

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A doxorubicin okozta miokardiális károsodás
prevenciós lehetőségeinek vizsgálata
patkánymodellben**

Lódi Mária

Témavezető: Dr. Czuriga Dániel



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2021

A doxorubicin okozta miokardiális károsodás preventív lehetőségeinek vizsgálata patkánymodellben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
Az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Lódi Mária okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Czuriga Dániel, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Tóth István Balázs, PhD
Dr. Gavallér Henriette, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2021. június 30. 10 óra (online)

Az értekezés bírálói:

Dr. András Csilla, PhD
Dr. Sax Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Tóth István Balázs, PhD
Dr. Gavallér Henriette, PhD
Dr. András Csilla, PhD
Dr. Sax Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2021. június 30. 11 óra (online)

A nyilvánosságot online biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a lodi.maria@med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző nap (2021.06.29.) 16:00 óráig.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A doxorubicin tulajdonságai, molekuláris hatásai

A doxorubicin (DOX) az antraciklinek családjába tartozó antibiotikum, mely egy tetraciklinvázból és a hozzá kapcsolódó aminosavból áll. Erős antitumor-aktivitása miatt már a felfedezése után ígéretes onkoterápiás szernek bizonyult, azonban hamar kiderült róla, hogy jelentős kumulatív dóziszfüggő kardiotoxikus mellékhatással is bír.

A szer hatásmechanizmusa a tumorsejtekben és a kardiomiocitákban azonos, főként reaktív oxigéngyökök (ROS) termelődésén keresztül történik, melyek többféle módon jöhetnek létre. Az egyik keletkezési mód, hogy a DOX komplexet képez a DNS kettős szállal, mely gátolja a topoizomeráz II β enzimet, és ezzel a DNS kettős spirál törését eredményezi. Ezen folyamat következménye a p53 fehérje aktiválódása, a mitokondriális diszfunkció létrejötte, valamint a ROS termelődése. A másik keletkezési út során a DOX szemikinon váza és a Fe³⁺-ionok kerülnek reakcióba egymással, miáltal ROS képződik, lipid peroxidációt és/ vagy protein karbonilációt okozva, a folyamat végén pedig apoptózist eredményezve.

A DOX további kardiotoxikus hatása, hogy megzavarja a szívműködés Ca²⁺- és energia homeosztázisát, valamint csökkenti a miokardium antioxidáns enzimeinek mennyiségét. Ezen utóbbi folyamatok szintén sejthalálhoz vezetnek. A miokardium ultrastrukturális vizsgálatakor a fentebb említett molekuláris útvonalak a DOX szívelégtelenségre jellemző mintázatot mutatnak: miofilamentumok károsodása, Z-vonal degeneráció, a szarkoplazmatikus retikulum és a mitokondrium szétesése, a sejtmagban lévő kromatin összezsugorodása.

1.2. A doxorubicin terápiás felhasználása, akut és krónikus mellékhatások

A DOX erős kardiotoxicitása ellenére még manapság is széles körben használatos szer az onkológiai betegek körében. A szívelégtelenség megelőzése érdekében a DOX kumulatív dózisát lecsökkentették (maximum 400 mg/m²), mely során 3-5%-os a kardiomiopátia

kialakulásának esélye. Amennyiben dózis emelésre van szükség, a százalékos előfordulás folyamatosan nő, és elérheti akár a 48%-ot is.

A szívelégtelenség kialakulása mellett a DOX-terápiának akut mellékhatásai is vannak, mint például EKG-eltérések, melyek visszafordíthatónak bizonyultak. Ezzel szemben a kardiomiopátia korai, illetve késői hatásként jelenhet meg, vagy úgynevezett „late-onset” módon, tehát akár 15 év múlva. Egyes vizsgálatok szerint a DOX már közvetlenül a kemoterápia után tünetmentes károsodásokat okoz, melyek majd csak évek múltán manifesztálódnak. Emiatt fontos a DOX okozta szívelégtelenség minél korábbi felfedezése, mely az időben indított kardioszupportív terápia alkalmazásával mérsékelheti a fellépő kardiomiopátia tüneteit, és annak további súlyosbodását, míg egy későn felfedezett szívelégtelenség kezelése komoly nehézséget okozhat a klinikai gyakorlatban.

1.3. A doxorubicin okozta kardiotoxicitás megelőzési stratégiái

A témában folyó intenzív kutatások során számos próbálkozás történt a DOX okozta szívelégtelenség megelőzésére. Az utóbbi néhány évben megjelent onkokardiológiai témájú útmutatások a kardiológusok és onkológusok közötti kommunikáció fontosságát hangsúlyozzák, valamint a többlépcsős döntéshozatali folyamatot, mely során felbecsülhetőek a DOX okozta kardiomiopátiára hajlamosító tényezők. További megelőzési stratégiaként említhető a DOX dózisának optimalizációja, mely során az egyszeri, nagyobb dózis beadását 3 hetente alkalmazott infúziós adagolás váltotta le. A DOX-analógok előállítására egy újabb kísérletnek bizonyult, azonban nem mutatkozott sikeresnek a kardiotoxicitás megelőzésének szempontjából. Ezzel szemben a liposzomális formulák közül a pegilált DOX jobban fel tudott halmozódni a daganatos régióban, míg az egyéb mellékhatások (mint a gasztrointesztinális rendszer károsodása és a szívelégtelenség) kivédhetőek voltak. Ezen formuláció azonban csak a nagy kardiovaszkuláris rizikóval rendelkező betegekben épült be a klinikai gyakorlatba,

illetve leginkább monoterápia vagy limitált számú kombinált kemoterápiás protokoll keretében került alkalmazásra.

