



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2023. május 12.

**AZ OXIDÁNS ÉS ANTIOXIDÁNS RENDSZEREK
VIZSGÁLATA GÉNKIÜTÖTT NYÚL MODELLBEN
KOLESZTERIN TERHELÉST KÖVETŐEN**

**Study the effect of cholesterol load on the oxidant and antioxidant status in
a knock-out rabbit model**

Készítette: **Major Fanni Csilla**
HLIH31
Takarmányozási és
takarmánybiztonsági mérnök,
mesterszak
Nappali
Szent István Campus

Témavezetők: dr. Erdélyi Márta, egyetemi docens, Élettani és
Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

Dr. Bodrogi Lilla, tudományos főmunkatárs, Genetika és
Biotechnológia Intézet, Állatbiotechnológia Tanszék

Pintér Tímea, tudományos segédmunkatárs, Genetika és
Biotechnológia Intézet, Állatbiotechnológia Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

**Gödöllő
2023.**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés.....	2
II. Célkitűzések	4
III. Irodalmi áttekintés	5
A nyúl emésztésének élettana	5
Takarmányalkotók emésztése	5
Lipid anyagforgalom.....	7
Lipidek.....	7
Lipidek lebontása	7
Lipidek bioszintézise	8
A nyúl zsírellátása	9
A vérérum koleszterin, LDL, HDL és triglicerid tartalma	10
Biotechnológiai modellek a koleszterin anyagcsere vizsgálatára	11
Nyúlmodellek	11
A nyúl, mint modellállat a szív és érrendszeri elváltozások vizsgálatára	12
Az antioxidáns rendszer szerepe és szabályozása	13
Lipidperoxidáció.....	14
Az antioxidáns rendszer génexpressziós szabályozása.....	16
NOX enzimek.....	17
NOX 4.....	17
NOX és a szív- és érrendszeri megbetegedések.....	18
IV. Anyag és módszertan.....	20
A kísérleti állatok.....	20
Etikai nyilatkozat	20
Az állatok tartása.....	20
A kísérleti csoportok kialakítása és kezelés.....	20
Mintavétel módszere	20
Biokémiai vizsgálatok.....	21
A redukált glutation koncentráció meghatározása	21
A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása	21
A malondialdehid mennyiségének mérése.....	21
Az összkoleszterin koncentráció meghatározása	22
A HDL-szint meghatározása	22

Az LDL-szint meghatározása	22
A triglicerid koncentráció meghatározása	23
Génexpressziós vizsgálatok.....	23
RNS izolálás	23
cDNS átírás reverz transzkripció által	24
Primerek.....	24
A qPCR módszere	25
Statisztikai módszerek	25
V. Eredmények	26
Biokémiai paraméterek.....	26
Génexpresszió vizsgálata	33
VI. Diszkusszió	37
A szérum zsír összetételének változásai.....	37
Az oxidált LDL által indukált TLR4 által közvetített oxidatív változások	38
Az antioxidáns rendszer aktiválódása	40
További javaslatok	41
Irodalomjegyzék	44

Rövidítések jegyzéke

CAT - kataláz

GAPDH - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GPx – glutation-peroxidáz (enzim)

GPX – glutation-peroxidáz (gén)

GSH – redukált glutation

HDL - high density lipoprotein

IL1B - interleukin 1 beta

KEAP1 - Kelch Like ECH Associated Protein 1

KO - knock out - génkiütött

LDL - low density lipoprotein

MDA - malondialdehyd

NFE2L2 - NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2

NOX4 - nikotinamid adenin dinukleotid foszfát-oxidáz 4

ROS - reactive oxygen species

SOD2 – szuperoxid dizmutáz 2

TG - triglicerid

TLR4 - Toll-like receptor 4

wt – vadtypus

I. Bevezetés

Napjainkban intenzíven kutatott terület a reaktív oxigénszármazékok (ROS) képződése és az ahhoz köthető élettani változások. A ROS-képződés szabályozása elengedhetetlen tényező a szervezet belső egyensúlyának, azaz a homeosztázisnak a fenntartásában. Amennyiben ez az egyensúly felborul túlsúlyba kerülhet a szabadgyökök képződése, ami már meghaladhatja a szervezet antioxidáns-védőrendszerének kapacitását. Ez a folyamat oxidatív stresszhez és különböző patológiás folyamatok, betegségek (szív és érrendszeri elváltozások, karcinogenezis, immunbetegségek, idegrendszeri kórképek) kialakulásához vezethet.

A nikotinamid adenin dinukleotid foszfát-oxidáz 4, azaz *NADPH-oxidáz 4 (NOX4)* gén expressziója során képződő enzimfehérje a fiziológias ROS-képzés szabályozásának egyik kulcsfontosságú eleme a legtöbb szervezetben, mind az állat-, mind a növényvilágban. Kutatások alátámasztják (Schürmann és mtsai., 2015), hogy a NOX4 fehérje hiányának következtében fokozott plakk-képződés figyelhető meg magas koleszterintartalmú táppal való etetést követően. A NOX4-ről úgy vélik, hogy az érlelmeszesedéssel összefüggésben ateroprotektív tulajdonságokkal rendelkezik. A szuperoxid helyett egy másik ROS-prekurzort, hidrogén-peroxidot szabadít fel a spontán szuperoxid-diszmutáció következtében. A hidrogén-peroxid nem lép kölcsönhatásba a nitrogénoxiddal, így a NOX4 nem fokozza a peroxinitrit keletkezését, amely az ér fal oxidatív károsodásának gyakori kiinduló vegyülete (Di Marco és mtsai., 2016; Zhang és mtsai., 2010).

Tudományos diákköri munkám során célul tűztük ki a folyamat molekuláris hátterének tanulmányozását. Ezért génexpressziós vizsgálatokat (kvantitatív RT-PCR) végeztünk, valamint mértünk egyes gyökfogó kapacitást és lipid anyagcserét jellemző biokémiai paramétereket (GSH, GPx, MDA, HDL, LDL, koleszterin, triglicerid). Célunk az volt, hogy a génexpressziós mintázat eltéréseit, fehérjeszinten is validáljuk és ezzel a NOX4 enzim funkcióját az érlelmeszesedés patológiás folyamatában jobban megértsük.

Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy a NOX4 gén kiütése hogyan befolyásolja a szervezet oxidáns-antioxidáns státuszát, és a lipidperoxidációs folyamatokat nyúlmodellben nagy koleszterintartalmú táp etetése esetén. Mivel a NADPH-oxidázok szerepe a szervezetben ROS termelése, ez utóbbiak pedig lipidperoxidációs láncreakciót indíthatnak el, ezért hipotézisünk szerint a gén működésének blokkolása jelentősen megváltoztathatja a szervezet antioxidáns védelmi rendszerének állapotát, és hatással lehet olyan folyamatokra – például

érelmeszesedés – amelyekben a szervezetben fiziológiásan képződő ROS-ok szignálként működnek.

Kísérletünkben a MATE-GBI Precíziós Nemesítés Csoport által előállított NOX4 génkiütött (KO), illetve vad típusú nyulakkal koleszterin-kiegészítést tartalmazó takarmányt etettünk és vizsgáltuk, hogy hogyan változnak az ismertetett élettani paraméterek. Mivel a házi nyúl zsíryanycseréje és annak zavaraival összefüggésbe hozható kórképek kialakulása nagymértékben hasonlít az emberéhez, ezért gyakran használják modellállatként ezen a területen.

II. Célkitűzések

A kutatás során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- 1, Van-e statisztikailag igazolható különbség az *NOX4* génkiütött, vad típusú, valamint kontroll (takarmánykezelésben nem részesülő) csoport között az élettani paraméterek tekintetében?
- 2, Van-e statisztikailag igazolható különbség a *NOX4* génkiütött és vad típusú csoportokban az antioxidáns-oxidáns rendszert szabályozó gének expressziójának tekintetében?
- 3, Milyen változások figyelhetők meg az élettani paraméterekben és az antioxidáns-oxidáns védőrendszert szabályozó gének expressziójában 10 hetes koleszterinetetés hatására?
- 4, Kimutatható-e az oxidatív stressz koleszterin-tartalmú takarmány etetésének hatására, van-e különbség a csoportok között?
- 5, Okoz-e az általunk választott paraméterekkel kimutatható oxidatív stresszt a magas koleszterin tartalmú takarmány?

III. Irodalmi áttekintés

A nyúl emésztésének élettana

A szervezetbe kerülve a takarmányok táplálóanyagokra bomlanak és létfenntartó szerepet töltenek be, vagy pedig termelésre fordítódnak (Holdas és mtsai., 1975). A dolgozat első részében ezt az összetett élettani folyamatot szeretném ismertetni, részletesen kitérve a nyúl emésztési sajátosságaira.

Takarmányalkotók emésztése

A táplálóanyagok az emészthetőség szempontjából két csoportba sorolhatók. Az emészthető anyagok, melyeket az állati szervezet által termelt enzimek képesek bontani, ilyenek a fehérjék, a zsírok, a keményítő, a laktóz és a szacharóz (Csapó & Csapóné Kiss, 2018). A folyamat során a kiindulási vegyülethez kémiaiilag hasonló végtermékek keletkeznek, melyek a vékonybélből felszívódnak. A táplálóanyagok másik csoportjának emésztéséhez az állati szervezet nem rendelkezik saját enzimekkel. Ilyenek például a cellulóz, az arabinoxilánok és a β -glükánok. Ezeket a vastagbélben élő baktériumok fermentálják (Fonyó, 2011). A folyamat során a kiindulási vegyülettől kémiaiilag eltérő végtermékek keletkeznek.

A *fehérjék* bontása a gyomorban kezdődik pepszines hidrolízissel, mely során polipeptidek keletkeznek. A pepszin működési pH optimuma 1,0-2,5, melyet a sósav biztosít. A gyomornedv elválasztásának szabályozása humorális, azaz neurális és hormonális szabályozás együttes hatása alatt áll. A beérkező takarmány mechanikai hatást fejt ki a gyomor falára (neurális hatás), amely serkenti a gasztrin elválasztást. Ennek következtében a gyomornedv szekréció fokozódik. Ezt követően a takarmány tovább halad a vékonybélbe, s arra fejt ki mechanikai hatást, a vékonybél proximális szakaszában csökken a pH érték, az enterogasztron elválasztás fokozódik és a gasztrin elválasztás gátlásra kerül, ennek következtében csökken a gyomornedv elválasztása. A polipeptideket ezt követően hasnyálmirigy eredetű enzimek bontják tovább, tripszin, kimotripszin és elasztán hatására további polipeptidek és oligopeptidek keletkeznek. A pancreasnedv szekréció szintén humorális szabályozású. A csökkenő pH érték a vékonybél proximális szakaszán és az így növekedő enterogasztrin szint serkeni a szekretin elválasztást, így a pancreasnedv szekréció fokozódik. A pH optimum ebben az esetben 7,6-8,2. Ezt követően a vékonybél eredetű enzimek hatására, karboxipeptidázok és aminopeptidázok, aminosavak és kis tagszámú peptidek keletkeznek. Ezek már fel tudnak szívódni a vékonybélből. A pH optimum 6,5-7,5 (Fonyó, 2011).

A **zsírok** emésztését a hasnyálmirigy eredetű lipáz végzi. Ennek pH optimuma 7,6-8,2 között van. Epesavas sók - kolsav, kenodezoxikolsav-segítségével a zsírokat monogliceridekre, zsírsavakra, valamint glicerinre bontja. Ezt követően a vékonybélből történik a felszívás.

A fő zsír-emésztőenzim, a pancreas lipáz már születéskor termelődik a kisnyúlban. Az epesavas sók is már a 22 napos embrióban kimutathatók. Azonban a fehérjebontó enzim aktivitásával összevetve a zsírbontás szerénynek tűnik, mivel a tejzsír döntő hányada hidrolizálatlanul felszívódik a finom emulgeálásnak köszönhetően (Vetési és mtsai., 1990).

A különböző **szénhidrátok** emésztésében alapvető különbségek vannak. Differencia fedezhető fel a keményítő, illetve a szacharóz és laktóz lebontása között. A keményítő feltárása a nyálban található enzimek segítségével kezdődik meg. Ennek pH optimuma 6-7,2 közé esik. Hatásukra dextrinek keletkeznek. A feltárás következő lépéseként a hasnyálmirigy-eredetű alfa-amiláz (pH optimum 7,6-8,2) hatására oligoszacharidok, dextrinek, maltóz és maltotrióz keletkezik. Utolsó lépésként glükóz és galaktóz keletkezik glukoamiláz és diszacharidáz hatására és felszívódik a vékonybélből. A pH optimum ez esetben 6,5-7,5. A szacharóz és laktóz lebomlása egy lépésben történik glukoamiláz és diszacharidáz hatására miután az felszívódik a vékonybélből (Vetési és mtsai., 1990).

Lipid anyagforgalom

Lipidek

A lipidek közös jellemzője, hogy apoláros oldószerben oldódnak, míg poláros oldószerben nem (Gurr, 2011). Döntő többségük energiatároló szerepet tölt be. Nagy mennyiségű szénből és hidrogénből épülnek fel. Oxidációjukkal nagy energiamennyiséghez jutunk (38 kJ/g), amely több mint kétszeresét jelenti a glikogén raktárakból felszabaduló energiának. A neutrális zsírok kiemelkedők ilyen tekintetben. (Csapó & Csapóné Kiss, 2018). Emellett azonban a zsírok jelentősek, mint a sejtek és organelumok membránját felépítő anyagok. Továbbá szabályozó funkcióik vannak hormonok, valamint vitaminok formájában is.

Lipidek lebontása

A lipolízis során glicerín, valamint szabad zsírsav képződik a trigliceridekből a lipáz enzim által. Ezt követően a glicerinnél glicerín-3-foszfát keletkezik a májban, amelyből újra triglicerid képződik, vagy pedig belép a glikolízisbe dihidrox-acetát-foszfáton keresztül. A trigliceridek, a koleszterin hidrofóbok, így nem fordulhatnak elő szabad formában a plazmában. Fosfolipidekből és fehérjékből álló burokokban szállítódnak. A lipoproteineknek négy nagy csoportját különböztetjük meg: HDL, LDL, VLDL és kilomikron. A plazmában lévő koleszterin egy részét HDL szállítja a májba, ahol epesav keletkezik belőle és elhagyja a szervezetet, vagy pedig beépül VLDL-be. A keletkező zsírsavak vérkeringésbe kerülnek, majd eljutnak az egyes szervekhez, főképpen a májhoz. A zsírsavak albuminhoz kötődnek, s így szállítódnak. Lebontásuk során a béta-oxidáció eredményeként acetyl-CoA képződik a mitokondriumban. A béta-oxidáció minden lépésében két-két szénatommal rövidül a zsírsav, miközben egy acetyl-CoA és egy NADH és FADH₂ képződik (William & M. Daniel, 2013).

A legnagyobb jelentőségű takarmány eredetű szteránváz vegyület, amelyet ismerünk a koleszterin. A szájon át felvételre került koleszterin mintegy 90%-a átalakul epesavvá, melynek nagy része széklettel ürül koprosztanol formájában, baktériumok végzik ebben az esetben a redukálást. A koleszterin a bőrben calciferollá alakul enzimatis, valamint fotokémiai reakciók révén. Ezt követően először prekuzorrá alakítják a belső elválasztású szervek, majd pregnenolonná. A pregnenolon átalakul progeszteronná, amely már önmagában is hormon hatást fejt ki, azonban prekuzora mellékvesehormonoknak, mint az ösztrogén, illetve androgének (Csapó & Csapóné Kiss, 2018).

