

2005. ÉVI ZÁRÓJELENTÉS

Számos vascularis megbetegedésben a hem-vas eredetű endothelialis károsodás pathogenetikai szerepére egyre több adat utal. A hem katabolizmusát végző enzim hiányában, a hemoxigenáz 1 deficienciában - mind humán vonatkozásban, mind "knock-out" egérben - egyrészt a hem plazmában történő akkumulációja, másrészt súlyos endothelialis sejtkárosodás észlelhető.

Pályázatunkban feltételeztük, hogy a hem-protein eredetű hem, amellyel önmagában is citotoxikus, az LDL oxidatív modifikációja révén is vezethet endothelialis funkciózavarhoz. In vitro kísérletekben teszteltük a különböző hemproteineket, hogy előidézik-e az LDL oxidatív modifikációját plazma jelenlétében. Methemoglobinnal illetve hemmel kezelt plazmából izolált LDL minták a humán umbilikális véna endothel sejtekre citotoxikusak voltak, szemben a hemet erőteljesebben kötő ferrohemoglobinnal, illetve metmioglobinnal vagy citokrómmal kezelt plazmából izolált LDL mintákkal, melyeknek nem volt citotoxikus hatásuk. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a hemproteinekből a hem kiszabadulása feltétele a toxikus LDL kialakulásának. Ezen megfigyelésünket bizonyítottuk úgy, hogy a methemoglobinban lévő hem csoportot haptoglobinnal illetve cianid ionnal stabilizáltuk, és várakozásunknak megfelelően, az így kezelt plazmából származó LDL minták nem voltak citotoxikusak. A ferrohemoglobin jelenléte a plazmában nem idézte elő az LDL oxidatív modifikációját, azonban az irodalomban ismert, hogy a ferrohemoglobin gyulladásszerű sejtek eredetű oxidánsok hatására methemoglobinná oxidálódhat. Ennek alapján a ferrohemoglobint tartalmazó plazmához aktivált neutrofil granulocitákat adtunk, majd LDL-t izoláltunk. Az így nyert LDL citotoxikus volt.

Feltételeztük, hogy hasonlóan toxikus LDL akkumulálódhat a korábban leírt hem oxigenáz-1 deficiens gyermek plazmájában. Kimutattuk, hogy a HO-1 deficiens gyermek LDL-je normál endothel sejtekre citotoxikus, hasonlóan a methemoglobinnal inkubált plazmából származó LDL-hez. A HO-1 deficiens gyermek plazmájának analízise során kimutattuk, hogy plazmája nagy mennyiségű (60 μM) hemoglobint tartalmazott, melynek 80%-a methemoglobin volt. A HO-1 gyermek LDL-jének lipidperoxidációs paraméterei (oxidatív rezisztencia, konjugált dién-, lipid-hidroperoxid-, TBARS-, α -

tocopherol-tartalom, zsírsav-összetétel, elektroforetikus mobilitás) az LDL nagyfokú oxidáltságát bizonyították.

Normál sejtekben az oxidált LDL szublethális dózisa citoprotektív géneket – hem-oxigenázt illetve ferritint – indukál, mely génindukciókat mi is kimutattuk a hemmel, methemoglobinnal illetve ferrohemoglobinnal és aktívált neutrofilokkal kezelt plazmákból szeparált LDL-ek esetében, valamint a HO-1 deficiens beteg LDL mintájánál. A HO-1 deficiens beteg esetén a citoprotektív HO-1 hiánya nagymértékben hozzájárul az endothelialis sejtkárosodás kialakulásához. A hem oxigenáz és ferritin vaszkuláris hatásainak ismerete nem csupán hem oxigenáz-1 deficienciában értékelődik fel, hanem olyan kórképekben is - glomerulosclerosis, atherosclerosis -, ahol a vörösvértest eredetű hemoglobin-, hem- és vas-indukálta LDL modifikáció érkárosodást okoz. (Ebben a témában megjelent publikációnk: Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):879-87.)

A HO-1 deficiens beteg plazmájában kimutattuk, hogy a hemoglobin nagy része methemoglobin formában van jelen, mely methemoglobin előidézi az LDL oxidatív modifikációját. A ferrohemoglobin methemoglobinná alakulását gyulladáscsökkentő sejtek által termelt oxidánsok előidézik, mely folyamat katalázal gátolható, amely a hidrogén-peroxid szerepét bizonyítja a folyamatban. Mi feltételeztük, hogy e mellett az oxidált LDL is képes a ferrohemoglobint methemoglobinná oxidálni. *In vitro* kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy az oxidált LDL valóban képes a ferrohemoglobint methemoglobinná oxidálni. Mivel az oxidált LDL egy többkomponensű partikula, így azt is bizonyítottuk, hogy az LDL oxidációja során képződő lipid-hidroperoxidok tehetőek felelőssé a ferrohemoglobin methemoglobinná alakításáért. Meghatároztuk a haptoglobin szerepét a fenti folyamatokban. Igazoltuk, hogy a hemoglobin oxidációját nem befolyásolja a haptoglobin jelenléte. Ezzel szemben a hemoglobin oxidációja okozta LDL oxidatív modifikáció kifejezetten gátolható haptoglobinnal. A gátlás mértéke függ a haptoglobin allotípusától.

