i>POLISZULFID OLDAT KÉSZÍTÉSE.....</i>	30
4.24	<i>SZULFID DONOROK KÉNHIDROGÉN MENTESÍTÉSE.....</i>	30
4.25	<i>KÍSÉRLETI EGYSÉG.....</i>	31
4.26	<i>STATISZTIKA.....</i>	31
5.	<i>EREDMÉNYEK.....</i>	32
5.1	<i>ELSŐ RÉSZ.....</i>	32
5.1.1	<i>AZ OXIDÁLT HEMOGLOBIN FORMÁK AZ LDL OXIDATÍV MÓDOSULÁSÁT OKOZZÁK.....</i>	32
5.1.2	<i>AZ OXIDÁLT HEMOGLOBIN FORMÁK OXIDATÍV STRESSZEN KERESZTÜL AZ ENDOTÉL SEJTEK PUSZTULÁSÁT OKOZZÁK.....</i>	34
5.1.3	<i>AZ OXIDÁLT HEMOGLOBINFORMÁK INDUKÁLJÁK A HEMOXIGENÁZ-1 ÉS A FERRITIN EXPRESSZIÓJÁT ENDOTÉL SEJTEKBEN.....</i>	35
5.1.4	<i>AZ OXIDÁLT LDL ÉS ATHEROMA LIPIDEK A HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓJÁT OKOZZÁK.....</i>	37
5.1.5	<i>A HIDROGÉNPEROXID ÉS REAKTÍV LIPIDEK INDUKÁLTA HEMOGLOBIN OXIDÁCIÓT A HAPTOGLOBIN ÉS A GLUTATION/GLUTATIONPEROXIDÁZ GÁTOLJA.....</i>	38
5.1.6	<i>A FERRYLHB FELSZAKÍTJA AZ ENDOTÉL SEJTEK KONFLUENCIÁJÁT ÉS MONOCITÁK ADHÉZIÓJÁT INDUKÁLJA.....</i>	40
5.2	<i>MÁSODIK RÉSZ.....</i>	43
5.2.1	<i>CSE EXPRESSZIÓJA MEGNŐ HUMÁN ÉS EGÉR ATHEROMÁBAN.....</i>	43
5.2.2	<i>A H₂S GÁTOLJA AZ ÉRELMESZESEDÉS FOLYAMATÁT EGEREKBEN.....</i>	44

5.2.3	<i>A KÉNHIDROGÉNT KIBOCSÁTÓ MOLEKULÁK GÁTOLJÁK AT LDL ÉS AZ ATHEROMA LIPIDEK OXIDÁCIÓJÁT.....</i>	47
5.2.4	<i>A KÉNHIDROGÉN GÁTOLJA A LIPIDPEROXIDÁCIÓS TERMÉKEK KIALAKULÁSÁT HUMÁN KOMPLIKÁLT LÉZIÓKBAN.....</i>	50
5.2.5	<i>A KOVALENSEN KERESZTKÖTÖTT HEMOGLOBIN MULTIMEREK KIALAKULÁSÁT GÁTOLJA A KÉNHIDROGÉN.....</i>	50
5.2.6	<i>A KÉNHIDROGÉN GÁTOLJA A HEMOBLOBIN-LIPID INTERAKCIÓT ÉS EZÁLTAL AZ ENDOTÉL SEJTEKRE GYAKOROLT HATÁSUKAT.....</i>	51
5.2.7	<i>AZ ATHEROGÉN LIPIDEK ÉS A PRO-INFLAMMATORIKUS CITOKINEK NÖVELIK A CISZTATION-γ-LIÁZ EXPRESSZIÓJÁT AZ ATHEOSZKLEROTIKUS ÉRFALBAN.....</i>	56
6.	MEGBESZÉLÉS.....	58
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	65
8.	SUMMARY.....	66
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	67
10.	TÁRGYSZAVAK.....	78
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	79
12.	FÜGGELÉK (KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI)	80

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A magyarra csak nehézkesen fordítható rövidítések angolul szerepelnek.

3-MST: 3-merkaptopiruvát

4-HNE: 4-hidroxinonenál

AHA: American Heart Association

AP67: (4-methoxyphenyl) (pyrrolidin-1-yl) phosphinodithioc sav)

AP72: (4 methoxyphenyl) (piperidin-1-yl) phosphinodithioc sav)

ApoE^{-/-}: apolipoprotein E deficiens egér

BCA: bicinchonininc sav

CD: cluster of differentiation

CD34: cluster of differentiation 4, transzmembrán foszfoglucoprotein

CD4: cluster of differentiation 4

cDNA: komplementer dezoxiribonukleinsav

COOH: kumin-hidroperoxid

CSE: cisztation- γ -liáz

DAB: diaminobenzidine

DEAE: Dietilaminoetil

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetil-szulfoxiddal

DNA: dezoxiribonukleinsav

dNTP: dezoxiribonukleotid-trifoszfátok

DW: desztillált vízben

ECIS: Electric Cell-Substrate Impedance Sensing

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FBS: fétál szarvasmarha sérum

FerrylHb: ferryl hemoglobin

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz

GPx: glutathion-peroxidáz

GSH: glutathion

GY4137: (P-(4- Methoxyphenyl)-P-4-morpholinyphosphinodithioic acid morpholine salt)

H&E: hematoxinilin és az eozin
H₂O₂: hidrogén-peroxid
H₂S: kén-hidrogén
HAoEC: humán aorta endotél sejt
HAOSMC: humán aorta simaizomsejt
Hb: Hemoglobin
HBSS+: Hank féle kiegyenlített sóoldat Ca²⁺ és Mg²⁺-al
HFT: H-ferritin
HO-1: hemoxigenáz-1
HO-2: hemoxigenáz-2
Hp: Haptoglobin
HRP: tormaperoxidáz
EC: humán köldökvéna endotél sejt
ICAM-1: intracelluláris adhézios molekula-1
IgG: "G" immunglobulin
IHC: immunhisztokémia
IL-1β: interleukin-1-béta
LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein
LFT: L-ferritin
LOOH: lipid-hidroperoxid
LPS: lipopoliszachariddal
MB: metilén kék
metHb: methemoglobin
MgCl₂: Magnézium-klorid
mRNA: hírvivő ribonukleinsav
MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid
NaCl: nátrium-klorid
Na₂S: Nátrium-szulfid
SDS: Nátrium dodecyl szulfát
HCl: sósav
NaOH: nátrium-hidroxid

NaSH: nátrium-szulfid
NNDP: dimetil-p-phenilenediamine dihidrochlorid
OD: optikai denzitás
OxLDL: oxidált LDL
PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis
PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat
PL: lipid extraktum humán atheromából
PPG: DL-propargylglycine
qRT-PCR: valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció
RBC: vörösvértest
PBMC: Perifériális mononukleáris sejt
RNS: ribonukleinsav
RPMI: Roswell Park Memorial Institute tenyésztőfolyadék
SDS-PAGE: nátrium dodecil szulfát-poliacrilamid gél
SMA: simaizom aktin
TBARS: tiobarbitursav-reaktív anyagok
TNF- α : tumor nekrosis factor-alfa
TrisHCl: Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
UV-Vis: ultraviola-látható
FeCl₃: Vas III klorid
VCAM-1: ér eredetű sejt adhéziós molekula-1
VVT: vörösvértest
VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési factor

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 érlelmeszesedés vesz részt. Az érlelmeszesedés során az erek falán zsíros lerakódások úgynevezett plakkok jönnek létre. A folyamat során a plakkok bevéreznék, destabilizálódnak, ami a felszakadásukhoz és a bennük lévő zsíros anyag véráramba történő jutását eredményezi. Az érlelmeszesedés szívinfarktus, agyvérzés, embólia és trombózis kialakulását is eredményezi.

A témaválasztásom alapját a plakkok belsejében megfigyelhető bevérések patogenezisének a kutatása, illetve a bevérések progressziójának farmakológiai úton történő vizsgálata képezi. A bevézés 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 bevérezt plakkokban végbemenő folyamatok részletes feltárása, illetve gyógyszeres támadáspontok tesztelése, mellyel az érlelmeszesedés 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 érlelmeszesedésben zajló molekuláris biológiai folyamatokat. Az egészséges humán karotisz artériákat a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézete biztosította számunkra. A humán ateróma és bevérezt 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

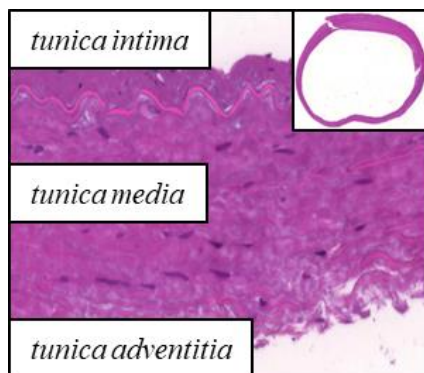
2.1 ÉRELMESESEDEÉS

2.1.1 AZ ÉRELMESESEDEÉS EPIDEMIOLOGIÁJA ÉS RIZIKÓFAKTORAI

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) jelentése alapján a világ vezető halálókát a szív- és érrendszeri betegségek adják (31% 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



1. ábra. Az aorta általános szerkezete (a szövettani festés a Debreceni Egyetem Patológia Intézetében készült, az ábra saját készítésű).

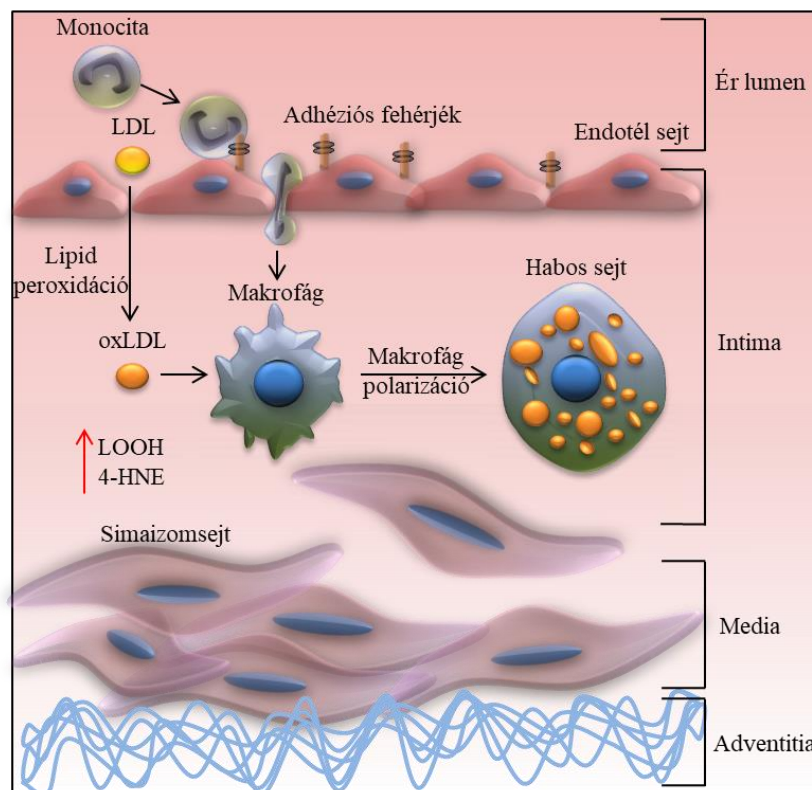
és az alatta található proteoglikán rétegből épül fel. A középső réteget (*tunica media*) főleg rugalmas rostok és simaizomsejtek alkotják. Az érfal külső kötőszöveti rétege (*tunica adventitia*) tartalmazza az érfalat tápláló ereket (*vasa vasorum*) és az érfalat ellátó idegeket (*nervi vasculares*) (1, 2). Az artériák szerkezete típustól függően (elasztikus artériák, muszkuláris artériák, arteriolák) eltérnek egymástól. Az aorta torakális és abdominális része között szerkezetbeli különbségek vannak (3).

2.1.3 AZ ÉRELMEZSESEDÉS 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 (4). 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 (5). 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 (6, 7). 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, amitől a monociták makrofágokká differenciálódnak (8). Az oxLDL a makrofágokat polarizálja, melynek következtében a szkevendzser receptorok (CD36; SRA) megemelkedett expressziója hatására a lipidek felvételre

2. ábra. Az érelmeszesedés kezdeti mechanizmusa (saját ábra).

kerülnek. A lipid cseppekkel telítődött makrofágokat habos sejteknek nevezzük (5). Az egyes típusú lézióknál mikroszkóposan megfigyelhető kicsi kiterjedésű sárga pontok láthatóak az aorta felületén, illetve lipideket tartalmazó habos sejtek csoportjai láthatóak a szövetben (4).

II-es típusú lézió – zsíros csíkok.

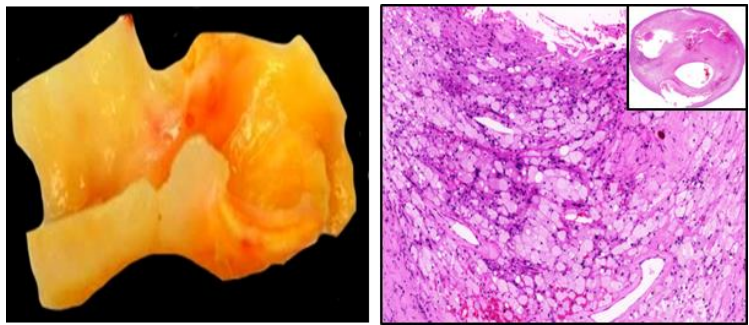
A lipidek akkumulációja az intimában már szabad szemmel is látható, a lipidcseppek már a simaizomsejtekben is megjelennek. Az egyes és kettes típusú léziót gyakran együtt nevezik korai léziónak.

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.



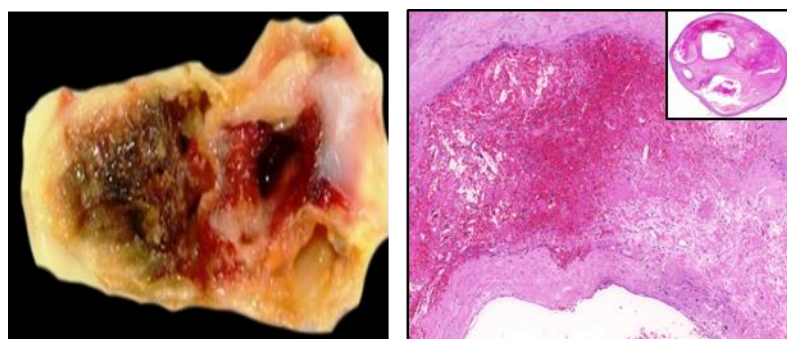
3. ábra. Humán atheróma (a szövettani festés a Debreceni Egyetem Patológia Intézetében készült, a képek saját készítésűek).

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 érlemezés 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

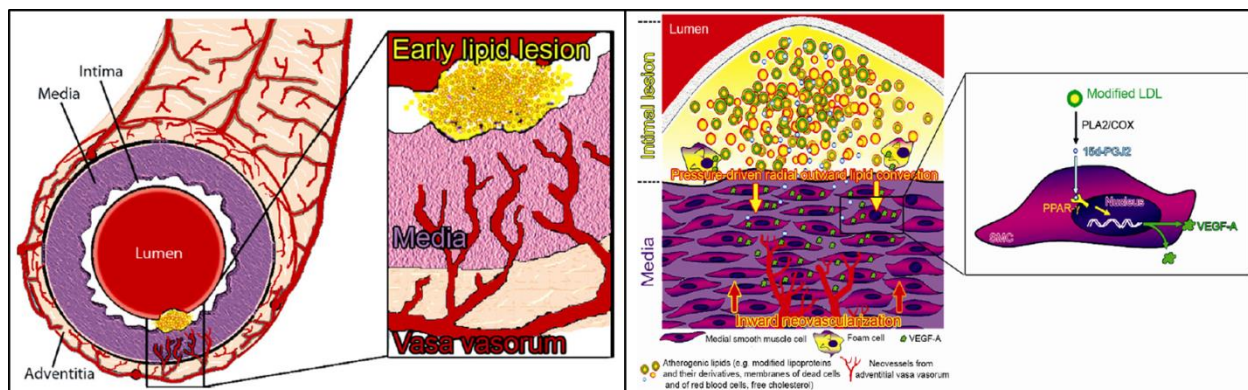


4. ábra. Bevérzet humán karotisz (a szövettani festés a Debreceni Egyetem Patológia Intézetében készült, a képek saját készítésűek).

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 (9). 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 (9). A plakkokban végbemenő peroxidáció miatt hipoxiás körülmények alakulnak ki, ennek hatására

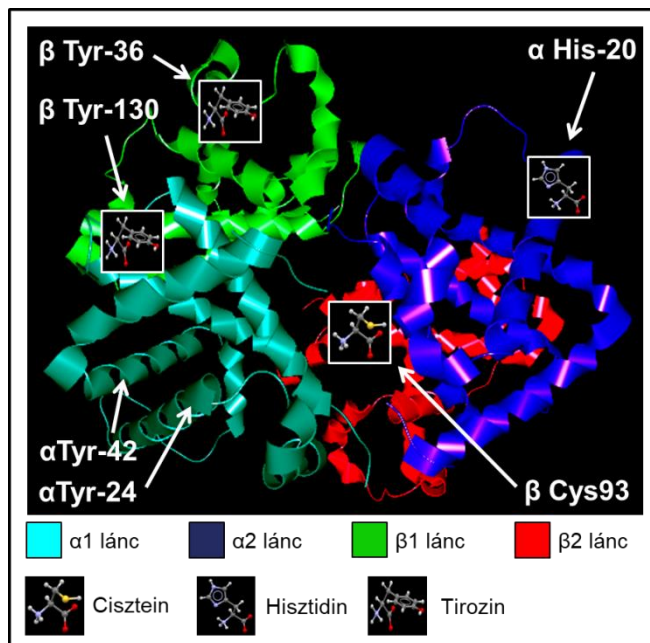


5. ábra. Plakkon belüli bevérzés kialakulása (Jean-Baptiste Michel et al. Pathology of human plaque vulnerability: mechanisms and consequences of intraplaque haemorrhages. Atherosclerosis. 2014 Jun; 234 (2): 311-9. alapján)

neovaszkularizált erek nőnek a plakokban 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 létrejöhet a plakkon belüli bevérzés (10-12).