Lipidek bioszintézise

A **telített zsírsavak** szintézise acetil-CoA-ból indul ki. A szintézis palmitinsavig a citoszolban történik. A további lánchosszabbítás a mitokondriumban és endoplazmatikus retikulumban történik. A zsírsavak szintézisét egy multienzim komplex végzi, ebben többféle enzimfehérje, több fajta aktív centrummal vesz részt (Engelking, 2010). A szintézis megindulásához szükséges még annyi malonil-CoA, amennyi C2-es egység beépítése történik. Például a palmitát szintéziséhez szükséges hét darab malonil-CoA. A szintézis megkezdésekor Ac-CoA és malonil-CoA az acetil transzferázhoz és malonil transzferázhoz kapcsolódik. A malonil csoportot a transzacyláz átviszi az ACP-re, az acetilcsoport viszont a láncon belüli béta-keto-acil szintetáz cisztein oldalláncához hozzákapcsolódik. Energiaigényes folyamat a két acilcsoport kondenzációja, ezen energiát a malonil- és acetilcsoport egyesülésekor kilépő széndioxid biztosítja, a folyamat irreverzibilis. Acetoacetil-S-ACP keletkezik. Következő lépésként a béta-keto-acil-ACP reduktáz hatására keto-acil-származék keletkezik és béta-hidroxi-butiril-származékká alakul. A hidrogén donor a szintézis redukciós reakciójában a NADPH+H⁺. A redukciós lépést ezután vízkilépés követi, ennek katalizálását az enoil-ACP hidratáz végzi. Az enoil-ACP reduktáz végzi a telítetlen kettőskötések redukcióját újabb NADH+H⁺ felhasználásával, végeredményül pedig butiril-A-ACP keletkezik. Ezzel befejeződik egy C2-beépülési ciklus (Csapó & Csapóné Kiss, 2018).

Többszörösen telítetlen zsírsavak (arachidonsav, linolsav, linolénsav) képzésére az emlősök nem képesek, táplálék útján szükséges bevinniük.

A **telítetlen kötést tartalmazó zsírsavak** keletkezését a monooxygenáz végzi úgy, hogy a molekuláris oxigén két elektronpárral reagál. Ezek közül az egyik a NADPH+H⁺-ről, a másik pedig a zsírsavról származik.

A nyúl zsírellátása

A zsírok a növényekben és állatokban általánosan tartalék tápanyagként szerepelnek. A növényi eredetűeket olajoknak nevezzük. A növényi olajok általában könnyebben emészthetők, illetve nagyobb energiaértékkel rendelkeznek, mint az állati eredetűek nyúlban, javítják az ízletességet. Többféle tényezőt figyelembe kell venni, amikor meghatározzuk a takarmány optimális zsírtartalmát. Az élettani szempontok mellett figyelembe kell venni a gazdaságosságot, valamint nyúl esetében fontos szempont a pellet minősége is (Peter R., 1987). Full fat szójával, illetve más olajos magvakkal sikeresen lehet növelni a takarmány zsírtartalmát (Paul Johnston & Berrio, 1985). Azonban gyapotmag használatánál emelkedett vérkoleszterinszintet és érlemeszesedést figyeltek meg a nyulaknál (Ferguson és mtsai., 1975).

A nyúlnak specifikus zsírszükséglete nincs. Számos vizsgálat szerint a zsírkiegészítés javítja a takarmányértékesítést és a testtömeg-gyarapodást, azonban egyes vizsgálatokban az ellenkezőjét észlelték. Czibulyás és mtsai., 1985 leírása szerint a 2-5% zsírt tartalmazó takarmány a megfelelő a házinyúl számára. Gippert & Póka (1979) szerint a takarmány kiegészítése 5% összeszír tartalomig állati eredetű zsírokkal a hízó nyulak takarmányértékesítését pozitív irányba befolyásolta. A zsírkiegészítés hatással van más takarmányalkotók emészthetőségére is, azonban az 5% feletti zsírkiegészítés az energia, fehérje és nyersrost kihasználását nem javítja. Kísérletek eredményei ugyanis arra utalnak, hogy nagy energiatartalmú tápok esetén a zsírkiegészítés rontja a táplálóanyag kihasználását és akár hasmenést is okozhat, míg kis energiatartalmú tápok esetén javítja azt (Czibulyás és mtsai., 1985).

Az állat testének zsírtartalma függ a takarmány energia-tartalmától. Nagy energiatartalmú takarmányozás esetén a zsírdepók képzésének aránya nagyobb, mint a kis energiatartalmú takarmány etetésekor. Ennek oka, hogy a bevitt kalória meghaladja a metabolikus folyamatok energiaszükségletét. A nyúl testének zsírösszetétele is függ a takarmánytól (Moore & Williams, 1968). A kutatókat komolyan foglalkoztatta a nyúlhús koleszterin tartalma, melyről sokáig azt állították, hogy alacsonyabb, mint más húsoké. Azonban későbbi vizsgálatok szerint ez az érték nem tér el szignifikánsan más húsoktól (Peter R., 1987).

Linolsavra, linolénsavra és arachidonsavra gyakran hivatkoznak esszenciális zsírsavként, mivel, az állat nem tudja ezeket hatékonyan szintetizálni, így, ha hiányoznak a takarmányból, hiánytüneteket, bőr-, illetve növekedési problémákat okoz. Ezek az esszenciális zsírsavak a sejtmembrán alkotórészei, illetve a számos biológiai funkcióval rendelkező prostaglandinok

prekursorai, emellett a zsírban oldódó vitaminok miatt is fontos szerepük van. Esszenciális zsírsavak gyakran megtalálhatók növényi olajokban, így az olajos magvak és egyes gabonamagvak a legjobb forrásai. A nyulak esszenciális olajsav hiánya a lágybélisárból származó bakteriális eredetű zsírsavak miatt ritka, azonban elsődleges zsírsavként a linolénsavat értékeli (Czibulyás és mtsai., 1985).

Kihasználási kísérletek alapján a zsírok látszólagos emészthetősége a nyúlban kiemelkedő, 90-95%. Valójában ezen érték terhelve van azzal a hibával, hogy a bélisárból lévő szaponifikált zsírok nem határozhatók meg, így a kihasználási százalék eltér a valóságtól (Czibulyás és mtsai., 1985).

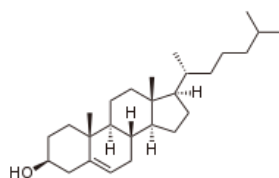
A vérszérum koleszterin, LDL, HDL és triglicerid tartalma

A vér összes koleszterinszintje (1.ábra) nagyon fontos paraméter a szív és érrendszeri betegségek (HCD) patológiájában. Fontos tényező még a koleszterinszint mellett az alacsony sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein, azaz LDL) és a nagy sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein, azaz HDL) mennyisége és aránya.

Az LDL a koleszterin szállítását végzi a májból a sejtek irányába. Az LDL visszakerül újra a májba, vagy felveszik azok a sejtek, melyeknek koleszterinre van szüksége vagy a falósejtek közvetítésével beépül az érfalba, ami ún. plakkok vagy lerakódások formájában jelenik meg, ami érlelmeszesedéshez vezet, ezért hétköznapi értelemben „rossz” koleszterinnek nevezik.

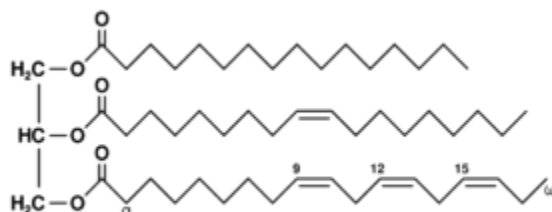
A HDL ezzel szemben felveszi a felesleges koleszterint a vérből (illetve a plakkokból is) és visszaszállítja a májba, ahol lebomlik, illetve az epével kiválasztódik, ezért ez az ún. „jó” vagy „védő” koleszterin, mert a vér koleszterinszintjének csökkentésében vesz részt ezzel az érlelmeszesedést akadályozza, érvédő hatású.

Trigliceridek (2.ábra) a vérzsírok egy másik csoportja, egy glicerinnmolekula és a hozzá kapcsolódó zsírsavakból épül föl. Élettani szempontból az energiellátásban vesznek részt. A koleszterinnel együtt a normálistól eltérő vérkoncentrációjának összefüggését a HCD-kel kimutatták.



1. ábra – koleszterin

Forrás: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Koleszterin>



2. ábra - triglicerid

Forrás: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Trigliceridek>

Biotechnológiai modellek a koleszterin anyagcsere vizsgálatára

Nyúlmodellek

A NOX4-et elsőként a vese epithel sejtjeiben azonosították, ezt követően viszont számos különböző sejtípusban megtalálták, beleértve az endothel sejteket, adipocitákat, neuronokat, a vaszkuláris simaizomzatot, a fibroblasztokat, a szívizomsejteket, a vázizomzatot. A NOX4 a legszélesebb körben vizsgált NADPH-oxidáz, számos génmódosított rágszálómodellt hoztak létre a NOX4 funkció vizsgálatára. A rágszálókkal szemben a nyúl megfelelőbb alanya a transzlációs kutatásoknak, evolúciós távolsága, a genomszekvencia nagyobb fokú hasonlósága és élettani és patológias folyamatok hasonlósága okán. A szív és érrendszeri betegségek vizsgálatának ideális és széles körben alkalmazott modellállata a nyúl. Kiemelt szerepe van olyan esetben, amikor egyes gének hiányoznak a rágszálókban viszont mind az ember, mind pedig a nyúl hordozza a funkcióképes gént. Erre a NOX enzimsaládban is van precedens a NOX5 gén esetében. Vizsgálataink során ezért is választottuk a nyulat, mint modellállatot, mert a NOX4 mellett, ami jelen dolgozat tárgya a NOX5 fehérje is szerepet játszik az érlemezsedés kialakulásában és a jövőben tervezzük egy dupla génkiütött vonal vizsgálatát is, ahol a két gén együttes hiányának hatását is tudjuk vizsgálni. A NOX4 izoforma kutatását hátráltatja az

endogén expressziós fehérjét megbízhatóan kimutatni képes specifikus antitest hiánya. A NOX4 intracelluláris lokalizációja nem tisztázott, a fehérjét számos intracelluláris helyen leírták, beleértve a sejtmagot, az endoplazmatikus retikulumot, a fokális adhéziókat, a plazmamembránt és a mitokondriumokat (Sirokmány és mtsai., 2016) .

Az endotheliális NOX4-ról feltételezik, hogy érvédő szerepe van. vérerekben. Egy vizsgálatban felgyorsult érlelmeszesedést fedeztek fel a *NOX4* génkiütött állatokban, amely a csökkent leukocita adhézióval magyarázható a NOX4 hiányos endothel sejtekben. A vizsgálat rámutatott a NOX4-ből származó ROS-ok feltételezett antiateroszklerotikus hatására is.

A NOX4 a szívben is jelen van, ahol pontos expressziós mintázata még meghatározásra vár (M. Zhang és mtsai., 2010). Tanulmányozták a NOX4 szerepét a szív adaptációjában a nyomás túlterhelésre *NOX4* KO és olyan transzgenikus állatokkal, amelyekben szívspecifikusan túlexpresszálódik a *NOX4*. Eredményeik arra utalnak, hogy a NOX4-nek védő szerepe van a krónikus terhelés által kiváltott stresszben. Ez volt az első tanulmány, amely kimutatta, hogy az enzim hiánya káros is lehet.

Babelova és mtsai. három különböző kóroktanú krónikus vesebetegség lefolyását tanulmányozták *NOX4* génkiütött egérmodellben. A patológiás állapot előidézésére a cukorbetegség által indukált vesekárosodást, az egyoldali húgyvezeték lekötést és az 5/6 nefrektómiát alkalmazták. A *NOX4* hiánya egyik modellben sem volt protektív, és az egyoldali ureter lekötés által kiváltott fibrózis lefolyása még valamivel súlyosabb is volt a *NOX4*-hiányos állatokban. A vese proximális tubularis sejtjeiben tapasztalható nagy expressziós szint és a konstitutív ROS-termelő aktivitás az enzim még pontosan nem meghatározott fiziológiai funkciójára utalnak.

A nyúl, mint modellállat a szív és érrendszeri elváltozások vizsgálatára

Az **ateroszklerózis** a házinyúl bizonyos vérvonalaiban spontán kialakul. Ezeknél az állatoknál megfigyelték, hogy már fiatal, akár 6-8 hónapos korban az összes artéria falában, különös tekintettel az aortára, rizsszemnyi elzsírosodott, elmeszesedett tartalmú athemorák és elmeszesedett kollagén és rugalmas rostok tűnnek fel. Lipofág sejtek ugyancsak megjelennek, hasonlóan az ember megbetegedéséhez (Pachauri és mtsai., 1976). A hajlam (koleszterin-anyagcsere zavara, hiperkoleszterinémia) öröklődik. Az ilyen állatok vérszérumának értékei eltérnek a normál értékektől, az összlipid 20g/l, a koleszterin pedig 4,0 mmol/l értékeket mutat, tehát jelentősen emelkedett. Tulajdonképpen a lipoidok familiaris anyagcserezavaráról van szó (Vetési és mtsai., 1990).

A *vérerek elmeszedése* során az aorta falában (a tunica media-ban) jelentkezik legsúlyosabb alakban a mészsó-lerakódás. Házinyúlban súlyos formában jelentkezik idült vese eredetű urémia, illetve D-hipervitaminózis esetén. Amennyiben az állat takarmánya E-vitaminban is szegény, abban az esetben a betegség igen súlyos alakot ölthet.

A laboratóriumi állatmodellek fontos szerepet játszanak az emberi betegségek tanulmányozásában. A nyulak lipid anyagcseréje (érzékenyek a koleszterin diétára), valamint az ateroszklerózis patogenezise igen hasonló az emberéhez (Fan és mtsai., 2015). A fejlett országokban az említett betegség a vezető halálozási okok közé tartozik, ezért számos transzgenikus nyúlmodellt létrehoztak, hogy tanulmányozhassák az élettani folyamatokat. Jelenleg háromféle általánosan elterjedt nyúlmodellt használnak: koleszterinnel táplált nyulakat, Watanabe hiperlipémiás nyulakat és genetikailag módosított (knock-out és transzgenikus) nyulakat (Fan és mtsai., 2015). Bősze és mtsai., 2016 cikkükben összefoglalják az összes létrehozott nyúlmodelleket a szív- és érrendszeri megbetegedések vizsgálatának céljából.

Az antioxidáns rendszer szerepe és szabályozása

Az oxidációs-redukciós egyensúly fenntartása, a pH szabályozáshoz hasonlóan központi szerepet játszik a homeosztázis fenntartásában. A redox folyamatok gyakorlatilag az összes alapvető élettani folyamatot átszövik, a bioenergetikától az anyagcseréig és az életfunkciókig (Sies és mtsai., 2017).

A reaktív oxigéngyökök nagy reakcióképességű, rövid életű molekulák, amelyekben a pár nélküli elektron vagy elektronok az oxigénatom külső elektronpályáján helyezkednek el (Lengyel, 2010), igen reaktív részecskék és új elektronpár létrehozására törekednek. A reaktív oxigén származékok molekuláris oxigénből kialakuló molekulák. Ide sorolhatjuk tágabb értelemben az ózont (O_3), szuperoxidot (O_2^-), a szinglet oxigént (O^-), illetve a hidrogén peroxidot (H_2O_2) is. Közülük szabadgyöknek csak a szuperoxid és a hidroxilgyök tekinthető. Az oxigén más molekulákkal mint, például nitrogénnel is képezhet reaktív származékokat, például nitrogén-monoxidot (NO), amely szintén fontos signalling molekula (Zana, 2019). A ROS-képződés a szervezetben egy természetes folyamat, oxidatív eustresszre szükség van az életfolyamatok redox jelátvitel útján történő szabályozásához.

Eredetileg úgy látták, hogy a szabadgyökök csak fagociták által felszabadított melléktermékek a test védelme érdekében. Mára már világos, hogy jelátviteli szerepe van sok biológiai rendszerben, mind az növények, mind pedig az állatok sejtjeiben. A szabadgyökök

nekrózist, programozott sejthalált indukálhatnak, aktiválják vagy blokkolják a sejtjelátviteli kaszkádokat és számos gén expresszióját szabályozzák (Hancock és mtsai., 2001).

A baktériumok és archaeák, csakúgy, mint az eukarióták antioxidáns védelmi útvonalakat fejlesztettek ki a ROS hatásának kompenzálására. Az antioxidáns védekezés fő védelmi vonalát elsősorban enzimek alkotják, de emellett megtalálhatók még kis molekulatömegű antioxidánsok is. Harmadik védelmi vonalként meg kell említeni azokat a komponenseket, melyek a már károsodott makromolekulák helyreállításáért vagy eltávolításáért felelősek.