A kemoterápia mellé adott szupportív terápiák közül a C- és E-vitaminokat több állatkísérletben is vizsgálták, azonban a vizsgálatok ellentétes eredményeket mutattak. A vaskelátor dexrazoxán ezzel szemben a humán vizsgálatokban is hatékonynak bizonyult a DOX okozta kardiomiopátia megelőzésében, azonban a szer mielotoxikus mellékhatása limitálja az alkalmazást. A kardiovaszkuláris gyógyszerek közül a probucol volt intenzív állatkísérletes vizsgálatok tárgya, míg a β -blokkolókkal, angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátló gyógyszerekkel, sztatinokkal, és angiotenzin receptor-blokkolókkal végzett klinikai vizsgálatok ellentétes következtetésekre jutottak. Éppen ezen korábbi eredmények miatt szükséges a megfelelő állatkísérletes protokollok kidolgozása, mely során az állatok *in vivo* paraméterei és szövetei is vizsgálhatóak. Egy nemrégiben megjelent ajánlás szerint a megfelelő állatkísérleti elrendezések tervezéséhez figyelembe kell venni, hogy a nagy dózisú DOX nem csupán kardiotoxikus, hanem egyéb szervekre is kiterjed a mellékhatása, melyek befolyásolhatják a kísérlet kimenetét. Az onkológiai gyakorlat modellezéséhez fontos a DOX intravénás beadásmódja, illetve a hosszú távú utánkövetés, mellyel hatékonyan modellezhető a „late-onset” kardiomiopátia. További fontos tényező az állatok nemének megfelelő kiválasztása, illetve a kardioprotektív terápia profilaktikus alkalmazása.

2. Célkitűzések

Vizsgálatainkban modellezni kívántuk a humán onkoterápiában használt DOX-kemoterápia kardiotoxikus mellékhatásait hím patkányokban. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy a profilaktikusan alkalmazott, kombinált szívelégtelenség terápia milyen előnyökkel járhat egy, a kemoterápia után későbbi fázisban indított kezeléssel szemben. Végül a profilaktikus kombinált szívelégtelenség terápia egyes elemeit tanulmányoztuk, hogy egyedileg mennyiben

járulnak hozzá a feltételezett előnyös hatások megjelenéséhez a DOX okozta kardiomiopátiában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Állatkísérlet a kombinált szívelégtelenség terápia optimális időzítésének megállapítására

12 hetes hím Wistar patkányokat 4 csoportba osztottunk. A negatív kontroll (CON) csoport kivételével minden csoport 6 ciklus DOX-injekciót kapott farokvénán keresztül, felületes szedációban a kísérlet 8. napjától kezdve minden 3. napon. A PRE csoportnak a DOX-beadás előtt 1 hétig fokozatosan feltitrált kombinált szívelégtelenség-terápiát adagoltunk (2,5 mg/kg bisoprolol, 2 mg/kg perindopril, 6,25 mg/kg eplerenon) egy úgynevezett vivőanyagban (mucilago hydroxyethylcellulosi) feloldva, gyomorszonda segítségével, a kísérlet végéig. A CON és a D-CON állatai a vizsgálat teljes időtartama alatt, míg a POST csoport a kísérlet 51. napjáig csak a vivőanyagot kapták, az 52. naptól kezdve pedig a PRE csoportnál leírt szívelégtelenség terápiát 1 hét alatt feltitrálva a maximális dózusra, szintén a kísérlet végéig. Szívultrahangos vizsgálatokat végeztünk a 0., az 51. és a 80. napon teljes szedációban, míg vérnyomásmérések történtek a 0., a 7. és a 39. napon ébrenléti állapotban. Az utolsó szívultrahangos vizsgálat után az állatokat túlaltattuk, szerveiket kimetszettük, majd folyékony nitrogénben fagyasztva -70°C -on tároltuk.

3.2. Állatkísérlet a profilaktikus gyógyszerek individuális hatásainak megállapítására

Az előző kísérletsorozatban használt korú és fajtájú állatok újabb egyedeit 5 csoportba osztottuk. A DOX-beadások, a szívultrahangos vizsgálatok és a vérnyomásmérések az előző kísérletsorozathoz hasonlóan történtek. A CON és a D-CON csoportok a korábbiakban megfelelően *per os* vivőanyagot, míg a BB csoport 2,5 mg/kg bisoprololt, az ACEI csoport 2 mg/kg perindopril, az AA csoport pedig 6,25 mg/kg eplerenont kapott a DOX kezelés indítása

előtt, 1 hétig a végső dózissal feltitrálva, a kísérlet utolsó napjáig. Az utolsó szívultrahangos vizsgálat után az állatokat az előző kísérletsorozat szerint túlaltattuk, majd a szerveket kimetszettük, folyékony nitrogénben mély fagyasztottuk, és -70°C -on tároltuk.