2.3 AZ OXIDÁLT HEMOGLOBIN KIALAKULÁSA ÉS ÉLETTANI HATÁSAI

A komplikált plakk kialakulása során a vörösvértestek (VVT) megjelennek a plakk belsejében (12). Nagy E. és munkatársai bizonyították, hogy az oxLDL és a lipid extraktum humán atheromás plakokban (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 (13).



6. ábra. Hemoglobin oxidációja során keletkező gyökök
(A Hb vizualizációja CAVAR Analyst 2.0 szoftverrel történt; PDB: 1BUW. Az aminosavak szerkezete Wikipédiából származik; saját ábra.)

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 kötással képesek létrehozni Hb dimert, tetramert és multimereket (16-18). 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 (13).

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 (19). 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 adhéziós molekulák expressziója is megemelkedik (VCAM-1, ICAM-1, E-szelektin) a EC-ben. Ezek a folyamatok arra utalnak, hogy a ferrylHb pro-inflammatorikus tulajdonsággal rendelkezik, s szerepet játszhat a plakkok progressziójában, ugyanis sem a Hb sem a metHb nem okozza a fentebb említett hatásokat (20).

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 (21). 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 (22-24).

2.5 A KÉNHIIDROGÉN SZEREPE AZ ÉRELMESESZESÉDÉS PROGRESSZIÓJÁBAN

A H_2S érrelmeszesedést befolyásoló hatásáról számos publikáció jelent meg a 2000-es évek elején. Az érrelmeszesedés egyik fő kezdeti lépése az LDL szubendoteliális térben történő oxidációja (5). Kimutatták, hogy a kénhidrogén képes gátolni az LDL hem indukálta oxidatív módosulását *in vitro* körülmények között (25). Leírták, hogy a H_2S 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 (26). Wang és munkatársai bemutatták, hogy a nátrium-hidroszulfid (NaSH) az Apolipoprotein E deficiens egerekben ($\text{ApoE}^{-/-}$) gátolta az aterogén diéta nélkül létrejött érrelmeszesedéses plakkok kialakulását. Továbbá bebizonyították, hogy a CSE gátlószer alkalmazása esetén az $\text{ApoE}^{-/-}$ egerekben az érrelmeszesedés progressziója előrehaladottabb volt a kontroll $\text{ApoE}^{-/-}$ egerekhez hasonlítva (27). Mani és munkatársai CSE deficiens egereket

használva a kísérletekhez kimutatták, hogy a CSE fehérje hiánya megnövekedett érlelmeszesedést okoz, és ezzel párhuzamosan csökkent H_2S termeléssel jár (28).

2.6 A KÉNHIDROGÉN ÉS A GYULLADÁS KAPCSOLATA

Az érlelmeszesedés során expresszáldó, gyulladást előldéző pro-inflammatórikus citokinek és proteázok hozzájárulnak a plakkok bevézéséhez és trombus kialakulásához (29, 30). Megállapították, hogy a kénhidrogén termeléséért felelős fő enzim, a CSE expressziója megemelkedik lipopoliszachariddal (LPS) gyulladást előldézett egerekben. Az eredményeiből azt a következtetést vonták le, hogy szeptikus sokk esetén a H_2S pro-inflammatórikus hatású (31). 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 H_2S védelmi funkciót lát el gyulladás során a sejtekben (32). Továbbá kimutatták, hogy a hidrogénperoxid (H_2O_2) indukálta oxidatív stressz a CSE expresszióját megemeli embrionális vese és a vese fibroblaszt sejtekben. Eredményeik azt mutatják, hogy a CSE expressziója miatt megemelkedett endogén H_2S gyökfogó hatása protektív funkciót lát el (33).

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

3. CÉLKITŰZÉSEK

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 érlemezsedéses plakkok bizonyított alkotói. Feltételeztem, hogy a plakkok bevérzése során a hemoglobin az oxLDL-el és reaktív lipidekkel érintkezve 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 adhézióját az EC-hez.
6. A CSE szint expressziója megemelkedik az érlemezsedéses állat modellekben. Ezért megvizsgáltam a CSE expresszióját humán egészséges, atheroma és komplikált léziókban, illetve magas zsír és koleszterin diétán tartott ApoE^{-/-} egerek aortáiban.
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 adhézións 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 termelődését felelős fő enzim, a CSE expresszióját. Ebből adódóan én is megvizsgáltam, hogy az IL-1b, 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. ANYAGOK ÉS 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 (34, 35). 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 Helsinkai 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-TUKÉB) 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 (36). 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 érelmeszesedés 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 pufferolt sóoldatot

E15103-34 SM R/M High fat (standard chow), 10mm 15% fat, 1,25% cholesterol Experimental diet (For laboratory animals only)	
Crude Nutrients	%
Crude Protein	19,0
Crude Fat	15,2
Crude fibre	3,4
Crude ash	6,3
Starch	25,6
Sugar	11,2
Additives	per kg
Vitamin A (IU)	15,000
Vitamin D3 (IU)	1,000
Vitamin E (mg)	110
Vitamin K3 (mg)	5
Vitamin C (mg)	-
Copper (mg)	13
Energy: 16,8MJ (or kcal) ME/kg Manufacturer: ssniff Spezialdiäten GmbH, DE-59494 Soest, +49(0)2921-9658-0 www.ssniff.com mail@ssniff.de	

7. ábra. Atherogén táp összetétele

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 injekcióval 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

injektáltam (PBS; N=21) (27). 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

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 Hematoxinil 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 SEJT TENYÉSZTÉS

Az EC sejteket köldökzsínórból szeparáltuk. A véna kanülálása után 0,2%-os diszpáz oldattal 45 percig inkubáltuk a köldökzsínórt 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 felfuszpendáltuk 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 (37). 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 (38). 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 H₂O₂-al inkubáltuk a Hb-t, a ferrylHb átalakulást spektrofotométer (Beckman DU-800) segítségével monitoroztuk 90% feletti átalakulásig. A hemoglobinoikat 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 fiziológiás sóoldatban dializáltuk. A hemoglobinformákat folyékony nitrogén alatt lefagyasztottuk, majd -70°C-on tároltuk (20).

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 fiziológiás sóoldat) Quick-SEAL (Beckman) ultracentrifugacsőbe rétegeztünk. Az ultracentrifugálást 302,000 G-én 2 órán át 4°C-on végeztük VTi 50.2. rotorral (Beckman). A kigyújtott 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 $5 \text{ }\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációjú hemmel és $75 \text{ }\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációjú H_2O_2 -val végeztük. Más kísérletben hemet, Hb-t, metHb-t és ferrylHb-t inkubáltunk EDTA alvadásgátolt plazmával egy órán át $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A hemoglobin formák koncentrációja $100 \text{ }\mu\text{mol/L}$ -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 $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ -es koncentrációra és az optikai denzitását (OD) 234 nm -en mértük spektrofotométerrel (Beckman DU-800). A 0,5-nél nagyobb abszorbancia felett beszélhetünk oxLDL-ről. Az LOOH tartalmat Simon-Wolf reagens segítségével mértük (39). TBARS mérésénél $50 \text{ }\mu\text{L}$ $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ -es koncentrációjú LDL-t kevertünk össze $100 \text{ }\mu\text{L}$ tiobarbitursav-reaktív reagenssel ($0,375 \text{ g}$ 2-tiobarbitur sav, $2,08 \text{ mL}$ sósav, 15 mL 10%-os triklórecetsav 100 mL -es végtérfogatban desztillált vízzel). A mintákat $90 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 20 percig melegítettük. A minták lehűtése után $200 \text{ }\mu\text{L}$ 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 ($20 \text{ }\mu\text{mol/L}$, hem csoportra számítva) H_2O_2 -al ($200 \text{ }\mu\text{mol/L}$), LDL-el ($50\text{-}500 \text{ }\mu\text{g}$ fehérje/mL), oxLDL-el ($50\text{-}500 \text{ }\mu\text{g}$ fehérje/mL), PL-el ($500 \text{ }\mu\text{g}$ fehérje/mL) inkubáltuk. A Hb redox állapotának a változását spektrofotométerrel követtük nyomon (Beckman DU-800).

4.10 SEJTTOXICITÁSI VIZSGÁLAT

Az endotél sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük. Kezelés előtt a sejteket Hank féle kiegyenlített sóoldattal mostuk, ami tartalmazott Ca^{2+} -ot és Mg^{2+} -ot (HBSS+). A konfluens endotél sejteket megkezeltük 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) HBSS+-ban hígítva. 1 óra kezelés elteltével a sejteket egyszer mostuk HBSS+-al, majd 3 órán át H_2O_2 -al (75 $\mu\text{mol/L}$) inkubáltuk őket. Más kísérletben LDL-t (250 μg fehérje/mL) inkubáltunk 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) 1 órán át majd endotél sejteket kezeltünk velük.

A kénhidrogénes kísérletek során 200 $\mu\text{g/mL}$ -es koncentrációjú LDL-t hemmel (5 $\mu\text{mol/L}$) és H_2O_2 -el (75 $\mu\text{mol/L}$) oxidáltunk. Az így létrejött oxLDL-t inkubáltuk 16 órán át 37°C -on önmagában és/vagy 20, illetve 200 $\mu\text{g/mL}$ -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 (40).

4.11 ENDOTÉL SEJT PERMEABILITÁSI VIZSGÁLATA

Az EC sejteket zselatinnal bélelt függő sejtenyésztő 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 lejárta után fluoreszcens nátriumsót (1 $\mu\text{mol/L}$) adtunk a sejtenyésztő 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-eket. 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 MgCl_2 -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 NanoDrop™ 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 µmol/L), Hb-al (100 µmol/L, hem csoportra számítva), methHb-al (100 µmol/L, hem csoportra számítva) és ferrylHb-al (100 µmol/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 gliceraldehid-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 (41).

4.15 FERRYLHEMOGLOBIN MULTIMEREK DETEKTÁLÁS

A hemoglobint tartalmazó mintákat (1-4 μg) 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-anitest 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 ezüsfestés segítségével tettük láthatóvá (42).

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 (19). 0,5 mg/mL-es koncentrációjú PL-et inkubáltunk Hb-al (100 $\mu\text{mol/L}$) önmagában, és vagy 200 $\mu\text{mol/L}$ -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 $\mu\text{mol/L}$) kezeltük 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 (43) által elsőként leírt és A.D Ang és munkatársai (44) 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-en 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-en 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 (45). 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 billegető 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 végtérfogóban lévő 50 μL formaldehid, 9 μL 2M-os citromsav és DW elegyből áll. Az előhívást követően a reakciót 50 mL-es végtérfogóban 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 bevezetett 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 (46).

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 küvetába 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 $28200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 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-teszttel 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

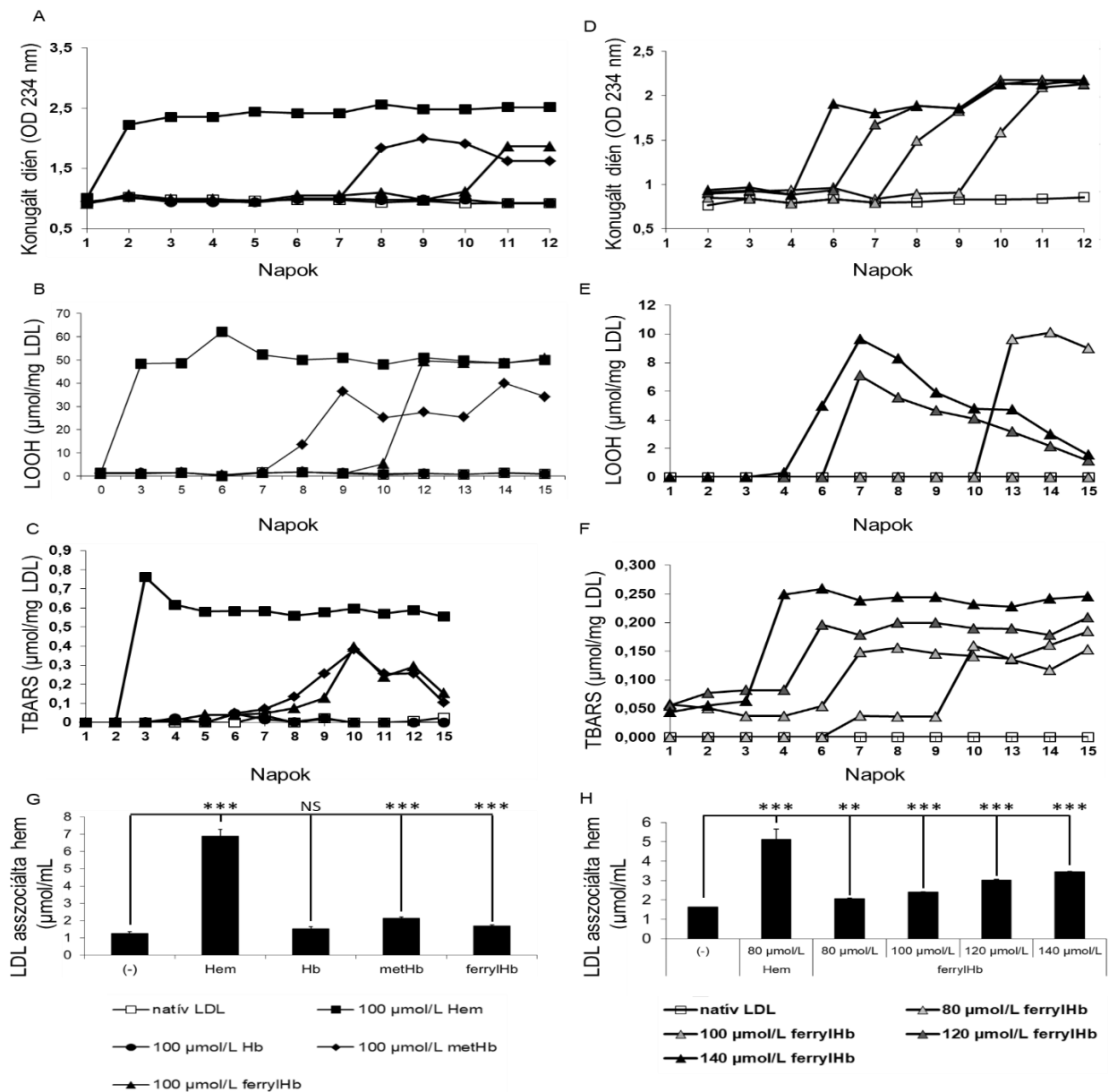
5.1 ELSŐ RÉSZ

Az érlelmeszesedés folyamatában a komplikált léziók kialakulása életet veszélyeztető eseménynek számít. A plakkon belüli bevézés 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 (12). A kutatásom első részében a bevézést 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 (8. ábra; A-C panelek). Ezzel szemben, a hemmel kezelt mintákban a lipidperoxidációs termékek szintje már a második napon megemelkedett (8. ábra; A-C panelek). 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 (8. ábra; A-C panelek). A lipidperoxidációs termékek szintjének megemelkedése a ferrylHb dózis emelkedésével fordított arányban, hamarabb kezdődött meg (8. ábra; D-F panelek). A hem a plazmában gyorsan asszociálódik az LDL-hez, ezzel párhuzamosan a hem degradálódik (39). Ebből kifolyólag azt feltételeztük, hogy a ferrylHb koncentráció emelésével az LDL-hez asszociálódott hem mennyisége is megnő. Ahogy azt az 8. ábra is mutatja, dózisfüggő módon emelkedik az LDL-hez kapcsolódott hem mennyisége a nagyobb koncentrációkkal kezelt LDL-ben (8. ábra; H panel). 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 letelte 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-ból nem, de metHb-ból képes hem kiszabadulni, ami az LDL-hez asszociálódik. Ezt a kezelt LDL mintákból mért megemelkedett hem szintek bizonyították (8. ábra; G panel). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a ferrylHb, hasonlóan a metHb-hoz, képes a hem csoportját elengedni, ezáltal a lipidperoxidáció folyamatát beindítani.

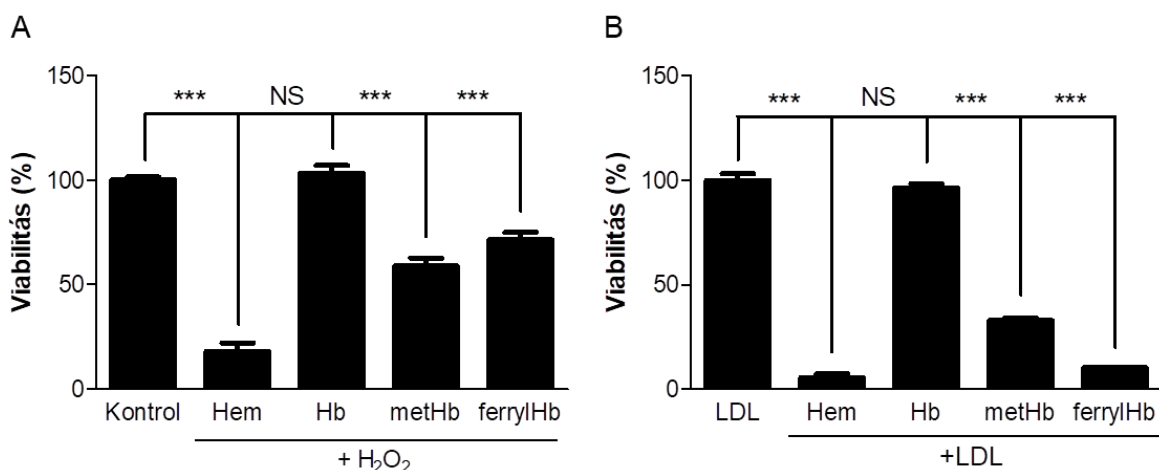


8. ábra. A ferrylHb az LDL oxidatív modifikációját okozza. Humán plazma hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb lett inkubálva 1 órán keresztül 37°C-on. Ezt követően a plazmából az LDL ki lett szeparálva. Az ábrán jelölt koncentrációk $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra vannak megadva. Az LDL szeparálást követően a mintákat 4°C-on tároltam. A minták konjugált dién (A; D), LOOH (B; E) és TBARS (C; F) tartalma minden nap mérve lett 15 napon keresztül. 3, egymástól független mérés reprezentatív eredménye szerepel az ábrán. A minták hem tartalma a 15. napon lett lemérve (G; H). Az eredmények 3 független mérés $\pm$ S.D értékét ábrázolják. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) szignifikancia szinteket jelöli, az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

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 (19). 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 (9. ábra; A panel).