Az antioxidáns enzimek termelődését egy jól jellemzett szignál kaszkád útvonal szabályozza. Oxidatív stressz következtében, a (Keap1) szenzor ciszteinjeit a ROS módosítja, ami az NFE Like BZIP Transcription Factor 2 (*NFE2L2*, korábban *NRF2*) stabilizációjához, felhalmozódásához és a sejtmagba történő transzlokációjához vezet. Az *NFE2L2* a KEAP1-ről való disszociációt követően transzlokálódik a sejtmagba, ahol az *NFE2L2* heterodimerizálódik (sMaf-fal), és az antioxidáns válaszelemhez (antioxidant response element, azaz ARE) kötődve aktiválja az antioxidáns gének transzkripcióját (Stefansson & Bakovic, 2014). Az *NFE2L2* citoprotektív funkciója igazolt, amely az antioxidáns gének expressziójának szabályozásával kapcsolatos (Chen, 2022). A GWAS vizsgálatok alátámasztják, hogy az *NFE2L2* több száz gén szabályozásában vesz részt (Raghunath és mtsai., 2018). Ezek között szerepel a kataláz (CAT). Továbbá a szuperoxid-dizmutáz (SOD), ami a hidrogénperoxidot eliminálja. A glutation átalakulási folyamataiban résztvevő enzimek csoportja, köztük a glutation peroxidáz (GPX), ami a ROS mediált redukált glutation képződést katalizálja, melynek során a lipidperoxidokat alakítja át (Peluso és mtsai., 2012), illetve a glutation reduktáz (GSR), ami pedig a NADPH-függő oxidációt katalizálja, mely folyamatban a NOX4 által történő ROS képződésben részt vevő NADPH-nak is szerepe van (Handy & Loscalzo, 2017; Zeeshan és mtsai., 2016).

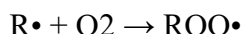
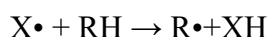
Az *NFE2L2* gén hiányában vagy az *NFE2L2* transzkripció faktor aktiválásának elmaradása következtében a kezdeti ROS-terhelés nem szűnik meg, ez mitokondriális károsodást és kiterjedt ROS-termelődést eredményez.

Lipidperoxidáció

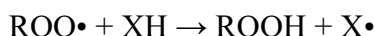
Az ateroszklerózis oxidációs hipotézisének központi eleme az LDL (low density lipoprotein) oxidatív módosítása, ezzel együtt a lipidperoxidációs folyamatok indukciója. A szinglet oxigén és az ózon tudnak például ilyen folyamatot elindítani. Egyre több kutatás foglalkozik a lipidperoxidációs termékek szerepével a sejtműködés szabályzásában, illetve jelátviteli hírvivőként betöltött szerepükkel (Niki és mtsai., 2005).

A lipidperoxidáció során a biológiailag aktív telítetlen kettőskötést (kettőskötéseket) tartalmazó zsírsavak reakcióba lépnek az oxigén eredetű molekulákkal, illetve szabad gyökökkel. Az oxidatív támadás célpontjai között szerepel a koleszterin és a telítetlen zsíracil-csoportokat tartalmazó foszfolipidek (Girotti, 1985). A folyamatok metastabil végtermékei között szerepelnek alkánok, aldehidek (alkenálok és alkanálok), mint például a malondialdehid (MDA). A MDA-koncentráció az oxidatív stressz és az antioxidáns státusz markere (Gawel és mtsai., 2004). A telítetlen zsírsavak peroxidációjával olyan vegyületek keletkeznek, amelyek károsítják a fehérjéket és a sejtek genetikai állományát is.

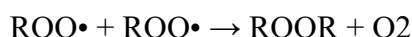
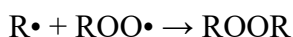
A lipidperoxidáció három részfolyamatra osztható (Mézes & Matkovics, 1986). Az *iniciáció* során a szabadgyök által hidrogén elvonással aktív állapotba kerül a lipid, eközben maga redukálódik. Ennek eredményeként keletkezett lipid, szabadgyök reakcióba tud lépni a molekuláris oxigénnel, melynek eredményeként lipidperoxid gyök keletkezik.



A *propagáció* során láncreakciószerűen terjed tovább a folyamat. A lipidperoxidgyökök hidrogént vesznek fel környezetüktől, azokat szabad gyökökké oxidálják, így ezek redukálódnak átmenetileg stabil lipidperoxidokká. A reakció további lépését a keletkezett szabadgyök biztosítja.



A *termináció* során szabadgyökök közötti reakciók során stabil gyökök és molekulák jönnek létre.



Az antioxidáns rendszer génexpressziós szabályozása

A gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz GAPDH, egy úgy nevezett housekeeping gén, ami azt jelenti, hogy az expressziója viszonylag stabil és folyamatos. Ezen géneket általában úgy írják le, mint "a sejtek létezéséhez nélkülözhetetleneket, függetlenül a szövetben vagy szervezetben betöltött specifikus funkciójuktól", és "stabilan kifejeződő géneket, függetlenül a szövettípustól, a fejlődési stádiumtól, a sejtciklus állapotától vagy a külső jelektől", ezért referenciagénként alkalmazható génexpressziós vizsgálatokban. Egyes funkciói jól ismertek, ezek közül meg kell említeni az energia metabolizmust, ATP és piruvát termelésében betöltött szerepét az anaerob glikolízis révén (Nicholls és mtsai., 2012). Bár a GAPDH fokozott génexpressziója és enzimatis funkciója a sejtproliferációval és tumorigenezissel hozható összefüggésbe, az olyan körülmények, mint az oxidatív stressz, károsítják a GAPDH katalitikus aktivitását, és sejtek öregedéséhez és apoptózishoz vezetnek. Jelen munkában referenciagénként került kiválasztásra.

A TLR4 által mediált oxidált-LDL-nek való kitettség hatása a gyulladásos citokinek termelődésére

A toll like receptor 4 fehérje (TLR4) - Az érlemeszesedés kialakulása során gyulladásos folyamatok indulnak be, progressziója során az immunrendszer is aktiválódik. A gyulladásos sejtek jelenléte az ateroszklerózis minden stádiumában megfigyelhető. Az aktivált gyulladásos sejtek szerepet játszanak az ateroszklerotikus plakkok kialakulásában és azok destabilizációját is előidézik. Ezen túl fontos szerepet játszanak a fertőző ágensek elleni védekezésben. Általánosságban elmondható, hogy az immunrendszer két, egymással szorosan összefüggő úton reagál hatékonyan a károsító ágensekre: a veleszületett és az adaptív immunfelismerő rendszerrel. Az adaptív immunrendszer a környezetben lévő kórokozókra jelen lévő egyedi antigén epitópokhoz való dinamikus alkalmazkodást foglalja magában (specifikus ellenanyagtermelés vezet). A veleszületett immunválasz az első védelmi vonal, és arra korlátozódik, hogy felismerje a magasan konzervált kórokozó motívumokat, a patogén-asszociált molekuláris mintákat (PAMP), melynek receptorai TLR-ek és a scavenger receptorok. A TLR4 főként a Gram- bakteriális lipopoliszacharid (LPS) receptora, a kölcsönhatás következtében a sejtben oxidatív burst, illetve gyulladásos citokintermelődés fokozódása indul el. A TLR-eket a veleszületett immunitásban betöltött döntő szerepük mellett az ateroszklerózissal is kapcsolatba hozták (Hongli Li & Sun, 2007). A TLR4 esetében az oxidált LDL jelenti a triggeret a TL-receptor 4 által mediált molekuláris útvonalak

aktiválódásához, ami az antioxidáns rendszer aktiválódásához, gyulladásos citokinek termelődésének fokozódásához vezet. Ez utóbbiak egyike az interleukin-1 β (IL1- β), melyet az aktiválódás folyamatának markermolekulájaként vizsgálunk jelen munka keretében.

NOX enzimek

A NOX enzimek megtalálhatók szinte minden többsejtű élőlényben, jelen dolgozat azonban kifejezetten az emlősökben megtalálható enzimrendszerrel foglalkozik. A NADPH-oxidázok elektronok transzportját katalizálják a sejtmembránon keresztül, így szerepet játszanak a szervezet szabályozott ROS termelődésében. Az enzimes család tagjai olyan enzimkomplexek, melyek többkomponensűek, citoszolikus, valamint membránköthetű alegységekből épülnek fel.

Első példa az emlős sejtekben a ROS termelésre a sejtek oxidatív robbanása volt. Ezért a fagocitákban kifejeződő NADPH-oxidáz a felelős. Oxidatív robbanásnak hívjuk azt a jelenséget, melynek során a fagocitáló fehérvérsejtek oxigén felhasználása jelentősen fokozódik. Kutatások során kiderült, hogy ez a többlet oxigén-fogyasztás szuperoxid termelésre fordítódik. Ez a mechanizmus kulcsfontosságú a kórokozók elpusztítása során. Az elmúlt évtizedben több fagocita-oxidázzal homológ enzimet is felfedeztek, melyek különféle szövetekben expresszálódnak. Ezeket ma a NOX enzim családként ismerjük, melynek hét izoformáját írták le emlősökben: a NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 és NOX5 fehérjék, valamint a DUOX1 és a DUOX2 (Geiszt, 2011). A legfontosabb közös jellemzőjük egy konzervált, transzmembrán katalitikus doménen keresztüli elektrontranszfer, ahol elektron donorként NADPH-t, akzeptorként pedig molekuláris oxigént használnak (Zana, 2019). A reakció során a szuperoxid anion vagy hidrogén-peroxid képződik. A család tagjai között számos szerkezeti és működésbeli azonosság megfigyelhető. Közös tulajdonságaik között szerepel, hogy a membránon keresztül egy elektront transzportálnak, mely végül molekuláris oxigénre kerül, ezáltal O_2 – képződik. Illetve másik sajátosságuk, hogy a NADPH oxidázok aktiválódásához, szabályozásához elengedhetetlen különböző citoszolikus fehérjék jelenléte (Zana, 2019).

NOX 4

Jelen dolgozatban azzal foglalkozunk, hogy a NOX4 (NADPH-oxidáz-4 szintéziséért felelős) gén kiütése hogyan befolyásolja a szervezet oxidáns-antioxidáns státuszát, és a fehérje hiányának milyen hatása van a lipidperoxidációs folyamatokra nagy koleszterintartalmú takarmány etetése esetén.

A NOX4 elnevezés mellett használják a vese oxidázt is, mivel az enzim jelentős mennyiségben a vesében expresszálódik. A humán NOX4 egy olyan 578 aminosavból álló

fehérje, mely jelentősen aktív, aminosav sorrendje 57%-os homológiát és 39%-os egyezést mutat a Nox2 enzimmel. Egymással 90%-ban homológ az egér és humán NOX4. Aktivitásához szükséges még p22phox és néhány endogénen expresszáldó sejtben Rac1 is. Geiszt és munkatársai humán vesében a vesepapillák epitéliumában, valamint a vesevelő gyűjtőcsatornájában detektálták (Geiszt és mtsai., 2000). A NADPH-oxidázok közül a NOX4 domináns az erek endotheljében, így az általa termelt $O_2^{•-}$ -nek komoly szerepe lehet a kardiovaszkuláris koordinációban, illetve az érlemezés kialakulásában (Donkó, 2010). Szubcellulárisan a NOX4-et kimutatták szinte az összes sejtalkotóban: nukleuszban, perinukleárisan, mitokondriumban, endoplazmatikus retikulumban és a plazmamembránban is.

A humán gén 160 kb-t ölel át a genomban és 18 exont tartalmaz. A 11q14.3-q21 kromoszómarendszelen található a NOX4 génje. Ezen génről mRNS szintű vizsgálatok során azonosítottak további négy splice variánst (Goyal és mtsai., 2005).

NOX és a szív- és érrendszeri megbetegedések

Az **ateroszklerózis** olyan gyulladásos megbetegség, amelyben NADPH oxidázok aktiválódnak (Brandes és mtsai., 2010). Számos tanulmány kimutatta, hogy a NADPH-oxidázok expresszáldásának fokozódása szerepet játszik a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában. Ennek egyik oka, hogy működésük hozzájárul a lipidperoxidációhoz (Lassègue és mtsai., 2012). Egerekben kimutatták NOX2 típusú NADPH expresszáldását fagocitákban, valamint makrofágokban. Emellett az ateroszklerotikus plakkok vaszkuláris sejtjei is fokozott NADPH-oxidáz expressziót mutattak (Judkins és mtsai., 2010). A plakkanyag NADPH-oxidázok aktív expressziójának ellenére rácsáló modellekben ateroszklerózisra irányuló vizsgálatok során eltérő eredmények születtek azzal kapcsolatban, hogy a NOX fehérjék mekkora mértékben járulnak hozzá a betegség kialakulásához. Az étrend által kiváltott érlemezés elleni védelem ApoE knockout egerekben és a Nox2 kiütése csak kis mértékben befolyásolta a fejlődést. Ellentmondásos eredmények azért születtek, mivel a ROS pro-arteriosclerotikus hatására erős bizonyítékok állnak a rendelkezésre (Huige Li & Förstermann, 2009). Másrészt a ROS-eltávolítás szintén ellentmondó eredményeket hozott az érlemezés kialakulásában, és az antioxidánsok ateroszklerózis-ellenes hatása általában nem megfelelő, vagy akár hiányozhat is (Brandes és mtsai., 2010). Ezek az adatok összességében arra utalnak, hogy a ROS szerepe az érlemezésben összetettebb, mint azt eredetileg feltételezték. Ennek tudatában további vizsgálatok lefolytatása szükséges, hogy letisztáozódjon ez az összetett, ellentmondásosnak tűnő folyamat.

Amíg az érlelmeszedésről eltérő bizonyítékok állnak a rendelkezésünkre, addig az érsérülések gyógyulása során képződő hegszövet a **neointima** fejlődésében a NADPH-oxidázokkal való összefüggését bizonyították. Például az enzimeket blokkoló 91ds peptid gyengítette a neointima képződést patkány modellekben (Jacobson és mtsai., 2003). NOX1-es kísérletek mellett más NADPH-oxidázok fokozott expresszáldódását is megfigyelték érkárosodás után. Az érgyógyulás késői szakaszában jellemző a NOX4 megjelenése.

A **központi vérnyomásszabályozás** esetében tanulmányozták a NADPH-oxidázok szerepét, melyek eltérően expresszáldódnak az agyban és az idegszövetben. A központi idegrendszer fontos szerepet játszik a vérnyomás szabályozásában mivel szabályozza a vízháztartást és a szimpatikus aktivitást. A NADPH-oxidázok szerepét ebben a folyamatban az egyes NOX homológok downregulációjával tanulmányozták, olyan adenovírus vektorokkal, amelyeket közvetlenül az előagyba juttattak be. A központilag alkalmazott angiotenzin II teljes vazopresszor hatásához mind a NOX2-re, mind a NOX4-re szükség volt (Cao és mtsai., 2009).

A **magas vérnyomást** több tényező alakítja ki. A megnövekedett perifériás ellenállás mellett a fokozott szív működés, a gyengített vese nátrium- és vízkiválasztás, valamint a diszfunkcionális központi vérnyomásszabályozás egyaránt hozzájárul a magas vérnyomás kialakulásához. Igaz, hogy ezek a tünetek együttesen jelentkeznek, az O^2 -ből származó NO₂ semlegesítés és az ebből származó perifériás ellenállás miatt régóta úgy gondolják, hogy a NADPH-oxidáz vezető szerepet játszik a magas vérnyomásban. Számos tanulmány tesztelt különböző antioxidánsokat hipertóniás modellekben, de a NADPH-oxidáz-kiütött egereken végzett kísérletek száma még mindig korlátozott (Brandes és mtsai., 2010).

A **pulmonalis hypertonia** egy többtényezős betegség, amelyet a különböző okok miatt megnövekedett pulmonalis vasculáris rezisztencia jellemez. A pulmonalis hypertonia etiológiája többek között hypoxiát, gyulladást és proliferációt, valamint apoptózist foglalhat magában, ami érszűkülethez vezethet. Mivel a NADPH-oxidázok szerepet játszanak ezen egyedi folyamatok patofiziológiájában, valószínű, hogy a NOX-eredetű ROS hozzájárul a pulmonális hipertóniához. Kimutatták egerekben, hogy a NOX4 expresszáldódás fokozódik az érrendszerben a hipoxia által kiváltott pulmonalis hypertonia során (Liu és mtsai., 2006).