3.3. Szövettan

A bal kamra egy darabját ShandonTM Cryomatrix-ba ágyasztuk, majd $15\ \mu\text{m}$ vastag kriosztátos metszeteket készítettünk, és festettük őket Mayer's féle hemalummal és pikroszírúsz vörös festékekkel. Ezt követően a tárgylemezeket izopropil-alkohollal mostuk, majd a metszeteket dehidráltuk és DPX-szel lefedtük. Olympus BX-50-es mikroszkóppal reprezentatív felvételeket készítettünk, melyeket az ImageJ nevű programmal értékeltünk ki.

3.4. TUNEL esszé

A kriosztátos metszeteket formalinnal fixáltuk, etanol: ecetsav 2:1 arányú oldatával utófixáltuk, majd citrát pufferben forraltuk. A metszeteket inkubáltuk Tdt-vel, a sejtmagokat pedig DAPI festékkel festettük. Mowiolal történő rögzítés után a tárgylemezeket Zeiss Axioskop mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.5. Elektronmikroszkópia

A mintaelőkészítés egy korábban leközölt protokoll módosításával történt. A bal kamra szabad falának egy darabját fixáltuk, mostuk foszfát pufferrel, majd ozmium-tetroxid oldattal utófixáltuk. Dehidráció után a szövetdarabokat DURCUPANTM ACM gyantába ágyasztuk, majd $50\ \text{nm}$ vastag metszeteket készítettünk, melyeket uranil-acetáttal és Reynold's-féle ólom citráttal kontrasztoltunk. A metszetekről reprezentatív felvételeket készítettünk, melyeken denzitometriai analízist végeztünk ImageJ program segítségével.

3.6. Izolált, permeabilizált szívizomsejtekben végzett erőmérések

Ezen kísérleteinket a korábban leközölt módszertan szerint végeztük. Az izolált, membránfosztott szívizomsejtek két végét egy motorhoz és egy erőmérőhöz rögzítettük, és a szarkomerhosszat $2,2\ \mu\text{m}$ -re állítottuk be. A vizsgálatokat 15°C -on végeztük. Különböző Ca^{2+} -

koncentrációjú oldatokban ismételt aktivációs és relaxációs ciklusokat hoztunk létre és rögzítettük a keresztmetszeti területre normalizált Ca^{2+} - aktiválta maximális- és Ca^{2+} - független passzív erőt, valamint meghatároztuk a Ca^{2+} - érzékenységet. A kardiomiociták aktiváló oldatban létrejött úgynevezett „steady-state” állapotát követően alkalmazott hossztengeley mentén történő pillanatszerű bemozgatás következtében mérni tudtuk az erő újra képződés sebességi állandóját is.

3.7. A kontraktilis fehérjék oxidatív státuszának vizsgálata

A fehérje karbonil csoportok kimutatásának alapjául egy korábban leközölt módszer szolgált. A szövetmintákat az izolált, permeabilizált szívizomsejt méréseknél használt protokoll szerint izoláltuk, majd hypo és Fenton reagenst alkalmazva pozitív kontroll oldatokat hoztunk létre. A mintákat ezután speciális mintapufferben szolubilizáltuk, majd 1 óra vortexelés után centrifugáltuk, és fehérje koncentrációt mértünk dot blot alapú módszerrel, BSA standard oldatokat használva. A mintákat ezután 3 mg/ml-es koncentrációja hígítottuk, majd dinitrofenil-hidrazinnal derivatizáltuk. 10%-os SDS poliakrilamid gélen történő futtatás után a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránokat ezután blokkoltuk, valamint inkubáltuk az elsődleges és másodlagos antitestekkel a gyártó protokollja szerint. A fehérjesávokat Westernbright ECL kittel hívtuk elő, és az össz fehérje mennyiségre normalizáltuk. Az össz fehérje mennyiséget speciális szuper-szenzitív membránfestő kittel tettük láthatóvá.

3.8. A kontraktilis fehérjék foszforilációs státuszának meghatározása

A szívizom mintákat az Oxyblot módszertan szerint izoláltuk, majd 1x-es Laemmli-pufferrel hígítottuk, és vortexeltük. Az oldatokból fehérje koncentrációt mértünk a korábban leírtak szerint, majd az oldatokat 50 mg/ml koncentrációra hígítottuk. A mintákat ezután 10%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd a fehérjék foszforilációs státuszát ProQTM Diamond gél festék alkalmazásával mutattuk ki a gyártó által megadott protokoll szerint. A géleket előhívás

után Comassie festékekkel festettük, meghatározva a teljes fehérje mennyiséget. A ProQ sávokat a teljes fehérje mennyiségre normalizáltuk.