Korábban kimutatták, hogy a hem és a metHb toxikus az EC-re azáltal, hogy az LDL oxidatív modifikációja során mérgező lipidperoxidációs termékek keletkeznek (39). 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 (9. ábra; B panel). Az LDL-el és a Hb-al kezelt EC sejtek esetén az életképességben nem mértem szignifikáns változást (9. ábra; B panel).

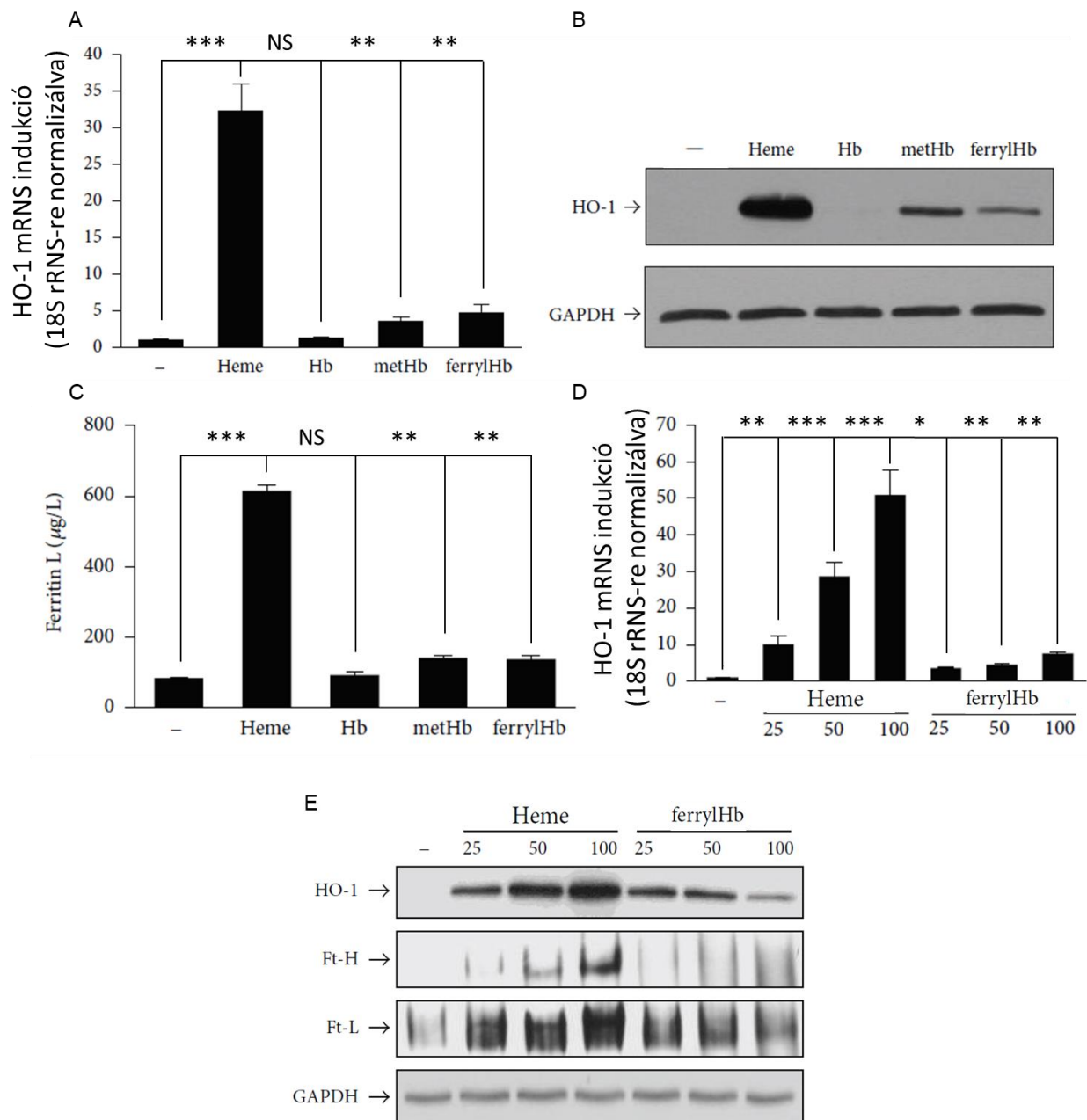


9. ábra. A ferrylHb az endotél sejtek halálát okozza két különböző módon. (A) EC sejteket 96-lyukú tenyésztőedényben tenyésztettem konfluenciáig, majd ezt követően előkezelttem hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb-al (5 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációkban hem csoportra számolva) 1 órán át HBSS+ oldatban. Az egy óra letelte után a sejteket kétszer megmostam HBSS+-al, majd folytattam az EC sejtek kezelését H_2O_2 -al (75 $\mu\text{mol/L}$) 4 órán át. A kezelés leteltével az MTT teszt segítségével az EC sejtek viabilitását kiszámoltam. (B) LDL-t inkubáltam hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb-al (10 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációkban hem csoportra számolva) 16 órán át. Ezt követően az EC sejteket kezeltem 250 $\mu\text{g/mL}$ LDL-el 4 órán át. A kezelés leteltével az MTT teszt segítségével a EC sejtek viabilitását kiszámoltam. Az eredmények 4 független mérés $\pm$ S.D értékét ábrázolják. *** ($p < 0,001$) szignifikancia szinteteket jelöli, az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

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

A HO-1 a hem profin 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 (19). 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 (10. ábra; A-B panel). 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 (10. ábra; C panel). A hemhez

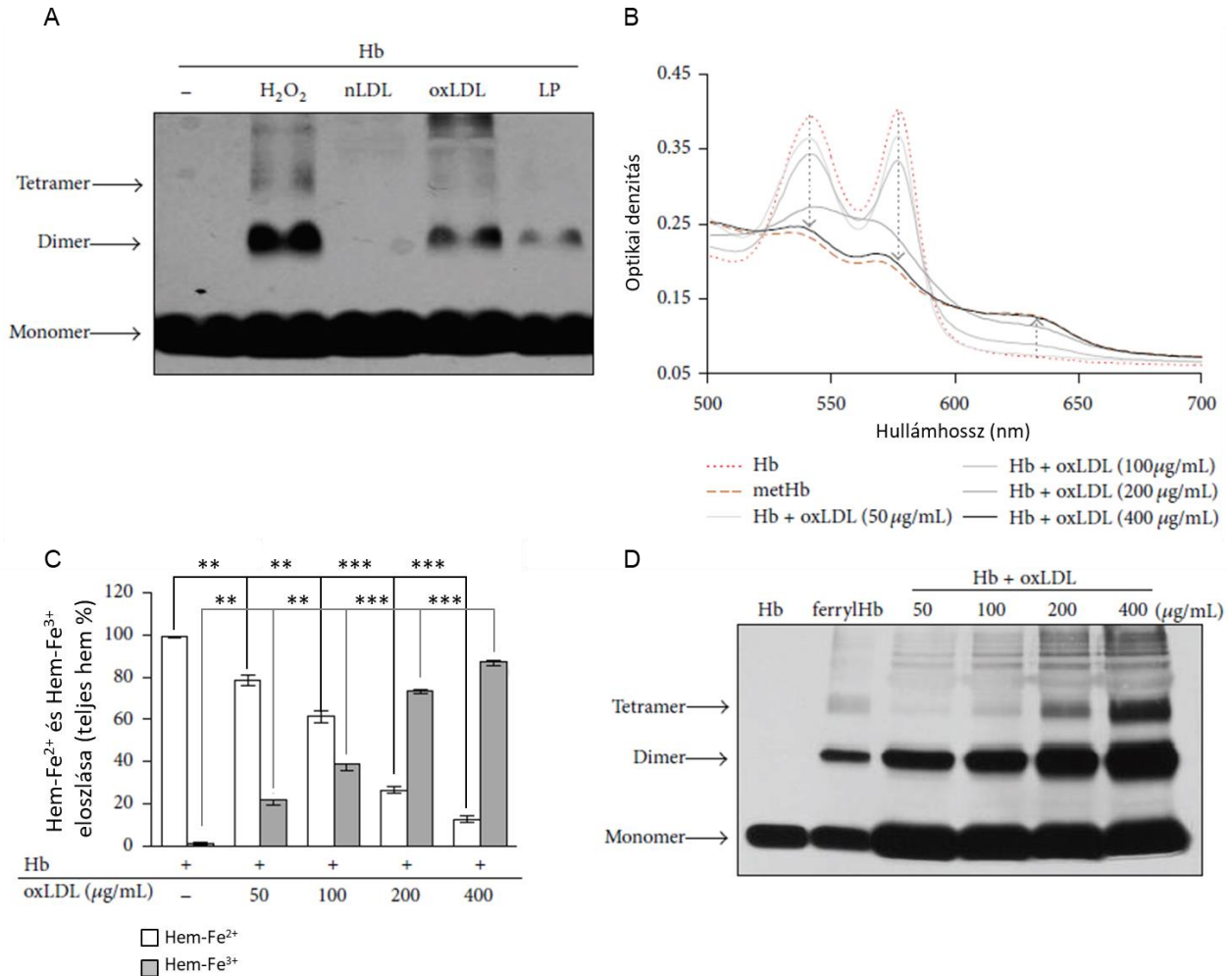
hasonlóan a ferrylHb is dózisfüggően befolyásolta a HO-1 RNS expresszióját (10. ábra; D panel), illetve a HO-1, HFT és LFT fehérje expresszióját (10. ábra; E panel).



10. ábra. A ferrylHb indukálja a Hemoxygenase-1-et és a Ferritin-t endotél sejtekben. EC sejteket 6-lyukú tenyésztőedényben növesztettem konfluenciáig. Ezt követően a sejteket hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb-al (100 μmol/L koncentrációkban hem csoportra számolva) kezeltem 15 % FBS tartalmú komplett tenyésztőfolyadékkal. (A; D) 4 óra elteltével a sejtekből RNS-t izoláltam és a HO-1 mRNA indukciókat mértem le kvantitatív RT-PCR segítségével. HO-1, H-ferritin és L-ferritin fehérje expressziós vizsgálatoknál az EC sejteket 8 óra kezelést követően szolubilizálóval előkészítettem (B; E) western blot és (C) ELISA vizsgálatokhoz. Az immunoblottokat GAPDH normalizáló fehérjére újra megfuttattam. Az eredmények 3 független mérés átlagos ±S.D értékét ábrázolják. A reprezentatív western blottok 3 független immunoblotból vannak kiválasztva. *** (p<0,001), ** (p<0,01), * (p<0,05) szignifikancia szinteket jelöli, az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

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 (40). Kimutatták, hogy az oxidált lipidek és a ferrylHb jelen van a komplikált léziókban (13), 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 (11. ábra; A panel). A mintákban lejárolt 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 (11. ábra; B panel). 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 (11. ábra; C panel). 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 (11. ábra; D panel).

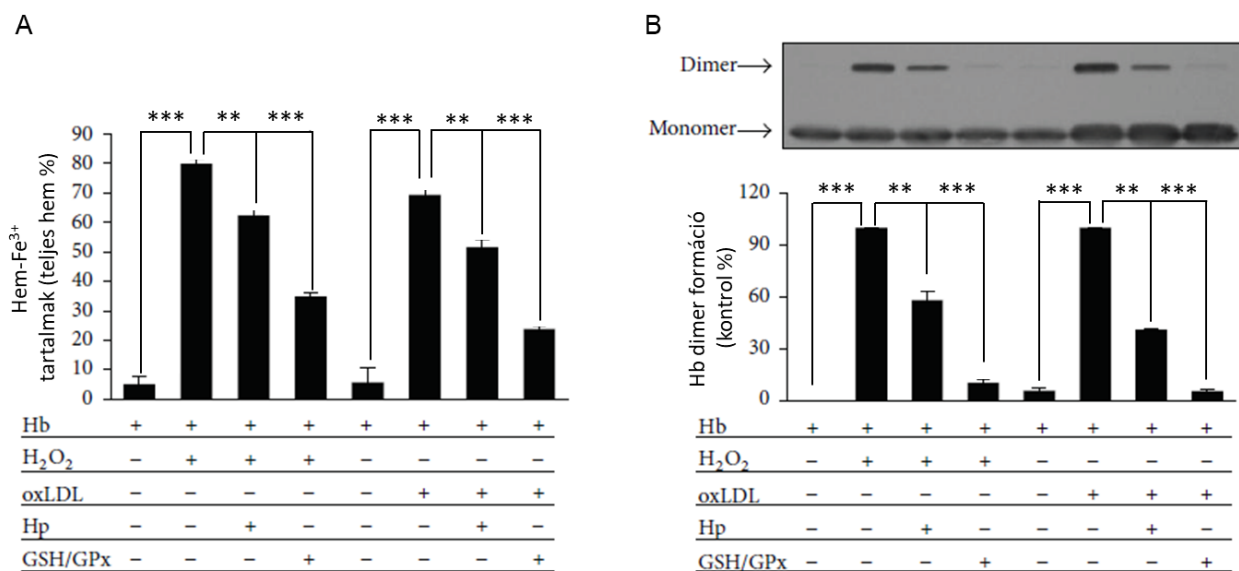


11. ábra. Az oxidált LDL és atheromából izolált lipidek a hemoglobin oxidációját és ferrylhemoglobin kialakulását okozzák. (A) Humán Hb (20 µmol/L hem csoportra nézve) inkubálva lett H₂O₂-al (200 µmol/L), natív LDL-el (400 µg/mL), oxLDL (400 µg/mL) és humán atheroszklerotikus plakkból izolált lipidekkel (400 µg/mL) 90 percig. Az inkubálást követően 4 µg-nyi Hb mintákat western blottal megfuttattam, amit ezüsfestés követett. (B, C és D) Humán Hb inkubálva lett növekvő dózisú oxLDL-el (50–400 µg/mL) 90 percig. (B; C) A Hb minták spektrum szkenje 500 és 700 nm között spektrofotométer segítségével fel lett véve. A minták Hb és metHb tartalma a spektrum alapján ki lett számolva. (D) 4 µg-nyi Hb mintákat western blottal megfuttattam, amit ezüsfestés követett. A reprezentatív ezüsfestéseket és a Hb spektrumokat szkennek 3 egymástól független kísérletből választottam ki. *** (p<0,001), ** (p<0,01) szignifikancia szinteket jelöli.

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 (47, 48). A glutationperoxidáz (GPx) sejten belüli antioxidáns enzim, ami enzimatis úton bontja a

reaktív oxigén gyököket (49). Előzőleg kimutattam, hogy a H_2O_2 , illetve a lipidperoxidáció során keletkező reaktív lipid mediátorok képesek a Hb-t oxidálni ferrylHb-á oxidálni. Ebből adódóan felmerült az a hipotézis, hogy a Hp és glutathion/glutathionperoxidáz 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 (12. ábra; A panel). Western blot analízissel alátámasztottam a spektrofotometriás mérés eredményeit. A Hp kisebb mértékben, míg a GPx nagyobb mértékben gátolta a ferrylHb kialakulását (12. ábra; B panel). 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.

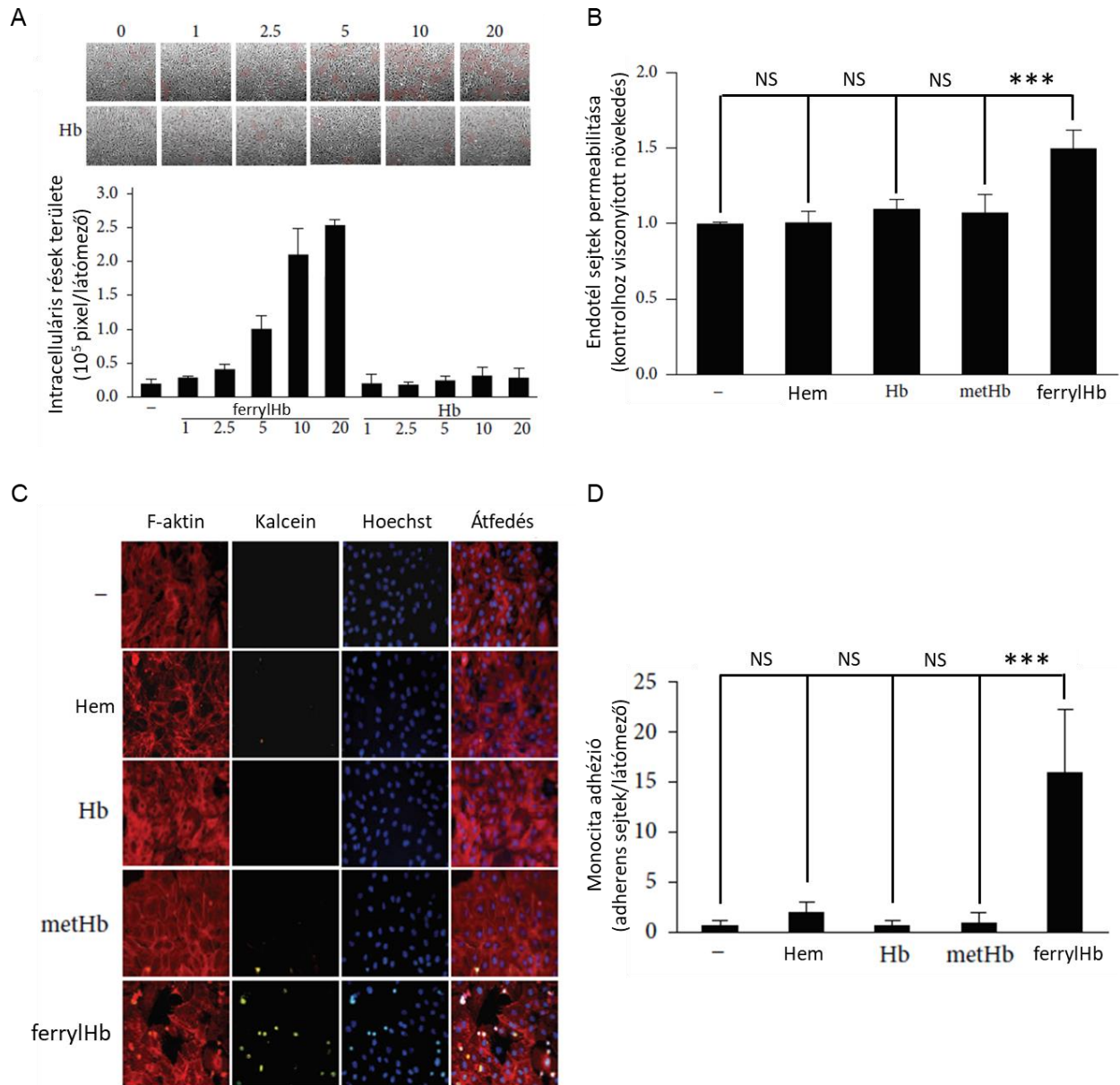


12. ábra. Glutathion/glutathion-peroxidáz és a haptoglobin gátolja a H_2O_2 és az oxidált LDL mediálta hemoglobin oxidációját és a hemoglobin keresztkötések kialakulását. Humán Hb (20 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számítva) lett előkezelve Hp-al (50 $\mu\text{mol/L}$) 10 percig 37°C-on. Az előinkubálást követően a mintákat kezeltem H_2O_2 -al (200 $\mu\text{mol/L}$), illetve oxLDL-el (400 $\mu\text{g/mL}$). A többi kísérleteknél H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$), illetve oxLDL (400 $\mu\text{g/mL}$) lett előkezelve GSH/GPx-el 10 percig 37°C-on. Az előinkubálást követően a mintákat inkubáltuk 90 percig Hb-al (20 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számítva). (A) A minták metHb tartalma spektrofotométerrel lett meghatározva. (B) A Hb oxidációja során keletkező Hb dimerek keletkezése western blot segítségével lett meghatározva. A Hb dimer formáció kvantálása ImageJ szoftver segítségével történt. A spektrofotometriás eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. A reprezentatív western blot 3 független immunoblotból lett kiválasztva. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$) szignifikancia szinteket jelöli.