IV. Anyag és módszertan

A kísérleti állatok

Etikai nyilatkozat

Minden állat a kutatási célra használt állatok gondozásáról és felhasználásáról szóló magyar jogszabályokkal szigorú összhangban volt kezelve, a kísérletet jóváhagyta a MATE Állatjóléti és Etikai bizottsága, és Pest megye kormányhivatala által a kísérlet a [PE/EA/00741-7/2022](#) engedélyezési számon került regisztrálásra. Az állatok szenvedésének minimalizálásáért minden lehetséges erőfeszítést elkövettünk. A vad típusú és a NOX4 génkiütött állatok a MATE-GBI állatházában fenntartott tenyészetből származtak.

Az állatok tartása

A kísérlethez használt nyulakat a MATE-GBI állatházában tartottuk. A kísérlet elvégzésének időszakán kívül az állatok egyedi ketrecekben voltak elhelyezték, a vízhez és takarmányhoz állandó hozzáférést biztosítva, standard megvilágítási programmal, (06.00–18.00 h) és 20 °C hőmérsékleten.

A kísérleti csoportok kialakítása és kezelés

A plakképződés indukálására 0,5% (m/m) koleszterint tartalmazó, nagy zsírtartalmú, aterogén takarmányt kaptak az állatok napi 120 g/nap mennyiségben. 20 hetes vad típusú és NOX4 génkiütött (NOX4-KO) bak nyulakat (n=5) használtunk a kísérleti csoportok kialakításához (n=5). Egy etetlen vad típusú nem etetett ún. kontroll csoportot is kialakítottunk (n=5). 4 napig 50% normál és 50% nagy zsírtartalmú takarmányt kaptak, majd 10 hétig kizárólag 120 g/nap nagy zsírtartalmú takarmányt fogyasztottak. A kísérlethez bakokat használtunk, mert általában kisebb és stabilabb koleszterinszintjük van, mint a nőstényeknek. Egyetlen állatot sem zártunk ki a vizsgálatból. A 10 hetes diéta alatt nem tapasztaltunk eltérést a csoportok között sem a takarmányfelvételben, sem a súlygyarapodásban.

Mintavétel módszere

Vérmintákat vettünk az aterogén diéta megkezdése előtt (0. időpont) és végén (10. hét), illetve az etetési időszak félidejében (5. héten). A mintákat -20 C-on tároltuk felhasználásig.

A mintavételezés a fülvénából történt EDTA-s csövekbe. A biokémiai paraméterekhez mintánként 3ml vér került levételre. A génexpressziós vizsgálatokhoz 3ml teljes vért vettünk Tempus Blood RNA Tube (Catalog nr.:4342792) csövekbe a gyártó utasításainak megfelelően, -20 C-on tároltuk további felhasználásig.

Biokémiai vizsgálatok

A redukált glutation koncentráció meghatározása

A GSH-koncentrációt szérumból mértük (Sedlak & Lindsay, 1968) módszerének megfelelően. A reakció alapját az képezi, hogy a glutation szabad SH-csoportja színes komplexet képez szulfhidrid-reaktív vegyületekkel. A mintákban található fehérjéket 10% (w/v) triklórecetsav oldattal kicsaptuk, majd ezt követően a csapadékot centrifugálással (10.000 g, 3 min) gyűjtöttük össze az eppendorf cső alján. A továbbiakban a felülúszóval dolgoztunk tovább. Az 5,5-ditiobis-(2-nitro-benzoészav) (Sigma, St. Louis) reagens színes (sárga) komplexet képez a felülúszóban lévő nem-fehérje szulfhidrid csoportokkal. A színintenzitás arányos a GSH koncentrációval, így fotometriásan mérhető. A komplexképződéshez szükséges lúgos közeg trisz-hidroximetil-aminometán (Sigma, St.Louis) puffer használatával került beállításra. A koncentrációt 412 nm-es hullámhosszon történő abszorbancia mérésével határoztuk meg.

A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása

A GPx-koncentrációt szérumból határoztuk meg. A módszer alapja, hogy a reaktív oxigéngyökök jelenlétében a redukált glutation az enzim közreműködésével glutation-diszulfiddá (GSSG) oxidálódik. A vizsgálati rendszerben a koszubtrátok GSH (Sigma, St. Louis) és kumul-hiperoxid (Merck, Darmstadt), egy szerves peroxid voltak. Az erzimreakció végbemenetléhez szükséges idő 10 perc, melyet 10%-os TCA végzett fehérjekicsapással állítottunk le (Carlo Erba, Rodano). A GSH-fogyását az 5,5-ditiobis-(2-nitro-benzoészav) -val (Sigma, St. Louis) képzett komplexének fényelnyelésével határoztuk meg 412 nm hullámhosszon spektrofotométerrel. Az enzimaktivitást a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adtuk meg és egységben fejeztük ki, amely 1 nmol redukált glutation oxidációját jelenti percenként a használt rendszerben, 25 °C-on (Matkovics et al. 1988).

A malondialdehid mennyiségének mérése

A malondialdehid olyan metastabil végtermék, mely a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációja során keletkezik. A módszer alapját képezi, hogy az MDA 2-tiobarbitursavval (Sigma, St. Louis) savanyú közegben és magas hőmérsékleten sárgás-vörös színű komplexet képez. Ennek abszorpciós maximuma 535 nm-en mérhető spektrofotometriásan. A rendszer megfelelő pH-értékének beállítását 10%-os TCA-val végeztük (Carlo Erba, Rodano). A centrifugálást (10000g, 3 perc) követően, az abszorbancia mérése a felülúszóból reagens vakkal szemben 535 nm hullámhosszon történt. Standardként 1,1,3,3-tetra-etoxi-propán (Fluka, Buchs) került alkalmazásra (Placer és mtsai., 1966); Matkovics et. al. 1988).

Az összkoleszterin koncentráció meghatározása

A Diagnosticum Zrt. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47061) határoztuk meg a szérumban koleszterin koncentrációját. A mérés (Allain és Matsuura, 1974) által leírt módszer alapján 505 nm-en történik. A koleszterinészter-hidroláz hidrolizálja a koleszterin észtereket, az így létrejövő szabad koleszterin a koleszterin-oxidáz koleszteronná alakítja át. A mérés során hidrogén-peroxid keletkezik (H_2O_2). A hidrogén-peroxid, a fenol és a 4-aminoantipirin indikátorreakciója során peroxidáz enzim segítségével egy vörös kinon származék képződik. A megjelenő szín intenzitása 505 nm-en mérve arányos a koleszterin koncentrációval.

A HDL-szint meghatározása

A CliniChem Kft. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47661) határoztuk meg a szérumban HDL-koncentrációját. A mérés alapját képezi, hogy az 1. reagensben lévő anti-humán béta-lipoprotein hozzákötődik a szérumban a HDL-en kívül megtalálható összes lipoproteinhez (LDL-hez, VLDL-hez és chylomikronokhoz). A 2. reagensben megtalálható koleszterinészteráz és koleszterin-oxidáz csak HDL-C-vel tud reagálni. Az enzimmal történő reakciók hatására a HDL-C-ből keletkezett hidrogén-peroxid peroxidáz jelenlétében egy oxidatív kondenzációs reakció eredményeként az N-etil-N-(2-hidroxi-3-szulfopropil)-3,5-dimetoxi-4-fluoralaninnal és 4-aminoantipirinnel egy kék színű komplexet képez, amelynek abszorbanciája 593 nm-közel hullámhosszon mérhető.

Az LDL-szint meghatározása

A CliniChem Kft. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47791) határoztuk meg a szérumban LDL-koncentrációját. A módszer alapjául szolgál, hogy amennyiben a mintát az 1. reagenssel elegyítik, a benne lévő maszkírozó anyag az LDL-hez kötődik és megvédi az enzimreakciótól. A koleszterinészteráz és a koleszterin-oxidáz reagál a nem-LDL-lipoproteinekkal. Az enzimreakciók révén a nem-LDL-koleszterinből képződő H_2O_2 -t elbontja az 1. reagensben lévő kataláz. A 2. reagens hozzáadagolásával a maszkírozó anyag leválik az LDL-ről és a kataláz inaktíválja a nátriumazidot. Ebben a második lépésben a CHE és a CO kizárólag csak LDL-C-vel reagálhat. Az enzimreakció során az LDL-C-ből keletkezett H_2O_2 hidrogén-peroxid peroxidáz jelenlétében oxidatív kondenzációt közvetít az N-(2-hidroxi-3-szulfopropil)-3,5-dimetoxianilinnal és a 4-aminoantipirin között és egy színes komplex keletkezik. A kék színű komplex abszorpciója 600 nm-körüli értéken mérhető és arányos az LDL koncentrációval.

A triglicerid koncentráció meghatározása

A Diagnosticum Zrt. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47163) határoztuk meg a szérumban a triglicerid koncentrációját. A meghatározás alapelve az, hogy a triglicerideket a lipoprotein-lipáz glicerinné és zsírsavakká bontja (Bucolo & David, 1973), majd a glicerinné-kináz (GK) - adénoszinn-trifoszfat (ATP) és Mg²⁺ ionok jelenlétében – foszforilálja azt, amelynek eredményeként glicerinné-3-foszfat képződik. Ez molekuláris oxigén jelenlétében a glicerinné-3-foszfat-oxidáz (GPO) révén oxidálódik. Fenol származék és 4-aminoantipirinné indikátor reagáltatásával a reakció során felszabaduló H₂O₂ peroxidáz enzim jelenlétében színes terméket eredményez, amely 505 nm-en mérhető.

Génexpressziós vizsgálatok

RNS izolálás

Az RNS izolálást az Applied Biosystems™ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit-tel végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően, azt pontosan követve. A módszer lépései röviden összefoglalva. A Tempus csőbe levett mintákat PBS-sel 12 ml-re egészítettük ki, majd vortexszel alaposan összekevertük és centrifugáltuk (30 perc, 4°C-on 3000 g). A felülúszó leöntését követően az RNS-t reszuszpendáltuk 400 µl “RNA purification resuspension solution” oldattal. RNáz mentes csőbe helyeztük az RNS megkötésére alkalmas oszlopokat, melynek membránját 100 µl “Wash solution 1” oldattal nedvesítettük. A 400 µl mintát az oszlopra pipettáztuk, majd centrifugáltuk (30 másodperc (mp)) 13.000 rpm, minden további centrifugálás ezen a fordulaton történik. Az átfolyt oldatot kiöntöttük, majd az oszlopot visszahelyeztük a csőbe. 500 µl “Wash solution 1” oldattal mostuk az oszlopot, centrifugáljuk (30 mp, maximum sebesség), majd az átfolyt oldatot leöntjük. 500 µl “Wash solution 2” oldatot pipettáztunk az oszlopra, majd centrifugáltuk (60 mp), az átfolyt oldatot leöntöttük. Ezt követően DNáz kezelés következik (Qiagen, RNase free DNase Set, ID:79254), 10 µl DN-áz és 70 µl RDD puffert mintánként össze kell mérni, majd felvisszük az oszlopra és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezt követően 500 µl Wash solution 2 oldattal kétszer mostuk az oszlopot, majd megszárítottuk a membránt centrifugálással (1 perc) és új csőbe helyeztük át, majd 80 µl Rnáz mentes vizet vittünk fel az oszlopra. Ezt követően inkubáljuk 2 percig 70°C-on, majd centrifugáltuk (30mp), majd a felülúszót visszapiptáztuk a membránra és újabb 30 másodpercig centrifugáljuk. Végül az RNS oldat koncentrációját megmértük NanoDrop készülékkel. A mintákat felhasználásig -70 C-on tároltuk.

cDNS átírás reverz transzkripció által

A tisztított teljes mRNS-t stabil szerkezetű komplementer cDNS-sé írjuk át. Ez a folyamat a reverz transzkripció. Az mRNS érési fázisa végén 3' végre kerülő poly-A farok egy két-háromszáz bázishosszúságú adenin telített szakasz, ehhez kapcsolódik a timinben gazdag primerünk (Oligo(dT)), így a reverz transzkriptáz enzim elvégzi az mRNS átírását komplementer szállá. Az átíráshoz az Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor Kit-jét használtuk (Cat.4374966), végig jégen tárolva a mintákat és a mixeket. A reakcióban 400 ng RNS-t írtunk át 20µl végtérfogatban. A mintákat 25°C-on, 10 percig anelláltattuk, majd 37°C-on 120 percig inkubáltuk, végül 85°C-on 5 percig tartott az enzim inaktivációja. A további felhasználáshoz 10x-es hígítást végeztünk.

Primerek

Az online elérhető Primer3 software segítségével történt a primerek tervezése nyúl referencia szekvenciák alapján.

Primerek szekvenciája (1.táblázat):

Gén	Forward	Reverse
GAPDH	ATCTCGCTCCTGGAAGATGG	CAAAGTGGATGTTG TCGCCA
KEAP	GTTCTCTCCGGGTAGTAGC	CCTCAACCGCCTGCTCTAT
NFE2L2	GCTCATCCCGTAACATGCTG	AAGTGGCTGCTCAGAATTGC
TGFβ	CTGATCAGGTGCAGGAGGAG	CTCCGACTTGTAGGCCTTCA
GPX	AGTTTGGGCATCAGGAGAACG	GAAGAGCATGAAGTTGGGCTC
CAT	ACTCGCGAACCGAAACTCTC	AGGACATCGGGTTTCTGCG
SOD2	CAC ATC AAC CAC ACC ATT TTC	TAT AAC TCT GCT GCA CCC C
TLR4	CCATGGCCTTCCTTTCCTAC	AGAAGGGAATGTTGTCAGGGA
IL1B	CTTGTCAGTCGTTGTGG CTC	TGCTACCTGCATCACACTCA

1. táblázat – Primerek szekvenciája

A qPCR módszere

A qPCR segítségével a fluoreszcens jelölésnek köszönhetően a templát amplifikációja valós időben megmérhető. Az amplifikációs görbén nyomon követhetjük ezt a folyamatot, ugyanis ahogy az amplikon mennyisége nő, a fluoreszcencia erőssége is úgy növekedik minden PCR-ciklus után elvégzett mérés alkalmával. Egy küszöbérték van meghatározva, amelyet átlépve már értelmezhető a fluoreszcens jel erőssége a háttéren. Azt a ciklusszámot, aminél a jel átlépi ezt a küszöbértéket Ct értéknek nevezzük. Minél kisebb a Ct érték, annál magasabb a kezdeti templát koncentráció. Leggyakrabban a Taq-man próbát, esetleg SYBR Green-t alkalmaznak a qPCR kivitelezéséhez. A qPCR-t számos területen alkalmazzák, például diagnosztikai célokra, génexpressziós vizsgálatokra, genetikai tesztekhez.

Kísérletünkben SYBR Green PCR Master Mix-et használtunk a qPCR során. A kvantitatív PCR során 60 ciklusos amplifikációt végeztünk, amelynek a ciklus-programja a következő 1, Preinkubáció – 90°C – 900 sec; 2, Denaturáció – 95°C – 15 sec; 3, Primer tapadása – 62°C -20 sec; 4, Lánchosszabbítás – 72°C – 15 sec

Statisztikai módszerek

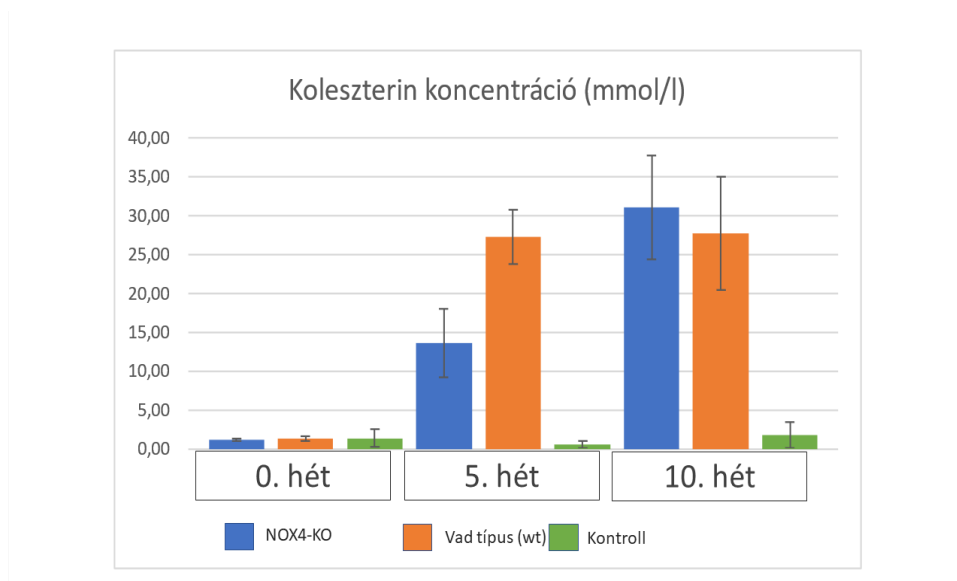
A kiértékelést Past statisztikai programmal végeztem, majd az adatokat Excel táblázatba gyűjtöttem össze, rendszereztem és kiértékeltem. A diagramokat Excel programban készítettem el.