3.9. Western immunoblot a mitokondriális fehérjék meghatározásához

A bal kamra falának egy darabját izoláló oldatban összetörtük, szonikáltuk, majd centrifugáltuk. A mintákhoz 5x-ös mintapuffert és β -merkaptoetanolt adtunk, majd felforraltuk. Fehérje koncentráció mérés után 50 μ g fehérjét vittünk fel 8%-os SDS-poliakrilamid gélekre, majd megfuttattuk. Blottolás után a nitrocellulóz membránokat blokkoltuk, és az alábbi elsődleges antitesttel inkubáltuk: anti-acetil koenzim-A karboxiláz (ACC), anti-foszfo ACC, anti-peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor-gamma koaktivátor 1 α , anti-Forkhead box protein O1. Mosás után a membránokat másodlagos antitesttel inkubáltuk, majd újabb mosás után a fehérje sávokat az Oxyblot módszernél leírtak szerint hívtuk elő. Ezután a membránokat anti- β aktin antitesttel inkubáltuk, majd előhívtuk a sávokat. Az eredeti fehérje jelöléseket a β -aktin jelölésekre normalizáltuk.

3.10. Western immunoblot a kaspáz-3 fehérje kimutatásához

A fagyasztott bal kamra mintákat mechanikusan feltártuk, majd fehérjekoncentrációt mértünk. Ezek után 35 μ g fehérjék vittük fel úgynevezett TGX Stain-Free™ 12%-os akrilamid gélekre illetve 4-20%-os Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein gélekre. Blottolás után a membránokat blokkoltuk, majd anti-kaspáz-3 ellenes antitesttel inkubáltuk. Másodlagos antitesttel követő inkubálás után a sávokat előhívtuk és a teljes fehérje mennyiségre normalizáltuk.

3.11. Adatelemzés és statisztika

Az izolált, permeabilizált szívizomsejt erőméréseket egy LabVIEW Data Acquisition alapú programmal (Myo) végeztük és értékeltük ki. A regisztrált adatpontokat Origin 6.0 programmal ábráztuk. A biokémiai vizsgálatok során kapott fehérje sávokat az ImageJ és MagicPlot programmal értékeltük ki. Kísérleteink legtöbbje során állatonként több mérést végeztünk,

mely értékeket átlagoltuk, ezek képezték a végső, reprezentatív értékeinket. Ezen módszer alól kivételt képezett a testsúly, testtömeg index és a strain vizsgálatok.

A statisztikai elemzést Stata programcsomag segítségével végeztük. A túlélést log-rank próbával, valamint annak lehetséges páronkénti változataival hasonlítottuk össze, míg a többi kísérlet eredményeit Kruskal-Wallis multivariációs analízissel, majd Student-féle t-teszttel vagy Wilcoxon-féle rangösszeg próbával vizsgáltuk az adatok eloszlásától függően. A statisztikai szignifikanciát $P \leq 0,05$ értékre állítottuk be.

4. Eredmények

4.1. Kísérlet a kombinált szívelégtelenség terápia optimális időzítésének megállapítására

A pozitív kontroll (D-CON) állatok túlélése alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest (CON), míg a PRE kezelés szignifikánsan magasabb túlélést eredményezett. A késői kombinációs csoportban (POST) az eredetileg hanyatló túlélési görbe nem romlott tovább a gyógyszeres kezelés elindítása után. Az állatok testsúlya folyamatosan nőtt a CON csoportban, míg minden DOX kezelt állatban stagnált a kísérlet kezdőpontjához viszonyítva. A vérnyomásmérések során a D-CON és POST állatait összevontuk, mivel a két csoport a 39. napig ugyanolyan kondíciókkal rendelkezett. Ezen összevont csoport állatainak szívfrekvenciája magasabb volt a CON csoporthoz képest, míg a PRE állatok szisztolés és diasztolés vérnyomása alacsonyabb volt, mint a CON csoporté, szívfrekvenciája pedig a CON és a D-CON+POST állataihoz képest volt alacsonyabb.

A kísérletünk végén végzett szívultrahangos méréseink során szignifikánsan alacsonyabb ejekciós frakció (EF) értékeket találtunk a D-CON csoportban, míg a PRE kezelés ezt a csökkenést képes volt megelőzni. A POST terápia nem volt hatással a DOX indukálta EF romlásra. A diasztolés paraméterek közül az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) megnyúlását

tapasztaltuk a DOX által, melyet egyik kezelés sem volt képes kivédeni. A longitudinális strain S szisztolés paraméterben mérsékelt csökkenést figyeltünk meg a DOX-terápiát kapó állatokban, ahol a PRE csoportban a csökkenés kevésbé volt jelentős a D-CON állataihoz képest.

A szövettani vizsgálataink során emelkedett fibrotikus terület arányt találtunk a DOX-kezelést kapó állatokban, melyet egyik terápia sem volt képes jelentősen kivédeni. A szívizom metszetekben jelenlévő kapillárisok számában illetve azok terület arányában nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a csoportok között. Ultrastrukturális szinten a D-CON csoportban a DOX kardiomiopátiára jellemző kardiomiocita károsodásokat figyeltük meg, melyet csak a PRE kezelés volt képes kivédeni. A denzitometriás kiértékelés során a károsodott miokardium csökkent értéket jelölt, ennek megfelelően a D-CON csoportban alacsonyabb, míg a PRE csoportban magasabb denzitometriás értékek voltak megfigyelhetőek.

Izolált, permeabilizált szívizomsejteken történő erőmérések során nem találtunk különbséget a csoportok között sem a Ca^{2+} -érzékenység, sem a maximális Ca^{2+} -aktiválta passzív vagy Ca^{2+} független passzív erőkből. Az aktin-miozin ciklus sebességi állandója ($k_{tr, max}$) azonban alacsonyabb volt a DOX kezelést kapó állatokban, mint a CON csoportban.