5.1.6 A FERRYLHB 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 (20). Az expresszált adhéziós molekulák az ér pályában keringő monociták adhézióját okozzák az EC sejtek felszínére (8). 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 kezeltem (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 dózisfüggően nőttek a sejtek közötti lyukak. A Hb-al kezelt EC sejtek között szignifikáns mértékű konfluencia felszakadást nem detektáltam (13. ábra; A panel). 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 sejtenyésző 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 $\mu\text{mol/L}$) kezeltem 12 órán át. A kezelési idő letelte után a kezelőoldatot lecseréltem Fluorescein oldatra (1 $\mu\text{mol/L}$). 1 órás inkubálás után a lógó sejtenyésző 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 (13. ábra; B panel). A ferrylHb EC sejt aktivációjában betöltött szerepének további vizsgálatához ismét konfluens EC sejteket kezeltem 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 Calceim-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 kapcsolatok bemutatása miatt a sejtek sejtvezét megfestettem. A kísérletből kiderült, hogy egyedül a ferrylHb-al kezelt sejtek konfluenciája

szakadt fel, amit a sejtvez festés támasztott alá. Emellett egyedül a ferrylHb kezelés esetében tapasztaltam a monociták szignifikáns adhézíóját az EC sejtekre (13. ábra; C és D panel). Az eredmények az bizonyítják, hogy a ferrylHb-nak fontos szerepe van az EC sejtek aktivációjában, illetve a gyulladásos folyamatok iniciációjában, ami az érlemezsedés folyamatában betöltött szerepére is utal.



13. ábra. A ferrylHb felszakítja az endotél sejtek konfluenciáját és monocita adhézíót indukál. (A) Az EC sejteket 6-lyukú tenyésztőedényben növesztettem. Konfluens EC sejteket növekvő dózisú Hb-al és ferrylHb-al megkezeltem 16 órán át (1-2.5-5-10 és 20 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számítva). A kezelt sejtekről a képeket inverteres mikroszkóppal készítettem el (100x-os nagyítás; Carl Zeiss 426126). A képek kvantálása ImageJ szoftver segítségével történt. (B) Konfluens EC sejteket függő sejt szaporító insertben kezeltem hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számítva) 12 órán át. A kezelést követően az apikális tenyésztő edénybe fluoreszcein sót adtam (1 $\mu\text{mol/L}$). A tenyésztő edény disztális részéből a fluoreszcein só jelenlétét 60 perc elteltével

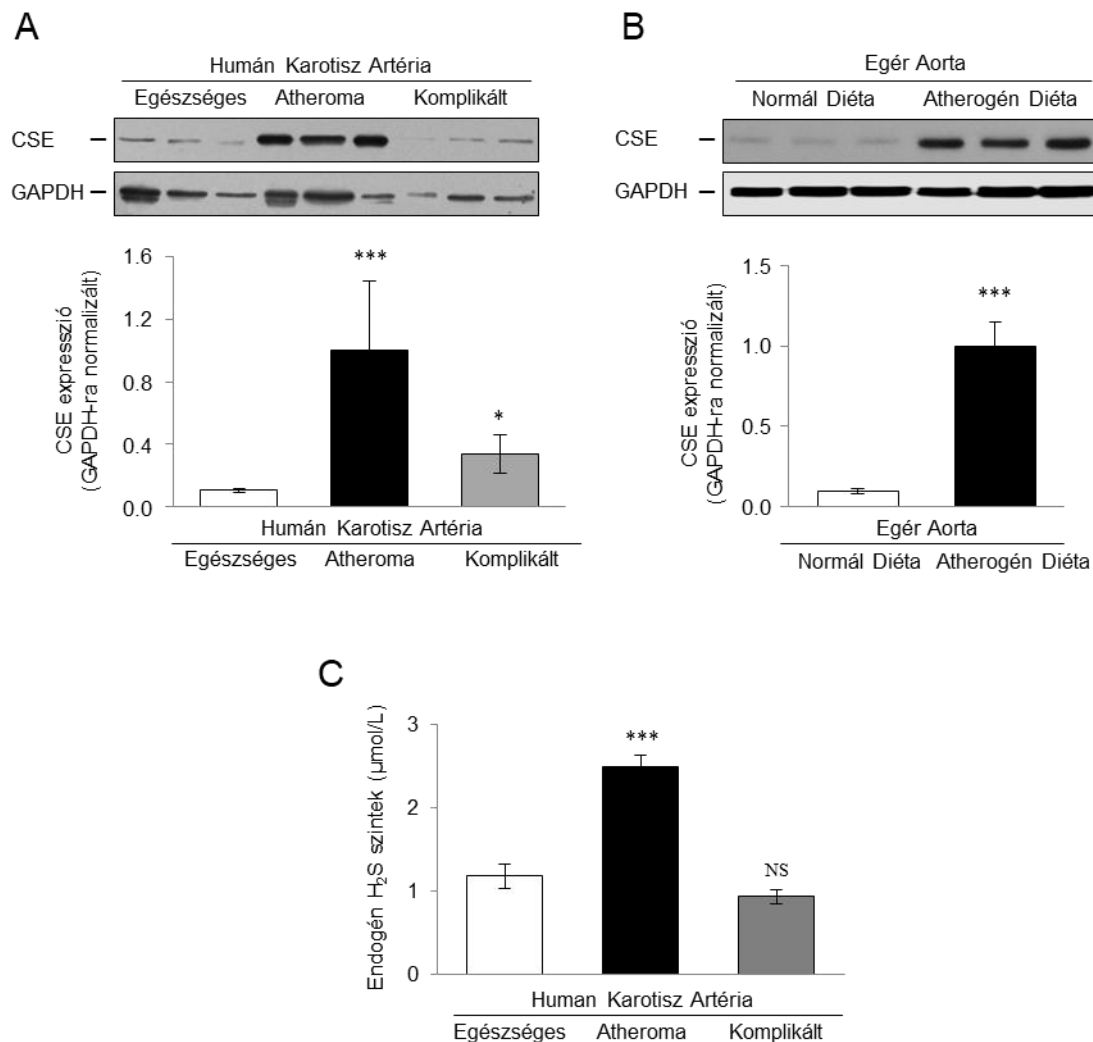
detektáltam fluoreszcens tenyésztőedény olvasó segítségével. (C) Konfluens EC sejteket hemmel, Hb-al, metHb-al és ferrylHb-val (10 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számítva) kezeltem 12 órán át. A kezelést követően egészséges humán perifériás vérből frissen szeparált monocitákat megjelöltem Calcein-AM festékkel. 10^5 /sejttenyésztő lyuk Calcein-AM-el jelölt monocitákat kezeltem 30 percen keresztül 37°C -on. Az EC-sejtek F-aktinját TRITCH konjugált phalloidin festékkel jelöltem meg, míg a DNS-üket (sejtmag) Hoechst festékkel tettem láthatóvá. A sejtekről a képek $400\times$ -os nagyításban készültek fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Az eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. A reprezentatív képek 3 független mérésből választottam ki. *** ($p<0,001$), ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$), az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

5.2 MÁSODIK RÉSZ

A kénhidrogén az endogén gáztranszmitterek legújabb tagja (21). A kénhidrogénnek az érlelmeszesedés 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 (21). A kénhidrogén érlelmeszesedés 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 (14. ábra; A panel). 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 (14. ábra; B panel). 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 (14. ábra; C panel). 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 érlelmeszesedés kimenetelét.



14. ábra. A Cystathionine γ -lyase expressziója megnő az atheroszklerotikus léziókban. (A, felső panel) CSE fehérje expressziók western blottal történő vizsgálata humán egészséges, atheroma és komplikált karotisz artériákból. Reprezentatív CSE western blot humán karotisz artéria fehérjelizátumából (N=3; 3 karotid artéria/csoport) lett vizsgálva (20 μ g fehérje/sáv). Az immunoblottokat GAPDH-ra újra előhívtam. (A, alsó panel) Az ábra oszlopai a CSE expressziókat mutatják GAPDH háztartási fehérjére normalizálva. *** $p < 0.005$, az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja. (B) ApoE^{-/-} egereket normál, illetve atherogén diétán tartottam 8 héten át, 8 hetes koruktól. (B, felső panel) Reprezentatív CSE western blot egér karotisz artéria fehérjelizátumából (N=3; 3 karotid artéria/csoport) lett vizsgálva (10 μ g fehérje/sáv). Az immunoblottokat GAPDH-ra újra előhívtam. Az ábra oszlopai a CSE expressziókat mutatják GAPDH háztartási fehérjére normalizálva. *** $p < 0.005$. (C) Az endogén H₂S szinteket humán egészséges, atheroma és komplikált karotisz artériákból határoztam meg (N=6).

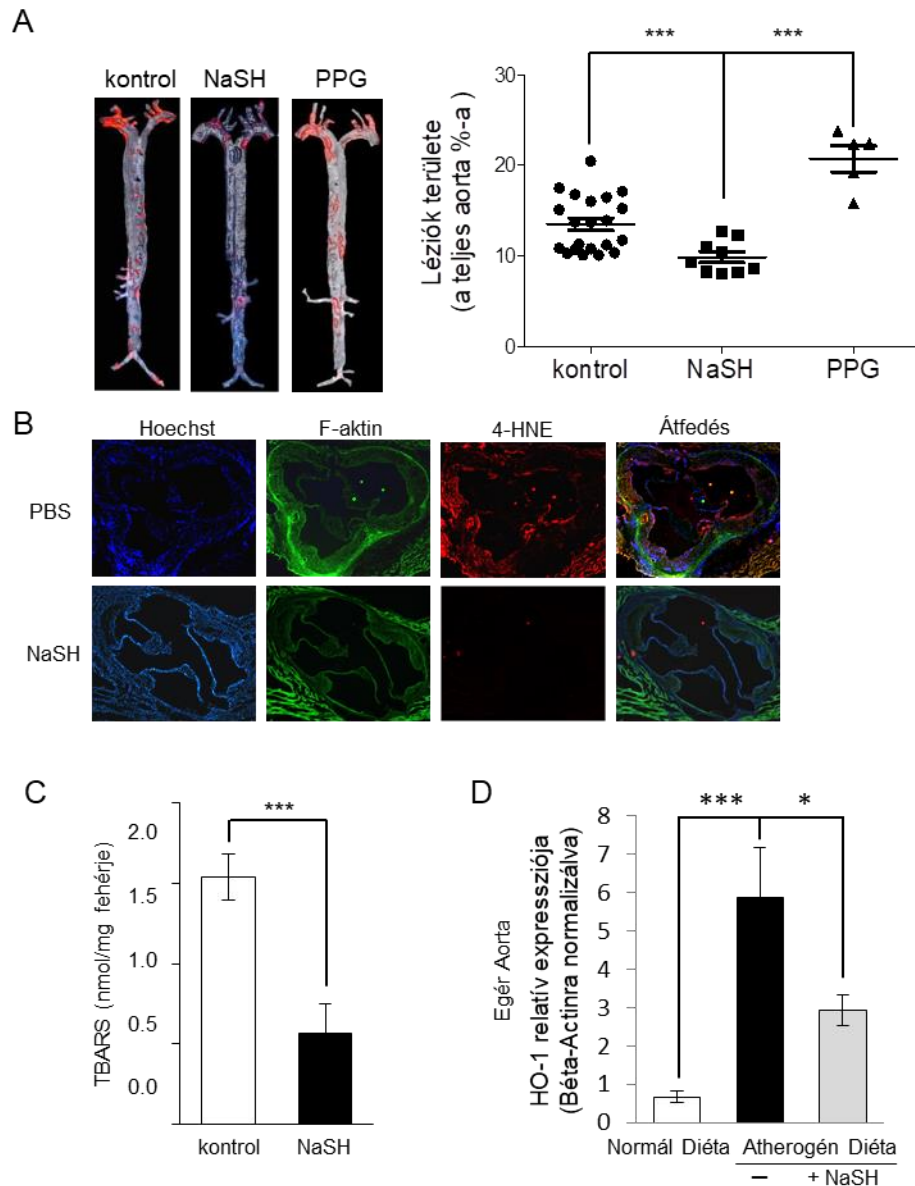
5.2.2 A H₂S GÁTOLJA AZ ÉRELMEZESÉDÉS FOLYAMATÁT EGEREKBEN

Korábban kimutatták állatkísérletben, hogy a kénhidrogén gátolja az ApoE^{-/-} egerekben kialakuló spontán érlemezsedést (27). Ebből adódóan megvizsgáltam atherogén diétán tartott ApoE^{-/-} egerekben a kénhidrogén érlemezsedést 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 érlemeszesedést gátló vagy elősegítő hatású, egerek egy csoportját atherogén diéta mellett kétnaponta CSE gátlószerekkel, PPG-val 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 (15. ábra; A panel). Ez az eredmény azt igazolja, hogy a kénhidrogén gátolja az érlemeszesedés 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 (15. ábra; A panel).

Kimutatták, hogy a lipidperoxidációs végtermékek közül a 4-hidroxinonenál (4-HNE) kulcsfontosságú szereppel bír az atherogenezis folyamatában (50). Képes a gyulladásozó folyamatokat tovább gerjeszteni (51), illetve sejthalált iniciálni (7). Emiatt megvizsgáltam, hogy a H₂S-el kezelt egerekben a 4-HNE mennyisége is lecsökken-e. Az egerek aorta gyökér 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 (15. ábra; B panel). 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 (15. ábra; C panel). A lipidek peroxidációja során keletkező LOOH az oxidatív stressz marker, HO-1 szintjét megemeli (46). 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 (15. ábra; D panel).

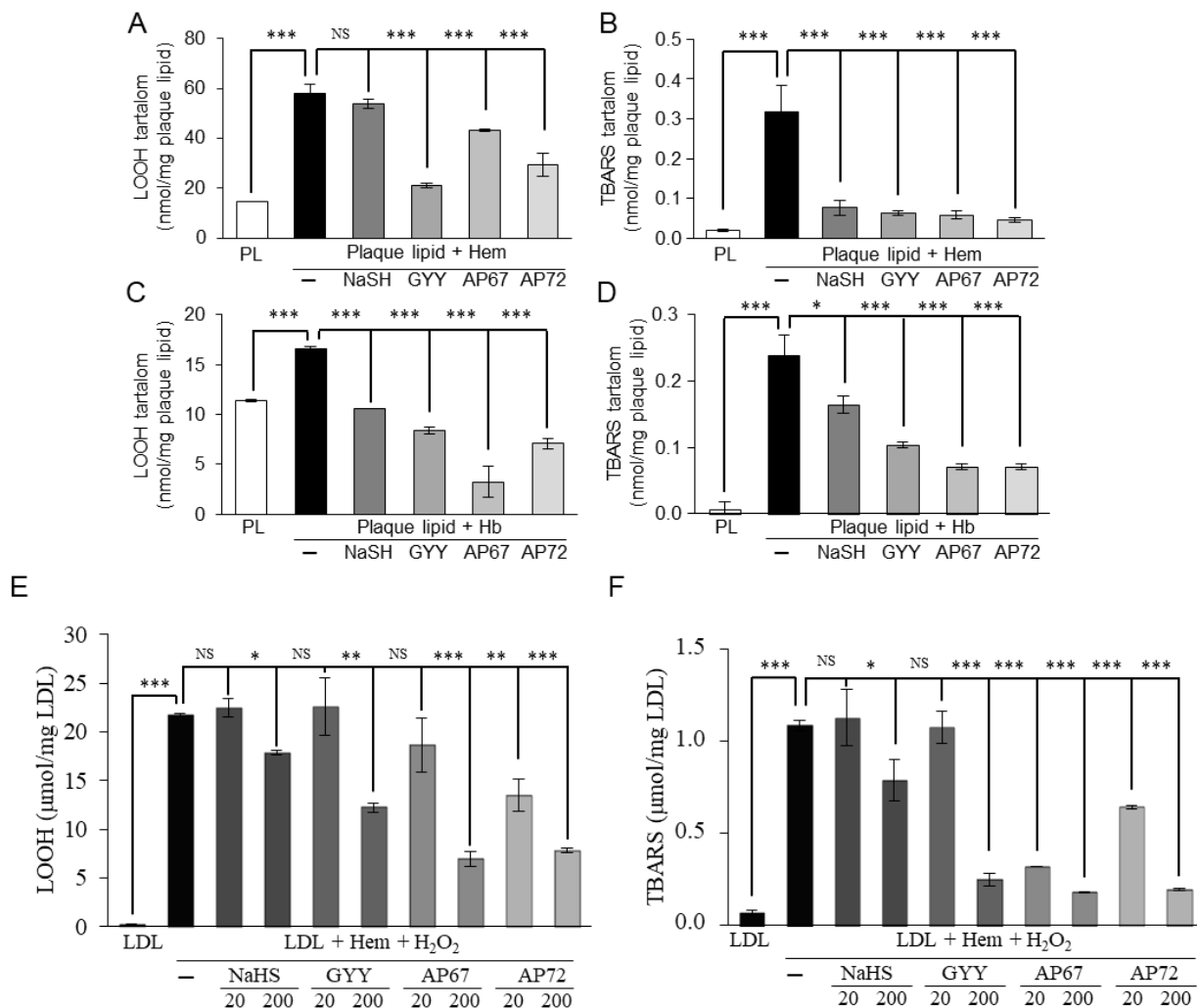


15. ábra. A kénhidrogén *in vivo* gátolja a lipidperoxidációt. (A, bal panel) ApoE^{-/-} egereket atherogén diétán tartottam 8 héten át, 8 hetes koruktól. A atherogén diétával párhuzamosan az egerek egyik csoportja intraperitoneálisan PBS-t (kontroll, N=21), másik csoportja NaSH-t (N=9), míg a harmadik csoportja az egereknek PPG-t (N=5) kapott két naponta. Az aortákban reprezentatív Oil Red O festés segítségével láthatóvá váltak a zsíros plakkok. (A, jobb panel) Az atheroszklerotikus plakkok területének számszerűsítése ImageJ szoftver segítségével történt. (B) Reprezentatív egér aorta gyöker régiójából származó 6 µm-es szeleteket Hoechst-el (DNS, sejtmag, kék szín), phalloidin-FITC-el (F-aktin, zöld szín) és 4-HNE-re (piros szín) festettem meg. A felső képeken az ApoE^{-/-} egér atherogén diéta mellett intraperitoneálisan PBS-t kapott (kontroll, N=9), az alsó képeken az ApoE^{-/-} egér atherogén diéta mellett intraperitoneálisan NaSH-t kapott (N=9). (C) Atherogén diétán tartott és PBS-el (kontroll, N=9), illetve NaSH-al injektált egerek aortáinak TBARS tartalmát mértem le (N=9). (D) Normál, illetve atherogén diétán tartott ApoE^{-/-} egerek aortáinak HO-1 mRNS indukcióit real-time qPCR segítségével lemértem. Az atherogén diétán tartott egerek egy része PBS-el (kontroll, N=9), illetve NaSH-al volt kezelve. A relatív HO-1 indukciókat

béta-actinra normalizáltam. Az eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. *** ($p<0,001$), * ($p<0,05$).