A biokémiai paraméterek vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet futtattam, hogy megállapítsam, hogy van-e különbség a három csoport között. A nemparametrikus próbára szükség volt a minták kis elemszáma miatt. A csoportok egymással történő összehasonlítását Dunn's post hoc tesztel végeztem. Két szempont alapján történt a összehasonlítás. Az egyik az idő: összehasonlítottam az 0, 5 és 10 hetes időpontokon belül a különböző csoportok értékeit, így megkapva a csoportok közötti különbségeket. A másik szempont az volt, hogy eltérő időpontokban hasonlítam össze a csoportokat önmagukkal, így hozzájutva ahhoz, hogy csoporton belül hogyan alakultak az értékek az idő múlásával.

A génexpressziós eredmények statisztikai értékeléséhez Mann–Whitney-próbát használtam, szintén nemparametrikus tesztet az említett ok miatt. Ebben az esetben egyrészt összehasonlítottam a *NOX4* génkiütött állatok csoportját a vad típussal 0, valamint 10 hetes időpontokban. Másrészt pedig összehasonlítottam a *NOX4* génkiütött csoportot, valamint a vad típust önmagával 0 és 10 hetes időpontok között.

V. Eredmények

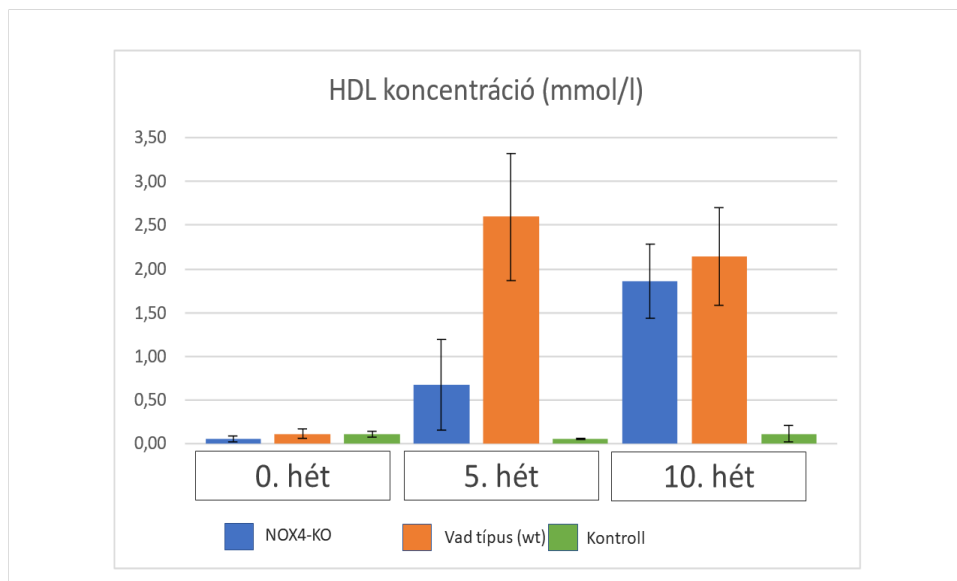
Biokémiai paraméterek



3. ábra - A koleszterin koncentráció alakulása a kísérlet során.

A koleszterin koncentráció (3.ábra) mindhárom csoportban hasonlóan alakult a kísérlet kezdetekor és a kontroll csoportban ez nem is változik a kísérlet teljes ideje alatt. A kísérlet 5. hetén a vad típusú koleszterin-kiegészítést tartalmazó takarmánnyal etetett állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan nagyobb szérumszint volt mérhető ($p=0,000711$). Ez az emelkedett érték a vad típusú csoportban megmarad az etetési periódus végéig (az eltérés a kiindulási értékhez képest itt is szignifikáns ($p=0,0186$)). Ez egyben szignifikánsan ($p=0,03251$) nagyobb a kontroll értéknél.

A *NOX4-KO* kísérleti csoport esetében a koleszterin koncentráció változásának dinamikája ettől eltérő. A 10. hét végére itt szignifikáns emelkedést látunk ($p=0,000407$), azonban a kísérlet félidejében a koleszterin koncentráció emelkedése még nem számottevő. A 10. héten, a *NOX4-KO* egyedek szérumszintje számottevően meghaladja a kontroll csoport értékeit ($p=0,003197$).

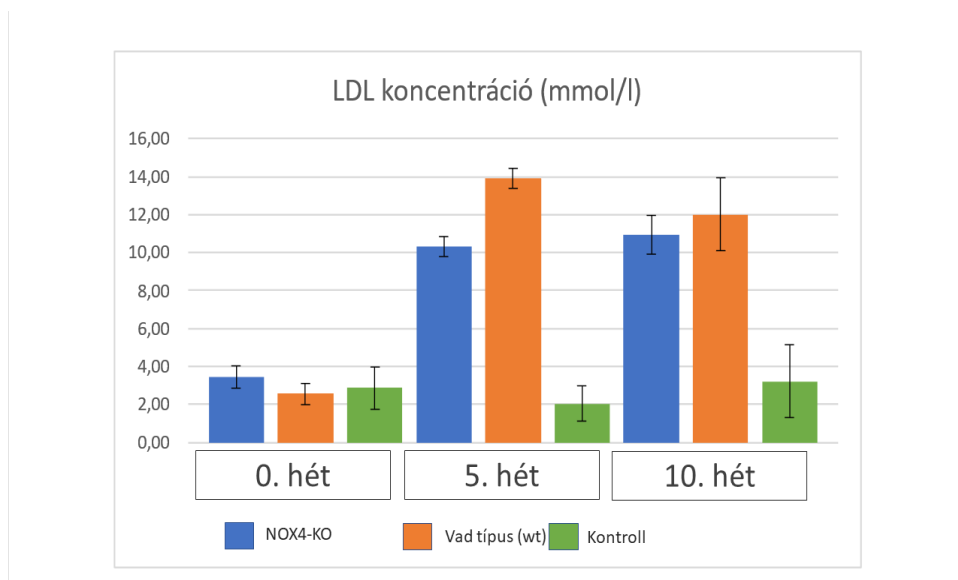


4. ábra - Az HDL koncentráció alakulása a kísérlet során.

A HDL esetében (4.ábra) a koleszterinszint változásához hasonló mintázatot figyeltünk meg. A kísérlet kezdetén nincs szignifikáns eltérés a csoportok között. A koleszterinetetés során a HDL szintje mindkét etetett csoportban nő, azonban a *NOX4-KO* csoport esetében az 5. héten mérsékelt emelkedés figyelhető meg (mely nem tekinthető szignifikánsnak), szemben a vad típusú etetett csoporttal, ahol az emelkedés mértéke szignifikáns már az 5. héten ($p=0,01738$) és a magas HDL szint megmarad a 10. hétre is. A *NOX4-KO* csoport esetében a 10. hétre az emelkedés mértéke közelít a vad típusban mért értékhez, de az emelkedés mértéke elmarad attól, így a 10. héten az etetett csoportok között (*NOX4-KO* és wt) szignifikáns különbség van ($p=0,01485$). A nem etetett kontroll csoportban a HDL értéke nem változik szignifikánsan és eltér az etetett csoportoktól ($p=0,009925$). A kontroll csoport esetében nem volt szignifikáns változás a kísérlet időtartama alatt.

A HDL esetében 0 hetes korban nem található szignifikáns eltérés a csoportok között, illetve a kontroll csoportban a kísérlet teljes ideje alatt hasonló értékeket mértünk. A kísérleti időszak 5. hetében látható, hogy a vad típusban jelentősen megemelkedett a HDL-tartalom, amely mind a *NOX4-KO* ($p=0,04311$), mind a kontroll ($p=0,005349$) csoporthoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult. A 10. héten a vad típusú állatokban a koncentráció továbbra is szignifikánsan ($p=0,009925$) nagyobb a kontrollnál, azonban ekkor már a *NOX4-KO* csoport értéke is számottevően ($p=0,01485$) meghaladja azt.

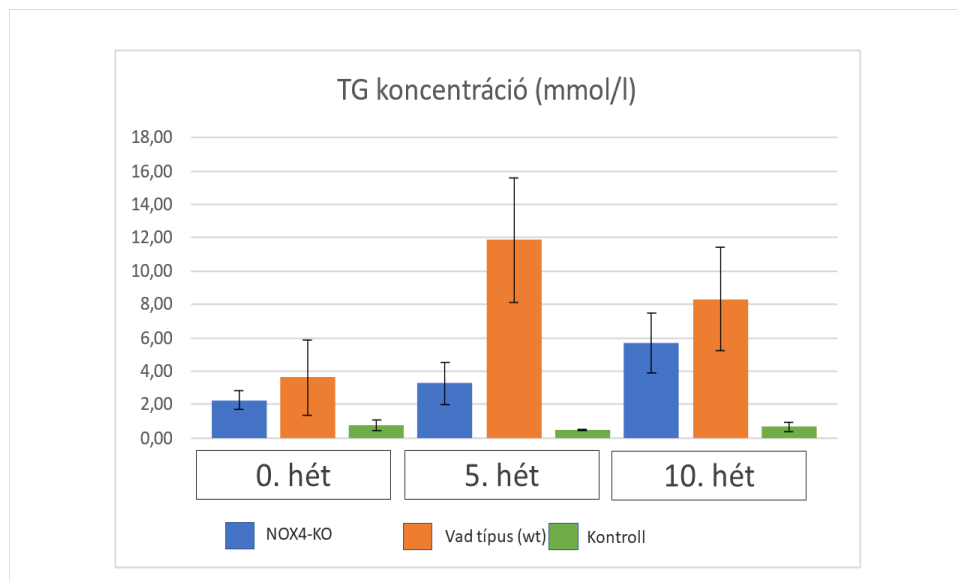
Megvizsgálva a különböző időpontokban mért értékeket a *NOX4-KO* nyulakban a koncentráció növekedése a 0. és 10. hét között bizonyult számottevőnek ($p=0,0009077$). A vad típus esetében ezzel szemben már az 5.hétre szignifikánsan nagyobb ($p=0,01738$) a HDL koncentráció, amely a kísérlet végére valamelyest mérséklődik és így az eltérés sem a 0. sem az 5. heti értékekhez viszonyítva nem számottevő.



5. ábra - Az LDL koncentráció alakulása a kísérlet során.

Hasonlóan a koleszterin és a HDL koncentrációhoz, az LDL koncentráció (5.ábra) esetében sincs eltérés a csoportok között a kísérlet indulásakor és a kontroll csoportban közel azonos értéket mértünk minden mintavétel alkalmával. A kísérlet 5. hetén mindkét emelt koleszterin-tartalmú takarmányt fogyasztó csoportban nagyobb LDL koncentrációt mértünk a kontrollhoz viszonyítva, azonban ez csak a vad típus esetében bizonyult szignifikánsnak ($p=0,0007014$). A 10. héten már mindkét kísérleti csoport LDL koncentrációja számottevően meghaladja a kontroll értéket (*NOX4-KO* $p=0,01485$, vad típus $p=0,009925$).

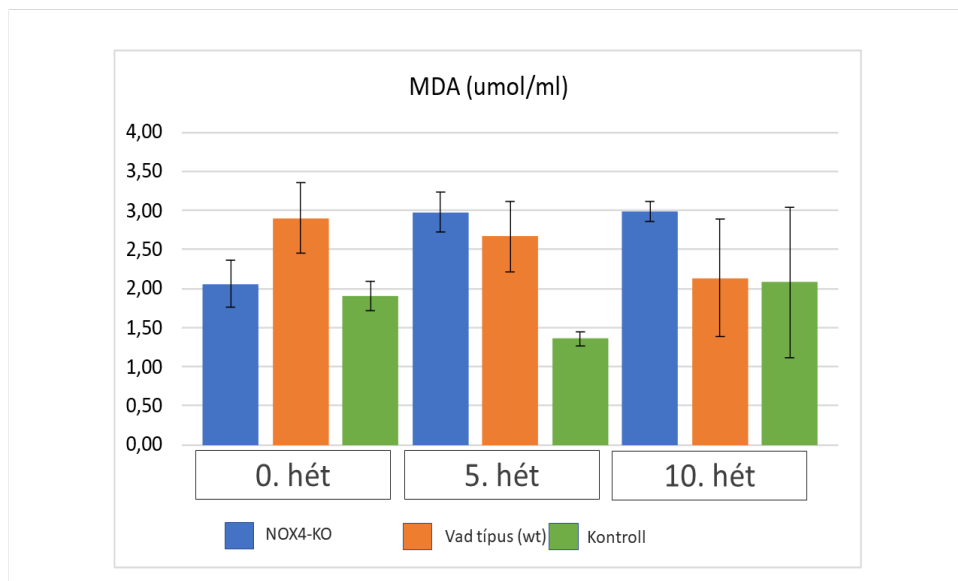
Mind a *NOX4-KO*, mind a vad típusú nyulakban szignifikánsan nőtt az LDL koncentráció a koleszterin-terhelés hatására az 5. hétre (az előbbi csoportnál $p=0,02454$, az utóbbinál $p=0,009467$). Az 5. és 10. hét között bár a *NOX4-KO* csoportban némiképp nőtt, míg a vad típusú csoportban valamelyest visszaesett a szérum LDL-tartalom, összességében ebben az időszakban számottevő változás a csoportokon belül nem történt. Az egyes csoportok LDL koncentrációját a 0. és 10. heti mintákban összehasonlítva mindkét csoportban emelkedett, azonban csak a *NOX4-KO* csoport esetében szignifikáns ($p=0,00234$) az eltérés.



6. ábra - Triglicerid koncentráció alakulása a kísérlet során.

A kontroll egyedekben mért triglicerid koncentráció (6.ábra) a 0. napon statisztikailag szignifikáns mértékben eltér a *NOX4* génkiütött nyulak értékeitől ($p=0,02334$), és a vad típustól ($p=0,003283$). 5 hetes korban az eltérés még szembetűnőbb. Elsősorban a vad típus és a kontroll csoport között figyelhetünk meg erős szignifikáns különbséget ($p=0,0007014$). A kontroll és a *NOX4*-KO értékek közötti különbség ugyan nőtt a kiindulási értékhez viszonyítva, azonban ez statisztikailag nem igazolható. A kezelés 10. hetében, bár a csoportok közötti eltérések kevésbé markánsak, de a 0. mintavételhez hasonlóan mégis szignifikánsan nagyobb mind a *NOX* génkiütött ($p=0,02334$), mind a vad típusú ($p=0,003283$) csoportban a TG-koncentráció a kontrollhoz viszonyítva.