A TUNEL-esszé emelkedett apoptotikus sejtmag arányt mutatott a D-CON csoportban a kontroll állatokhoz képest, míg a két kezelés eredményesen csökkentette az apoptózist. A kaspáz-3 fehérje relatív mennyiségének vizsgálatakor emelkedett értékek voltak megfigyelhetőek a D-CON és a POST csoportokban, míg megtartott volt a PRE állataiban.

További Western blot vizsgálatainkkal csökkent $PGC1\alpha$ szinteket találtunk minden DOX kezelt csoportban az alkalmazott protektív terápia ellenére, míg az acetyl-coenzim A karboxiláz és annak foszforilált formájának (pACC/ACC) relatív mennyiségében, valamint a foszfo-troponin I magasságában jelentkező fehérje sáv relatív mennyiségében nem találtunk különbséget a csoportok között.

4.2. Kísérlet a profilaktikus gyógyszerek individuális hatásainak megállapítására

Ezen kísérleti elrendezésünk során csökkent szisztolés és diasztolés vérnyomás értékeket figyeltünk meg az ACEI állataiban a többi csoporthoz képest, míg a szívfrekvencia a BB csoportban volt a legalacsonyabb. A DOX-kezelés ezzel szemben szignifikánsan megnövelte a szisztolés vérnyomást a kontroll csoporthoz képest.

Az állatok testsúlya hasonlóképpen alakult ezen kísérletsorozat során is, mint az előzőben: a DOX-kezelést kapó állatok testsúlya nem változott, míg a CON csoporté folyamatosan nőtt. A D-CON állatok túlélése ezúttal is jelentősen alacsonyabb volt a CON csoporthoz képest, míg a profilaktikusan alkalmazott kezelések túlélésre gyakorolt hatásában nem volt szignifikáns különbség a D-CON csoporthoz képest. A tüdő szövetek nedves-száraz arányakor alacsonyabb értékek voltak megfigyelhetők a BB és ACEI csoportokban a D-CON állataihoz viszonyítva.

A szívultrahangos vizsgálat a korábbiakhoz hasonlóan csökkent értékeket mutatott a D-CON csoportban, míg a BB alkalmazása hatékonynak bizonyult a megelőzésben. Az ACEI csoportban szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a kezdeti EF értékekhez képest, azonban a végponti EF nem különbözött jelentősen a CON állatainak értékétől. Az AA kezelés nem volt képes megelőzni a DOX indukálta EF csökkenést. A diasztolés IVRT paraméter minden DOX kezelt csoportban megnyúlt az alkalmazott profilaxisok ellenére. A diasztolés strain rate E paraméter értéke a kezdeti ponthoz viszonyítva szignifikánsan csökkent a D-CON csoportban, míg a BB és ACEI csoportokban nem volt jelentős változás a kiindulási értékhez képest.

Emelkedett fibrotikus terület volt megfigyelhető a D-CON és AA csoportokban, mely változás a BB és ACEI profilaktikus kezelésekkel kivédhető volt. A miokardium mintákban előforduló kapillárisok területében nem volt jelentős különbség a csoportok között. A szívizom ultrastruktúrájának vizsgálatakor jelentős, DOX indukálta károsodásokat figyeltünk meg a D-CON állataiban, míg a profilaktikus kezelések képesek voltak kivédeni ezeket a változásokat.

Ezen kvalitatív megfigyeléseinket denzitometriai elemzésekkel is alátámasztottuk, ahol a D-CON csoportban csökkent értékeket, míg a kezelt csoportokban magasabb denzitometriai értékeket találtunk. A sejtmag vonalában mért kardiomiocita átmérők jelentős hipertrófiát mutattak az AA csoportban, míg az ACEI csoportban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk.

Az apoptózis vizsgálatok során emelkedett TUNEL pozitív sejtmag arányt találtunk a D-CON csoportban, ami megelőzhető volt mindegyik profilaktikus kezeléssel, míg a kaszpáz-3 fehérje mennyiségének emelkedését a BB és az ACEI terápiák voltak képesek kivédeni.

Az izolált, permeabilizált kardiomiocita erőmérések során nem mutatkozott különbség a preparátumok Ca^{2+} -érzékenységében, azonban a $k_{tr,max}$ paraméter DOX hatására bekövetkező csökkenését ezen kísérletsorozatunkban is igazolni tudtuk. A kardiomiociták aktív ereje csökkent értéket mutatott az AA csoportban a CON állataihoz képest.

A Western blot kísérleteink során ismét alacsonyabb PGC1 α relatív fehérje mennyiséget találtunk minden DOX kezelt csoportban, míg a FoxO1 fehérje és a pACC/ACC arányokban nem találtunk különbséget a csoportok között.