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

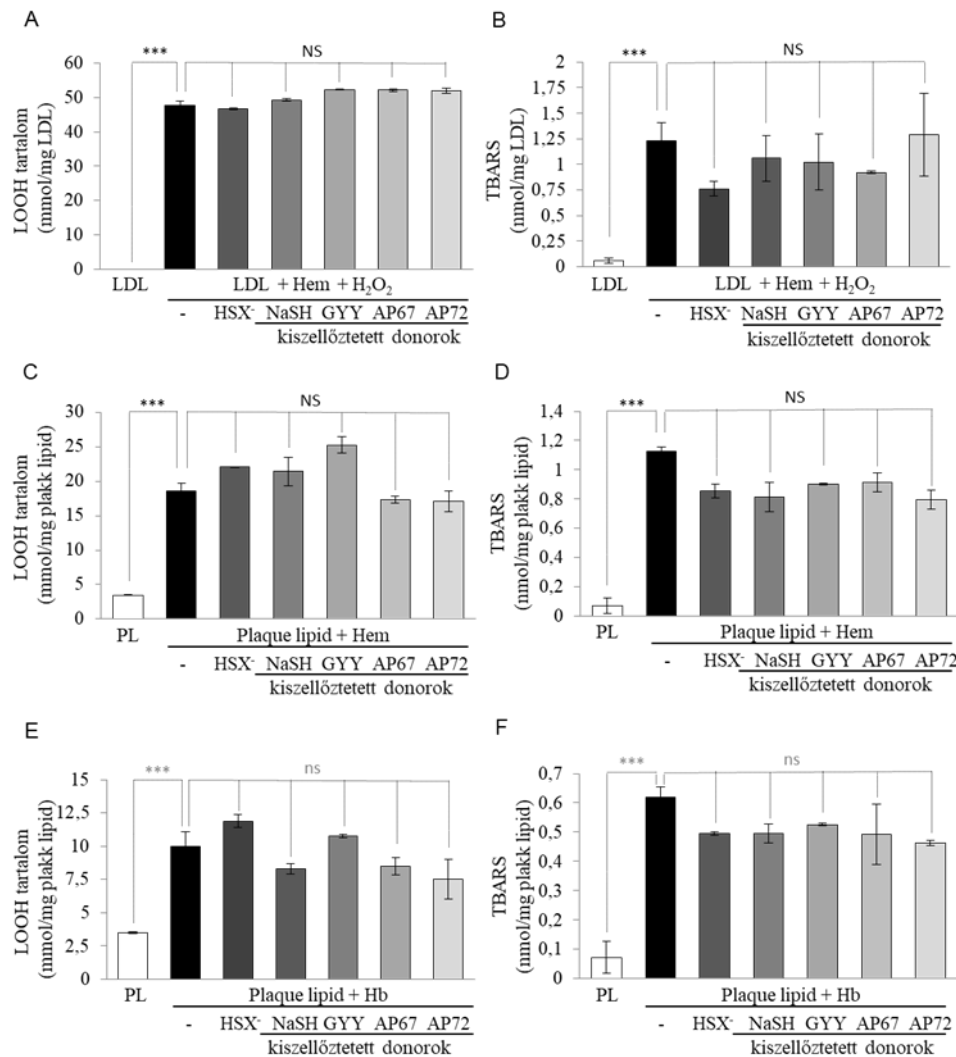
Az állatkísérletekben használt NaSH vegyszer a feloldást követően a kénhidrogént gyorsan bocsátja ki magából. A kutatásom során lehetőséget kaptam újfajta potenciális



16. ábra. A kénhidrogén gátolja a plakk lipidek és az LDL oxidációját. (A-D) Humán plakkból származó lipideket (400 μ g/mL) inkubáltam (A-B panelek) hemmel és vagy (B-C panelek) Hb-al (20 μ mol/L hem csoportra számolva) önmagában, illetve NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72 kénhidrogén donor molekulákkal (200 μ mol/L) 37°C-on 48 órán át. Az inkubálást követően meghatározásra került a minták (A és C panelek) LOOH és (B és D panelek) TBARS tartalma. (E-F) LDL-t (200 μ g/mL) inkubáltam hemmel (5 μ mol/L) és H₂O₂-al (75 μ mol/L) önmagában, illetve NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72 kénhidrogén donor molekulákkal (200 μ mol/L) 37°C-on 90 percig. A kezelést követően meghatározásra került a minták (E) LOOH és (F) TBARS tartalma. Az eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. *** ($p<0,001$), ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$), az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

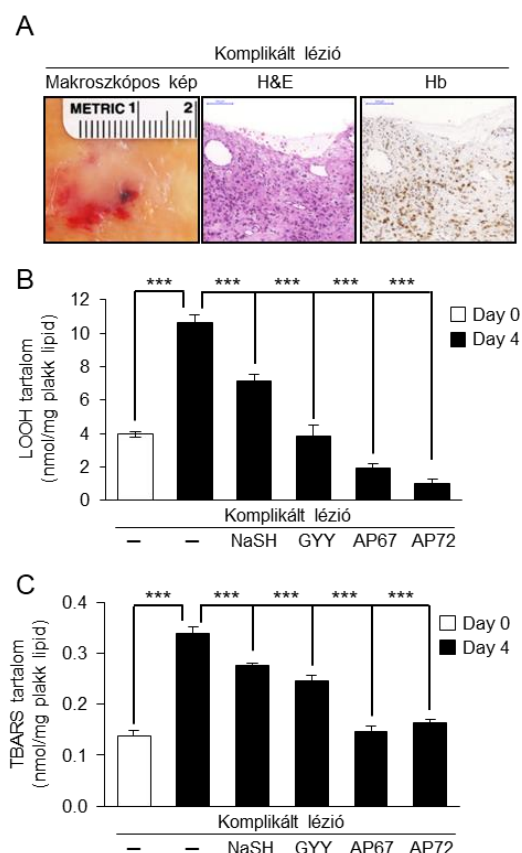
gyógyszermolekulák tesztelésére, amik a kénhidrogént lassan, akár hetekig is képesek kibocsátani. A kutatásban használt szulfid donor molekulákat Matthew Whiteman és Roberta Torregrossa szintetizálták számomra (34, 35). A lipidperoxidációt gátló kísérletekben az alábbi kénhidrogént lassan kibocsátó vegyszereket 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 e lipidperoxidációs markerek szintjének megemelkedését gátolni (16. ábra; A-D panel). Más kísérleteknél humán LDL-t oxidáltam hemmel és H_2O_2 -al, illetve NaSH, GYY4137, AP67, AP72 kénhidrogén donorok jelenlétében. A lipidperoxidáció kénhidrogén donorok általi gátlását LOOH és TBARS tartalmak méréseiből végeztem el. Azt találtam, hogy a donorok eltérő mértékben és dózisfüggő módon gátolták az LDL oxidációját. A lassú donorok közül az AP67 és AP72-es molekula bizonyult a leghatékonyabbnak (16. ábra; E-F panel).

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 (52). Ebből következően felmerült az a kérdés is, hogy nem a kialakuló poliszulfidok okozzák-e a lipidperoxidációban bekövetkező gátlást? Ezekből kifolyólag a kísérleteket megismételtem 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 H_2S donor molekulák nem voltak képesek gátolni a hem indukálta LDL, a hem és Hb indukálta PL oxidációját (17. ábra; A-C panel).



17. ábra. A poliszulfid és a kiszellőztetett donor molekulák nem képesek gátolni a plakk lipidek és az LDL oxidációját. (A-B) LDL (200 µg/mL) inkubálva lett hemmel (5 µmol/mL) és H₂O₂-al (75 µmol/mL) önmagában, illetve HSX-al (200 µmol/mL) vagy kiszellőztetett szulfid donorokkal (200 µmol/mL, NaSH, GYY4137, AP67, AP72) 37°C-on 1 órán át. Kezelést követően mérésre került a minták (A) LOOH és (B) TBARS tartalma. (C-D) Humán atheromából izolált PL (400 µg/mL) inkubálva lett hemmel (5 µmol/mL) önmagában, illetve HSX-al (200 µmol/mL) vagy kiszellőztetett szulfid donorokkal (200 µmol/mL, NaSH, GYY4137, AP67, AP72) 37°C-on 16 órán át. Kezelést követően mérésre került a minták (C) LOOH és (D) TBARS tartalma. (E-F) Humán atheromából izolált PL (400 µg/mL) inkubálva lett Hb-al (20 µmol/mL hem csoportra számítva) önmagában, illetve HSX-al (200 µmol/mL) vagy kiszellőztetett szulfid donorokkal (200 µmol/mL, NaSH, GYY4137, AP67, AP72) 37°C-on 16 órán át. Kezelést követően mérésre került a minták (E) LOOH és (F) TBARS tartalma. Az eredmények 3 független mérés átlagos ±S.D értékét ábrázolják. *** (p<0,001), az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

5.2.4 A KÉNHDROGÉN GÁTOLJA A LIPIDPEROXIDÁCIÓS TERMÉKEK KIALAKULÁSÁT HUMÁN KOMPLIKÁLT LÉZIÓKBAN



18. ábra. A kénhidrogén gátolja a lipidperoxidációt a humán komplikált léziókban. (A) Humán komplikált lézió makroszkópos képe, H&E, illetve Hb festése. (B-C) Humán karotid artéria makroszkóposan látható plakkon belüli bevérvéssel lett homogenizálva. A homogenizátumot (5 mg/mL) önmagában, illetve NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72 kénhidrogén donor molekulákkal (200 μ mol/L) inkubáltam 37°C-on 4 napon keresztül. Kezelést követően mérésre került a minták (B) LOOH és (C) TBARS tartalma. Az eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. *** ($p < 0,001$).

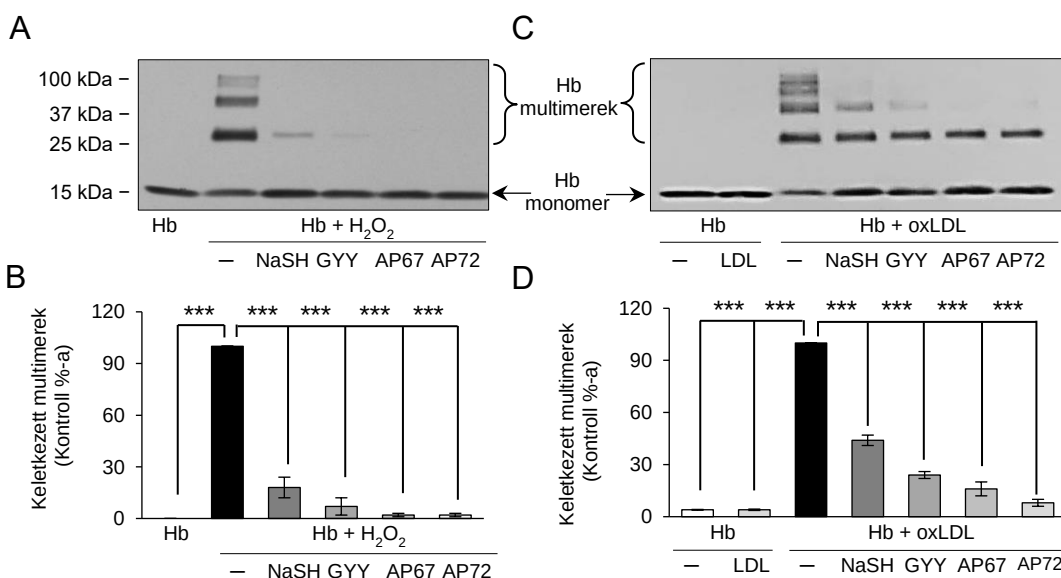
Következő lépésként megvizsgáltam, hogy a bevérvett plakkokban megjelenő ferrylHb indukálta lipidek peroxidációját a különböző kénhidrogént kibocsátó molekulák képesek-e gátolni? A kísérlet során endarterectómiából származó humán bevérvett karotisz plakkokat homogenizáltam, majd a mintákat (5 mg/mL) 37 °C-on inkubáltam NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al (200 μ mol/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 (18. ábra; A-C panel).

5.2.5 A KOVALENSEN KERESZTKÖTÖTT HEMOGLOBIN MULTIMEREK KIALAKULÁSÁT GÁTOLJA A KÉNHDROGÉN

Korábban bebizonyítottam, hogy a kovalensen keresztkötött Hb (ferrylHb) megtalálható a bevérvett

atheroszklerotikus léziókban (53-55), illetve, hogy a kénhidrogén képes a lipidperoxidációt gátolni (16. ábra). Ahhoz, hogy modellezhessem a bevérvett atheroszklerotikus léziókban megfigyelhető ferrylHb kialakulását *in vitro*, Hb-t (5 μ mol/L) inkubáltam H₂O₂-al (75 μ mol/L) és oxLDL-el (50 μ g/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 $\mu\text{mol/L}$) 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 H_2O_2 -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 (19. ábra; A-D panel).



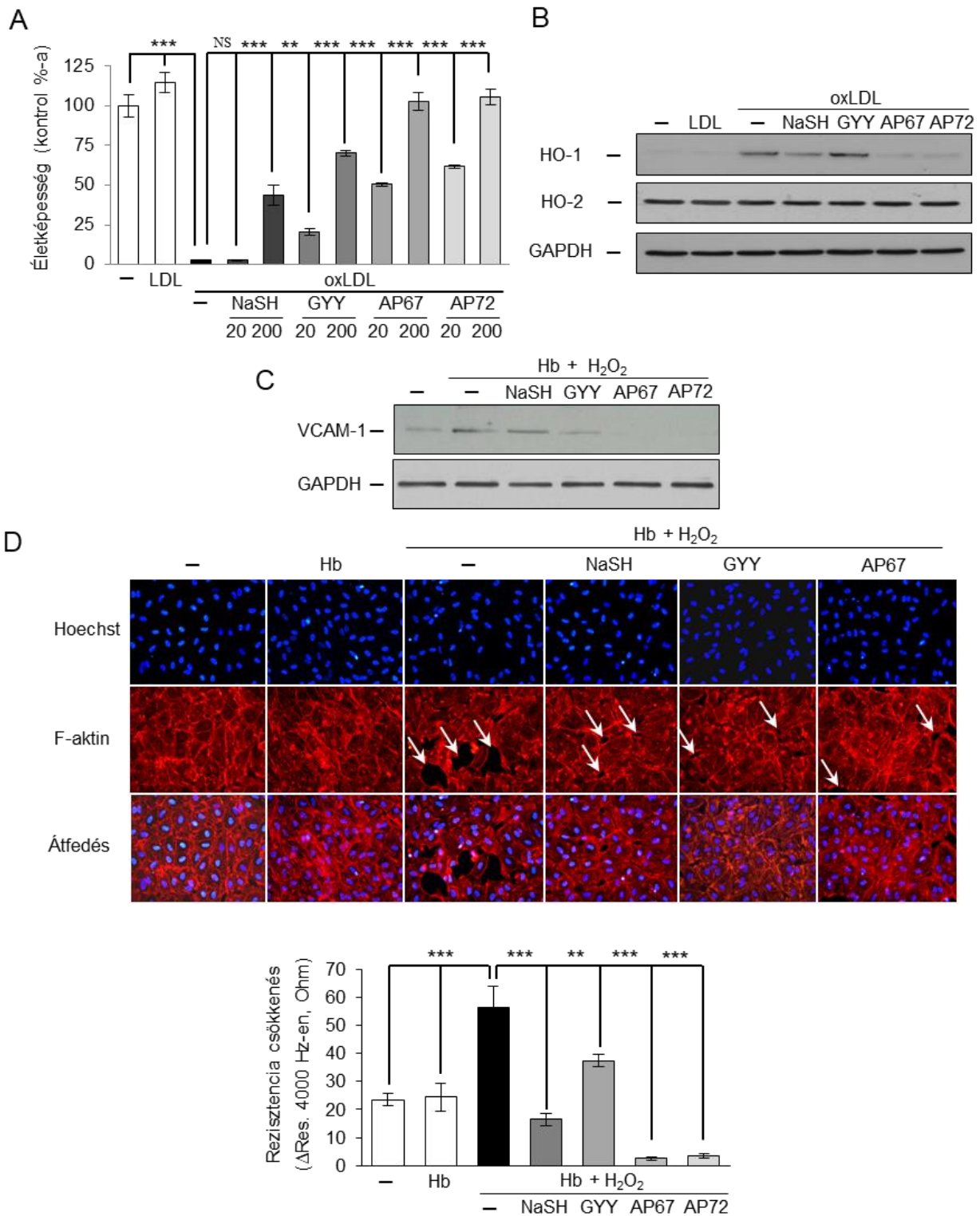
19. ábra. A kénhidrogén gátolja a ferrylHb kialakulását (A) Hb (5 $\mu\text{mol/L}$) inkubálva lett H_2O_2 -al (75 $\mu\text{mol/L}$) önmagában, illetve NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72 kénhidrogén donor molekulákkal (200 $\mu\text{mol/L}$) 37°C-on 90 percen keresztül. 0,5 μg Hb mintákat western blottal futtattam meg és a kialakuló keresztkötött Hb-t humán anti-Hb antitesttel detektáltam. (B és D panelek) A Hb multimerek quantálása ImageJ szoftverrel történt. (C) Hb-t (5 $\mu\text{mol/L}$) inkubáltam oxLDL-el (50 $\mu\text{g/mL}$) önmagában, illetve NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72 kénhidrogén donor molekulákkal (200 $\mu\text{mol/L}$) 37°C-on 4 órá át. 0,5 μg Hb mintákat western blottal futtattam meg és a kialakuló keresztkötött Hb-t humán anti-Hb antitesttel detektáltam. Az eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. *** ($p < 0,001$).