Azt is bizonyítottuk, hogy az oxidált LDL lipid-hidroperoxid komponense a felelős az oxidált LDL citotoxikusságáért illetve citoprotektív génindukáló hatásáért. A HO-1 deficiens betegből származó limfoblasztoid sejtvonal segítségével bizonyítottuk, hogy az oxidált LDL nagyobb mértékben citotoxikus a HO-1 deficiens sejtekre mint a kontrol sejtekre. (Ezen eredményeink alapján megjelent

publikációnk: Nagy E, Jeney V, Yachie A, Szabo RP, Wagner O, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G, Balla J. 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. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2005 Sep 30;51(4):377-85.)

A hem okozta érkárosodások vizsgálata mellett klinikai tanulmányban vizsgáltuk, hogy a megemelkedett intima-media vastagság (IMT), melynek előfordulását kimutatták az atherosclerosis korai fázisában, mely egyéb klinikai paraméterekkel van összefüggésben. A klinikai tanulmányban 55 év alatti személyek vettek részt, 3 csoportra osztva az artéria carotis interna szűkületének foka alapján (kontrol, szűkület, elzáródás). A tanulmány során meghatároztuk a betegek LDL-jének oxidatív rezisztenciáját, gyulladásos markereket, a plazma viszkozitását, a vörösvértestek deformálhatóságát, lipidszinteket valamint a homocisztein szintet. Igazoltuk, hogy az agyi erek korai érrelmeszesedésének rizikója elsősorban az inflammációs markerek (WBC, CRP, fibrinogen) megemelkedett szintjével van összefüggésben. (Eredményeinket publikáltuk: Magyar MT, Szikszai Z, Balla J, Valikovics A, Kappelmayer J, Imre S, Balla G, Jeney V, Csiba L, Bereczki D. Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. Stroke. 2003 Jan;34(1):58-63.)

Endothelialis sejtkárosodás végstádiumú veseelégtelenségben szenvedőkben is igazolást nyert. Ennek ciklikus változása egybeesik a hemodialízis kezelések alkalmazásával, azonban oki összefüggés ezidáig nem volt azonosítható.

A low-density lipoprotein oxidatív rezisztenciáját vizsgálva hasonló ciklicitást tudtunk megfigyelni végstádiumú veseelégtelenségben szenvedőkben, mint ahogyan az az endotheliumnál ismert. Az oxidatív rezisztenciában bekövetkező változások ciklusai egybeestek a hemodialízis kezeléssel, annak késleltetése, illetve ritkítása a ciklusok lefolyását azonos módon befolyásolta. A ciklus 2 jól elkülönült részből állt. Az első, igen gyors, órák alatt bekövetkező változás, egybeesett a hemodialízis kezelésekkel. Paradox módon erre a periódusra az LDL oxidatív rezisztenciájának csökkenése volt a jellemző. Feltételeztük, hogy az LDL oxidatív rezisztenciájának változása a plazma kis móltömegű lipofil tulajdonságú anyagaival lehet összefüggésben. Tanulmányunkban egészséges kontrol (n=15), krónikus veseelégtelen (CKD) dialízis előtt és után (n=10), valamint konzervatív

terápián lévő krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek (n=13) vettek részt. A betegek plazmájából centrifugálással ultrafiltrátumot nyertünk, mely tartalmazta az 5000 Da alatti molekulákat. Az egészséges kontrollok plazmájának ultrafiltrátuma megnyújtotta egy normál LDL hem mediálta oxidációjának maximális sebességéig eltelt időt (ΔT at V_{max}) a kontrolhoz viszonyítva. A krónikus veseelégtelenségben szenvedő beteg dialízis előtti plazma-ultrafiltrátuma az egészséges kontrolhoz képest még inkább megnyújtotta az LDL ΔT at V_{max} értékét. Ezzel szemben a CKD beteg hemodialízis kezelés utáni ultrafiltrátuma kevésbé gátolta az LDL oxidatív modifikációját mint az egészséges kontrolé. A CKD betegek dialízis előtti ultrafiltrátumának megnövekedett LDL oxidációt gátló hatásáért felelős molekulák azonosítása érdekében számos retenciós molekula hatását vizsgáltuk meg a hem mediálta LDL oxidációra. A veseelégtelenségben szenvedők plazmájában mért koncentrációban alkalmazva az általunk vizsgált 28 molekula közül 7 - az L-arginin, az L-aszorbinsav, a bilirubin, a p-krezol, a 3-indoxil-szulfát, az indoxil- β -D-glükoronid, a fenol és a húgysav - gátolta az LDL hem mediálta modifikációját. A húgysav eltávolítása urikázzal nem eredményezte az ultrafiltrátum antioxidáns kapacitásának teljes eltűnését; mintegy 30%-a a kiindulási aktivitásnak megmaradt. Meghatároztuk ezen retenciós molekulák koncentrációját a plazma ultrafiltrátumokban, és megállapítottuk hogy az anyagok koncentrációja a dialízis során az egészséges kontrollok ultrafiltrátumában mért értékek alá esik. A gátló hatású retenciós molekulák antioxidáns potenciálját összehasonlítva azt kaptuk, hogy az LDL hem-mediálta oxidatív modifikációjának a legerősebb inhibitora a p-krezol, majd ezt követi a bilirubin. Az LDL oxidatív modifikációját gátló anyagok direkt citoprotektív hatását is megvizsgáltuk humán endotheliális sejteken. A vizsgált molekulák eltérő mértékben ugyan, de protektív módon hatottak a hemmel illetve hidrogén-peroxiddal előidézett citotoxicitás során.