5. Megbeszélés

A DOX okozta szívelégtelenség manapság intenzív kutatás tárgyát képezi, mégsem rendelkezünk egységes állásponttal a megelőzést tekintve. A preventív terápia alkalmazása leginkább a nagy kardiovaszkuláris rizikóval rendelkező betegekben terjedt el, holott egy kemoterápia mellett alkalmazott kardioprotektív kezeléssel akár az alacsony rizikójú betegek is profitálhatnak. Ahhoz azonban, hogy széles körben alkalmazásra kerülhessenek a profilaktikus terápia lehetőségei, fontos a DOX okozta kardiomiopátia alaposabb megismerése, illetve az alkalmazott protektív gyógyszerek hatásmechanizmusának feltárása *in vivo* és *in vitro* szinten.

Kísérleteinkkel sikeresen létrehoztunk egy olyan patkánymodellt, mely modellezi a humán onkoterápiás protokollokat, és megfelel a korábban kiadott ajánlásoknak: alacsony dózisu, ismétlődő DOX beadást végeztünk intravénásan, hosszú távú után követéssel, a protektív gyógyszereket gyomorszondán keresztül adagoltuk, valamint többfajta időpontban és elrendezésben vizsgáltuk a lehetséges hatásokat.

Az általunk választott kardioprotektív gyógyszerek mindegyike IA ajánlással rendelkezik a csökkent EF-val rendelkező betegekben, mivel javították a betegek hospitalizációs és mortalitási rizikóját. Ennél fogva nem csak a nagy kardiovaszkuláris rizikójú betegeknek származhatna előnyük az alkalmazásból, hanem a kisebb rizikójú pácienseknek is. Erre mutat rá egy meta-analízis is, mely szerint a β -blokkolók 70%-os, míg az ACE-gátlók 90%-os relatív rizikó csökkenést okozhatnak a szívelégtelenség kialakulását tekintve.

Klinikai tanulmányokban próbálkozások történtek a profilaktikus kardioprotektív gyógyszerek kombinációban történő alkalmazására. Az egyik ilyen volt a carvedilol és az enalapril együttese, mely kedvezően befolyásolta a mortalitást vagy szívelégtelenség alkotta klinikai végpontokat. Ezzel egybehangzónak bizonyult a mi tanulmányunk PRE csoportja, mely növelte a túlélést, és megelőzte a DOX okozta EF-csökkenést. Habár a D-CON csoportban jelentkező folyamatos EF-csökkenés az első hónapban még nem volt szignifikáns, a második hónapra ez a különbség már látható volt. Az adatok „torzulását” eredményezheti az állatok folyamatos elhullása a csoportban, mely miatt egyfajta pozitív szelekció jött létre.

Ellentmondásos eredmények születtek a korábbi állatkísérletes és humán tanulmányokban, melyekben a carvedilol és az enalapril hatásait önállóan vizsgálták. A mi modellünkben a BB terápia képest volt megelőzni az EF csökkenését, csökkenteni a fibrózist és a miokardium ultrastruktúráját, és csökkentette az apoptózist. Az ACEI csoportban ezzel szemben szignifikáns EF-csökkenés volt megfigyelhető a kezdőponthoz képest, viszont a szív

ultrastruktúrája megőrzött maradt, ezzel összhangban pedig kisebb mértékű apoptózis és fibrózis volt megfigyelhető a szövetben a D-CON csoporthoz viszonyítva.

Az AA típusú gyógyszerek közül korábban a spironolakton bizonyult hatásosnak a DOX okozta kardiomiopátiában az állatkísérletes és humán vizsgálatokban. Ezzel szemben az eplerenon az állatkísérletes elrendezésekben ellentétes eredményeket mutatott. A mi eredményeink alapján az eplerenon nem volt képest megőrizni az EF-t és csökkenteni a fibrózist. A diasztolés funkciók közül a DOX okozta IVRT megnyúlás nem volt kivédhető sem a kombinációs, sem pedig az egyedileg alkalmazott kezelésekkel, míg a diasztolés strain rate a profilaktikus terápia alkalmazásával nem változott.

POST csoportunk jól reprezentálta a klinikai gyakorlatot, mely során a DOX okozta kardiomiopátia felfedezése után történik gyógyszeres beavatkozás. Habár az állatok túlélése megtartott maradt a protektív terápia elindítása után, az *in vitro* paraméterek nem különböztek a D-CON csoporthoz képest. Ezen eredményeinkkel alátámasztottuk a kardioprotektív terápia időzítésének fontosságát. Egy másik, nyulakban történt vizsgálat szintén ezt hangsúlyozza. A szerzők már 1 héttel a DOX terápia befejezése után emelkedett fibrózist figyeltek meg az állatokban függetlenül attól, hogy a szívultrahangos vizsgálatok során nem találtak jelentős különbséget a kezelt és kezeletlen csoportok között. *In vitro* szinten pedig a titin óriásfehérje expressziója és foszforilációs státusza változott meg. A szerzők nem találtak különbséget az izolált, permeabilizált kardiomiocita erőméréseik során a vizsgált paraméterekben. Ezzel összhangban voltak a mi modellünkben talált eredmények is. Azonban itt is fent áll a pozitív szelekció lehetősége, mivel csak az egészséges kardiomiocitákat tudtuk a mérésekre felhasználni. Ettől függetlenül is megfigyelhető volt a $k_{tr,max}$ paraméter csökkenése a DOX kezelt állatokban, melyből az aktin-miozin keresztkötési ciklus kinetikájának zavarára lehet következtetni.