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

Az eddigi eredményeim bizonyítják, hogy a bevezetett 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 $\mu\text{g/mL}$) inkubáltam NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al (20 és 200 $\mu\text{mol/L}$) 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 $\mu\text{mol/L}$ -os koncentrációban nem, de 20 $\mu\text{mol/L}$ -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 $\mu\text{mol/L}$ -os koncentrációban a sejttöxicitást teljes mértékben megakadályozták (20. ábra; A panel). Az oxidatív stressz kísérletekben oxLDL-t (200 $\mu\text{g/mL}$) inkubáltam NaSH, GYY4137, AP67, AP72-al (20 és 200 $\mu\text{mol/L}$) 24 órán át. Ezt követően a HAoEC sejteket inkubáltam szubletális dózisú LDL mintákkal (50 $\mu\text{g/mL}$) 8 órán át. A sejteket lizálás után western blot technika segítségével megfuttattam. A mintákból a HO-1 stresszfehérje, a konstitutívan expresszálandó HO-2 fehérje és a fehérje normalizálásra használt GAPDH fehérje expressziós változásait követtem nyomon. A szubletális dózisú oxLDL (50 $\mu\text{g/mL}$) 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 (20. ábra; B panel). Önmagában a 200 $\mu\text{mol/L}$ -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 adhézis molekuláinak expresszióját, illetve felszakítja a sejt-sejt kapcsolatot (20). 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 $\mu\text{mol/L}$) inkubáltam H_2O_2 -al (50 $\mu\text{mol/L}$) NaSH, GYY4137, AP67, AP72 (200 $\mu\text{mol/L}$) 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 adhézis molekula 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 (20. ábra; C panel). Immunofluoreszcens technika segítségével

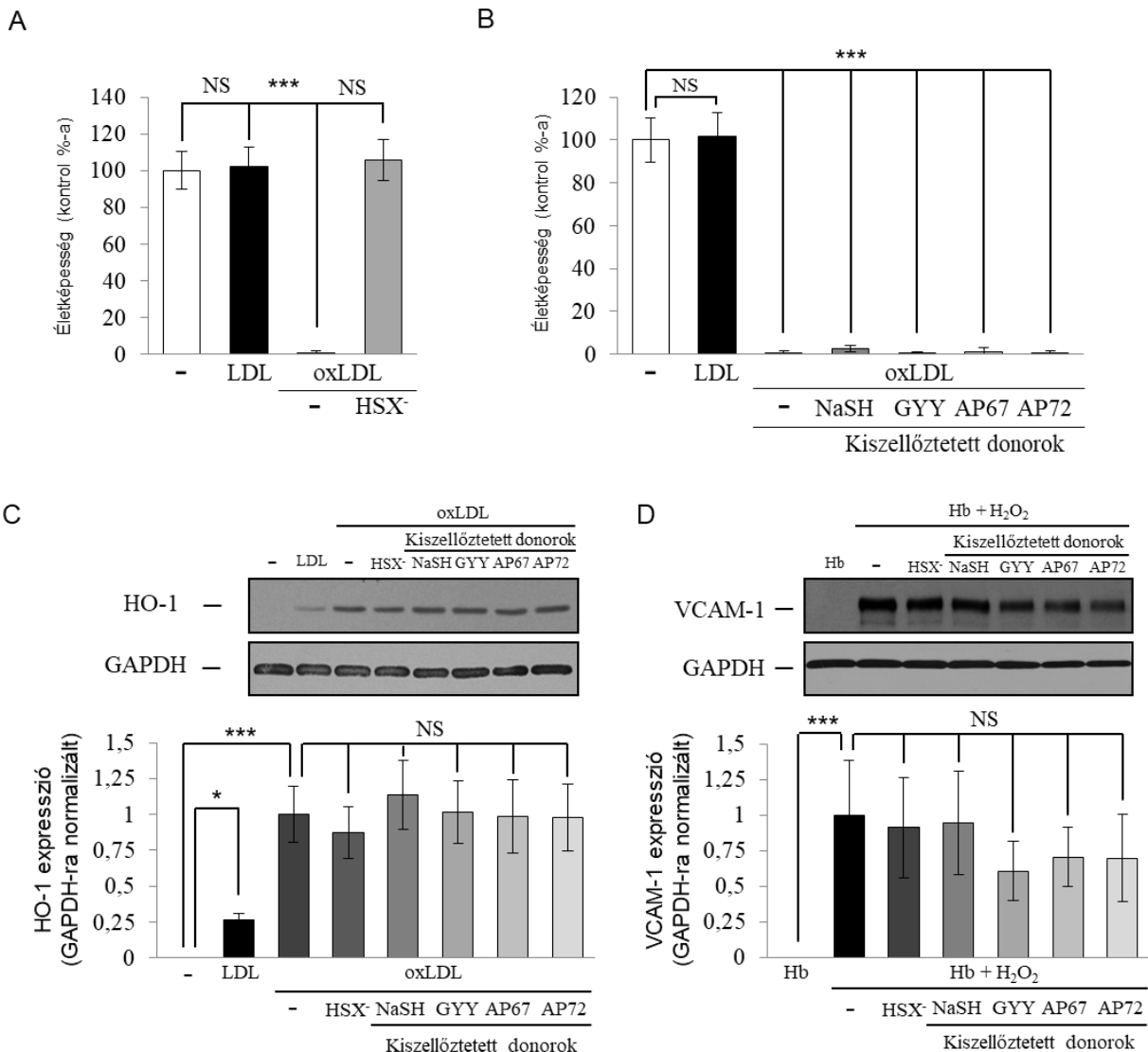
kimutattam, hogy a ferrylHb a HaoEC sejtek konfluenciáját felbontja, ezt a hatást az NaSH, GYY4137 és az AP67 is gátolta (20. ábra; D felső panel).



20. ábra. A Hb-lipid interakció során fellépő endotél sejtek aktivációját gátolja a kénhidrogén. (A) OxLDL (200 $\mu\text{g/mL}$) inkubálva lett NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72-el (20 és 200 $\mu\text{mol/L}$) 37°C-on 24 órán át. Konfluens HAoEC sejteket kezeltem az LDL (200 $\mu\text{g/mL}$) mintákkal 4 órán át. A kezelést követően a HAoEC sejtek sejtvitalitása MTT módszer segítségével került le mérésre. (B) OxLDL (200 $\mu\text{g/mL}$) inkubálva lett NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72-el (20 és 200 $\mu\text{mol/L}$) 37°C-on 24 órán át. Konfluens HAoEC sejtek kezelésére kerültek az LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) mintákkal 8 órán át. HO-1 és HO-2 fehérjék expressziók mértéke western blot technikával került meghatározásra. (C-D) Hb (10 $\mu\text{mol/L}$) inkubálva lett H_2O_2 -al (50 $\mu\text{mol/L}$) önmagában, illetve NaSH, GYY4137 (GYY), AP67 és AP72-el (200 $\mu\text{mol/L}$) 37°C-on 90 percen át. (C) Konfluens HAoEC sejteket kezeltem a Hb mintákkal 8 órán át. A kezelést követően a sejtek VCAM-1 fehérje expresszióját western blottal határoztam meg. A western blottokat GAPDH-ra újra előhívtam. (D, felső panel) HAoEC sejteket 24-lyukú tenyésztőedénybe rakott tárgylemezen növesztettem a teljes konfluencia eléréséig. Ezt követően a sejteket a Hb mintákkal kezeltem 8 órán keresztül 37°C-on. A kezelést követően a sejteket fixáltam az immunofluoreszcens vizsgálathoz. A sejtek F-aktinját (phalloidin-TRITC, piros) és DNS-ét (Hoechst, kék) megfestettem. A fehér nyilak a kezelés során keletkezett sejtek közötti lyukakat mutatják. (D, alsó panel) Konfluens HAoEC sejteket kezeltem a Hb mintákkal, a sejtek transzendentális elektromos rezisztenciáját 3 órán át monitoroztam ECIS impedancia mérő segítségével. Az eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

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 H_2O_2 -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 (20. ábra; D alsó panel). Az eredmények azt bizonyítják, hogy a kénhidrogén képes meggátolni a ferrylHb indukálta endotél sejtek aktivációját azáltal, hogy magát a ferrylHb kialakulását gátolja.

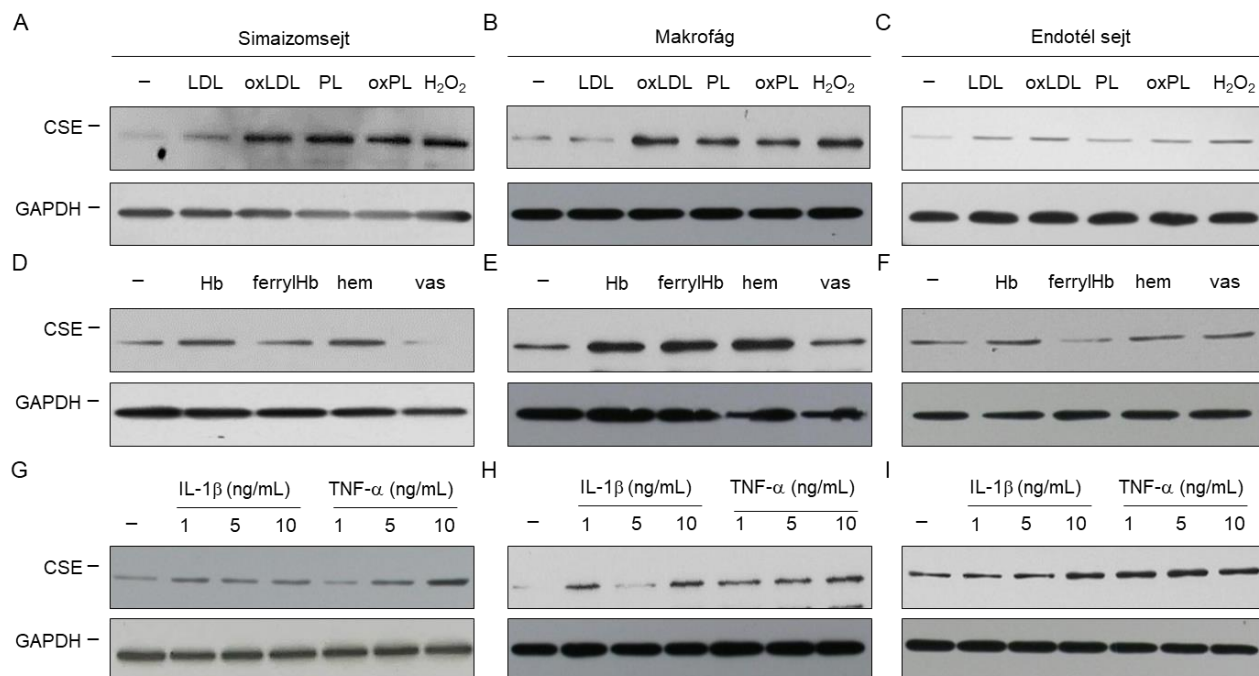
Végül a poliszulfidok és a kiszellőztetett donor molekulák hatását is megvizsgáltam a ferrylHb indukálta endotél sejtek aktivációjában. Meglepő módon kimutattam, hogy a poliszulfid képes volt meggátolni az oxLDL toxikus hatását (21. ábra; A panel). Ennek hátterében úgy vélem, hogy a poliszulfid gyökfogó 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 (21. ábra; B panel). 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 (21. ábra; C és D panel).



21. ábra. A polisulfid és a kiszellőztetett szulfid donorok nem képesek megakadályozni a Hb-lipid interakció során kialakuló endotél sejtek aktivációját. OxLDL (200 µg/mL) inkubálva lett (A) HSX⁻-al (200 µmol/mL) vagy (B) kiszellőztetett NaSH, GYY4137 (GY), AP67 és AP72-el szulfid donorokkal (200 µmol/mL) 37°C-on 16 órán keresztül. Az EC sejteket 6 órán át kezeltem a mintákkal. A kezelést követően az EC sejtek életképességét MTT módszerrel meghatároztam. (C) OxLDL (200 µg/mL) inkubálva lett HSX⁻-al (200 µmol/mL), illetve kiszellőztetett NaSH, GYY4137 (GY), AP67 és AP72-el szulfid donorokkal (200 µmol/mL) 37°C-on 16 órán keresztül. EC sejteket kezeltem 50 µg/mL HSX⁻-al vagy 50 µg/mL kiszellőztetett NaSH, GYY4137 (GY), AP67 és AP72-el szulfid donorokkal előkezelt oxLDL mintákkal 8 órán keresztül. HO-1 fehérje expresszióját western blottal meghatároztam. A fehérje expressziók relatív denzitása ImageJ szoftverrel lett meghatározva. (D) Hb (10 µmol/mL) inkubálva lett H₂O₂-al (50 µmol/mL) önmagában, illetve HSX⁻-al (200 µmol/mL) vagy kiszellőztetett NaSH, GYY4137 (GY), AP67 és AP72-el szulfid donorokkal (200 µmol/mL) 37°C-on 90 percig. Az EC sejteket 8 órán át kezeltem a mintákkal. VCAM-1 fehérje expressziója western blottal lett meghatározva. A fehérje expressziók relatív denzitása ImageJ szoftverrel lett meghatározva. Az eredmények 3 független mérés átlagos ±S.D értékét ábrázolják. *** (p<0,001), * (p<0,05), az NS jelzés a nem szignifikáns eredményt mutatja.

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 (56), simaizomsejtek (57, 58) és az endotél sejtek is (59). 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 plakkokban megtalálhatóak. Ezek három csoportra oszthatóak: lipidek (LDL, oxLDL, PL, oxPL), a bevérzéses plakkban megtalálható: Hb, ferrylHb, heme, vas, illetve citokinek: TNF- α és IL-1 β . A kezeléseket során a H₂O₂-öt mint pozitív kontroll használtam, a szakirodalom alapján a H₂O₂ megemeli a CSE fehérje expresszióját (33). 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 (22. ábra; A-C panelek). Továbbá, a Hb és heme megemeli a CSE expresszióját simaizomsejtekben és makrofágokban (22. ábra; D és E panelek). A vas kezelés hatására a CSE szintje lecsökken a simaizomsejtekben (22. ábra; D). 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 (22. ábra; G-I panel).



22. ábra. A cisztation- γ -liáz expressziójának modulátorai simaizomsejtekben, makrofágokban és endotél sejtekben. (A) Konfluens simaizomsejtek, (B) makrofágokat és (C) EC sejteket LDL-el (50 $\mu\text{g/mL}$), oxLDL-el (50 $\mu\text{g/mL}$), PL-el (500 $\mu\text{g/mL}$), oxPL-el (500 $\mu\text{g/mL}$) vagy H_2O_2 -al (100 $\mu\text{mol/L}$)-al kezeltem 8 órán keresztül. (D) konfluens simaizomsejteket, (E) makrofágokat és (F) EC sejteket kezeltem Hb-al (50 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számolva), ferrylHb-al (50 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számolva), hemmel (50 $\mu\text{mol/L}$ hem csoportra számolva) vagy vassal (vas-ammónium citrát; 50 $\mu\text{mol/L}$) 8 órán keresztül. (G) Konfluens simaizomsejteket, (H) makrofágokat és (I) EC sejteket inkubáltam IL-1 β (1-5-10 ng/mL) vagy TNF- α -val (1-5-10 ng/mL) 8 órán keresztül. Az eredmények 3 független mérés átlagos $\pm$ S.D értékét ábrázolják. Az immunoblottokat GAPDH-ra újraráhítottam.

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 (60, 61). 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 (62, 63), illetve patológiás körülmények között is megtalálható az emberi vérben (64). Korábban kimutatták, hogy a kovalensen keresztkötött ferrylHb megtalálható az emberi bevezett érlelmeszesedéses lézióban (13). Habár a ferrylHb ki lett mutatva az érlelmeszesedéses léziókban, annak szerepéről, illetve az érlelmeszesedés folyamatában betöltött szerepéről még keveset tudunk. A kutatásom első felének a célja a ferrylHb létrejöttének és szerepének vizsgálata volt az érlelmeszesedéses léziókban.