Mivel az LDL oxidatív modifikációja endothel károsodáshoz vezet, megvizsgáltuk hogy a plazma ultrafiltrátumok meg tudják-e gátolni az oxidált LDL mediálta endothel citotoxicitást. Kimutattuk, hogy az egészséges kontrollok plazma-ultrafiltrátuma hatékonyan gátolja az oxidált LDL előidézte citotoxicitást, hasonlóan a konzervatív módon kezelt CKD betegek, illetve a dialíziskezelés

előtti betegek plazma ultrafiltrátumához. Ezzel szemben a dialízis kezelés után nyert ultrafiltrátum nem tudta meggátolni az oxidált LDL mediálta citotoxicitást.

Szubletális dózisú oxidált LDL endothel sejtekben hem oxigenáz-1-et és ferritint indukál, melyek az oxidatív stressz érzékeny markerei. Kimutattuk, hogy az egészséges kontrolok ultrafiltrátuma hasonlóan a konzervatív terápiával kezelt CKD betegek illetve a dialízis előtti CKD betegek ultrafiltrátumához, meggátolta az oxidált LDL mediálta HO-1 mRNS indukcióját és aktivitásának növekedését, valamint a ferritin szintjének emelkedését. Ezzel szemben a dialízis utáni ultrafiltrátum nem akadályozta meg az oxidált LDL mediálta redox szenzitív géningdukciókat, így a HO-1 és a ferritin szintje is megemelkedett.

Ebben a tanulmányban rávilágítottunk arra, hogy a hemodialízis során az antioxidáns tulajdonságú retenciós molekulák eltávolítása elősegítheti az LDL oxidatív modifikációját és a bekövetkező endothelsejt-károsodás veszélyeztetheti az érrendszert. A stresszadaptáció néhány órát is igénybevehet, addig azonban a sejtek védtelenek az oxidált LDL károsító hatásával szemben. Az endothelium gyorsan változó oxidatív környezete és a késlekedő adaptáció megnövelheti az atherosclerosis rizikóját a hemodializált, krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben. (Ezen eredményeink alapján megjelent publikációnk: Ujhelyi L, Balla G, Jeney V, Varga Z, Nagy E, Vercellotti GM, Agarwal A, Eaton JW, Balla J. Hemodialysis reduces inhibitory effect of plasma ultrafiltrate on LDL oxidation and subsequent endothelial reactions. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(1):144-51.)

A pályázat időtartama alatt két review megírására kaptam felkérést, melyekben összefoglaltuk az elmúlt évek legfontosabb eredményeit a hem mediálta folyamatok területén. Az alábbi összefoglaló ábra jól szemlélteti a munkacsoportunk által leírt folyamatokat. A hem a vörörsvértestek lízise során keletkező ferrohémoglobinból képződik. Ennek a folyamatnak azonban nagyon fontos lépése a ferrohémoglobin methemoglobinná oxidálódása, amit gyulladásos sejtek által termelt reaktív oxigénradikálok illetve LDL-asszociált lipid-hidroperoxidok is előidézhettek. A methemoglobinná szabdá váló hem azután direkt és indirekt módon is okozhat endotheliális sejt-károsodást, illetve alacsonyabb dózisban a sejtekben citoprotektív géneket – hem oxigenáz-1-et illetve ferritint – indukálhat. A direkt útvonal során a hem az endotheliális sejtek által felvételre kerül, és szenzitizálja a

sejteket oxidatív stresszel szemben. Ha azonban nincs oxidatív stressz, akkor a hem felvétele után megindul a HO-1 és a ferritin transzkripciója illetve translációja, melynek eredménye a sejtek megnövekedett oxidatív rezisztenciája. Az indirekt útvonal, melyen keresztül a hem szenzitizációt illetve stressz adaptációt válthat ki az LDL oxidatív modifikációjával kapcsolatos. Az LDL plazma jelenlétében is képes a lipofil tulajdonságú hem felvételére, melynek következménye az LDL oxidatív modifikációja. Az oxidált LDL az endotheliumra citotoxikus, szubletális dózisban azonban citoprotektív géneket indukál.