A DOX fő tumorellenes hatása a ROS-képzés, mely a kardiomiocitákat is érinti. Mivel a szívműködő sejtek fokozottan érzékenyek az oxidatív stresszre, így jellegzetes mitokondriális elváltozások, és egyéb ultrastrukturális elváltozások figyelhetők meg a miokardiumban a DOX-expozíció követően. Ezeket az eltéréseket az általunk választott profilaktikus terápiák mindegyike képes volt kivédeni, amelyre a későbbi időpontban alkalmazott szupportív terápia nem volt alkalmas.

Biokémiai vizsgálatainkkal csökkent PGC1 α szinteket találtunk a DOX terápiás csoportokban, melyet egyik gyógyszerelési protokoll sem tudott kivédeni. Ez a fehérje a szívműködő sejtek energiaháztartásában és a mitokondriális biogenezisben játszik fontos szerepet. Eredményeink arra utalnak, hogy az alkalmazott kardiosupportív kezelések nem avatkoznak bele a DOX daganatellenes hatásaiba. A ROS produkció mellett a DOX kardiomiopátiában jellemző a kaszpáz-3 fehérje mennyiségének növekedése is, melyet mi is alátámasztottunk a kísérleteinkkel. Ezzel összhangban emelkedett fibrózist figyeltünk meg a kizárólag DOX-t kapó állatokban, melyet az egyedileg alkalmazott profilaktikus BB és ACEI kezelések képesek voltak kivédeni. Ezen eredményünk azt mutatja, hogy a BB és ACEI hatóanyagú gyógyszerek a kedvező hemodinamikai hatás mellett molekuláris szinten is jótékony hatással bírnak.

Kísérleteinkkel tehát igazolni tudtuk, hogy mind az egyedileg alkalmazott BB és ACEI, mind pedig a kombinációjuk (akár AA hatóanyagokkal kiegészítve) előnyösek lehetnek a DOX okozta szívelégtelenség megelőzésében, mivel a korábbi hipotézishez híven kedvező hemodinamikai paramétereket képesek teremteni. Vizsgálataink megerősítésére azonban további klinikai tanulmányok szükségesek a humán gyógyászatban történő alkalmazáshoz.

6. Összefoglalás

A doxorubicin (DOX) okozta kardiomiopátia még napjainkban is megoldatlan problémának számít a klinikai gyakorlatban. Bár a DOX-kardiotoxicitás megelőzésére korábban számos

állatkísérletes és klinikai vizsgálat is irányult, ezidáig nem került be érdemi preventív stratégia a kis kardiovaszkuláris rizikóval rendelkező onkológiai betegek kezelésére vonatkozó ajánlásokba.

Kísérleteink során olyan patkánymodellt hoztunk létre, mely jól reprezentálta a humán onkoterápiás protokollt. Ezáltal vizsgálhatóvá váltak a kardiológiai gyakorlatban használt szívelégtelenség gyógyszerek (BB, ACEI, AA) egyedi, valamint kombinációban történő alkalmazásának hatásai a DOX okozta kardiomiopátia megelőzésének szempontjából, különös tekintettel a terápia időzítésére. Eredményeinkből kiderült, hogy a kombinált, profilaktikusan alkalmazott szívelégtelenség terápia hatására megelőzhető a DOX okozta EF csökkenés, a miokardiális ultrastruktúra károsodása, továbbá a szívizomsejtek apoptózisa, ami végső soron az állatok túlélésének javulását eredményezi. Ezzel szemben a késői stádiumban alkalmazott kombinációs kezelés mellett ezen hatások nem érvényesültek. A hármas gyógyszerprofilaxis egyes komponenseit külön-külön vizsgálva megállapítható, hogy az EF megőrzéséhez a BB kezelés, az apoptózis mérsékléséhez pedig főként a BB és az ACEI kezelés, míg az ultrastrukturális károsodások kivédéséhez mindhárom gyógyszeres terápia (BB, ACEI, AA) hozzájárult; így a legnagyobb túlélési előny a BB és az ACEI terápiában részesülő csoportokban volt megfigyelhető.

Összességében elmondható, hogy a kemoterápia előtt indított BB vagy ACEI kezelés, illetve ezek kombinációja jelentősen enyhíthetik a DOX okozta miokardiális károsodást.

7. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/214/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lódi Mária
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057390

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lódi, M.**, Bánhegyi, V., Bódi, B., Gyöngyösi, A., Kovács, Á., Árokszállási, A., Hamdani, N., Fagyas, M., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárday, Z., Lekli, I., Bai, P., Tóth, A., Papp, Z., Czuriga, D.: Prophylactic, single-drug cardioprotection in a comparative, experimental study of doxorubicin-induced cardiomyopathy.
J. Transl. Med. 18 (1), 1-48, 2020.
IF: 4.124 (2019)
2. **Lódi, M.**, Priksz, D., Fülöp, G. Á., Bódi, B., Gyöngyösi, A., Nagy, L. N., Kovács, Á., Kertész, A. B., Kocsis, J., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárday, Z., Juhász, B., Lekli, I., Bai, P., Tóth, A., Papp, Z., Czuriga, D.: Advantages of prophylactic versus conventionally scheduled heart failure therapy in an experimental model of doxorubicin-induced cardiomyopathy.
J. Transl. Med. 17, 1-16, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-019-1978-0>
IF: 4.124