Az LDL szubendoteliális térben történő felhalmozódása, annak oxidációja során kialakuló oxLDL hatására kialakuló immunválasz az érlelmeszesedés kiindulásának kezdeti lépése (65). Kimutatták, hogy az érfalban felhalmozódó oxLDL, apoptotikus sejtek és a módosult fehérjék a miokardiális infarktus és az agyvérzés kialakulásához vezetnek (66). 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 potenciónális oxidatív anyagokat. A Hb erős oxidatív károsodást képes előidézni az atheroszklerotikus léziókban. Kétféle mechanizmust írtak le, ami alapján a Hb megjelenhet az érlelmeszesedéses plakkokban. Az egyik a plakk intima felőli részén történő ruptúra miatt, a másik a plakkon belüli bevezés létrejötté végett (67-69). A plakkon belüli bevezés elsősorban a kicsi neovaszkularizált erek felszakadásából ered, ezek az erek adventitia része felől nőnek be a plakk belseje felé a plakkban bekövetkező oxidációs folyamatok során fellépő hypoxia és a hypoxia következtében szekretálódó vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) miatt (70, 71). Továbbá kimutatták, hogy a plakkon belüli bevezés hozzájárul a plakk meggyengüléséhez, annak felszakadásához, ami így közvetlenül hozzájárul az érlelmeszesedéshez

kapcsolható akut klinikai tünetek megjelenéséhez (72). 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 plakkban található oxidatív anyagok, mint például az oxLDL hatására. A Hb oxidációja során a globin felszakadása miatt a benne található hem is kiszabadul és degradálódik (73). Korábban kimutatták, hogy mind a humán atheromatous léziókból extrahált lipidek, mind az oxLDL a VVT-ket lizálja, illetve a Hb képesek oxidálni (13). 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) (8. ábra). Hb és H_2O_2 inkubálása során a keletkező globin gyökök iniciálják az LDL oxidációját (74). 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 (75, 76). 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 (8. ábra) (74). 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 (77, 78), illetve az intact VVT-ékben (79). Ezekben a komplex reakciókban Hb formák keletkeznek, mint például a metHb és ferrylHb (15, 80). A ferrylHb-ban lévő Fe^{4+} nem stabil, képes reakcióba lépni specifikus aminosavakkal a globin láncokon, melynek során globin gyökök keletkeznek (16, 17). A keletkezett globin gyökök egymással képesek kovalensen összekötődni, így alkotva Hb dimereket, tetramereket és multimereket (11. ábra) (81). Továbbá kimutatták, hogy a klasszikus

reaktív oxigén metabolitok, organikus peroxidok is képesek a VVT-ék membránjának felszakítására, ezáltal a Hb kiszabadulását követően metHb generálására (82, 83). Korábban kimutatták, hogy ferrylHb képes keletkezni a VVT-ék lizálása után LDL-el történő reakció során (84, 85). Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy az oxLDL, de nem a native LDL a Hb oxidációja és a kovalensen keresztkötött ferrylHb létrejöttéhez vezet (11. ábra). 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 (12. ábra). Ez az eredmény azt mutatja, hogy az oxLDL LOOH köztes lipidperoxidációs termék tartalma a felelős a Hb oxidációjáért.

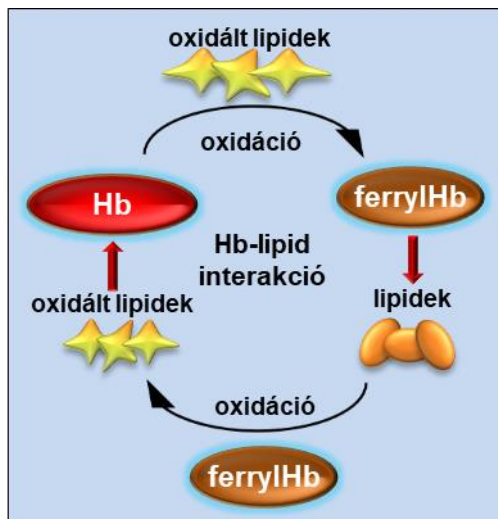
Intravaszkuláris és extravaszkuláris hemolízis és bevérzés során a VVT-ékből kiszabaduló Hb képes nagy affinitással asszociálódni a Hp-hoz (47, 86, 87). A Hp-hoz kötött Hb-t a monociták és a rezidens makrofágok eltávolítják a reticuloendoteliális rendszeren át a CD163 szkevendzser receptoron keresztül (48). 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 (61). Ezzel párhuzamosan megnő a ferritin expressziója és a hemből kiszabaduló vasat elraktározza (48, 88). CD163 receptor és HO-1 közötti kolokalizációt korábban kimutatták neovaszkularizált atheroszklerotikus léziókban megfigyelhető makrofágok szubpopulációiban (88), illetve bevérzett léziókban (89). A makrofágok ezen alcsoportja gyorsan képes degradálni a Hb-t, kevesebb reaktív gyököt termelve és nagyobb mennyiségben termelik az anti-inflammatorikus IL-10 citokint. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a bevérzéshez kapcsolható makrofágok anti-inflammatorikus irányban polarizált makrofágok, ezáltal atheroprotektív hatásúak (90, 91). 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 (81). 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-protektív hatással társul a bevérzett plakkokban lévő makrofágokban (81, 91). A ferrylHb felvételének a hiánya szabad hem jelenlétét okozza, ami programozott nekrozishoz és apoptotikus makrofágok és egyéb plakkban található rezidens sejtek apoptózisát okozza (92, 93). Összességében elmondható, hogy a Hp képes megakadályozni a Hb oxidációját, ezáltal gátolja a hem kiszabadulását a Hb-ből (74, 94, 95).

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 (96). Ezen megfigyelést mi is alátámasztottuk a kísérleteinkben. Kimutattuk, hogy az oxLDL mediálta Hb oxidációját és a kovalensen keresztkötött Hb multimerek kialakulását a Hp gátolta (12. ábra).

Az endotél sejtek aktivációja és károsodása összekapcsolható atheroszklerózis iniciációjával és progressziójával (97). 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 (37), melynek során citotoksikus LOOH és 4-HNE keletkezik (39, 98). Munkám során kimutattam, hogy a ferrylHb citotoxikus hatású az endotél sejtekre nézve azáltal, hogy iniciálja az LDL oxidációját, és szenzitálja az endotél sejteket H₂O₂ mediálta módon (9. ábra). 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 (10. ábra). A HFT a vasat vas³⁺ 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 (10. ábra).

Kimutatták, hogy a Hb oxidációja során keletkező ferrylHb proinflammatorikus tulajdonságú az endotél sejtekre nézve (20). A ferrylHb hatására az endotél sejtek actin sejtváza átrendeződik, melynek során a sejtek konfluenciája felszakad és lyukak alakulnak ki közöttük (20). A kezelt sejtekben a pro-inflammatorikus gének, mint például az ICAM-1, E-selectin és VCAM-1 indukciója megnő (20). 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 (13. ábra). 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 (13. ábra). 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 (10. ábra).



23. ábra. Hemoglobin-lipid interakciók az érlemezsedéses léziókban.

Összegzésképpen, munkám első felében kimutattam, hogy a humán atheromában lévő lipidek interakcióba lépnek a bevézés során megjelenő VVT-hez nem asszociálódott Hb-al, így provokálva egy ördögi kört, ahol a plakkban található lipidek és Hb oxidációja egymásra hatva idézik elő az endotél sejtek aktivációját, ami az endotél sejtek toxicitásához vezet (23. ábra).

A különböző biológiai rendszerekben a kénhidrogén nem csak antioxidáns (rekaktiv oxigén intermedierek megkötése) képességgel rendelkezik, hanem sejtes adaptációban, metabolikus szabályozásban, sejthalál szignalizációban, oxidatív stressz szabályozásában, enzim folyamatokban, illetve a fehérjék intramolekuláris szerkezetének változtatásában is szerepet játszik (99). 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 bevézés során kialakuló ferrylHb oxidatív stressz lévén hozzájárul a kialakult komplikált léziók patofiziológiai változásához (13). Korábban kimutatták, hogy a ferrylHb proinflammatorikus hatású az EC sejtekre nézve (20). Kísérleteim során elvégeztem a Hb oxidációjának kénhidrogén donorokkal történő gátlását (19. ábra). 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 (20. ábra).

Az oxidált Hb formák képesek elengedni heme csoportjukat, ezáltal indukálják a lipidperoxidációt (39, 46). Kutatásom során kimutattam, hogy a kénhidrogén donor molekulák gátolják a Hb, illetve a heme indukálta humán atheromából izolált plakk lipidek oxidációját (16. ábra). Továbbá azt is kimutattam, hogy a humán komplikált léziókban zajló lipidperoxidációs folyamatokat is képesek gátolni a kénhidrogént kibocsátó molekulák (18. ábra). Kémiaiilag a H₂S

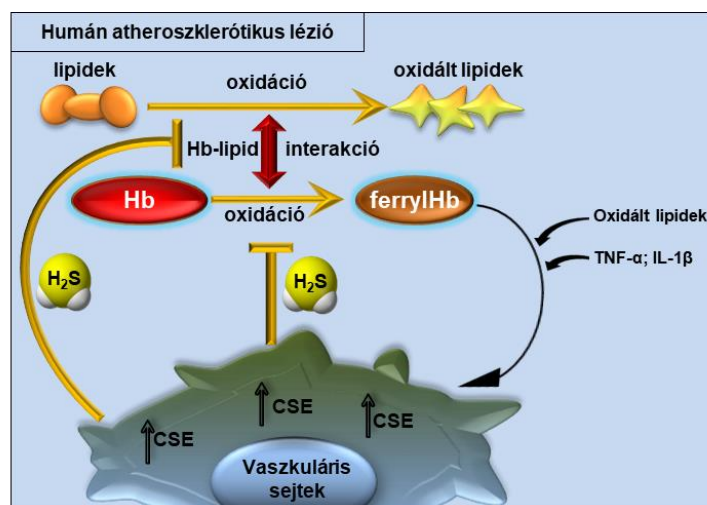
redukáló szer. Korábbi kutatás kimutatta, hogy a kénhidrogén a LOOH-t átalakítja lipid-alkohollá *in vitro* (100). Ezt a megfigyelést *ex vivo* kísérlettel is alá tudtam támasztani. A humán komplikált lézió LOOH tartalmát a kénhidrogén képes volt a kiinduláskor mért LOOH szint alá csökkenteni (18. ábra).

Az endogén kénhidrogén termelésért felelős fő enzimünk a kardiovaszkuláris szövetekben a CSE (101). 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 (14. ábra). Érdekeséggéppen a komplikált léziókban a CSE fehérje expressziója alacsonyabb az atheromában megfigyelhető expressziós szinthez képest (14. ábra). Továbbá a humán karotisz artériákból termelhető kénhidrogén szintje nem volt szignifikánsan magasabb az egészséges érszakaszhoz viszonyítva (14. ábra).

Az atheroszklerotikus plakk nagy mennyiségben tartalmaz reaktív oxigén mediátorokat, reaktív lipid mediátorokat, proinflammatorikus citokineket, illetve plakk bevérvése során keletkező Hb oxidációs termékeket. Az érlemezsedéses 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 (22. ábra). Mivel a humán atheromában és komplikált léziókban ezek a mediátorok megtalálhatóak, így azok hozzájárulnak az általam is megfigyelt megemelkedett CSE expressziókhoz (14. ábra).

Korábban Wang, Mani és társaik bemutatták, hogy a kénhidrogén gátolja az ApoE^{-/-} egerekben az atheroszklerotikus léziók kialakulását (102, 103). 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 (15. ábra). 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 (102, 103). *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 (15. ábra).

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 (14. ábra). 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 (15. és 18. ábra). 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 nyújtana a kénhidrogén hatásának a vizsgálatára a prooxidáns és proinflammatorikus tulajdonsággal bíró ferrylHb kialakulásának 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.



24. ábra. A kénhidrogén hatása az érlelmeszesedéses léziókban megfigyelhető hemoglobin-lipid interakciókra.

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 (24. ábra).

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 összekötődve 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 progresszóját gyorsítja, míg a kénhidrogént kibocsájtó molekulák a ferrylHb hatásának és kialakulásának gátlásán keresztül atheroprotektív hatással bír.

8. SUMMARY

Accumulation and oxidation of lipids in the vascular wall are major inducers of atherosclerosis. As a result of lipid peroxidation, small blood vessels grow in the atheromatous plaque from the *vasa vasorum*. The endothelial cell layer of these small vessels ruptures upon contact with cytotoxic lipid peroxidation products, and the RBCs in the vessels enter the plaque, creating complicated atherosclerotic lesions. RBCs lyse on contact with oxidized lipids in atheromatous plaque, following this the released Hb from RBCs is oxidized to ferrylHb. FerrylHb contains radicals in both the α and β globin chains that covalently bond to each other to form globin dimers, tetramers, and multimers. In addition to the pro-inflammatory effect of ferrylHb, it also causes rupture of the monolayer of endothelial cells.

H₂S is the most recently discovered member of endogenous gas transmitters. It is involved in the regulation of multiple physiologically significant processes. From a therapeutic point of view, drug molecules that release hydrogen sulfide under controlled conditions in a stable, prolonged, and low physiological concentration appear to be promising in the prevention and treatment of cardiovascular disease.

In the first half of the study, which formed the basis of the doctoral dissertation, we modeled the conditions for the formation of ferrylHb. We found that ferrylHb can induce oxidative stress and cell death in EC cells through the oxidation of LDL. Moreover, we also demonstrated that ferrylHb disrupts the confluent layer of EC cells.

In the second part of the research, we showed that the expression of the CSE enzyme, which is responsible for hydrogen sulfide production, increased in the human carotid artery as well as in the aorta of ApoE^{-/-} mice fed with an atherogenic diet. We demonstrated that H₂S inhibits lipid peroxidation both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we presented that H₂S inhibited atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice fed an atherogenic diet, whereas pharmacological inhibition of the CSE enzyme increased the progression of plaque formation. The formation of ferrylHb was shown to be inhibited by H₂S. We also demonstrated that H₂S prevented the rupture of the EC monolayer exposed to ferrylHb.

In summary, ferrylHb accelerates the progression of atherosclerosis, whereas hydrogen sulfide-releasing molecules have an atheroprotective effect by inhibiting the action and formation of ferrylHb.

9. IRODALOMJEGYZÉK

(REFERENCIA)

1. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Jr., Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1992;85(1):391-405.
2. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89(5):2462-78.
3. Sokolis DP, Boudoulas H, Karayannacos PE. Segmental differences of aortic function and composition: clinical implications. *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese*. 2008;49(3):145-54.
4. Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1992;421(4):277-90.
5. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature medicine*. 2002;8(11):1235-42.
6. Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and iron-mediated reactions. *Journal of lipid research*. 1993;34(3):479-90.
7. Li L, Hamilton RF, Jr., Kirichenko A, Holian A. 4-Hydroxynonenal-induced cell death in murine alveolar macrophages. *Toxicology and applied pharmacology*. 1996;139(1):135-43.
8. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990;344(6263):254-7.
9. Li W, Ostblom M, Xu LH, Hellsten A, Leanderson P, Liedberg B, et al. Cytocidal effects of atheromatous plaque components: the death zone revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(13):2281-90.
10. Barger AC, Beeuwkes R, 3rd, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 1984;310(3):175-7.
11. Moreno PR, Purushothaman KR, Zias E, Sanz J, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Current molecular medicine*. 2006;6(5):457-77.
12. Michel JB, Martin-Ventura JL, Nicoletti A, Ho-Tin-Noe B. Pathology of human plaque vulnerability: mechanisms and consequences of intraplaque haemorrhages. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):311-9.
13. Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, et al. Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(7):1347-53.
14. Harel S, Kanner J. The generation of ferryl or hydroxyl radicals during interaction of haemproteins with hydrogen peroxide. *Free radical research communications*. 1988;5(1):21-33.

15. Patel RP, Svistunenko DA, Darley-Usmar VM, Symons MC, Wilson MT. Redox cycling of human methaemoglobin by H₂O₂ yields persistent ferryl iron and protein based radicals. *Free radical research*. 1996;25(2):117-23.
16. Deterding LJ, Ramirez DC, Dubin JR, Mason RP, Tomer KB. Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidiny radical. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(12):11600-7.
17. Ramirez DC, Chen YR, Mason RP. Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(7):830-9.
18. Lardinois OM, Detweiler CD, Tomer KB, Mason RP, Deterding LJ. Identifying the site of spin trapping in proteins by a combination of liquid chromatography, ELISA, and off-line tandem mass spectrometry. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(5):893-906.
19. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9285-9.
20. Silva G, Jeney V, Chora A, Larsen R, Balla J, Soares MP. Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(43):29582-95.
21. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(13):1792-8.
22. Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(33):22457-66.
23. Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, et al. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(4):703-14.
24. Kabil O, Vitvitsky V, Xie P, Banerjee R. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(2):363-72.
25. Jeney V, Komodi E, Nagy E, Zarjou A, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Suppression of hemin-mediated oxidation of low-density lipoprotein and subsequent endothelial reactions by hydrogen sulfide (H₂S). *Free radical biology & medicine*. 2009;46(5):616-23.
26. Mani S, Untereiner A, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(5):805-17.
27. Wang Y, Zhao X, Jin H, Wei H, Li W, Bu D, et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(2):173-9.
28. Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(25):2523-34.
29. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annual review of pathology*. 2006;1:297-329.
30. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on A. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129-38.
31. Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB journal* :

- official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2005;19(9):1196-8.
32. Fox B, Schantz JT, Haigh R, Wood ME, Moore PK, Viner N, et al. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H₂S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012;16(4):896-910.
 33. Wang M, Guo Z, Wang S. Cystathionine gamma-lyase expression is regulated by exogenous hydrogen peroxide in the mammalian cells. *Gene expression*. 2012;15(5-6):235-41.
 34. Chitnis MK, Njie-Mbye YF, Opere CA, Wood ME, Whiteman M, Ohia SE. Pharmacological actions of the slow release hydrogen sulfide donor GYY4137 on phenylephrine-induced tone in isolated bovine ciliary artery. *Experimental eye research*. 2013;116:350-4.
 35. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12(10):1147-54.
 36. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-74.
 37. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9285-9.
 38. Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods in enzymology*. 1990;186:265-72.
 39. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*. 2002;100(3):879-87.
 40. Nagy E, Jeney V, Yachie A, Szabo RP, Wagner O, Vercellotti GM, et al. Oxidation of hemoglobin by lipid hydroperoxide associated with low-density lipoprotein (LDL) and increased cytotoxic effect by LDL oxidation in heme oxygenase-1 (HO-1) deficiency. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2005;51(4):377-85.
 41. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676-82.
 42. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1852-8.
 43. Gilboa-Garber N. Direct spectrophotometric determination of inorganic sulfide in biological materials and in other complex mixtures. *Analytical biochemistry*. 1971;43(1):129-33.
 44. Ang AD, Konigstorfer A, Giles GI, Bhatia M. Measuring free tissue sulfide. *Advances in Biological Chemistry*. 2012;Vol.02No.04:6.
 45. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1852-8.
 46. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology*. 1991;11(6):1700-11.
 47. Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafraneck T, Levy NS, Ricklis RM, et al. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood*. 2001;98(13):3693-8.
 48. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409(6817):198-201.

49. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(7):1957-97.
50. Negre-Salvayre A, Garoby-Salom S, Swiader A, Rouahi M, Pucelle M, Salvayre R. Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free radical biology & medicine*. 2017;111:127-39.
51. Gargiulo S, Gamba P, Testa G, Rossin D, Biasi F, Poli G, et al. Relation between TLR4/NF-kappaB signaling pathway activation by 27-hydroxycholesterol and 4-hydroxynonenal, and atherosclerotic plaque instability. *Aging cell*. 2015;14(4):569-81.
52. Greiner R, Pálinkás Z, Bäsell K, Becher D, Antelmann H, Nagy P, et al. Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(15):1749-65.
53. Gáll T, Pethő D, Nagy A, Hendrik Z, Méhes G, Potor L, et al. Heme Induces Endoplasmic Reticulum Stress (HIER Stress) in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1595.
54. Posta N, Csősz É, Oros M, Pethő D, Potor L, Kalló G, et al. Hemoglobin oxidation generates globin-derived peptides in atherosclerotic lesions and intraventricular hemorrhage of the brain, provoking endothelial dysfunction. *Laboratory Investigation*. 2020;100(7):986-1002.
55. Zavaczki E, Gáll T, Zarjou A, Hendrik Z, Potor L, Tóth CZ, et al. Ferryl Hemoglobin Inhibits Osteoclastic Differentiation of Macrophages in Hemorrhaged Atherosclerotic Plaques. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020:3721383.
56. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *Journal of internal medicine*. 2000;247(3):349-58.
57. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13531-6.
58. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):692-702.
59. Gimbrone MA, Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):620-36.
60. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama*. 2005;293(13):1653-62.
61. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2008;86(10):1097-111.
62. Svistunenko DA, Patel RP, Voloshchenko SV, Wilson MT. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(11):7114-21.
63. Vollaard NB, Reeder BJ, Shearman JP, Menu P, Wilson MT, Cooper CE. A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo. *Free radical biology & medicine*. 2005;39(9):1216-28.
64. Reeder BJ, Sharpe MA, Kay AD, Kerr M, Moore K, Wilson MT. Toxicity of myoglobin and haemoglobin: oxidative stress in patients with rhabdomyolysis and subarachnoid haemorrhage. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(4):745-8.
65. Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(12):2311-6.

66. Leibundgut G, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidation-specific epitopes and immunological responses: Translational biotheranostic implications for atherosclerosis. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(2):168-79.
67. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004;110(14):2032-8.
68. Levy AP, Moreno PR. Intraplaque hemorrhage. *Current molecular medicine*. 2006;6(5):479-88.
69. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *European heart journal*. 2013;34(10):719-28.
70. Alpern-Elran H, Morog N, Robert F, Hoover G, Kalant N, Brem S. Angiogenic activity of the atherosclerotic carotid artery plaque. *Journal of neurosurgery*. 1989;70(6):942-5.
71. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(10):2054-61.
72. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *European heart journal*. 2011;32(16):1977-85, 85a, 85b, 85c.
73. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *The New England journal of medicine*. 2003;349(24):2316-25.
74. Miller YI, Altamentova SM, Shaklai N. Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: antioxidant role of haptoglobin. *Biochemistry*. 1997;36(40):12189-98.
75. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1991;11(6):1700-11.
76. Miller YI, Smith A, Morgan WT, Shaklai N. Role of hemopexin in protection of low-density lipoprotein against hemoglobin-induced oxidation. *Biochemistry*. 1996;35(40):13112-7.
77. Lynch RE, Lee R, Cartwright GE. Inhibition by superoxide dismutase of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 1976;251(4):1015-9.
78. Winterbourn CC, McGrath BM, Carrell RW. Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins. *The Biochemical journal*. 1976;155(3):493-502.
79. Weiss SJ. Neutrophil-mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. The role of superoxide and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(6):2947-53.
80. Harel S, Kanner J. The Generation of Ferryl or Hydroxyl Radicals During Interaction of Haemproteins with Hydrogen Peroxide. *Free radical research communications*. 1988;5(1):21-33.
81. Vallelian F, Pimenova T, Pereira CP, Abraham B, Mikolajczyk MG, Schoedon G, et al. The reaction of hydrogen peroxide with hemoglobin induces extensive alpha-globin crosslinking and impairs the interaction of hemoglobin with endogenous scavenger pathways. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(8):1150-8.
82. Deuticke B, Heller KB, Haest CW. Leak formation in human erythrocytes by the radical-forming oxidant t-butylhydroperoxide. *Biochimica et biophysica acta*. 1986;854(2):169-83.
83. Trotta RJ, Sullivan SG, Stern A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. The relative roles of haem- and glutathione-dependent decomposition of t-butyl hydroperoxide and membrane lipid hydroperoxides in lipid peroxidation and haemolysis. *The Biochemical journal*. 1983;212(3):759-72.

84. George P, Catherine R-E, Rebecca R, David L. The interaction between ruptured erythrocytes and low-density lipoproteins. *FEBS Letters*. 1992;303(2):154-8.
85. Paganga G, Rice-Evans C, Andrews B, Leake D. Oxidised low density lipoproteins convert oxyhaemoglobin from ruptured erythrocytes to reactive ferryl forms. *Biochemical Society transactions*. 1992;20(4):331s.
86. Murray RK, Connell GE, Pert JH. The role of haptoglobin in the clearance and distribution of extracorporeal hemoglobin. *Blood*. 1961;17:45-53.
87. McCormick DJ, Atassi MZ. Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha-chain of human hemoglobin. *Journal of protein chemistry*. 1990;9(6):735-42.
88. Christian AS, Gabriele S, Alexander I, Michael OK, Dominik JS. Constitutive Endocytosis of CD163 Mediates Hemoglobin-Heme Uptake and Determines the Noninflammatory and Protective Transcriptional Response of Macrophages to Hemoglobin. *Circulation research*. 2006;99(9):943-50.
89. Boyle JJ, Johns M, Lo J, Chiodini A, Ambrose N, Evans PC, et al. Heme induces heme oxygenase 1 via Nrf2: role in the homeostatic macrophage response to intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(11):2685-91.
90. Schaer CA, Schoedon G, Imhof A, Kurrer MO, Schaer DJ. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circulation research*. 2006;99(9):943-50.
91. Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, et al. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *The American journal of pathology*. 2009;174(3):1097-108.
92. Fortes GB, Alves LS, de Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, et al. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood*. 2012;119(10):2368-75.
93. Gozzelino R, Soares MP. Heme sensitization to TNF-mediated programmed cell death. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011;691:211-9.
94. Lipiski M, Deuel JW, Baek JH, Engelsberger WR, Buehler PW, Schaer DJ. Human Hp1-1 and Hp2-2 phenotype-specific haptoglobin therapeutics are both effective in vitro and in guinea pigs to attenuate hemoglobin toxicity. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(14):1619-33.
95. Buehler PW, Abraham B, Vallelian F, Linnemayr C, Pereira CP, Cipollo JF, et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. *Blood*. 2009;113(11):2578-86.
96. Cooper CE, Schaer DJ, Buehler PW, Wilson MT, Reeder BJ, Silkstone G, et al. Haptoglobin binding stabilizes hemoglobin ferryl iron and the globin radical on tyrosine β 145. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(17):2264-73.
97. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.
98. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, et al. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Molecular nutrition & food research*. 2005;49(11):1030-43.
99. Nagy P, Schwarz G, Kopriva S. Highlighted mechanistic aspects in the chemical biology of reactive sulfur species. *British Journal of Pharmacology*. 2019;176(4):511-3.
100. Muellner MK, Schreier SM, Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Exner M, et al. Hydrogen sulfide destroys lipid hydroperoxides in oxidized LDL. *The Biochemical journal*. 2009;420(2):277-81.

101. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO journal*. 2001;20(21):6008-16.
102. Wang Y, Zhao X, Jin H, Wei H, Li W, Bu D, et al. Role of Hydrogen Sulfide in the Development of Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(2):173-9.
103. Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, et al. Decreased Endogenous Production of Hydrogen Sulfide Accelerates Atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(25):2523-34.

KONFERENCIÁK

CITÁLHATÓ KONFERENCIA ABSZTRAKTOK

1. Jeney, V., Silva, G., **Potor, L.**, Balla, G., Soares, M., Balla, J.: Ferryl hemoglobin is a proinflammatory agonist that activates endothelial cells and induces mouse peritonitis. *Am. J. Hematol.* 88 (5), E234-E235, 2013.
2. Jeney, V., **Potor, L.**, Whiteman, M., Wood, M., Balla, G., Balla, J.: P58 Potential anti-atherogenic effects of hydrogen-sulfide releasing molecules. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 31 S61-, 2013.
3. Jeney, V., **Potor, L.**, Pethő, D., Whiteman, M., Wood, M., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen-sulfide releasing molecules inhibit intraplaque hemorrhage-associated oxidative burst in the human atheroma and subsequent endothelial reactions. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 39 S45-S46, 2014.
4. Balla, J., Zarjou, A., Agarwal, A., Becs, G., Sikura, K., Nyitrai, M., **Potor, L.**, Pethő, D., Oros, M., Zavaczki, E., Arosio, P., Eaton, J., Balla, G.: Role of heme in soft tissue mineralization. *Free Radic. Biol. Med.* 96 S13, 2016.

KONFERENCIA ABSZTRAKTOK

ELŐADÁS

1. **Potor, L.**, Balla, J., Balla, Gy, Jeney, V.: A kén-hidrogén donor molekulák hatékonyan gátolják az LDL és a hemoglobin oxidációját. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság VII. konferenciája, Debrecen, Magyarország, 2013.08.29-31.

2. **Potor, L.,** Balla, J., Balla, Gy., Jeney, V.: A kénhidrogén antioxidáns hatásának vizsgálata. Tavaszi szél konferencia, Debrecen, Magyarország, 2014.03.21-23.

3. **Potor, L.,** Jeney, V.: Ferrylhemoglobin prooxidatív és proinflammatorikus szerepe az ateroszklerózis patomechanizmusában. A Laki Kálmán Doktori Iskola Doktorandusz hallgatóinak 2013. évi konferenciája. Debrecen, Magyarország, 2013.06.15.

4. Balla, J., Jeney, V., Zavaczky, E., Becs, G., Nyitrai, M., Kovács, K., Oros, M., Balogh, E., **Potor, L.,** Pethő, D., Gáll, T., Sümegi, A., Tolnai, E., Szőnyi, A., Gyetvai, Á., Balla, Gy.: Kiemelt kutatási területek a vaszkuláris biológiai kutatócsoportban. A Magyar Tudomány Ünnepe konferencia, Debrecen, Magyarország, 2014.11.27.

5. **Potor, L.,** Balla, J., Balla, Gy., Jeney, V.: A kénhidrogén antioxidáns hatásának vizsgálata. A Laki Kálmán Doktori Iskola Doktorandusz hallgatóinak 2014. évi konferenciája. Debrecen, Magyarország, 2015.06.06.

6. **Potor, L.,** Pethő, D., Hegedűs, H., Trencsényi, Gy., Szigeti, Zs., Pócsi, I., Nyitrai, M., Tóth, J., Jeney, V., Balla, J., Balla, Gy.: Gomba eredetű vaskeláló desferriropogén gátolja az ateroszklerotikus léziók kialakulását apolipoprotein E deficiens egerekben. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság VIII. Kongresszusa Budapest, 2015. november 5-6.

7. **Potor, L.,** Hendrik, Z., Posta, N., Sikura, K., Oros, M., Nagy, A., Balla, Gy., Balla, J.: A kénhidrogén protektív hatása a ferrylhemoglobin indukálta oxidatív stressz kivédésében. Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság IX. Kongresszusa és az MTA ÉKB Mikroelem Munkabizottságának Tudományos Ülése. Gödöllő. 2017.

8. **Potor, L.,** Hendrik, Z., Nagy, P., Méhes, G., Balla, Gy., Balla, József.: A kénhidrogén gátolja a hemoglobin-lipid interakciót az atheroszklerotikus léziókban. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, Magyar Anatómus Társaság, Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság, Magyar Élettani Társaság közös Vándorgyűlése (FAMÉ). Budapest, 2019.07.5-8.

9. **Potor, L.,** Sikura, K., Hegedűs, H., Pethő, D., Szabó, Zs., Szigeti, Zs., Pócsi, I., Trencsényi, Gy., Szikra, D., Garai, I., Gáll, T., Combi, Zs., Kappelmayer, J., Balla, György.,

Balla, József.: Gomba eredetű vaskeláló gátolja az érlemezsedést. GINOP-2.3.2-15-2016-00043. Szív- és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART) konferencia. Debrecen, 2020.11.19.

10. **Potor, L.**, Sikura, K., Hegedűs, H., Pethő, D., Szabó, Zs., Szigeti, Zs., Pócsi, I., Trencsényi, Gy., Szikra, D., Garai, I., Gáll, T., Combi, Zs., Kappelmayer, J., Balla, György., Balla, József.: Gomba eredetű vaskeláló gátolja az érlemezsedést. Szív- és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART) projekt zárórendezvénye. Debrecen, 2021.07.28.

POSZTER

1. **Potor L.**, Bányai, E., Nagy, E., Méhes, G., Balla Gy., Balla, J., Jeney, V.: Vicious cycle in the atherosclerotic plaque involving lipid-peroxidation and hemoglobin oxidation. 7th International Meeting on Heme Oxygenases and Related Enzymes, Edinburgh, UK, 2012.05.28-06.01.

2. Jeney, V., Silva, G., **Potor, L.**, Balla, Gy., Soares, MP., Balla, J.: Ferryl hemoglobin is a proinflammatory agonist that activates endothelial cells and induces mouse peritonitis. 5th meeting of the International Bioiron Society, London, UK, 2013.04.14-18.

3. Jeney, V., **Potor, L.**, Soares, M., Balla, Gy., Balla, J.: Red blood cell infiltration of atheromatous lesion induce a vicious cycle leading to endothelial activation and cytotoxicity. European Atherosclerosis Society Congress, Lyon, France, 2013.06.02-05.

4. Gáll, T., Sümegi, A., Nyitrai, M., **Potor, L.**, Jeney, V., Pócsi, I., Balla, J.: Humán hemoxigenáz-1 variánsok expressziója és katalitikus aktivitásának vizsgálata prokarióta fehérje expressziós rendszerrel. A szív és érbetegségek interdiszciplináris kutatása a DEOEC-ben. A Magyar Tudomány Ünnepe konferencia, Debrecen, Magyarország, 2013.11.15.

5. **Potor, L.**, Hegedűs, H., Balla, J., Balla, Gy., Jeney, V.: A hem- hemoglobin detoxifikáló útvonal szerepének vizsgálata az atheroszklerózis patomechanizmusában. A szív és érbetegségek interdiszciplináris kutatása a DEOEC-ben. A Magyar Tudomány Ünnepe konferencia, Debrecen, Magyarország, 2013.11.15.

6. Majnár, M., Pethő, D., **Potor, L.**, Jeney, V., Csépanyi, E., Tósaki, Á., Lekli, I., Balla, J., Bak, I., Balla, Gy.: Lipidperoxidációhoz kapcsolódó szén-monoxid termelés vizsgálata. A szív és érbetegségek interdiszciplináris kutatása a DEOEC-ben. A Magyar Tudomány Ünnepe konferencia, Debrecen, Magyarország, 2013.11.15.
7. Jeney, V., **Potor, L.**, Pethő, D., Whiteman, M., Wood, ME., Balla, Gy., Balla, J.: Hydrogen-sulfide releasing molecules inhibit intraplaque hemorrhage associated oxidative burst in the human atheroma and subsequent endothelial reactions. European Atherosclerosis Society Congress Congress, Madrid, Spain, 2014.05.31-06.01.
8. **Potor, L.**, Tolnai, E., Balogh, E., Gyetvai, Á., Czirják, T., Hegedűs, H., Balla, J., Balla, Gy., Jeney, Viktória.: A CSE/H₂S rendszer ateroprotektív hatásai. A Magyar Tudomány Ünnepe konferencia, Debrecen, Magyarország, 2014.11.27.
9. Tolnai, E., **Potor, L.**, Pataki, I., Nagy, A., Balla, J., Balla, Gy., Jeney, V.: Oxidált hemoglobin formák szerepe az intraventriculáris vérzést követő neuro-inflammációban. A Magyar Tudomány Ünnepe konferencia, Debrecen, Magyarország, 2014.11.27.
10. **Potor, L.**, Tolnai, E., Hegedűs, H., Szigeti, ZM., Pócsi, I., Balla, Gy., Balla, J., Jeney V.: The fungal iron chelator desferri-coprogen inhibits atherosclerotic plaque formation in apoE deficient mice via different mechanisms. European Iron Club, Verona, Italy, September 11-14, 2014.
11. **Potor, L.**, Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Sikura, K., Beke, L., Combi, Zs., Fürtös, I., Pethő, D., Vasas, A., Olvasztó, S., Nagy, P., Balla, Gy., Balla J.: Hydrogen sulfide abrogates hamoglobin-lipid interaction in atherosclerotic lesion. Debrecen, Hungary, 2018.03.01-03.

11. TÁRGYSZAVAK

Érelmeszesedés, oxidált hemoglobin, ferryl hemoglobin, lipidperoxidáció, LDL oxidáció, kénhidrogén, komplikált lézió, bevérzés, endotél sejt, makrofág.

Atherosclerosis, oxidized hemoglobin, ferryl hemoglobin, lipid peroxidation, LDL oxidation, hydrogen sulfide, complicated lesion, hemorrhage, endothelial cell, macrophage.

12. 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 Xéniánka, 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.

13. FÜGGELÉK

Megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye.



**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/119/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

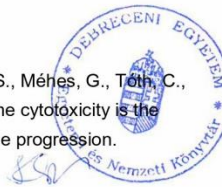
Jelölt: Potor László
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10043377

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: 2.597 (2020)
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: 4.379 (2020)





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: 6.6 (2020)
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: 10.479 (2020)
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: 8.401 (2020)
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 Desferricoprogen Inhibits Atherosclerotic Plaque Formation.
Int. J. Mol. Sci. 21 (13), 4746-, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21134746>
IF: 5.923
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 közzétett folyóiratok összesített impakt faktora: 80,836

**A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául 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, 2022.03.21.