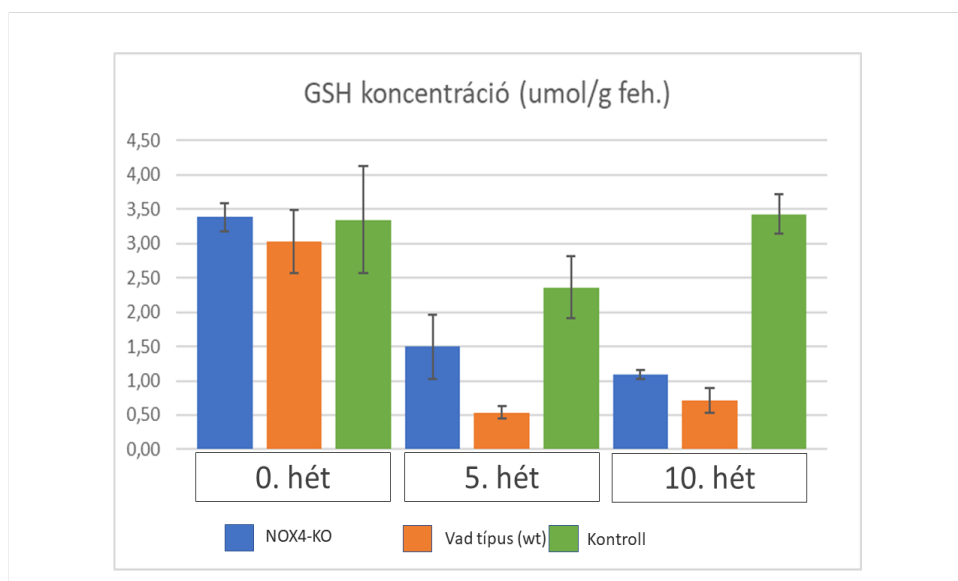
Az etetési időszak 10 hetében a *NOX4*-KO és a vad típusú csoportban egyaránt jelentősen nőtt a triglicerid koncentráció. A növekedés előbbi csoportban lassúbb dinamikát mutat, ezért csak a 0. – 10. mintavétel között bizonyult szignifikánsnak ($p=0,002361$). A vad típusú nyulakban azonban a változás gyorsabban zajlik, ezért az eltérés már a 0 és 5. hét időpontjai között statisztikailag igazolható ($p=0,008107$), a továbbiakban pedig már visszaesés figyelhető meg, amely azonban nem számottevő. A kontroll csoportban egyik időpontban sem volt statisztikailag szignifikáns eltérés.



7. ábra - A MDA koncentráció alakulása a vérszérumban.

A malondialdehid koncentráció (7.ábra) esetében, a vad típusú egyedekben szignifikánsan nagyobb értéket mértünk a kísérlet indulásakor, mint a *NOX4*-KO ($p=0,02973$) kontroll ($p=0,004875$) nyulak szérumában. 5 héttel az etetés megkezdését követően a *NOX4*-KO csoportban volt a legnagyobb az MDA koncentráció, amely a kontroll csoport értékével összehasonlítva statisztikailag is igazolható eltérést jelentett ($p=0,00194$). A 10. héten a *NOX4*-KO egyedekben továbbra is nagy MDA koncentráció volt mérhető, míg a vad típusú és a kontroll egyedek értékei hasonlóan alakultak, és elmaradtak a génkiütött nyulak értékeitől. Az eltérés a vad típus és a *NOX4*-KO csoportok között statisztikailag is igazolható mértékű volt ($p=0,03251$).

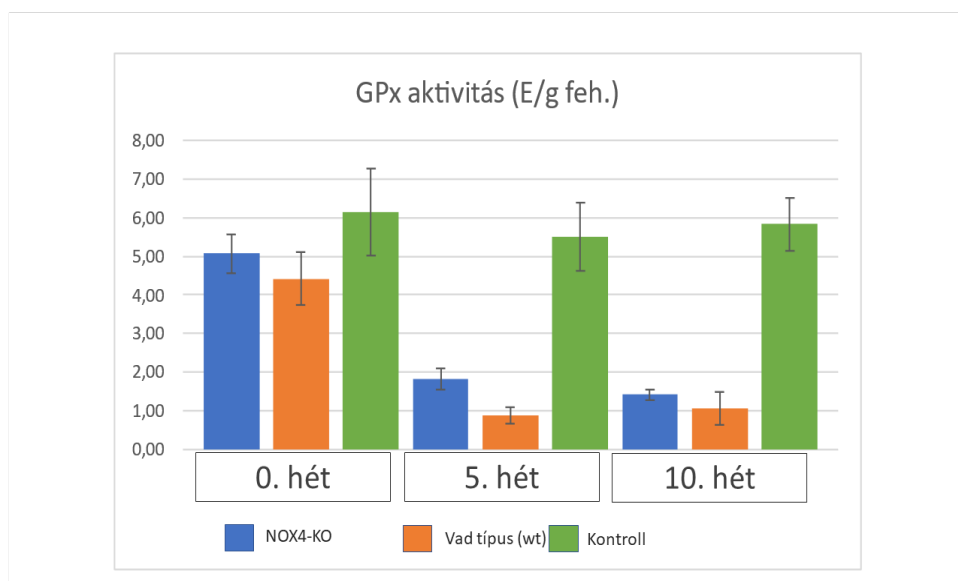
Az egyes kísérleti csoportokban vizsgálva a malondialdehid koncentráció változásait megállapítható, hogy a *NOX4*-KO nyulak esetében statisztikailag igazolható mértékben nőtt az 5. hétre ($p=0,04771$), majd ezen a szinten stabilizálódott 10 hetes etetési időszak végéig. Mindez azt is jelenti, hogy a kiindulási és a 10. héten mért MDA koncentráció szignifikánsan ($p=0,0008893$) eltért egymástól. A vad típus esetében az MDA koncentráció folyamatosan csökken, azonban a nagy egyedi variancia miatt a változások statisztikailag nem számottevőek. A kontroll, koleszterin-kiegészítést nem fogyasztó csoportban a 0. 5. hét között ($p=0,004678$) statisztikailag igazolható eltérés figyelhető meg, a 0. és 10. hét, ill. az 5. és 10. hét között azonban nem látunk eltérést.



8. ábra - A GSH koncentráció alakulása a vérérszérumban.

A redukált glutation (8.ábra) esetében nem volt szignifikáns eltérés a kísérlet kezdetén a vizsgálati csoportok között. Az emelt koleszterin-tartalmú takarmány etetésének 5. hetén azonban a vad típus szignifikánsan eltért a kontroll csoporttól ($p=0,001184$) és ez az eltérés a 10. hétig meg is maradt($p=0,000711$).

A NOX4-KO nyulak esetében 5. hétre statisztikailag szignifikáns ($p=0,03389$) csökkenés következett be, amely a 10. hétre ugyan nem szignifikáns, de tovább csökkent. A vad típusban a redukált glutation koncentráció az 5. hétre hasonlóképpen statisztikailag szignifikánsan csökkent, ezt követően azonban közel azonos szinten maradt. A kontroll csoport mintáiban a vizsgált időszakban a GSH-koncentráció ugyan mutatott némi ingadozást ez statisztikailag nem igazolható.

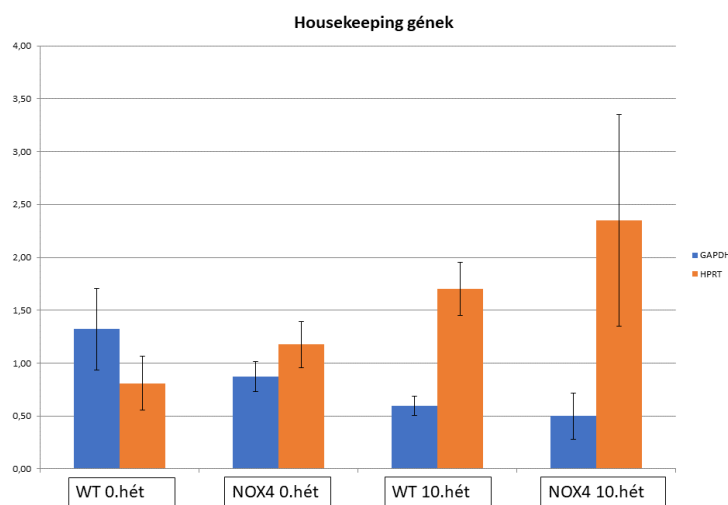


9. ábra - Glutation-peroxidáz aktivitás alakulása a kísérlet során.

A kísérlet kezdetén a glutation-peroxidáz aktivitás (9. ábra) a kontroll csoportban volt a legnagyobb, amely a vad típus egyedeiben mért értékhez viszonyítva szignifikáns eltérést jelentett ($p=0,01465$). A kísérlet 5. hetében az eltérések hasonló, markánsabb mintázatot adtak. Ekkor mindkét koleszterin-kiegészítést fogyasztó csoportban számottevően kisebb volt a kontroll értéknél. A vad típus és kontroll csoport ekkor is szignifikánsan eltért egymástól ($p=0,000711$). A 10. héten a *NOX4-KO* nyúl csoport ($p=0,02334$), valamint a vad típus ($p=0,003283$) esetében is szignifikánsan kisebb a GPx aktivitása a kontroll egyedekben mért értékhez viszonyítva.

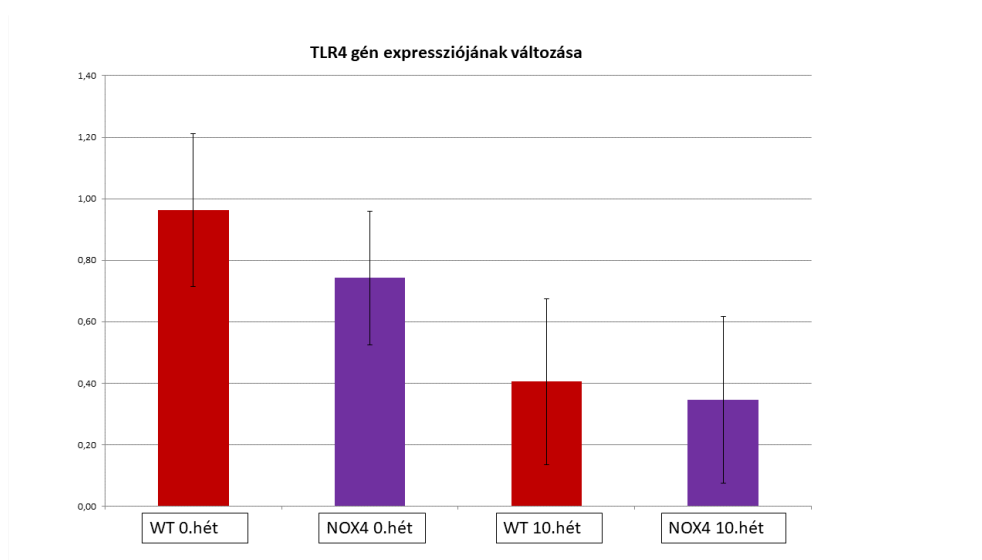
A *NOX4-KO* nyulak esetében a glutation-peroxidáz aktivitás statisztikailag szignifikánsan csökkent a 0. és 5. hét között ($p=0,04771$), majd a 10. hét közel azonos szinten maradt. A vad típus esetében hasonló szignifikáns változást láthatunk az etetési időszak első felében ($p=0,01051$), amely az aktivitás csökkenése a kísérlet végére mérséklődik. A kontroll csoport esetében az enzimaktivitás nem változik szignifikáns mértékben a kísérlet ideje alatt.

Génexpresszió vizsgálata



10. ábra – A housekeeping gének expressziója.

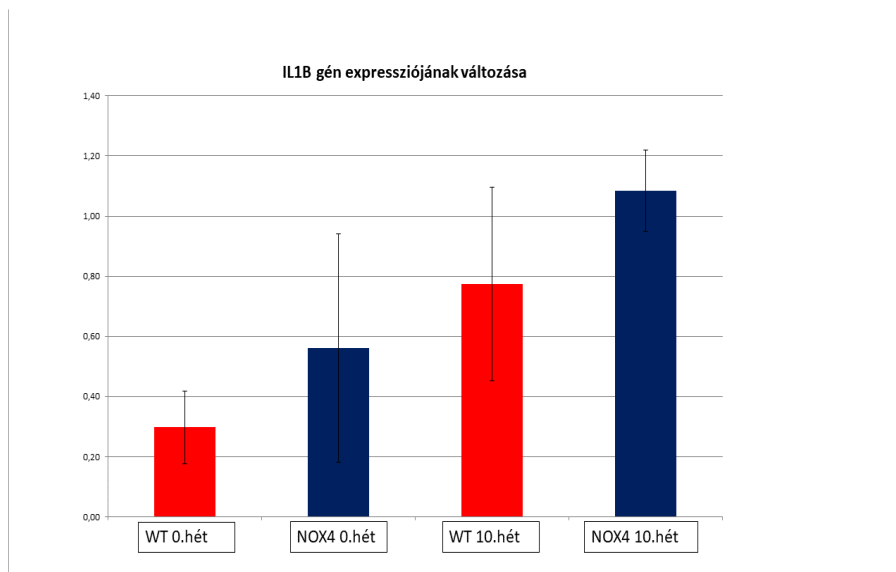
A housekeeping gének közül (10.ábra) a GAPDH-t tekintve sem a *NOX4*-KO sem pedig a vad típus értékei között nem található statisztikailag szignifikáns eltérés. A HPRT értékeiben ezzel szemben az figyelhető meg, hogy a vad típus, valamint a *NOX4*-KO nyulak esetében is szignifikáns az eltérés a 0 és 10. heti időpontok között. Emiatt a GAPDH-t választottuk a relatív expresszió kifejezésére, mivel az „stabilabb” pontot feltételez.



11. ábra – A TLR4 gén expressziója.

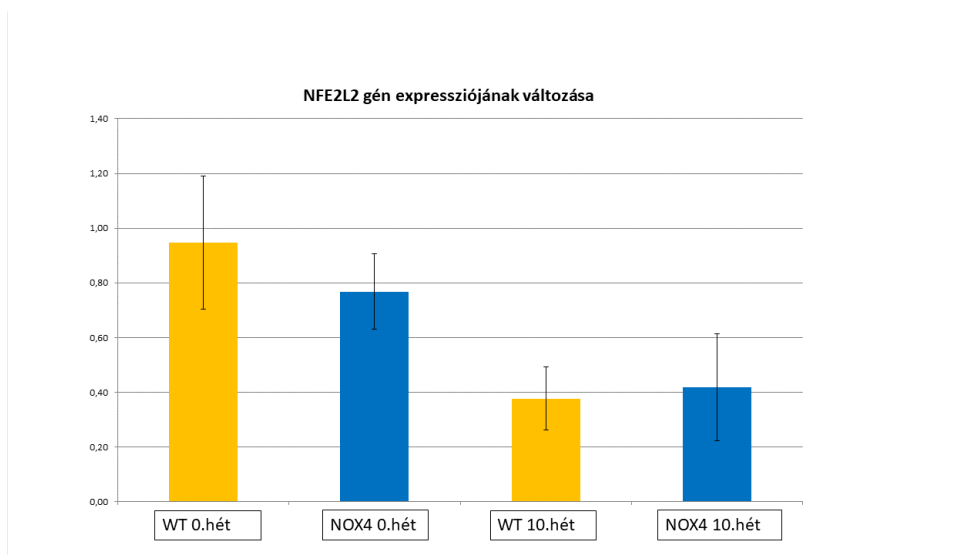
A TLR4 esetében (11.ábra) azt lehet megfigyelni, hogy 0 hetes időpontban a *NOX4* és a vad típus között statisztikailag szignifikáns eltérés van ($p=0,019964$), amely a 10. heti

időpontra kiegyenlítődik. Emellett az is látható, hogy a 0. és 10. időpont között szintén statisztikailag szignifikáns csökkenés van ($p=0,029401$).



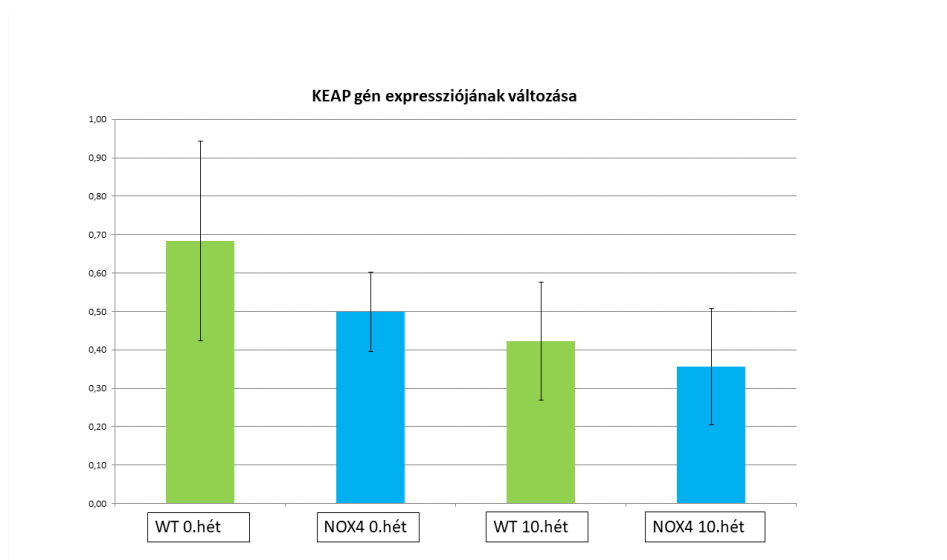
12. ábra – Az IL1B gén expressziója.

Az IL1B esetében (12.ábra) az figyelhető meg, hogy statisztikailag szignifikánsan növekszik a *NOX4* génkiütött nyulak 0. és 10. időpont közötti expresszió.



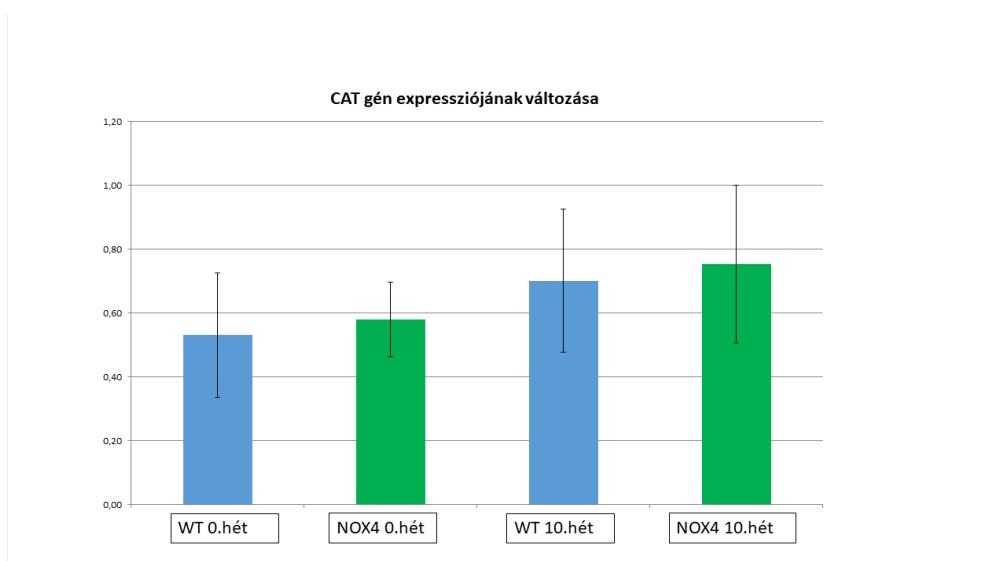
13. ábra – Az NFE2L2 gén expressziója.

Az NFE2L2-t megfigyelve (13.ábra) az látható, hogy mind a *NOX4* génkiütött nyulak esetében ($p=0,011925$), mind pedig a *NOX4* génkiütött nyulak esetében ($p=0,030383$) statisztikailag szignifikáns csökkenés következett be.



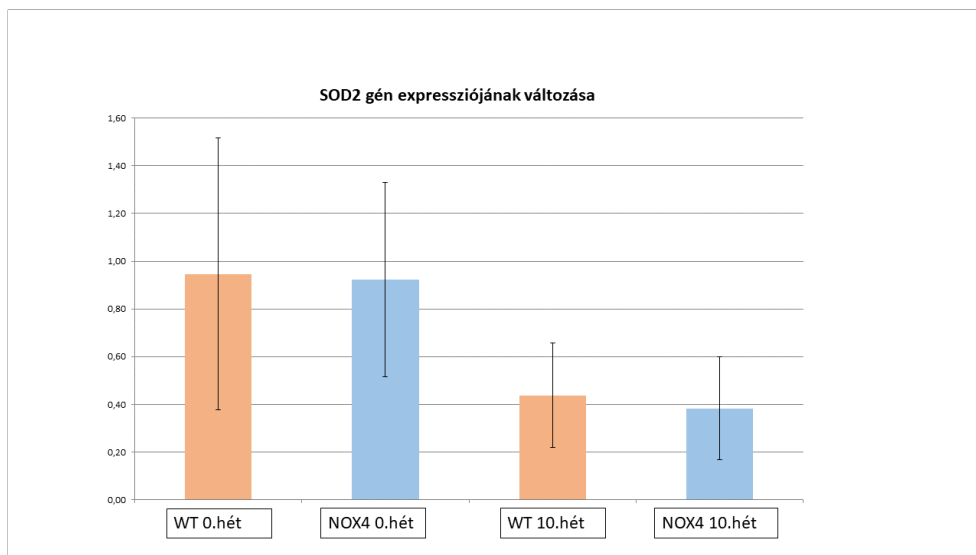
14. ábra - A KEAP gén expressziója.

A KEAP génexpresszióját tekintve (14.ábra) megfigyelhetjük, hogy a 0 és 10. időpont között van statisztikailag igazolható csökkenés a vad típus csoportban ($p=0,030383$). A többi paramétert összehasonlítva nem lehet látni statisztikai eltérést.



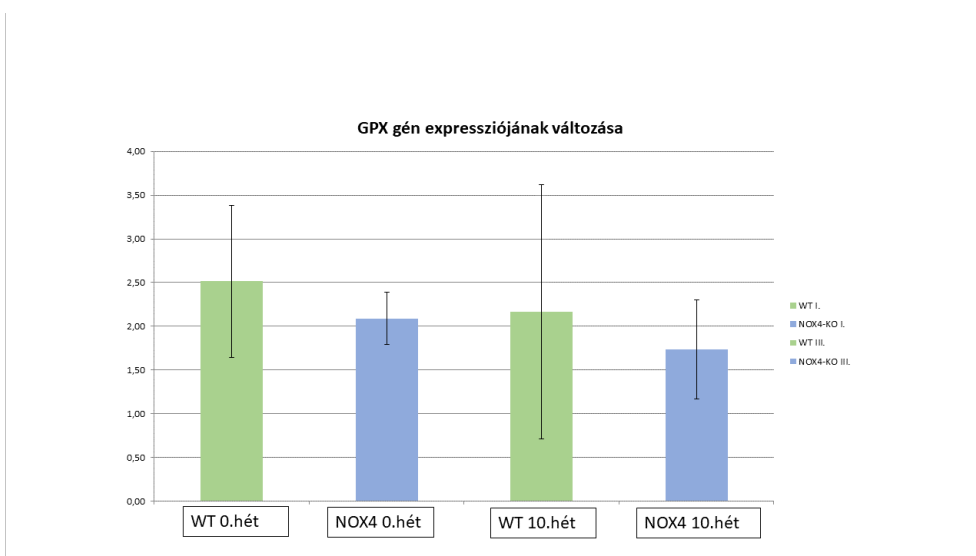
15. ábra – A CAT gén expressziója.

A CAT génexpressziós szintjei esetében (15.ábra) nem látható statisztikailag szignifikáns különbség.



16. ábra – A SOD2 gén expressziója.

Nincsen statisztikailag értékelhető különbség a SOD2 esetében (16.ábra) az egyes csoportok és időpontok között.



17. ábra – A GPX gén expressziója.

A GPX tekintetében (17. ábra) nem figyelhetünk meg statisztikailag igazolható eltérést.

VI. Diskusszió

A szérum zsír összetételének változásai

A kontroll, azaz hozzáadott koleszterint nem tartalmazó keveréktakarmánnyal etetett csoportban nem látható statisztikailag szignifikáns változás a 10 hetes periódusban sem az összes koleszterin, sem a HDL, LDL, illetve triglicerid szint vonatkozásában.

A kísérleti csoportokban a koleszterin és a HDL koncentráció a kísérlet ideje alatt jelentős változást mutat. Mindkét paraméter, mindkét csoportban emelkedik az etetési időszakban, azonban ennek dinamikája a két csoportban eltérő. Míg a vad típusú állatokban a koleszterin és a HDL koncentráció is szignifikánsan megnő már az 5. hétre és ezen a szinten stabilizálódik, addig a *NOX4-KO* csoportban a koncentráció növekedése mindkét paraméter esetében lassúbb folyamat, így szignifikáns eltérést csak a 10. héten mutat. Az LDL koncentráció esetében a két csoportban hasonló mértékű és hasonló ütemű növekedést tapasztaltunk.

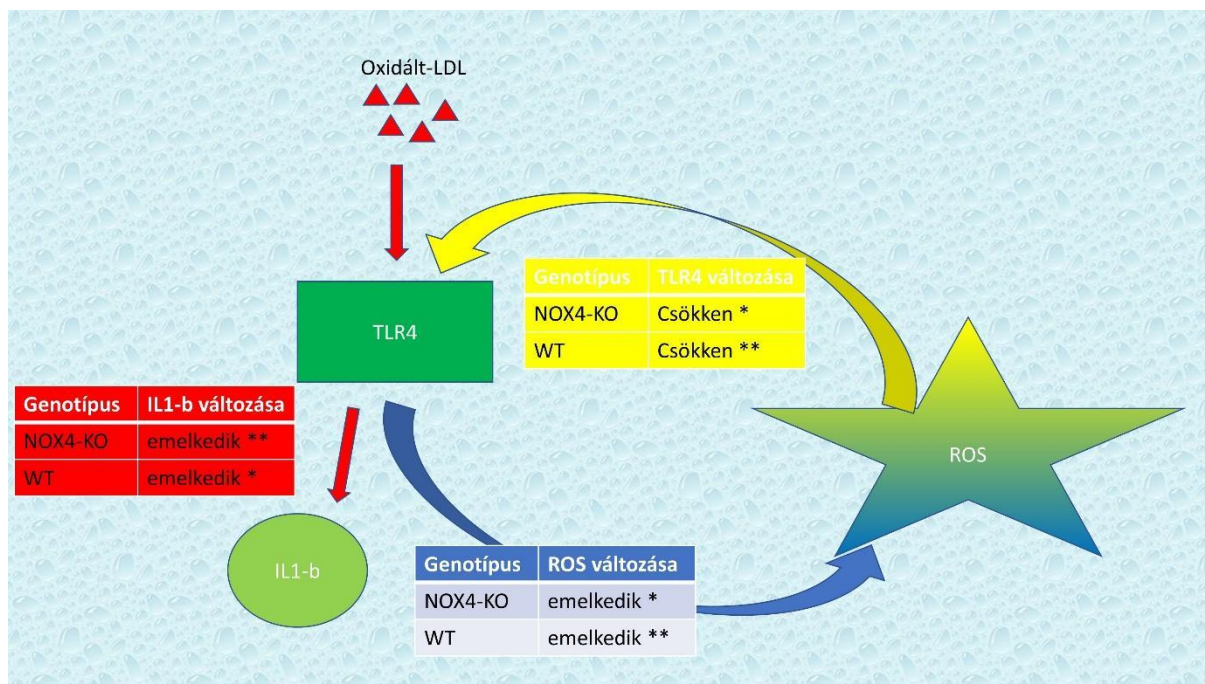
A fentiek alapján a *NOX4-KO* genotípus esetében, feltételezzük a *NOX4* hiány érlemeszesedést fokozó (mértékében és/vagy kifejlődésének gyorsaságában) hatását. A *NOX4-KO* genotípus esetében a HDL szint emelkedése elmarad a vad típustól, ennek magyarázatára két lehetséges, de egy irányba mutató hipotézist állítottunk fel. Az egyik szerint feltételezzük, hogy a *NOX4* gén hiánya csökkenti a koleszterin fehérjéhez kapcsolódását, azaz a HDL-képződést és ennek következtében a periféria koleszterin mentesítése gyengébb hatásfokú, amely hozzájárulhat az atherosclerosis kialakulásához. A másik hipotézis szerint a vérben keringő HDL nagyobb mértékben ürül a szervezetből és ezért tapasztaljuk az alacsonyabb szérum HDL szintet a *NOX4-KO* állatok esetében. A két lehetséges hipotézis tesztelése további vizsgálatokat igényel, melyek során az érben keletkező plakkok összetételének, illetve a plakkosodás mértékének, továbbá a máj anyagcseréjének vizsgálata tovább árnyalhatja az eredményeinket.

Az oxidált LDL által indukált TLR4 által közvetített oxidatív változások

A TLR4 által mediált ROS képződést a receptor-ligand kölcsönhatás váltja ki (Miller, 2005), ami egészséges állat szervezetében, tehát ahol hiányzik vagy nagyon alacsony a TLR 4 különböző ligandjainak a koncentrációja, nem indukálódik.

Vizsgálataink alapján a TLR4 expressziójának szintje szignifikánsan alacsonyabb a *NOX4-KO* csoport esetében (a kísérlet kezdetekor). TLR4 által indukált ROS termelés egyik forrása a NOX enzimek által termelt ROS, aminek szintje feltételezhetően alacsonyabb a *NOX4* gén kiütésének következtében. A ROS szint emelkedése ugyanakkor negatívan szabályozza a TLR4 expresszióját, tehát ha egy rendszerben alacsonyabb a ROS szintje, akkor azt várjuk, hogy a TLR4 expressziója csökken, aminek éppen az ellenkezőjét tapasztaltuk a kezeletlen *NOX4-KO* csoport viszonylatában. A ROS szint tényleges eltéréseinek, változásának vizsgálata lényeges információt hordoz, ezért ennek vizsgálat fontos lehet a további vizsgálatok tervezésekor.

A koleszterin-kiegészítés során nő a keringésben mind az összes koleszterin, mind az LDL mennyisége, ezt a vizsgálataink során is így tapasztaltuk. Tudjuk azt is, hogy az LDL-ből a szervezetben keletkezik oxidált LDL (oxLDL), ami a TLR4/CD14 komplexen keresztül szignáltranszdukciós utakat aktivál, melynek következtében oxidatív burst jelentkezik, azaz nagy mennyiségű ROS képződése történik az érintett sejtekben (18. ábrán kék színnel jelölve) (Peluso és mtsai., 2012).



18. ábra - Az oxidált LDL által indukált TLR4 által közvetített oxidatív változások

A ROS szint emelkedése a TLR4 receptor expressziójának csökkenését idézi elő (18. ábra), ezt a korábban már leírt összefüggést, a mi adataink is alátámasztják. A TLR4 expressziójának csökkenése eredményeink alapján kifejezettebb a vad típusú csoportban, aminek magyarázata a *NOX4* hiány miatti alacsonyabb ROS képződés lehet (18. ábrán sárga színnel jelölve).

Ezzel párhuzamosan a kezdeti TLR4 által mediált indukció következtében a citokinek expressziója fokozódik, ennek a folyamatnak/aktivációnak az egyik markere az IL1-beta, melynek növekedését megfigyeltük a 10 hetes kezelés végére -párhuzamosan a TLR4 expressziós szintjének csökkenésével- mind a *NOX4*-KO mind a wt csoportokban. Ugyanakkor csak a *NOX4*-KO csoport esetében volt szignifikáns az IL1-beta szint emelkedése. Ennek a némileg kifejezettebb emelkedésnek a hátterében feltételezéseink szerint a *NOX4* génkiütés következtében fennálló alacsonyabb ROS képződés és az ezzel összefüggő alacsonyabb TLR4 aktivitás állhat (18. ábrán piros színnel jelölve).

Az antioxidáns rendszer aktiválódása

A glutation-redox rendszer jellemzésénél a vad típusban és a kontrollban a változás ugyan olyan tendenciát mutat. Az látszik, hogy 5. és 10. hétig fokozatosan csökken a GSH és GPx aktivitás, amely teljesen összhangban van, mivel a GSH szubsztrátja, míg az MDA koncentráció közel állandó vagy növekszik az idővel. Ezt okozhatja az, hogy a koleszterin bevitel elindít egy gyors oxigén gyök képződést, amire aktiválódik a glutation-redox rendszer, de az 5.hétre már ez a rendszer kimerül. Ezért úgy gondoljuk, hogy ismétlés esetén egy gyakoribb mintavételre van szükség a kezdeti stádiumban. Mivel a vad és *NOX4* ugyan úgy reagált, ezért úgy tűnik a génkiütés a glutation-redox rendszert nem érinti. A védelmi vonal kimerül, erre utal, hogy a kontrollnál végig a kiindulási szinten marad a GSH és GPx szint. A kiindulásban nincsen szignifikáns különbség. Tervezzük, hogy az oxidatív gyökök mennyiségét is mérni fogjuk az oxidatív stressz pontosabb igazolására.

A növekvő LDL szintre mindkét csoportban (*NOX4*-KO, vad típus) úgy reagált, hogy csökkent a legtöbb gén expressziója. A lehetséges ok csökkenő expressziókat a növekvő LDL szintre reagálva azzal magyarázhatjuk a *NOX4* génkiütése esetén, hogy a k.o. állatokban mindig alacsonyabb a ROS termelés, amely csökkenti a tagok expresszióját is. Azonban a vad típusnál csökkenő génexpressziós értékek magyarázatának megtalálása további vizsgálatokat igényel.

A kataláz esetében a vad típusú csoportnál az expresszió növekszik, a *NOX4*-KO csoport értéke csökkent. Ez arra enged következtetni, hogy a kataláz aktivitásának növekedése szükséges volt a növekvő ROS termelés miatt, amely a *NOX4* génkiütés hatására igazolhatóan csökken.

Az NFE2L2 és a KEAP1 két kulcsfontosságú fehérje, amelyek részt vesznek a sejtek oxidatív stresszre adott válaszában. Fiziológias körülmények között a Keap1 az NFE2L2-höz kötődik. Amikor azonban a sejtek oxidatív stressznek vannak kitéve, a Keap1 oxidálódik és disszociál az NFE2L2-ről, lehetővé téve az Nrf2 számára, hogy bejusson a sejtmagba és aktiválja az antioxidáns védelemben és méregtelenítésben részt vevő géneket, köztük a katalázt, a szuperoxid dizmutázt, a glutation peroxidázt, melyek expressziójában nem tapasztaltunk eltérést/változást a vizsgálataink során. A génexpresszió mértéke azonos volt a koleszterin-kiegészítés kezdetén és a 10 hetes etetési periódus végén. Azonban ez nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy a kezelés következtében változott a gének expressziója. Érdekes lehet az is, hogy a változás milyen dinamika mentén történik. Ennek részletesebb elemzése további

vizsgálatok tárgya. Köztes időpontban, az 5. héten történt mintavétel, ezen minták feldolgozása még folyamatban van, de valószínűleg szükség lesz további köztes időpontokban történő mintavételekre, ha az antioxidáns enzimek expressziós változásának pontosabb mintázatát és a NOX4 enzim hiányának következményeit alaposabban fel szeretnénk tárni az érlelmeszesedés ezen nyúlmodelljében.

Érdekes eredmény, hogy a kísérleti modellünkben megfigyeltük az NFE2L2 és a Keap1 expressziójának csökkenését a kiindulási értékekhez képest a 10 hetes koleszterinetetés végére. Ezt a jelenséget már korábban is leírták, miszerint a hosszan tartó oxidatív stressz mind az NFE2L2, mind a KEAP1 expressziójának csökkenéséhez vezethet. Ez feltehetően azért következik be, mert az elhúzódó oxidatív stressz magukat a fehérjéket is károsíthatja, beleértve a fehérjék oxidációját és a degradációt, ami a szintek csökkenéséhez vezet. Ezenkívül az oxidatív stressz epigenetikai változásokhoz (pl. DNS metiláció, hiszton módosulások) is vezethet (Bhat és mtsai., 2018, B. Zhang és mtsai., 2016), ami érintheti az NFE2L2-t és a KEAP1-et kódoló gének promóter régióját is. Erre vonatkozó utalások vannak a szakirodalomban (S. Zhang és mtsai., 2022) ahol leírják, hogy az epigenetikai módosítások befolyásolhatják a transzkripciós faktorok hozzáférhetőségét a promóter régióhoz, és végső soron gátolják a génexpressziót, ami csökkent aktivitáshoz vezet. Ezért a hosszan tartó vagy súlyos oxidatív stressz mindkét fehérje expressziójának csökkenéséhez vezethet, maguknak a fehérjéknek a károsodása és az epigenetikai változások miatt. Ennek vizsgálata, az epigenetikai mintázat változásainak leírása és összehasonlítása szintén terveink között szerepel.

További javaslatok

Irodalmi adatokból ismert, hogy a vér sejtjes elemeiben típusonként eltérő az antioxidáns aktivitás szintje. A neutrofil granulocitákban például magasabb a szuperoxid-dizmutáz és kataláz transzkriptumok szintje, mint a monocitákban vagy makrofágokban, azonban a SOD fehérje szintje hasonló, míg a kataláz aktivitása magasabb a neutrofilekben. A GPX expressziója és aktivitása és a GSH-tartalom magasabb a monocitákban, mint a neutrofil granulocitákban (Pietarinen-Runtti és mtsai., 2000). Vizsgálataink során a vér összes sejtjes eleméből preparált mintán végeztük az elemzéseinket, így a vér különböző sejtpopulációinak összeadott értékeit mérjük, a tényleges változás akár ellentétes is lehet az eltérő fehérvérsejt populációk között. A különböző fehérvérsejt populációk szortírozása a sejtfelszíni markereik alapján az ún. flow citometria módszerével lehetővé teszi, hogy az egyes populációkat egymástól elkülönítve vizsgáljuk.

A NOX4-ről egyes vizsgálatok alapján feltételezik, hogy az érrelmeszesedéssel összefüggésben ateroprotektív tulajdonságokkal is rendelkeznek. A szuperoxid helyett egy másik ROS-prekurzort, hidrogén-peroxidot szabadít fel, ami nem lép kölcsönhatásba a nitrogén-oxidokkal, így a NOX4 nem fokozza a peroxinitrit keletkezését (Di Marco és mtsai., 2016; Schröder és mtsai., 2012). Az ér simaizomsejtek (VSMC) proliferációja központi szerepet tölt be az érrelmeszesedés kialakulásában ennek gátlása, tehát érvédő hatású. A NOX4 által felszabaduló hidrogén-peroxid képes csökkenteni a VSMC proliferációs arányát, így gátolja az érrendszeri remodellinget és a gyulladást, valamint képes fenntartani az eNOS és a heme-oxigenáz-1 expresszióját érrendszeri stresszhelyzetben (Fulton & Barman, 2016). Ezzel szemben szívhipertrofiás és ischaemiás stroke rágszálómodellben a NOX4 káros hatását mutatták ki (Nishimura és mtsai., 2016). A hidrogén-peroxid, valamint más ROS-ok egyszerre hathatnak védő és károsító hatásúként, ami függhet a sejttípustól, a ROS mennyiségétől és szubcelluláris elhelyezkedésétől.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni kitartó és precíz munkáját három konzulensemnek, Balláné Dr. Erdélyi Mártának, Dr. Bodrogi Lillának és Pintér Tímeának. Szeretném emellett megköszönni, hogy hozzáértő labormunkájával hozzájárult Dr. Balogh Krisztián a biokémiai mérésekhez, valamint Pintér Tímeának az elvégzett génexpressziós vizsgálatokat. Szeretném megköszönni Plank Patriknak is szakértő konzultációját a statisztikai vizsgálatokat illetően.

Irodalomjegyzék

- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(4), 470–475.
- Babelova, A., Avaniadi, D., Jung, O., Fork, C., Beckmann, J., Kosowski, J., Weissmann, N., Anilkumar, N., Shah, A. M., Schaefer, L., Schröder, K., & Brandes, R. P. (2012). Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(4), 842–853.
- Bhat, A. V., Hora, S., Pal, A., Jha, S., & Taneja, R. (2018). Stressing the (Epi)Genome: Dealing with Reactive Oxygen Species in Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(13), 1273–1292.
- Bősze, Z., Major, P., Baczkó, I., Odening, K. E., Bodrogi, L., Hiripi, L., & Varró, A. (2016). The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 121(2), 123–130.
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2010). NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(5), 687–706.
- Bucolo, G., & David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*, 19(5), 476–482.
- Cao, X., Demel, S. L., Quinn, M. T., Galligan, J. J., & Kreulen, D. (2009). Localization of NADPH oxidase in sympathetic and sensory ganglion neurons and perivascular nerve fibers. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 151(2), 90–97.
- Chen, Q. M. (2022). Nrf2 for protection against oxidant generation and mitochondrial damage in cardiac injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 179, 133–143.
- Czibulyás, J., Molnár, B., Pacs, I., & Csikváry, L. (1985). *Nyúltenyésztők kézikönyve* (S. Holdas, Szerk.). Mezőgazdasági Könyvkiadó.
- Csapó, J., & Csapóné Kiss, Z. (2018). *Biokémia agrármérnököknek*. Scientia Kiadó.
- Di Marco, E., Gray, S. P., Kennedy, K., Szyndralewicz, C., Lyle, A. N., Lassègue, B., Griendling, K. K., Cooper, M. E., Schmidt, H. H. H. W., & Jandeleit-Dahm, K. A. M. (2016). NOX4-derived reactive oxygen species limit fibrosis and inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells in diabetic atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 97, 556–567.
- Donkó, Á. (2010). *Peroxidáz és NADPH-oxidáz enzimek működésének vizsgálata*.
- Engelking, L. R. (2010). *Textbook of veterinary physiological chemistry*. books.google.com.
- Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xu, J., Zhang, J., Liu, E., & Chen, Y. E. (2015). Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, 146, 104–119.
- Ferguson, T. L., Wales, J. H., & Lee, D. J. (1975). *Cholesterol levels, atherosclerosis and liver morphology in rabbits fed cyclopropenoid fatty acid*.
- Fonyó, A. (2011). *Az orvosi élettan tankönyve*.
- Fulton, D. J. R., & Barman, S. A. (2016). Clarity on the Isoform-Specific Roles of NADPH Oxidases and NADPH Oxidase-4 in Atherosclerosis [Review of *Clarity on the Isoform-Specific Roles of NADPH Oxidases and NADPH Oxidase-4 in Atherosclerosis*]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(4), 579–581.
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie*, 57(9–10), 453–455.
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P., & Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8010–8014.

- Geiszt, Miklós. (2011). *NADPH-OXIDÁZ ÉS PEROXIDÁZ ENZIMEK VIZSGÁLATA EMLŐS SEJTEKBEN*.
- Gippert, T., & Póka, G. (1979). *Nyúltáp-kiegészítés zsírpórral*.
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2), 87–95.
- Goyal, P., Weissmann, N., Rose, F., Grimminger, F., Schäfers, H. J., Seeger, W., & Hänze, J. (2005). Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(1), 32–39.
- Gurr, M. I. (2011). *Lipid Biochemistry: An Introduction* [PDF]. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5907-1>
- Hancock, J. T., Desikan, R., & Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 345–350.
- Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2017). Responses to reductive stress in the cardiovascular system. *Free Radical Biology & Medicine*, 109, 114–124.
- Hellung-Larsen, P. (1968). Lactate dehydrogenases of colostrum and milk from different species in relation to cellular content. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 27(3), 703–708.
- Holdas S., Csikváry L., & Szikora A. (1975). *A nyúltenyésztés kézikönyve* (Sándor H., Szerk.). Mezőgazdasági Kiadó.
- ISO 3656:2011 International Standard Fourth edition. Animal and vegetable fats and oils – Determination of ultraviolet absorbance expressed as specific UV extinction. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.
- Jacobson, G. M., Dourron, H. M., Liu, J., Carretero, O. A., Reddy, D. J., Andrzejewski, T., & Pagano, P. J. (2003). Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of rat carotid artery. *Circulation Research*, 92(6), 637–643.
- Judkins, C. P., Diep, H., Broughton, B. R. S., Mast, A. E., Hooker, E. U., Miller, A. A., Selemidis, S., Dusting, G. J., Sobey, C. G., & Drummond, G. R. (2010). Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(1), H24-32.
- Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 110(10), 1364–1390.
- Lengyel, L. (2010). *A TOJÁS ANTIOXIDÁNS KAPACITÁSÁNAK MÉRÉSE JAPÁNFÜRJBEN*.
- Li, Hongli, & Sun, B. (2007). Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(1), 88–95.
- Li, Huige, & Förstermann, U. (2009). Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Current Pharmaceutical Design*, 15(27), 3133–3145.
- Liu, J. Q., Zelko, I. N., Erbynn, E. M., Sham, J. S. K., & Folz, R. J. (2006). Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(1), L2-10.
- Majzinger, I. (2018). *APRÓVAD-ÁLLOMÁNYOK SZABÁLYOZÁSA ÉS HASZNOSÍTÁSA*.
- Matkovics, B., Szabó, L., Sz. Varga, I. (1988): Lipideroxidáció és a redukált glutation anyagszere enzimek aktivitásának meghatározása biológiai mintákban. *Lab. Diagn.* 15:248-250.
- Mézes, M., & Matkovics, B. (1986). *A lipid peroxidáció molekuláris mechanizmusa és mennyiségi mérése*.
- Miller, Y. I. (2005). Toll-like receptors and atherosclerosis: oxidized LDL as an endogenous Toll-like receptor ligand. *Future Cardiology*, 1(6), 785–792.

- Moore, J. H., & Williams, D. L. (1968). The effect of diet on the composition and positional distribution of the fatty acids in the triglycerides obtained from the adipose tissues of rabbits. *The British journal of nutrition*, 22(3), 473–482.
- Nicholls, C., Li, H., & Liu, J.-P. (2012). GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 39(8), 674–679.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 668–676.
- Nishimura, A., Ago, T., Kuroda, J., Arimura, K., Tachibana, M., Nakamura, K., Wakisaka, Y., Sadoshima, J., Ihara, K., & Kitazono, T. (2016). Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(6), 1143–1154.
- Pachauri, S. P., Jacotot, B., & Beaumont, J. L. (1976). Circulating lipophages and aortic foam cells in experimental atherosclerosis of rabbits under altered reticuloendothelial activity. *Nutrition and Metabolism*, 20(1), 14–26.
- Paul Johnston, N., & Berrio, L. F. (1985). *Comparative effects of cottonseed, soybeans, safflower seeds and flax seeds on the performance of rabbits and guinea pigs*.
- Peluso, I., Morabito, G., Urban, L., Ioannone, F., & Serafini, M. (2012). Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 12(4), 351–360.
- Peter R., C. (1987). *Rabbit Feeding and Nutrition*. Academic Press, INC.
- Pietarinen-Runtti, P., Lakari, E., Raivio, K. O., & Kinnula, V. L. (2000). Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 278(1), C118-25.
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359–364.
- Raghunath, A., Nagarajan, R., Sundarraj, K., Panneerselvam, L., & Perumal, E. (2018). Genome-wide identification and analysis of Nrf2 binding sites - Antioxidant response elements in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 360, 236–248.
- Schröder, K., Zhang, M., Benkhoff, S., Mieth, A., Pliquett, R., Kosowski, J., Kruse, C., Luedike, P., Michaelis, U. R., Weissmann, N., Dimmeler, S., Shah, A. M., & Brandes, R. P. (2012). Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circulation Research*, 110(9), 1217–1225.
- Schürmann, C., Rezende, F., Kruse, C., Yasar, Y., & Schröder, K. (2015). The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. *European heart journal*, 36(48). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv460>
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(1), 192–205.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748.
- Sirokmány, G., Donkó, Á., & Geiszt, M. (2016). Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(4), 318–327.
- Stefanson, A. L., & Bakovic, M. (2014). Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients*, 6(9), 3777–3801.
- Szendró, Z., Matics, Z., & Gerencsér, Z. (2011). *Húsnyulak takarmányozása*. Kaposvári Egyetem.

- Vetési, F., Fekete, S., Papp, Z., Varga, I., & Zöldág, L. (1990). *Házinyúl-egészségtan* (V. Ferenc, Szerk.). Mezőgazdasági Kiadó.
- William, J. L., & M. Daniel, L. (2013). *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press.
- Zana, M. (2019). *A Nox4 NADPH oxidáz működésének vizsgálata*. Semmelweis Egyetem, Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola.
- Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 327.
- Zhang, B., Xu, J., Li, C., Shi, S., Ji, S., Xu, W., Liu, J., Jin, K., Liang, D., Liang, C., Liu, L., Liu, C., Qin, Y., & Yu, X. (2016). MBD1 is an Epigenetic Regulator of KEAP1 in Pancreatic Cancer. *Current Molecular Medicine*, 16(4), 404–411.
- Zhang, M., Brewer, A. C., Schröder, K., Santos, C. X. C., Grieve, D. J., Wang, M., Anilkumar, N., Yu, B., Dong, X., Walker, S. J., Brandes, R. P., & Shah, A. M. (2010). NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18121–18126.
- Zhang, S., Duan, S., Xie, Z., Bao, W., Xu, B., Yang, W., & Zhou, L. (2022). Epigenetic Therapeutics Targeting NRF2/KEAP1 Signaling in Cancer Oxidative Stress. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 924817.