További közlemények

3. Reil, J. C., Reil, G. H., Kovács, Á., Sequeira, V., Waddingham, M. T., **Lódi, M.**, Herwig, M., Ghaderi, S., Kreusser, M. M., Papp, Z., Voigt, N., Dobrev, D., Meyhöfer, S., Langer, H. F., Maier, L. S., Linz, D., Mügge, A., Hohl, M., Steendijk, P., Hamdani, N.: CaMKII Activity Contributes to Homeometric Autoregulation of the Heart: a Novel Mechanism for the Anrep Effect.
J. Physiol.-London. 598 (15), 3129-3153, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/JP279607>
IF: 4.547 (2019)
4. Kolijn, D., Pabel, S., Tian, Y., **Lódi, M.**, Herwig, M., Carrizzo, A., Zhazykbayeva, S., Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Falcao-Pires, I., Reusch, P. H., Linthout, S. V., Papp, Z., Heerebeek, L. v., Vecchione, C., Maier, L. S., Ciccarelli, M., Tschöpe, C., Mügge, A., Bagi, Z., Sossalla, S., Hamdani, N.: Empagliflozin Improves Endothelial and Cardiomyocyte Function in Human Heart Failure With Preserved Ejection Fraction via Reduced Pro-Inflammatory-Oxidative Pathways and Protein Kinase G α Oxidation.
Cardiovasc. Res. 2020, 1-13, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvaa123>
IF: 8.168 (2019)
5. Kolijn, D., Kovács, Á., Herwig, M., **Lódi, M.**, Sieme, M., Alhaj, A., Sandner, P., Papp, Z., Reusch, P. H., Haldenwang, P., Falcao-Pires, I., Linke, W. A., Jaquet, K., Linthout, S. V., Mügge, A., Tschöpe, C., Hamdani, N.: Enhanced Cardiomyocyte Function in Hypertensive Rats With Diastolic Dysfunction and Human Heart Failure Patients After Acute Treatment With Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Activator.
Front. Physiol. 11, 1-21, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.00345>
IF: 3.367 (2019)
6. Herwig, M., Kolijn, D., **Lódi, M.**, Hölper, S., Kovács, Á., Papp, Z., Jaquet, K., Haldenwang, P., Dos Remedios, C., Reusch, P. H., Mügge, A., Krüger, M., Fielitz, J., Linke, W. A., Hamdani, N.: Modulation of Titin-Based Stiffness in Hypertrophic Cardiomyopathy via Protein Kinase D.
Front. Physiol. 11, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.00240>
IF: 3.367 (2019)
7. Nagy, L., Gódey, I., Nánási, P. P. i., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csipő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., **Lódi, M.**, Papp, Z.: A szív pozitív inotrop támogatása a miozin-aktivátor hatású omecantiv-mecarbil segítségével.
Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.
8. Nagy, A. C., **Lódi, M.**, Balogh, I., Czuriga, D., Kocsis, J.: Az onkokardiológiai ellátás új irányelvei.
Magyar Onkol. 61 (3), 219-227, 2017.





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

9. Gulácsi-Bárdos, P., Szokol, M., **Lódi, M.**, Czuriga, D., Czuriga, I., Édes, I., Nagy, A. C., Sármán, B.: Ischaemiás szívbetegség és tumoros betegségek együttes előfordulása: kérdések és problémák.
Orvosi Hetilap. 158 (43), 1691-1697, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30897>
IF: 0.322

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,019

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,248**

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

Debrecen, 2021.04.22.



8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a témavezetőm, Dr. Czuriga Dániel áldozatos munkáját, az évek alatt nyújtott szakmai segítségét és pártfogását. A közösen elvégzett kísérletek, az eredmények kiértékelése és az ötletbörzék mindig emlékezetesek maradnak számomra.

Köszönettel tartozom Dr. Papp Zoltán Professzor úrnak, a Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette a tanszéken történő kutatómunkát, véleményeivel és kritikus látásmódjával jobbra tette a munkánkat, és az eredményeinket, ezzel engem is megtanítva, hogy még alaposabban végezzem a kísérleteimet.

Hasonlóképpen köszönettel tartozom Dr. Tóth Attila Professzor úrnak, aki új ötleteivel mindig más és más megvilágításba helyezte az eredményeinket, ezzel felvillantva a projektben rejlő új lehetőségeket.

Köszönet illeti még Nazha Hamdanit, akinek a laborjában sok hasznos ismerettel gyarapodtam.

Külön köszönettel tartozom minden kollaborátorunknak, akik a módszereikkel hozzájárultak a munkánk kiteljesítéséhez, és észrevételeikkel hozzájárultak a sikeres publikációk létrejöttéhez.

Végül, köszönettel tartozom a szüleimnek és a páromnak, akik támogatása nélkül nem tudtam volna a PhD-s éveimet végigcsinálni.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 „Szív és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)”, és az EFOP-3.6.2-16-2017-00006 Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. A TKP2020-NKA-04 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a 2020-4.1.1-TKP2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg.