

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A doxorubicin okozta miokardiális károsodás prevenció
lehetőségeinek vizsgálata patkány modellben**

Lódi Mária

Témavezető: Dr. Czuriga Dániel



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A doxorubicin tulajdonságai, molekuláris hatásai	6
2.2. A doxorubicin terápiás felhasználása, akut és krónikus mellékhatások	7
2.3. A doxorubicin okozta kardiotoxicitás megelőzési stratégiái.....	8
3. Célkitűzések	13
4. Anyagok és módszerek.....	14
4.1. Állatkísérlet a kombinált szívelégtelenség terápia optimális időzítésének megállapítására	14
4.2. Állatkísérlet a profilaktikus gyógyszerek individuális hatásainak megállapítására	16
4.3. Szövettan.....	18
4.4. TUNEL esszé	18
4.5. Elektronmikroszkópia.....	19
4.6. Izolált, permeabilizált szívizomsejtekben végzett erőmérések	20
4.7. A kontraktilis fehérjék oxidatív státuszának vizsgálata (Oxyblot).....	21
4.8. A kontraktilis fehérjék foszforilációs státuszának meghatározása.....	22
4.9. Western immunoblot a mitokondriális fehérjék meghatározásához.....	22
4.10. Western immunoblot a kaszpáz-3 fehérje kimutatásához	23
4.11. Adatelemzés és statisztika	24
5. Eredmények:.....	25
5.1. Kísérlet a kombinált szívelégtelenség terápia optimális időzítésének megállapítására	25
5.2. Kísérlet a profilaktikus gyógyszerek individuális hatásainak megállapítására.	35
6. Megbeszélés.....	46
7. A disszertáció legfontosabb eredményei, új tudományos megállapítások	52
8. Összefoglalás	54
9. Summary	55
10. Irodalomjegyzék	56
Saját közlemények jegyzéke	66
11. Tárgyszavak.....	69
12. Köszönetnyilvánítás	70
13. Függelék	71

Rövidítések jegyzéke

AA	aldoszteron antagonistá/eplerenon kezelést kapó csoport
ACC	acetyl-koenzim A karboxiláz
ACEI	angiotenzin-konvertáló enzim inhibitor/perindopril kezelést kapó csoport
AU	optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve
BB	β -blokkoló/bisoprolol kezelést kapó csoport
BPM	ütés/perc (beat per minute)
CON	negatív kontroll csoport
DBP	diasztolés vérnyomás
D-CON	pozitív kontroll csoport
DOX	doxorubicin
DNPH	dinitrofenil hidrazin
DTT	dithiothreitol
EF	ejekciós frakció
F_{max}	maximális Ca^{2+} -aktiválta erő
FoxO1	Forkhead box protein O1
$F_{passive}$	Ca^{2+} mentes környezetben mért passzív erő
HR	szívfrekvencia
HRP	torma peroxidáz
IVRT	izovolumetriás relaxációs idő
$k_{tr,max}$	erő regenerálódás sebességi állandója
pACC	foszfo-acetyl koenzim A karboxiláz
PB/PBS	foszfát puffer
pCa ₅₀	az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenysége

PGC1 α	peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor-gamma koaktivátor 1 α
POST	késői időpontban alkalmazott kombinált szívelégtelenség terápia
PRE	profilaktikusan indított kombinált szívelégtelenség terápia
ROS	reaktív oxigén gyökök
SBP	szisztolés vérnyomás
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	az átlag standard hibája
Tdt	terminális deoxinukleotidil transzferáz

1. Bevezetés

A daganatos betegségek globálisan a második leggyakoribb haláloknak számítanak, jóllehet, bizonyos fejlett országokban az onkológiai betegségek mortalitása már meghaladta a kardiovaszkuláris halálozást^{1,2}. Az utóbbi időben a modern onkoterápia rendkívüli fejlődésen esett át; széles körben elérhetővé váltak a célzott-, illetve immunterápiás lehetőségek. Ugyanakkor a hagyományos kemoterápiának még mindig jelentős szerepe van bizonyos daganatok kezelésében. Az antraciklinek családjába tartozó doxorubicin (DOX) az egyik legelterjedtebb kemoterápiás szer, melyet különböző hematológiai és szolid tumoros megbetegedésekben alkalmaznak. Ez a szer azonban jelentős, kumulatív dózisfüggő kardiotoxikus mellékhatásokkal bír, mely rontja a betegek életminőségét, és növeli a hospitalizációt^{3,4}. Bár a molekula mellékhatásainak kivédésére irányuló intézkedések széleskörű, intenzív kutatás tárgyát képezik mind állatkísérletes, mind pedig humán kísérleti elrendezésben, a mai napig nem rendelkezünk megfelelő prevenciós stratégiával a kardiotoxicitás megelőzésére nézve.

Az utóbbi években számos klinikai állásfoglalás jelent meg a különböző onkoterápiák kardiovaszkuláris szövődményeinek gyakorlati ellátásával kapcsolatban. Ezek legfőképpen a kardiovaszkuláris rizikófaktorok előzetes meghatározását helyezték előtérbe a kemoterápia alkalmazása előtt, valamint ajánlásokat fogalmaztak meg az onkológiai betegekben kialakuló kardiotoxicitás monitorozására vonatkozóan. Ugyanezen útmutatásokban javaslatokat tettek a nagy kardiovaszkuláris rizikóval rendelkező betegek kemoterápia előtti preventív kezelésével kapcsolatban. Ugyanakkor a társbetegségtől mentes, kis kardiovaszkuláris rizikójú vagy rizikómentes egyének esetében nem kerültek megállapításra hasonló irányelvek a prevenciós lehetőségekre nézve³⁻⁶.

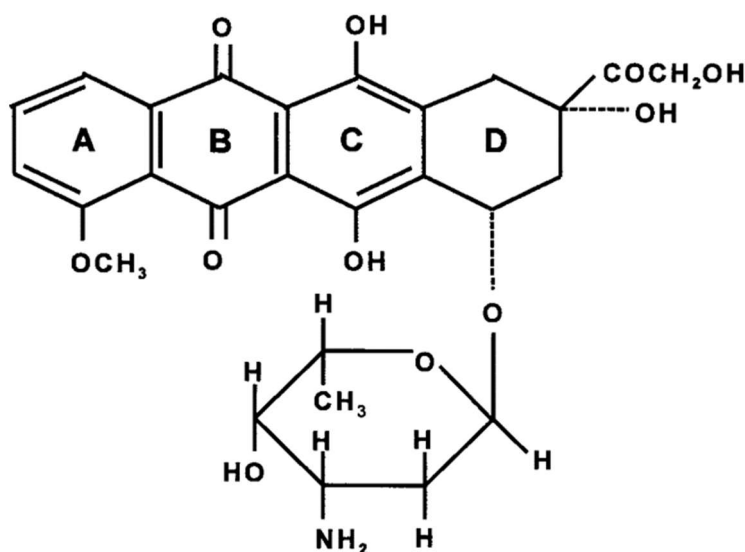
Fontos ugyanakkor hangsúlyozni, hogy az antraciklin kemoterápia által okozott kardiális mellékhatások és következményes szívelégtelenség az esetek egy jelentős részében

csak későn kerül felfedezésre. Mivel az előrehaladott stádiumban indított bázis szívelégtelenség terápia sokszor már nem képes a kialakult károsodásokat visszafordítani, felmerül, hogy az antraciklin kardiotoxicitás bizonyos megelőzési lehetőségeinek bevezetése a szélesebb, kis kardiovaszkuláris rizikójú populációban is kívánatos volna. Ahhoz, hogy fel tudjuk térképezni a DOX okozta kardiomiopátia megelőzésében hatékony gyógyszeres kezelési stratégiákat, mindenképpen szükség van olyan állatmodellekre, melyek jól mintázzák a humán onkoterápiás gyakorlatot, valamint lehetőséget teremtenek a különböző prevenciók lehetőségei *in vivo* és *in vitro* hatásainak vizsgálatára⁷.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A doxorubicin tulajdonságai, molekuláris hatásai

A DOX az antraciklinek családjába tartozó antibiotikum, melyet a *Streptomyces peucetius* baktérium termel. Szerkezetét tekintve egy tetraciklin vázból és a hozzá kapcsolódó aminosavból álló vegyület; jelentős lipofil tulajdonsággal és hosszú félélettartóval bír^{8,9}. A szemikinin vázon belül található kinon gyűrű (1. ábra B gyűrű) kulcsfontosságú a vegyület hatását tekintve⁹.



1. ábra. A doxorubicin szerkezeti képlete. A szemikinin gyűrű (B) felelős a reaktív oxigén gyökök kialakulásáért.

Forrás: Singal és mtsai⁹.

Erős tumorellenes aktivitása miatt az 1960-as években felfedezett molekula ígéretes onkoterápiás szernek bizonyult, azonban hamar nyilvánvalóvá vált, hogy komoly kardiotoxikus mellékhatásokkal rendelkezik¹⁰. Utóbbiak pontos patomechanizmusa a mai napig nem tisztázott, jöllehet, ezen a területen mindmáig intenzív kutatás zajlik.

Feltételezések szerint a DOX mind a tumorsejtekben, mind a szívizomsejtekben azonos módon, reaktív oxigén gyökök (ROS) termelődésén keresztül vezet sejtkárosodáshoz, azonban ezen oxigén gyökök forrása nem teljesen feltárt. Az egyik hipotézis szerint a DOX komplexet képez a DNS kettős spirállal, így gátolva a topoizomeráz II β enzimet, ami DNS kettős szál töréshez vezet. Ezen folyamat következménye a p53 tumorszupresszor fehérje aktiválódása, a mitokondriális diszfunkció megjelenése, valamint következményes reaktív oxigén gyök képződés. A másik elmélet szerint a DOX szemikinin váza reakcióba lép a Fe³⁺-ionokkal, ezáltal szabadgyökök képződnek, melyek lipid peroxidáción és/vagy protein karboniláción keresztül sejthalálhoz vezetnek¹¹⁻¹⁵.

Mindezekon felül a DOX megzavarhatja a szívizomsejtek Ca²⁺- és energia homeosztázisát, illetve a miokardiumban előforduló antioxidáns enzimek mennyiségének csökkenését is előidézhetheti. Ezen folyamatok végül apoptózishoz vezethetnek^{14,16-19}. Ultrastrukturális szinten a fentebb említett molekuláris hatásoknak számos következménye jön létre, melyek jellegzetesek a DOX okozta kardiomiopátiára: miofilamentum károsodás, Z-vonal degeneráció, a szarkoplazmatikus retikulum szétesése, a mitokondriumok szétesése, kromatin összecsapódás a sejtmagban¹⁰.

2.2. A doxorubicin terápiás felhasználása, akut és krónikus mellékhatások

Annak ellenére, hogy a DOX erős kardiotoxicitással bír, napjainkban is fontos szerepet tölt be az onkológiai betegek terápiája során. A DOX széles körben használt szernek számít

emlődagában, limfómában és szarkómában szenvedő felnőttek körében, valamint gyermekkori hematológiai malignitások esetében²⁰.

Tekintettel a kezelt betegek között nagy arányban kialakuló kardiomiopátiára, manapság a DOX terápia dózisa jelentős csökkentést igényelt. Bár a klinikai gyakorlatban alkalmazott maximális kumulatív dózis 400 mg/m²-re redukálódott, ezen dózis alkalmazásakor is kb. 3-5%-os eséllyel jöhet létre kardiomiopátia. Amennyiben az onkoterápia során mégis dózisémelésre van szükség, és a DOX kumulatív mennyisége eléri az 550 mg/m²-t, a szívelégtelenség kialakulásának esélye 7-26%-ra nő, míg 700 mg/m²-es dózis esetén a kardiomiopátia incidenciája elérheti akár a 18-48%-ot is⁴.

A bal kamra diszfunkció kialakulása mellett a DOX kezelésnek egyéb mellékhatásai is lehetnek. Az akut hatás során EKG eltérések alakulhatnak ki (ST-szakasz és T hullám változások, QT szakasz megnyúlás, szupraventrikuláris aritmiák) a betegek kevesebb mint 1%-ában; ezen hatások reverzibilisnek tekinthetőek⁴. Korai, illetve késői hatásként kell megemlíteni a tüneteket okozó szívelégtelenséget, mely akár egy éven belül, vagy néhány év múlva, adott esetben pedig úgynevezett „late-onset” módon, akár 15 év múlva is jelentkezhet^{4,21}. Egy korábbi olasz tanulmány szerint a DOX már a kemoterápiát követő fél éven belül tünetmentes károsodásokat okoz, melyek csak évek múltán manifesztálódnak²². Emiatt kulcsfontosságú a DOX okozta kardiomiopátia korai felismerése, valamint az időben elindított kardioszupportív terápia, mellyel mérsékelhetőek a szívelégtelenség tünetei, annak progressziója. Ezzel szemben egy későbbi stádiumban diagnosztizált szívelégtelenség kezelése komoly nehézséget jelent a klinikai gyakorlatban^{23,24}.

2.3. A doxorubicin okozta kardiotoxicitás megelőzési stratégiái

Az antraciklinek okozta szívelégtelenség évtizedek óta intenzív kutatások fókuszában áll. Számos próbálkozás történt megfelelő preventív módszerek kifejlesztésére, pl. a DOX okozta kardiotoxicitás kapcsán. Az utóbbi években több onkokardiológiai témájú útmutatás is

napvilágot látott, melyek hangsúlyozzák az onkológusok és kardiológusok közötti kommunikáció fontosságát, valamint a többlépcsős döntéshozatali folyamatot. Ennek során mindenképpen meg kell határozni az antraciklin okozta kardiotoxikus mellékhatások kifejlődésének rizikóját. Emelkedett rizikónak tekinthető, ha a beteg korábban már antraciklin terápián esett át. Ebben az esetben mindenképpen számolni kell az élethosszig tartó kumulatív dózissal. További rizikófaktor, ha a beteg nő, és/vagy meglévő kardiovaszkuláris betegsége van, magas vérnyomással rendelkezik, korábban kemoterápián vagy mellkasi irradiáción esett át. A betegek életkora szintén fontos: amennyiben a beteg 18 év alatti vagy 60-65 év feletti, fontolóra kell venni más kemoterápiás kezelési protokoll alkalmazását vagy szoros megfigyelés mellett szükséges adagolni a DOX terápiát³⁻⁶.

Egy másik megelőzési stratégia a DOX dózisának optimalizációja. Az egyszeri, nagyobb mennyiség beadásának gyakorlatát mindinkább átveszi a 3 hetente alkalmazott, lassú, 6 óra alatt beadott infúziós adagolás, mellyel el lehet kerülni a DOX magas plazmakoncentrációját. Ezen adagolásmód csökkentette a bal kamra diszfunkció előfordulását, valamint a kezelés után néhány évvel megjelenő kardiomiopátia megjelenését a betegekben. Mivel azonban a DOX kumulatív dóziszfüggő mellékhatással bír, a hosszútávú megelőzés szempontjából nem jelentett igazi előrelépést^{9,25-27}.

Korábban történtek próbálkozások DOX analógok előállítására is. Bár eddig kb. 2000 újabb molekula látott napvilágot, daganatellenes aktivitásukat figyelembe véve érdemben egyik sem bizonyult hatásosabbnak a DOX-nál, vagy nem rendelkezett alacsonyabb kardiotoxikus mellékhatással²⁸. Az utóbbi években megjelent liposzomális DOX formulációk szintén intenzív kutatás tárgyát képezik, azonban ezek közül csak néhány jutott tovább a biztonságossági és klinikai hatékonysági vizsgálatokon²⁹. Ezek közül egyik a liposzomális, pegilált DOX, melynek a hagyományosan alkalmazott DOX-hez képest több előnye is ismert. Egyrészt a liposzomális formula megakadályozza, hogy a DOX a szívbe, illetve a gasztrointesztinális rendszerbe jusson,

ugyanakkor a tumor mikrokörnyezetének köszönhetően a daganatos régióban hatékonyabban képes dúsulni, mint a szabad DOX³⁰. Ezen tulajdonságai miatt a liposzomális DOX daganatellenes aktivitása tovább növelhető a maximális tolerált dózis alkalmazása esetén, ugyanakkor nem kell számolni nagyobb mértékű kardiotoxicitással²⁹. Ugyan már több tanulmány igazolta, hogy a liposzomális formuláció alkalmazása mellett kevesebb a kardiotoxikus mellékhatás a szabad DOX formához képest³¹⁻³⁴, annak használata egyelőre csak a nagy kardiovaszkuláris rizikójú betegek kezelési protokolljába épült be^{3,4,6}. Továbbá, ezen formulációkat leginkább monoterápia vagy limitált számú kombinált kemoterápiás protokoll keretében alkalmazzák.

A fenti megelőzési stratégiákon túlmenően a kemoterápia mellé adott szupportív kezelések alkalmazása is hamar kutatási célponttá vált. Több vitamint és gyógyszerhatóanyagot is kipróbáltak a DOX okozta szívelégtelenség megelőzésére állatkísérletekben, valamint humán vizsgálatok során, azonban az eredmények nem voltak teljes mértékben egybehangzóak. Az E-vitamin például hatásosnak bizonyult a DOX okozta kardiomiopátia megelőzésére rágcsálókban, ugyanakkor nyulakban és kutyákban nem tudták megerősíteni ezen eredményeket³⁵⁻³⁷. Ezzel szemben a C-vitamin mind egerekben, mind tengerimalacokban sikeresen csökkentette a DOX okozta szívelégtelenség előfordulását³⁸.

A vaskelátor tulajdonságú dexrazoxán (ICRF-187) nemcsak kutyákban végzett kísérletek során, hanem humán vizsgálatokban is hatékonyan képes volt megelőzni a DOX okozta kardiomiopátia kialakulását, továbbá lehetővé tette magasabb dózisu DOX terápia alkalmazását is onkológiai betegekben^{15,39-41}. A dexrazoxán további előnye, hogy nem csökkenti a DOX daganatellenes aktivitását^{42,43}. Jóllehet, korábban több állatkísérletből és klinikai vizsgálatból származó eredmény is alátámasztotta a dexrazoxán protektív hatását, a gyógyszer dózisát limitálja annak mielotoxikus mellékhatása, mely nagy arányban fordul elő a kezelt betegekben^{43,44}.

A fentiek mellett kardiovaszkuláris gyógyszerekkel is történtek próbálkozások a DOX kardiotoxicitásának csökkentésére és megelőzésére nézve. Ezen szerek egyike a probucol, ami egy LDL-koleszterinszintet csökkentő gyógyszer, mely patkányokban növelte az állatok élettartamát a DOX kezelés alatt, normalizálta a kardiális funkciót és csökkentette az aszcitesz kialakulását⁴⁵. A múltban további, a napi gyakorlatban használt gyógyszerek is az állatkísérletek és klinikai tanulmányok fókuszába kerültek. Vizsgálták például a β -blokkolók, angiotenzin-konvertáló enzim- (ACE) gátlók, sztatínok illetve angiotenzin receptor blokkolók hatásait. Ezen eredmények egyelőre nem bizonyultak teljesen egybehangzónak, így a jövőben további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy ezen szerek a klinikai gyakorlatban is valóban alkalmasak-e a DOX okozta kardiomiopátia megelőzésére^{3,46}. Emiatt továbbra is szükséges megfelelő állatkísérleti protokollok kidolgozása, melyek során (ellentétben a humán klinikai vizsgálatokkal) nemcsak az állatok *in vivo* paraméterei, hanem azok szövetei és celluláris preparátumai is jól vizsgálhatóvá válnak.

A korábban végzett állatkísérleti elrendezéseknek sajnos több hiányossága is felmerült a múltban. Egyrészt az egyszeri, esetlegesen többszöri adagolású, nagy dózisú DOX nem csupán kardiotoxikus, hanem egyéb szervekre irányuló mellékhatásokkal is bír (mint pl. a gasztrointesztinális rendszer), ami befolyásolhatja a kísérletek eredményét^{7,47}. Hasonlóképpen problémát jelenthet a DOX beadási módja, mely legtöbb esetben intraperitoneálisan történt, ami nem modellezte megfelelően a humán intravénás onkoterápiás protokollokat. A kísérletek időtartama a legtöbb esetben túl rövidnek bizonyult, ami miatt az úgynevezett „late-onset”, későn jelentkező kardiomiopátia modellezése nem volt kivitelezhető⁷. Ezen aspektusok mellett az állatkísérletek tervezése során azt is fontos volna figyelembe venni, hogy míg a klinikai gyakorlatban a női nem hajlamosító tényezőként szerepel a DOX okozta kardiomiopátia létrejöttére, rágcsálók esetében a hím állatok érzékenyebbek lehetnek az antraciklin kemoterápiára^{7,21,48-52}. Ezek alapján a klinikumban alkalmazott, DOX alapú onkoterápia okozta

kardiomiopátia adekvát modellezéséhez a jövőben elkerülhetetlen, hogy az állatkísérletek során erőfeszítések történjenek a kemoterápia intravénás alkalmazására, a kardioprotektív kezelés profilaktikusan történő elindítására, valamint az állatok hosszabb távú utánkövetésére⁷.

3. Célkitűzések

Kutatásaink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Egy humán onkoterápiát modellező transzlációs rágsáló modellben a DOX alkalmazása után mennyi idő múlva alakul ki szívelégtelenség?
- Milyen folyamatok állnak a DOX okozta szívelégtelenség hátterében ebben az állatmodellben?
- Egy profilaktikusan alkalmazott, kombinált szívelégtelenség terápia jelent-e bármiféle előnyt a DOX kardiotoxicitásával szemben?
 - Melyek a terápia *in vivo* hatásai?
 - Melyek az *in vitro* hatások?
- Milyen hatásai vannak a DOX kezelés után 1 hónappal adott kombinált szívelégtelenség terápiának?
 - *In vivo* és *in vitro* hatások.
- Profilaktikusan alkalmazva a BB, ACEI és AA gyógyszercsoportok közül melyik rendelkezik a legelőnyösebb hatásokkal a DOX kardiomiopátia megelőzésében?
 - *In vivo* és *in vitro* hatások.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Állatkísérlet a kombinált szívelégtelenség terápia optimális időzítésének megállapítására

Az állatkísérletekhez 7-8 hetes hím patkányokat (TOXI-COOP Zrt.) rendeltünk, melyeket néhány hetes akkomodációs idő után, 12 hetesen vontunk kísérletbe. A patkányokat 12 óra világos / 12 óra sötét váltakozó ciklusokban tartottuk, állandó hőmérséklet (20-25°C) és páratartalom (55±10%) mellett. A kísérletek megfelelnek az állatvédelmi rendelkezéseknek, és a következő engedély számokon vannak nyilván tartva: DEMÁB/2016/13-M és DEMÁB/2018/15.

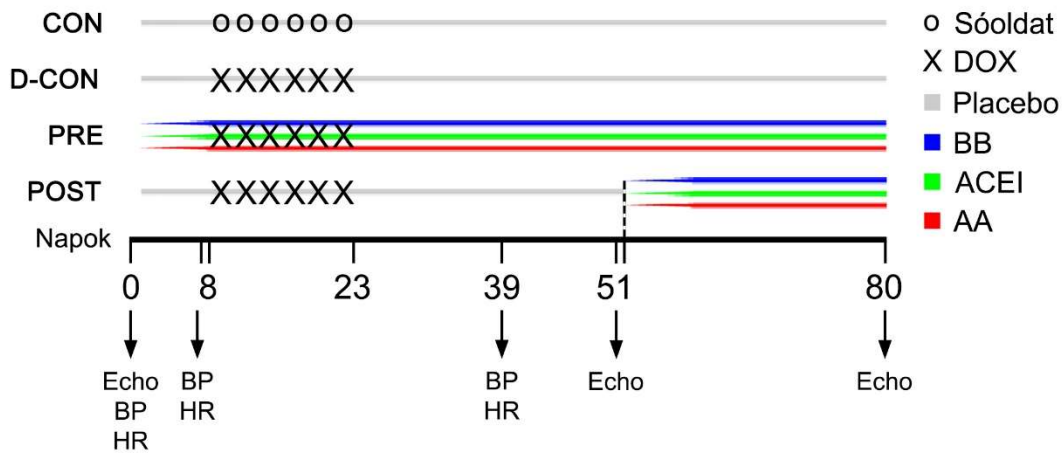
Az akkomodációs idő után a patkányokat a 2. ábra szerinti csoportokba osztottuk. A D-CON, PRE és POST csoportok állatainak farokvénájába DOX-t [Doxorubicin „Ebewe” 2 mg/ml ampulla] adagoltunk 6 ciklusban, alkalmanként 1,5 mg/kg dózisban a kísérlet 8., 11., 14., 17., 20. és 23. napján, míg a CON csoport ugyanezen napokon intravénás fiziológiás sóoldatot kapott. Az intravénás kezelések felületes szedációban történtek intramuszkuláris ketamin:xylazin kombináció alkalmazásával (50 mg/kg ketamin [Calypsol 50 mg/ml ampulla, Richter Gedeon Nyrt.], 5 mg/kg xylazin [CP-xylazin 2%-os oldat, Medicus Pharma Kft.]).

A PRE csoport állatai a DOX beadást megelőzően egy hétig fokozatosan feltitrált, majd fenntartó dózisban alkalmazott kombinált szívelégtelenség terápiát kaptak (2,5 mg/kg bisoprolol [Concor, Merck], 2 mg/kg perindopril [Prenessa, KRKA], 6,25 mg/kg eplerenon [Inspra, Pfizer]). A gyógyszereket porítottunk, majd a dózisonak megfelelően egy úgynevezett vivőanyagban (mucilago hydroethylcellulosi) feloldva, gyomorszonda segítségével juttattuk be az állatok gyomrába. A gyógyszerek feltitrálási protokollját az 1. táblázat mutatja.

	1. nap	2. nap	3. nap	4. nap	5. nap	6. nap	7. nap
Bisoprolol	1,25 mg/kg		2,5 mg/kg				
Perindopril	1 mg/kg		2 mg/kg				
Eplerenone	1,5625 mg/kg	3,125 mg/kg		6,25 mg/kg			

1. táblázat. A profilaktikusan alkalmazott gyógyszerek feltitrálásának protokollja

A CON és D-CON állatok a kísérlet teljes ideje alatt, a POST állatok pedig a kísérlet 51. napjáig gyógyszermentes vivőanyagot („placebo”) kaptak gyomorszondán át. A POST állatoknak az 52. naptól kezdve 1 héten át titrált, majd fenntartó dózisban alkalmazott hármas gyógyszerkombinációt adagoltuk a PRE csoportban alkalmazott mennyiségben. Ezzel a jelenlegi humán gyakorlatot jellemző, konvencionálisan időzített szívelégtelenség terápia hatásait kívántuk modellezni.



2. ábra. A kombinációs kezelés kísérleti elrendezése. Minden csoport 6 ciklus intravénás DOX kezelésben részesült (a CON csoport kivételével, melynél fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk). A profilaktikus gyógyszerterápiát a PRE csoportban 1 héttel a DOX expozíció előtt indítottuk, míg a POST csoportban az 52. napon. A gyógyszer mennyiségeket mindkét esetben egy hét alatt titráltuk fel a fenntartó dózisokra. Vérnyomás- és szívfrekvencia méréseket (BP, HR) a kísérlet 0., 7. és 39. napján végeztünk. Szívultrahangos vizsgálat (Echo) a kísérlet 0., 51. és 80. napján készült.

A kísérlet kezdetén kontroll vérnyomásmérést végeztünk úgynevezett farokmandzsettás módszerrel (CODA non-invazív vérnyomásmérő rendszer, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA), melyet a kísérlet 7. és 39. napján ismételtünk meg. A vérnyomásmérés a 39. nap után nem volt lehetséges, mivel a farokvénába beadott DOX helyileg a farok kisebesedését, szklerózist okozta, ezáltal megbízhatatlanná téve a további vérnyomásméréseket.

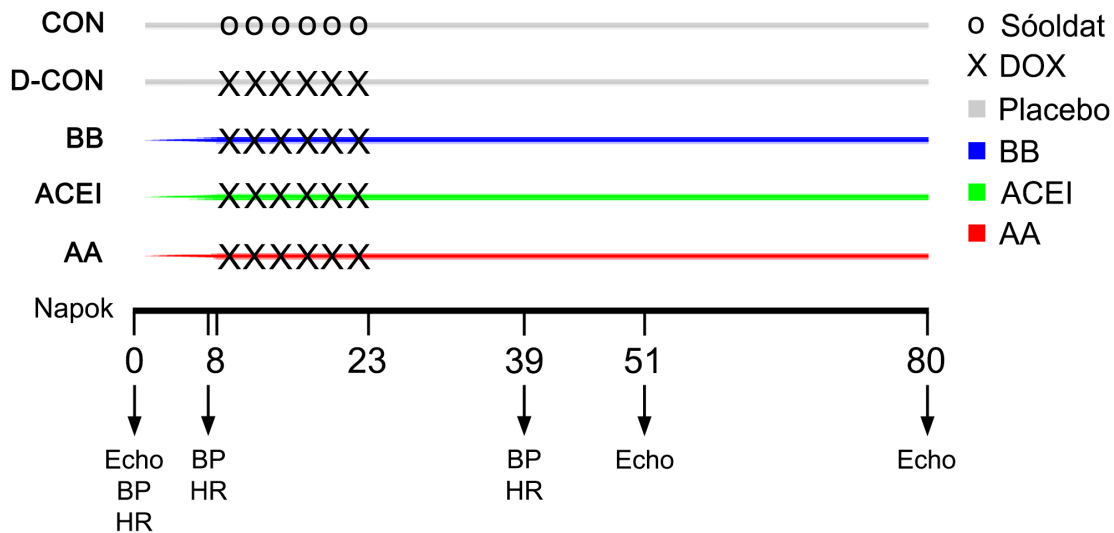
Az állatokban echokardiográfiás vizsgálatokat végeztünk a kísérlet kezdetén, majd az 51. és 80. napon, mély anesztéziában (100 mg/kg ketamin és 10 mg/kg xylazin kombinációja). A vizsgálat során paraszternális hosszmetzeti M-mód felvételeket készítettünk a szisztolés paraméterek meghatározására. A diasztolés és a Doppler alapú szisztolés paraméterek vizsgálatához 4 üregű felvételeket használtunk, míg a strain paraméterekhez egy rövid felvételt készítettünk ugyanebből a metszetből. A strain paraméterek méréséhez technikai okokból csak a bal kamra szeptumának bazális és középső részét tudtuk felhasználni. Az echokardiográfiás vizsgálatokat a General Electric Vivid E9 (General Electric, Fairfield, CT, USA) ultrahang készülékével végeztük egy speciális, rágcsálókhoz használható ultrahang fej segítségével (14.1 MHz, i13L, General Electric).

Az utolsó echokardiográfiás vizsgálatot követően az állatokat intreaperitoneálisan alkalmazott tiopentállal (100 mg/kg) túlaltattuk, majd azok szerveit kimetszettük, mélyfagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd -70°C -on tároltuk további felhasználásig.

4.2. Állatkísérlet a profilaktikus gyógyszerek individuális hatásainak megállapítására

Az előző kísérletsorozatban felhasznált állatokkal azonos korú egyedek újabb csoportjait a korábban leírt kontroll vérnyomásmérések és szívultrahangos vizsgálatokat követően az alábbi gyógyszerelési kezelésekben részesítettük: a BB csoport 2,5 mg/kg bisoprololt, az ACEI csoport 2 mg/kg perindoprilt, míg az AA csoport 6,25 mg/kg eplerenont kapott gyomorszondán keresztül, speciális vivóanyagban feloldva. A gyógyszereket a DOX kezelést megelőző 1 hét

alatt titráltuk fel a fenntartó dózissig, és azokat a teljes kísérlet során alkalmaztuk. A CON és D-CON csoportok állatai a korábban leírtak szerint voltak kezelve (3. ábra).



3. ábra. Kísérleti elrendezés a profilaktikus gyógyszerek individuális hatásainak megállapítására. Az állatok a CON csoport kivételével 6 ciklus DOX-t kaptak intravénásan. A CON állatok farokvénáiba ugyanezen időpontokban fiziológiás sóoldatot injektáltunk. A gyógyszeres kezelések mindegyikét az első DOX injekció előtt indítottuk el folyamatos, 1 hétig tartó feltitrálás mellett. Vérnyomás- és szívfrekvencia méréseket (BP, HR) a kísérlet 0., 7. és 39. napján végeztünk. Szívvultrahangos vizsgálatok (Echo) a 0., 51. és 80. napokon történtek.

A vérnyomás- és szívfrekvencia méréseket a 7. és 39. napon, míg az echokardiográfias vizsgálatokat az 51. és 80. napokon ismételtük meg. Az állatok tiopentállal (100 mg/kg) történő túlaltatása után a szerveket kimetszettük, majd folyékony nitrogénben mélyfagyasztottuk, és a későbbi felhasználásig -70°C -on tároltuk. A tüdő egy darabját kimetszettük, megmértük annak „nedves” súlyát, majd 60°C -on, 24 órán át történő szárítást követően meghatároztuk a „száraz” súlyt is. Az állatokból natív vérmintát vettünk, majd centrifugálást követően (1500 G, 15 perc) a szérumokat a további vizsgálatokig -70°C -on tároltuk.

4.3. Szövettan

A bal kamra szabad falából egy darabot Shandon™ Cryomatrix-ba (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) ágyasztunk, majd abból 15 µm vastag kriosztátos metszeteket készítettünk. A tárgylemezek szárítása után a sejtmagokat Mayer's féle hemalummal festettük 10 percig, majd kékítés után 0,1% -os pikroszíriusz vörös festékekkel mutattuk ki a fibrotikus szövetet. Izopropil alkohollal történő mosást követően a metszeteket dehidráltuk, majd DPX-szel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) rögzítettük. A tárgylemezekről reprezentatív fényképeket készítettünk Olympus BX-50-es mikroszkóp segítségével 40x-es nagyításon. A kapilláris denzitás és a fibrotikus területek kiértékelését ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) programmal végeztük. A fibrotikus területek arányát az ImageJ program „Colour Threshold” funkciójával határoztuk meg. A kapilláris denzitás értékeléséhez olyan reprezentatív felvételeket használtunk, melyeken a miokardium keresztmetszeti felvételei voltak azonosíthatóak, továbbá mentesek voltak a festési műtermékektől. Így határoztuk meg a kapillárisok abszolút számát és össz-területét a képeken látható szívizomszövet teljes felszínére normalizálva.

4.4. TUNEL esszé

Az apoptózis során létrejövő DNS fragmentáció kimutatására TUNEL esszét végeztünk, mely során a terminális, deoxynukleotid transferáz enzim speciális, fluoreszcens festékekkel jelölt deoxynukleotidokat köt a fragmentált DNS szabad 3' végéhez, ezáltal a fragmentált DNS részek fluoreszcens mikroszkóppal kimutathatóak. A módszer során a kriosztátos metszeteket először 4%-os jéghideg formalinnal fixáltuk 4°C-on 45 percig. Etanol:ecetsav 2:1 arányú oldatával végzett, -20°C-on 5 percig tartó utófixálást követően a metszeteket pH=6-os citrát pufferben forraltuk, majd 20 percig szobahőmérsékleten hűtöttük. Az egyes lépések között 2x5 percig tartó, foszfát pufferben (PBS) történő mosást alkalmaztunk. A metszeteket ezután 1 órán keresztül nedves kamrában inkubáltuk 37°C-on Tdt-vel. Újabb mosás után a sejtmagokat DAPI

(4', 6-diamidino-2-fenilindol) festékekkel tettük láthatóvá, majd Mowiol-lal történő rögzítés után a szövetszövetmintákat Zeiss Axioskop mikroszkóppal vizsgáltuk. Az apoptotikus sejtmagok lila színnel jelentek meg a kék és vörös csatornák összevonása miatt, míg a kék foltok a nem apoptotikus sejtmagoknak felelnek meg. Az apoptotikus sejtmagok számát a Tdt-re való pozitívítás és az össz sejtmagszám arányában határoztuk meg.

4.5. Elektronmikroszkópia

A mintaelőkészítés egy korábban közölt protokoll⁵³ módosításával történt. A bal kamra szabad falának egy darabját jéghideg, 4% paraformaldehidet és 3% glutáraldehidet tartalmazó fixáló elegyben inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A szövetszövetblokkokat ezután háromszor mostuk 0,1 M foszfát pufferrel (PB), majd ozmium-tetroxid oldatban inkubáltuk, és dehidráció után DURCUPAN™ ACM gyantába ágyaztuk. A mintákból 50 nm vastagságú metszetek készültek, melyeket uranil acetáttal és Reynold's-féle ólom citráttal kontrasztoltunk. A metszetekről reprezentatív fényképek készültek, melyeket denzitometriai analízisnek vetettünk alá úgy, hogy a vizsgáló elől elrejtettük az egyes állatcsoportok azonosításához szükséges adatokat. Csoportonként 10-13 felvételt választottunk ki, 3000x-es nagyításon, melyeket ImageJ programmal elemeztünk háttérdenzitásra és expozícióra történő normalizálás mellett. A háttérdenzitás meghatározására szívizomszövettől mentes területek, míg expozíció kontrollra látszólag intakt szarkomerek átlagdenzitásai szolgáltak. A denzitometriai elemzésből kizártuk a felvételeken lévő sejtmagokat és fixálási melléktermékeket, majd szabad kézzel körberajzoltuk a kielemezendő területeket. Ezután határoztuk meg az egyes területek kiterjedésére súlyozott átlagdenzitásokat az alábbi szummációs képlet alapján:

$$\text{SUM}((X-Y) / Z * A_x)$$

, ahol X egy szabadkézzel körberajzolt szívizomsejt terület átlagdenzitása, Y a háttér átlagdenzitása, Z az intakt szarkomerek átlagos denzitása és A_x az adott szívizomsejt terület

kiterjedésének aránya a képeken látható szívizomszövet teljes felszínéhez képest. A DOX kemoterápia okozta ultrastrukturális károsodások, mint a miofibrillolízis, a vakoulizáció és a mitokondriális dezintegráció egyaránt alacsonyabb denzitometriás értékekhez vezettek összehasonlítva az egészséges miokardiumban mért értékekkel.

4.6. Izolált, permeabilizált szívizomsejtekben végzett erőmérések

Ezen kísérletsorozatot a már korábban közölt módszertan szerint⁵⁴⁻⁵⁶ végeztük. Az izolált, membránjától megfosztott szívizomsejtet két végét egy elektromágneses motorhoz és egy erőmérőhöz rögzítettük rovartűk segítségével. A szívizomsejtek szarkomerhosszát 2,2 μm -re állítottuk be a preparátumok 15°C-os izoláló oldatban (10 mM KCl, 2 mM etilén-glikol-tetraacetát /EGTA/, 1 mM MgCl₂, 0,1 M ATP, 100 mM imidazol; pH 7,0, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) történő manipulálásával (az alacsony hőmérséklet a preparátumok stabilitását segítette elő). Ezután kiváltottuk a preparátumok ismételt aktivált (aktiváló oldatok: 10 mM BES, 37,34 mM KCl, 6,24 mM MgCl₂, 7 mM Ca²⁺-EGTA, 6,99 mM ATP, 15 mM kreatin-foszfát; pH 7,2) és relaxált állapotát (relaxáló oldat: 10 mM BES, 37,11 mM KCl, 6,41 mM MgCl₂, 7 mM EGTA, 6,94 mM ATP, 15 mM kreatin-foszfát; pH 7,2) azok különböző Ca²⁺-koncentrációjú oldatba történő mozgatásával, eközben mérve a preparátumokban ébredő izometriás erőt. A különböző Ca²⁺-koncentrációkat az aktiváló és relaxáló oldatok keverésével állítottuk elő. Minden oldat 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, 40 μM leupeptin és 10 μM E-64 proteáz inhibitorot tartalmazott. Rögzítettük a keresztmetszeti területre normalizált Ca²⁺-aktiválta maximális- (F_{max}) és Ca²⁺-független passzív erőt ($F_{\text{passzív}}$), valamint a Ca²⁺-erő összefüggés értékeinek módosított Hill egyenlettel történő illesztését követően kifejeztük az izometriás erő Ca²⁺-érzékenységét ($p\text{Ca}_{50}$). A preparátumok aktiváló oldatban létrejött steady-state állapotát követően alkalmazott, hossz tengely mentén történő pillanatszerű bemozgatás („slack test”) lehetővé tette az erő újdonszülődés sebességi állandójának ($k_{\text{tr,max}}$) meghatározását.

4.7. A kontraktilis fehérjék oxidatív státuszának vizsgálata (Oxyblot)

A fehérje karbonil csoportok kimutatásának alapjául a Balogh és munkatársai⁵⁶ által korábban használt Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit szolgált. A módszer során a szívizom mintákat az erőmérésekhez használt protokoll szerint izoláltuk, majd 1mM nátrium-hipoklorit oldat (pozitív kontroll 1), illetve Fenton reagens (50 μ M FeSO₄, 6mM aszkorbinsav és 1,5 mM H₂O₂ tartalmú oldat; pozitív kontroll 2) 30 percig történő felhasználásával pozitív kontrollokat hoztunk létre. A pozitív kontroll mintákat 4°C-on, 1 percig, 1000 G-n centrifugáltuk, majd az összes mintát egy speciális mintapufferben (8 M urea, 0,75 mM dithiothreitol [DTT], 4 M thiourea, 3% nátrium-dodecil-szulfát [SDS], 10 μ M E64, 40 μ M leupeptin 50 mM Tris-base tartalmú pH=4-es oldatban, 10% glycerol és 0,5% bromofenol hozzáadásával) szolubilizáltuk. Egy óra vortex kezelést követően a mintákat 25°C-on, 5 percig, 10 000 G-n centrifugáltuk, majd a felülúszóból fehérjemérést végeztünk dot-blot alapú módszerrel, fehérje standardként bovine szérum albumint (BSA) használva. A mintákat 3 mg/ml-es koncentrációra hígítottuk, majd dinitrofenil-hidrazinnal (DNPH) derivatizáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. A reakció neutralizálása után a mintákat 10% SDS-poliakrilamid tartalmú gélekre vittük fel, majd kb. 1 órán keresztül 150 V-on, gélenként 30 mA áramerősség mellett futtattuk őket. A fehérjék nitrocellulóz membránra történő blottolása 100V-on történt 90 percig. A membránok blokkolása, az elsődleges és másodlagos antitestek felvitele és inkubálási ideje a gyártó által megadott protokoll szerint történt. A fehérjesávokat Westernbright ECL kittel (Advansta, San Jose, CA, USA) hívtuk elő MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzsálem, Izrael) gél dokumentációs rendszer segítségével, majd normalizálást végeztünk az össz-fehérje mennyiségre. A fehérjék teljes mennyiségét szuper-szenzitív membránfestő kittel (UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd., Debrecen, Magyarország) mutattuk ki.

4.8. A kontraktilis fehérjék foszforilációs státuszának meghatározása

A foszforilációs státusz meghatározásához ProQ™ Diamond gél festéket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) alkalmaztunk. A szívizommintákat az Oxyblot módszertan szerint izoláltuk, 1x-es Laemmli pufferrel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) hígítottuk, majd 1 órán keresztül vortexeltük. A fehérje koncentrációk meghatározása a korábbiakban leírt dot-blot alapú módszerrel történt. Az oldatokat 50 mg/ml fehérje koncentrációra hígítottuk, majd 10%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk az Oxyblot módszertannál leírt körülmények között. A fehérje sávokat ezután ProQ™ Diamond gél festék alkalmazásával vizualizáltuk a gyártó által megadott protokoll szerint. A sávokat a korábban említett fehérje dokumentációs rendszerrel hívtuk elő, majd Comassie festést követően normalizálást végeztünk az össz-fehérje mennyiségre.

4.9. Western immunoblot a mitokondriális fehérjék meghatározásához

A bal kamra szabad falának egy darabját az izolált, permeabilizált szívizomsejt mérésénél használt izoláló oldatban mechanikusan feltártuk, majd szonikáltuk 10 másodpercig. Centrifugálás után (szobahő, 10 perc, 1000 G) 80 µl felülúszóhoz 20 µl 5x-ös mintapuffert (50% glicerin, 10% SDS, 310 mM Tris-HCl pH=6,8, 100 mM DTT, 0,01% bromofenol kék) és 5 µl β-merkaptotetanolt adtunk, majd 10 percig forraltuk. A minták fehérje koncentrációját dot-blot alapú módszerrel határoztuk meg. 8%-os SDS-poliakrilamid géltre 50 µg fehérjét vittünk fel, majd az Oxyblotnál leírt futtatási körülmények után nitrocellulóz membránra blottoltuk (szintén az Oxyblotnál leírtak szerint). 1 órán át tartó 1% BSA-t tartalmazó TBST oldattal történő blokkolás után a membránokat az alábbi, nyúlban termeltetett elsődleges antitestekkel inkubáltuk 1:1000 hígításban, egy éjszakán keresztül, 4°C-on: anti-acetil koenzim-A karboxiláz (ACC), anti-foszfo ACC, anti-peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor-gamma koaktivátor 1 α (PGC1α), anti-Forkhead box protein O1 (FoxO1) (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA). A membránokat ezután TBST-vel mostuk, majd anti-nyúl IgG specifikus másodlagos

antitesttel inkubáltuk (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; hígítás: 1:40 0000) szobahőmérsékleten 1 órán át. A fehérje sávok előhívása az Oxyblot módszernél leírtakhoz hasonlóan történt. Ezután a membránokat anti- β -aktin antitesttel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőn, majd a sávokat előhívtuk. Az eredeti fehérje sávokat a β -aktin jelölésekre normalizáltuk.

4.10. Western immunoblot a kaspáz-3 fehérje kimutatásához

A fagyasztott szívizom mintákból kb. 100 mg mennyiséget tártunk fel mechanikusan 200 μ l izoláló oldatban, majd a korábban leírtak szerint⁵⁷ mértük a fehérje koncentrációt. A mintákból 35 μ g fehérjét vittünk fel úgynevezett TGX Stain-Free™ 12%-os akrilamid gélekre, illetve 4-20%-os Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein gélekre (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), melyeket 120 V-on 1-1,5 óráig futtatunk. A géleket ezek után UV fényel exponáltuk, amely során a gél trihalo csoportjai kovalensen kötődtek a fehérjék triptofán oldalláncaihoz. Ezek után a fehérjéket 100V alkalmazásával 1 órán át blottoltuk át a membránra, majd egy újabb, rövid UV fényel történő besugárzással előhívtuk a fluoreszcens szignált, amely a teljes fehérje mennyiségét mutatta. Ezután a membránokat 5%-os zsírmentes tejport tartalmazó, 0,1% TBST oldattal blokkoltuk. A mintát nyúlban termeltetett anti-kaspáz-3 elsődleges antitesttel (1:500 hígításban, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) inkubáltuk tovább egy éjszakán keresztül 4°C-on. A membránok TBST-vel történő háromszori mosása után anti nyúl, HRP konjugált másodlagos antitest oldatban 1,5 órán keresztül szobahőn folytattuk tovább a reakciót, majd újabb mosást követően Clarity Western ECL szubsztrátot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) használva hívtuk elő a fehérje sávokat az ajánlott protokoll alapján (ChemiDoc Touch, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Az előhívott sávokat a teljes fehérje mennyiségre normalizáltuk Image Lab™ 5.2.1 programot használva (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

4.11. Adatelemzés és statisztika

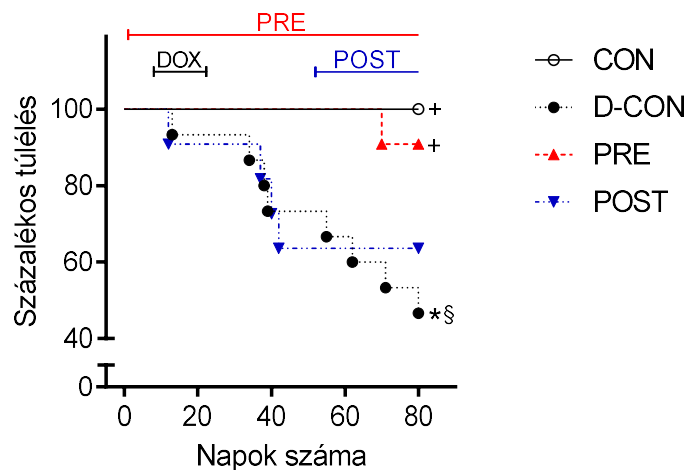
Az izolált, permeabilizált szívizomsejt erőmérések során LabVIEW Data Acquisition alapú programmal (Myo; National Instruments, Austin, TX, USA) regisztráltuk és értékeltük a Ca^{2+} -indukálta erőket. Az adatpontokat a továbbiakban Origin 6.0 (Originlab Corporation, Northampton, MA, USA) programmal ábrázoltuk. A biokémiai mérések során előhívott fehérje sávokat az ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), valamint a MagicPlot (MagicPlot Systems, Saint Petersburg, Russia) szoftverekkel értékeltük. Egy állat mintájából több mérést végeztünk, majd az értékeket átlagolva megkaptuk az adott állatra jellemző paramétert. Ezek után az állatok egyes paramétereit csoportonként is átlagoltuk, amelyből egy úgynevezett „átlagok átlaga” érték keletkezett, reprezentálva a kezelési csoportra vonatkozó értéket. Ezen átlagolási módszer azonban nem volt alkalmazható a következő paraméterekre: testsúly, testtömeg index, strain vizsgálatok. Az ábrákon és a táblázatokban feltüntetett elemszámok a csoporton belüli állatok elemszámát reprezentálják, míg az ábraszövegben az állat azonosítókon belüli mérések számát is feltüntettük. A feltüntetett, állatcsoportokra jellemző értékeket $\text{átlag} \pm \text{az átlag standard hibája}$ formátumban adtuk meg.

A túlélés szempontjából a csoportokat átfogó log-rank próbával, valamint annak lehetséges páronkénti változataival hasonlítottuk össze. A többi kísérleti eredményt 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. A statisztikai elemzéseket Stata programcsomag segítségével végeztük (StataCorp LLC. 2017, Stata Statistical Software; Release 15. Collage Station, TX, USA).

5. Eredmények:

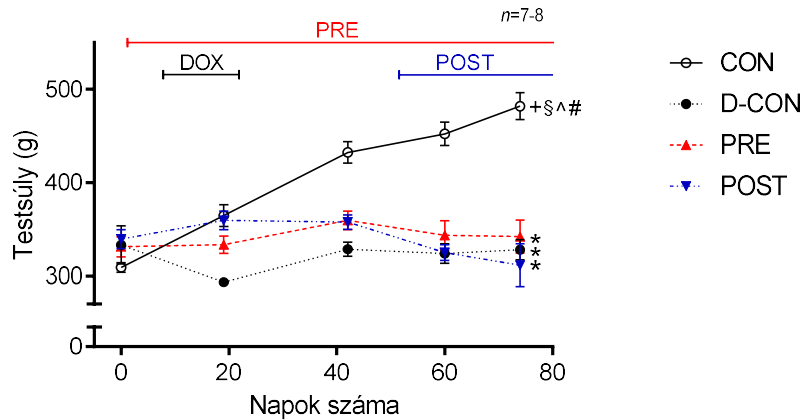
5.1. Kísérlet a kombinált szívelégtelenség terápia optimális időzítésének megállapítására

A kemoterápia hatására a pozitív kontroll csoport (D-CON) állatainak túlélése szignifikánsan alacsonyabb volt a negatív kontrollhoz (CON) képest ($P=0,0247$), míg a DOX-t megelőzően elindított profilaktikus gyógyszeres kezelés a PRE csoportban szignifikánsan jobb túlélést eredményezett ($P=0,0207$) a D-CON csoporthoz viszonyítva. Az 52. naptól kezdve, amikor a POST csoport gyógyszeres kezelését elindítottuk, az állatok túlélése nem változott (4. ábra).



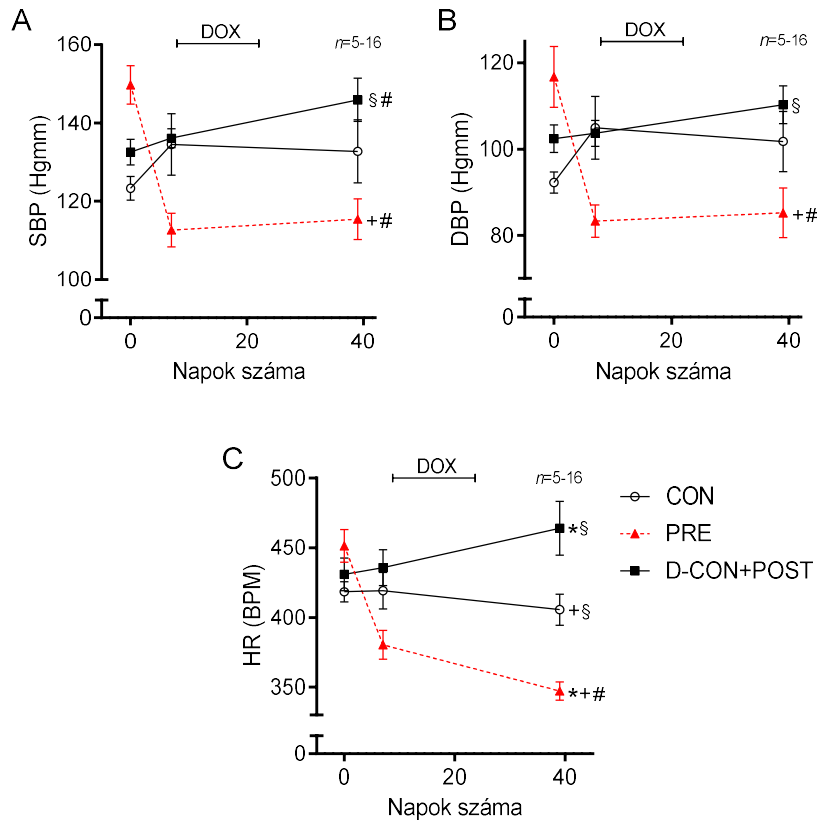
4. ábra. Az állatok túlélésének százalékos eloszlása. A DOX kezelés hatására a D-CON állatok túlélése szignifikánsan csökkent a CON csoporthoz képest, ezzel szemben a PRE kezelés szignifikánsan növelte az állatok túlélését a D-CON állataihoz képest. A POST csoport túlélése a kombinációs kezelés elindítását követően a továbbiakban már nem változott. *: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, +: $P \leq 0,05$ a D-CON csoporthoz képest, §: $P \leq 0,05$ a PRE csoporthoz képest. Statisztika: log-rank próba.

A CON állatok testsúlya folyamatosan nőtt a kísérlet során, míg a többi, DOX kezelésben részesülő csoportok állatainak testsúlya jelentősen alacsonyabb maradt a CON csoporthoz képest ($P \leq 0,0018$) (5. ábra).



5. ábra. Az állatok testsúlyának alakulása a kísérlet során. A CON állatok testsúlya folyamatosan gyarapodott a kísérlet alatt, míg a DOX kezelt állatok testsúlya nem változott a kísérlet kezdetéhez képest. $n=7-8$ állat/csoport. Állatonként 1 mérés. *: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, +: $P \leq 0,05$ a D-CON csoporthoz képest, §: $P \leq 0,05$ a PRE csoporthoz képest, ^: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, #: $P \leq 0,05$ a kísérlet 0. napjához képest. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba.

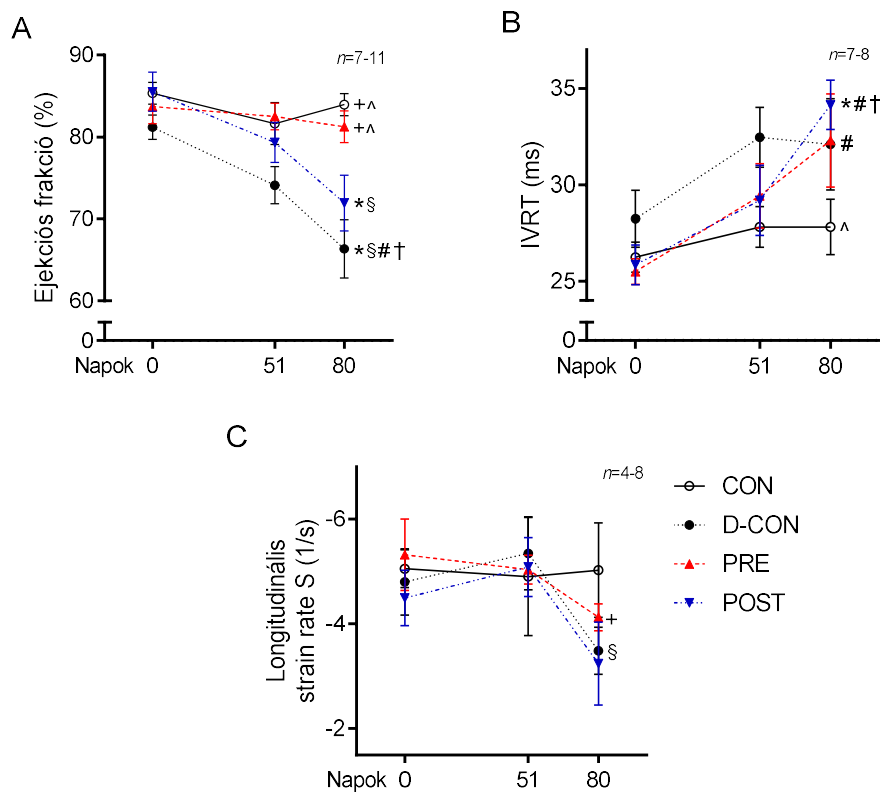
A vérnyomás eredmények kiértékelése során a D-CON és a POST csoport adatait összevontuk, mivel a 39. napig a két csoport identikusnak volt tekinthető (a POST csoport állatai csak az 52. naptól részesültek gyógyszeres kezelésben). Ezen összevont csoportban a DOX megnövelte az állatok szívfrekvencia (HR) értékeit a CON csoporthoz képest (464 ± 19 vs. 406 ± 11 ütés per perc (BPM), $P=0,0193$). Ezzel szemben a PRE kezelés szignifikánsan csökkentette a szisztolés- (SBP), valamint a diasztolés vérnyomást (DBP) a D-CON+POST csoporthoz képest ($115 \pm 5/85 \pm 6$ és $146 \pm 6/110 \pm 4$ Hgmm, sorrendben), továbbá csökkentette a szívfrekvencia értékeit (347 ± 7 BPM) a CON és D-CON+POST csoportokhoz képest ($P=0,0074$ és $P=0,0029$, sorrendben) (6. ábra).



6. ábra. Az állatok vérnyomás értékei a kísérlet alatt. A PRE csoport állatainak szisztolés (A) és diasztolés vérnyomás értékei (B) szignifikánsan alacsonyabbnak adódtak a D-CON+POST csoporthoz képest, míg a szívfrekvencia értékek minden más csoporttal összehasonlítva mutattak jelentős csökkenést (C). n =állat/csoport, állatonként 5 mérés. *: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, +: $P \leq 0,05$ a D-CON csoporthoz képest, §: $P \leq 0,05$ a PRE csoporthoz képest, ^: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, #: $P \leq 0,05$ a kísérlet 0. napjához képest. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba.

A szívultrahangos vizsgálatok során szignifikánsan alacsonyabb ejekciós frakciót (EF) figyeltünk meg a kísérlet végén a D-CON csoportban a CON állataihoz viszonyítva ($66,4 \pm 3,6\%$ és $84 \pm 1,3\%$, sorrendben, $P=0,0043$). A profilaktikus kombinációs kezelés ezzel szemben megőrzött EF-t mutatott ($81,3 \pm 2\%$), mely jelentősen különbözött a D-CON és a POST csoport EF értékeitől ($72 \pm 3,4\%$; $P=0,0046$ a D-CON, $P=0,0237$ a POST csoporthoz viszonyítva). A POST kezeléssel nem volt kivédhető a DOX okozta EF csökkenés (3. ábra, A panel).

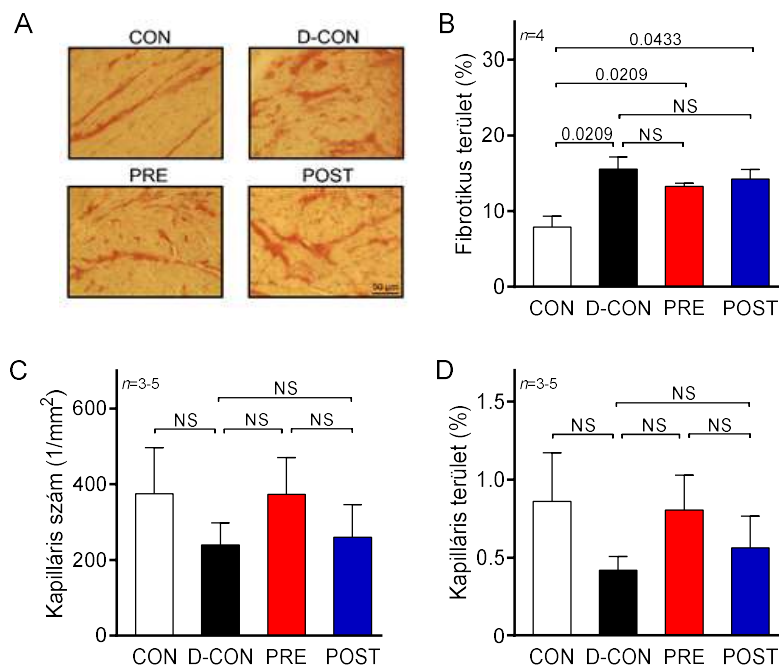
Egyik kezelés sem volt képes kivédeni az izovolometriás kontrakciós idő (IVRT) DOX okozta enyhe megnyúlását, mely a POST és CON csoportok esetében szignifikánsnak bizonyult ($34,1 \pm 1,3$, illetve $27,8 \pm 1,4$ ms, sorrendben, $P=0,006$) (7. ábra B panel). A longitudinális strain rate S elnevezésű szisztolés paraméter esetében mérsékelt fokú csökkenés volt megfigyelhető a DOX kezelést kapó állatokban. Ez a változás azonban a PRE csoportban jelentősen kisebbnek adódott, mint a D-CON csoportban ($-4,1 \pm 0,3$, illetve $-3,5 \pm 0,4$, $P=0,0321$) (7. ábra C panel).



7. ábra. Szívoltrahangos paraméterek. A D-CON állatokban jelentősen csökkent EF-t mértünk, míg a profilaktikus kezelésben részesülő PRE csoportban ez a változás nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor a POST kezelésben részesülő állatok esetében nem sikerült kivédeni a DOX indukálta EF csökkenést (A). Az IVRT DOX okozta megnyúlását egyik kezelés sem tudta megakadályozni (B). A DOX kezelt állatokban csökkent longitudinális szisztolés strain rate volt megfigyelhető, amely változás mérsékelhetőnek bizonyult a PRE kezelés alkalmazásával (C). n =állat/csoport, állatonként 3 mérés, kivéve a strain mérés során (1 mérés/állat). *: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, +: $P \leq 0,05$ a D-CON

csoporthoz képest, §: $P \leq 0,05$ a PRE csoporthoz képest, ^: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, #: $P \leq 0,05$ a kísérlet 0. napjához képest. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba.

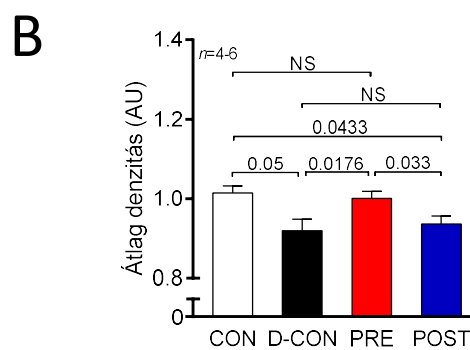
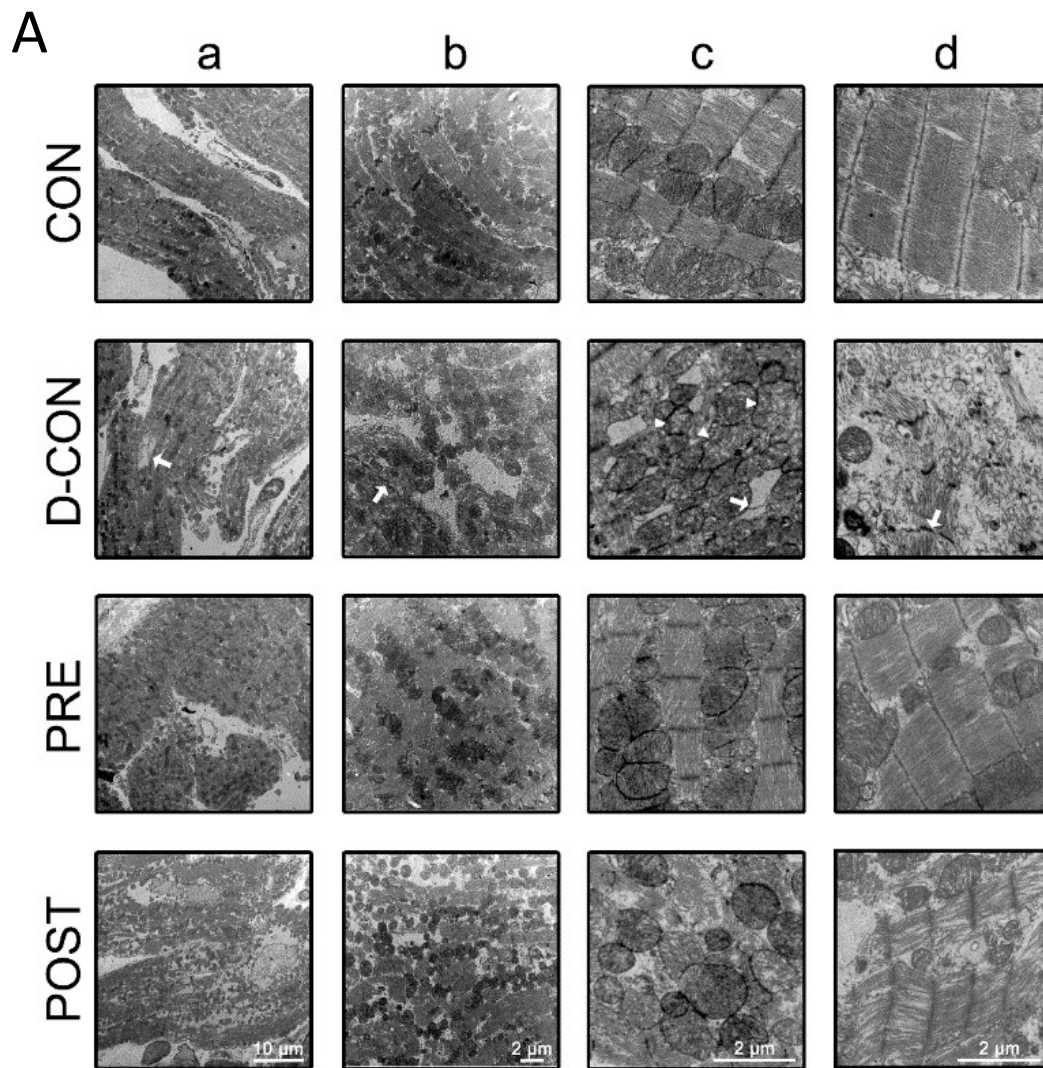
A miokardiumban létrejövő fibrózis kimutatására pikroszíriusz vörös festést használtunk kriosztátos metszeteken. A reprezentatív felvételeket a 8. ábra A panelje mutatja. A fibrotikus régió a szövetben piros színnel látszódik. A fényképek kvantitatív analízise alapján a DOX kezelt csoportokban jelentősen nagyobb mértékű fibrózis volt megfigyelhető ($>10\%$) a CON csoport állataihoz képest ($P \leq 0,0433$), mely változás egyik kezelés hatására sem volt érdemben kivédhető (8. ábra B panel). A kapillárisok abszolút számában, valamint azok terület arányában nem találtunk jelentős különbségeket a csoportok között (8. ábra C és D panel).



8. ábra. Szövettan. A metszetekről pikroszíriusz festést követően készült reprezentatív felvételeken a fibrózis piros színnel jelenik meg (A). A DOX kezelés hatására minden csoportban megfigyelhető volt a nagyobb mértékű fibrózis (B). A D-CON és POST csoportok esetében csökkenés következett be a kapilláris számban (C) és a kapilláris terület arányban (D) a CON és PRE csoportokhoz képest, azonban egyik különbség sem volt szignifikáns. n =állat/csoport, állatonként 9 kép a fibrózis mérésekhez, 3

kép/állat a kapilláris mérésekhez. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik. NS=nem szignifikáns.

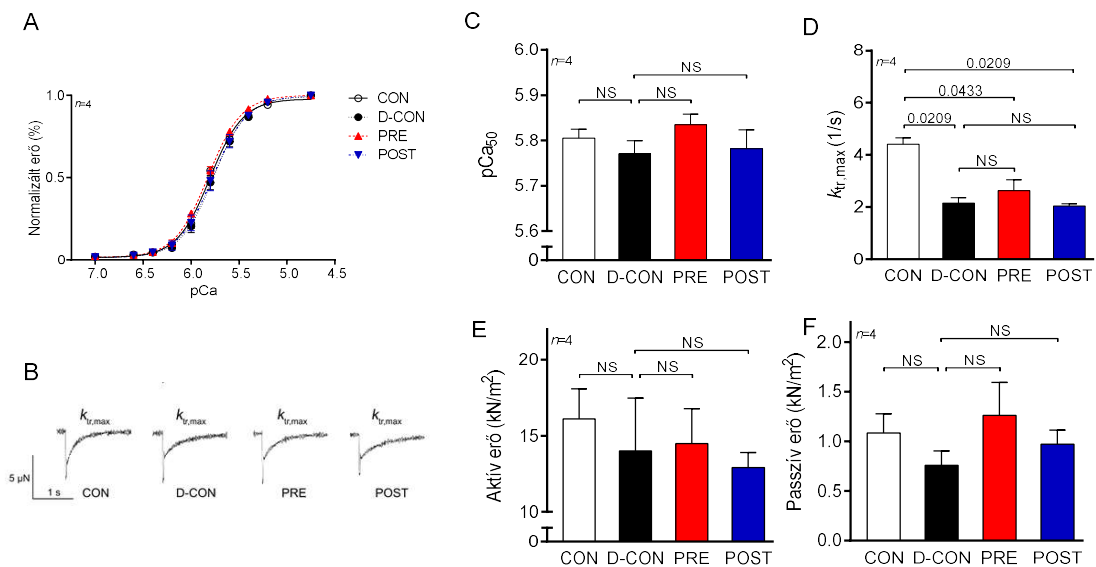
Elektronmikroszkópos vizsgálataink során megőrzött miokardiális ultrastruktúrát találtunk a CON csoport állatainak szívizom mintáiban, míg a D-CON csoportban a DOX kezelésre jellemző károsodások ábrázolódtak, úgymint miofibrillolízis, vakuolizáció, mitokondriális károsodás, Z-vonal degeneráció és sejtmag kromatinállomány szétesapzódás. A későbbi stádiumban indított szívelégtelenség terápiában (POST) részesülő állatok miokardiuma hasonló sérüléseket mutatott, némileg megőrzöttebb mitokondrium megjelenéssel. A PRE kezelésben részesülő állatok szívizma ezzel szemben mentes volt a DOX okozta sérülések nagy részétől, csupán néhány területen jelent meg kismértékű miofibrillolízis (9. ábra A panel). Kvalitatív megfigyeléseinket kvantitatív módon, denzitometriai elemzéssel is alátámasztottuk, mely során a magasabb denzitometriás érték nagyobb mértékben megőrzött ultrastruktúrát jelképezett. Összhangban a vizuálisan látott képpel, a D-CON és a POST csoportok alacsonyabb denzitometriás értékeihez képest a PRE csoportban jelentősen magasabb értékek adódtak, azaz ebben a csoportban nagyobb mértékben megőrzött miokardiális ultrastruktúra volt igazolható ($P=0,0176$ illetve $P=0,033$, sorrendben) (9. ábra B panel).



9. ábra. Elektronmikroszkópos eredmények. Reprezentatív felvételek az állatok miokardiumából. A D-CON csoportban a DOX kezelésre jellemző ultrastrukturális sérülések figyelhetők meg: miofibrillolízis (d), vakuolizáció (c, nyíl), mitokondriális károsodás (c, nyílhegy), Z-vonal degeneráció (b, d, nyíl) és kromatin sérülés (a, nyíl) (A). A denzitometriai méréseink során nagyobb mértékben megőrzött ultrastrukturát (magasabb denzitometriás értékeket) találtunk a CON és a PRE csoportokban a D-CON és a POST csoportokhoz képest (B). AU= optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve.

n =állat/csoport, állatonként 1-6 kép a denzitometriás mérések esetén. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik. NS=nem szignifikáns.

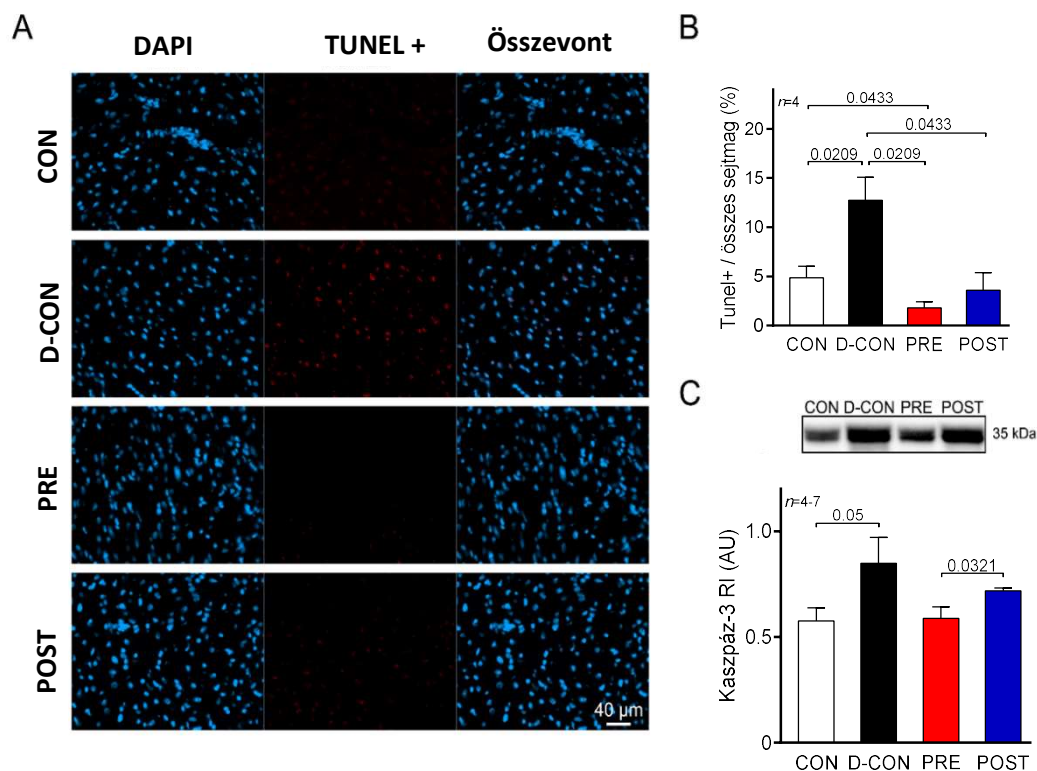
Az izolált, permeabilizált szívizomsejteken történő erőmérések során nem észleltünk szignifikáns különbséget a Ca^{2+} -érzékenység, a maximális Ca^{2+} -aktiválta aktív vagy a Ca^{2+} -független passzív erőben a csoportok között. Az aktin-miozin ciklus sebességi állandója, a $k_{\text{tr,max}}$ paraméter értékében bekövetkező csökkenés azonban minden DOX kezelt csoportban megfigyelhető volt (2.16 ± 0.20 , 2.63 ± 0.42 , 2.04 ± 0.08 a D-CON, PRE és POST csoportokban, sorrendben, 4.41 ± 0.26 a CON csoportban, $P \leq 0.0433$) (10. ábra).



10. ábra. Erőmérések izolált, permeabilizált szívizomsejteken. A Ca^{2+} -érzékenységben (A, C), a Ca^{2+} -függő aktív (E) és a Ca^{2+} -független passzív erőben (F) nem találtunk különbséget a csoportok között. A $k_{\text{tr,max}}$ paraméterben jelentős mértékű csökkenés volt megfigyelhető minden DOX kezelt csoportban (B, D). n =állat/csoport, állatonként 2-4 szívizomsejt. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik. NS=nem szignifikáns.

Az apoptózis vizsgálataink során emelkedett TUNEL-pozitív sejtmag arányt találtunk a D-CON csoportban a CON állatokhoz képest ($12.75 \pm 2.35\%$ és $4.85 \pm 1.18\%$, sorrendben, $P=0.0209$), mely nem volt jellemző a másik két DOX kezelt csoportra ($1.79 \pm 0.63\%$, $P=0.0209$ a PRE esetében a D-CON-hoz viszonyítva, míg $3.62 \pm 1.77\%$, $P=0.0433$ a POST állatoknál a D-

CON csoporthoz viszonyítva). A Western immunoblot mérések emelkedett relatív kaszpáz-3 mennyiséget igazoltak a D-CON csoportban a CON állatokhoz képest ($0,85 \pm 0,12$ optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve [AU], illetve $0,58 \pm 0,06$ AU, $P=0,05$), mely a PRE kezelésben részesülő csoport esetében nem volt megfigyelhető ($0,59 \pm 0,05$ AU, $P=0,089$ a D-CON csoporthoz viszonyítva). Ugyanakkor a POST állatok mintáiban szintén emelkedett relatív kaszpáz-3 szintek igazolódtak ($0,72 \pm 0,01$ AU, $P > 0,9999$ a D-CON-hoz viszonyítva, $P=0,0321$ a PRE csoporthoz viszonyítva). (11. ábra).

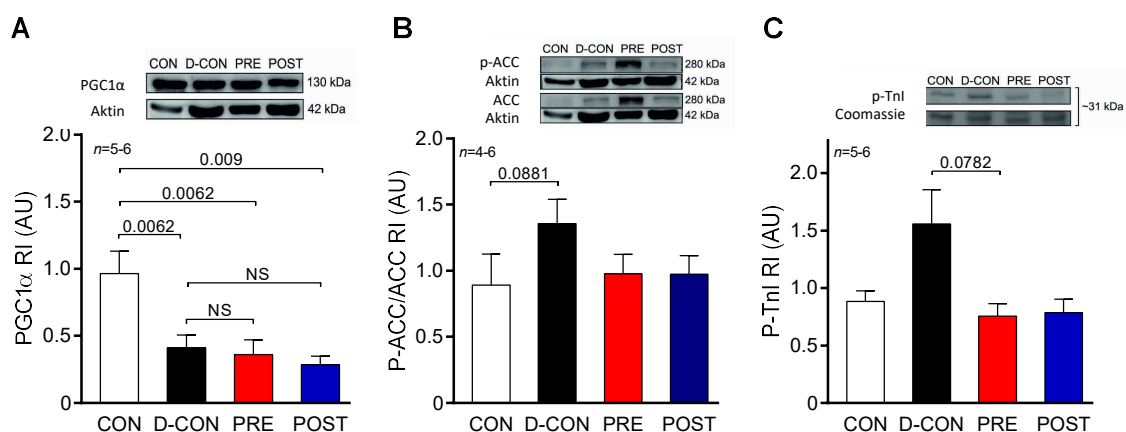


11. ábra. Apoptózis vizsgálatok. A TUNEL-esszé reprezentatív felvételei. Kék színnel az összes sejtmag, piros színnel az apoptotikus (TUNEL pozitív) sejtmagok láthatóak. Az összevont felvételeken lila színnel ábrázoltuk a két csatorna összevont képét (A). A D-CON csoportban a TUNEL+ sejtmagok megemelkedett százalékos arányát észleltük a CON csoporthoz képest, míg a PRE és POST csoportokban ez a változás nem volt megfigyelhető (B). A Western immunoblot során emelkedett relatív kaszpáz-3 fehérje mennyiségek igazolódtak a D-CON csoportban, míg a PRE csoportban alacsony maradt ezen fehérje szintje. AU= optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve, RI=relatív intenzitás. n =állat/csoport, 8 kép/állat a TUNEL-esszé esetében, 3-5 mérés/állat a Western immunoblot során. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik.

A mitokondriális diszfunkció molekuláris hátterének feltárása érdekében további Western immunoblot vizsgálatokat végeztünk. A sejtek energiaszenzor hálózatának tagjai közül a PGC1 α , az acetyl-coenzim A karboxiláz (ACC), valamint utóbbi foszforilált formájának (p-ACC) relatív mennyiségét határoztuk meg a szívizomszövet lizátumokban. Méréseink alapján a DOX kezelés hatására csökkent a PGC1 α szintje a CON csoporthoz képest ($0,41 \pm 0,1$, $0,36 \pm 0,11$, $0,28 \pm 0,07$, illetve $0,96 \pm 0,17$ AU a D-CON, PRE, POST és CON csoportokban, sorrendben, $P \leq 0,009$) (12. ábra A és B panel). A p-ACC/ACC arányban nem találtunk szignifikáns mértékű emelkedést a D-CON csoportban a CON-hoz képest ($1,36 \pm 0,18$, illetve $0,89 \pm 0,24$, $P = 0,0881$) (12. ábra B panel).

A miokardiális fehérjék foszforilációs státuszának kimutatásához ProQTM Diamond gélfestést használtunk, mely során a foszfo-troponin I (P-TnI) magasságában (~31 kDa) megjelenő fehérje sáv relatív mennyiségében nem találtunk szignifikáns emelkedést a D-CON csoportban a többi csoporthoz képest (12. ábra C panel).

A miokardiális fehérjék oxidatív státuszának vizsgálatakor nem találtunk jelentős különbséget a csoportok között.

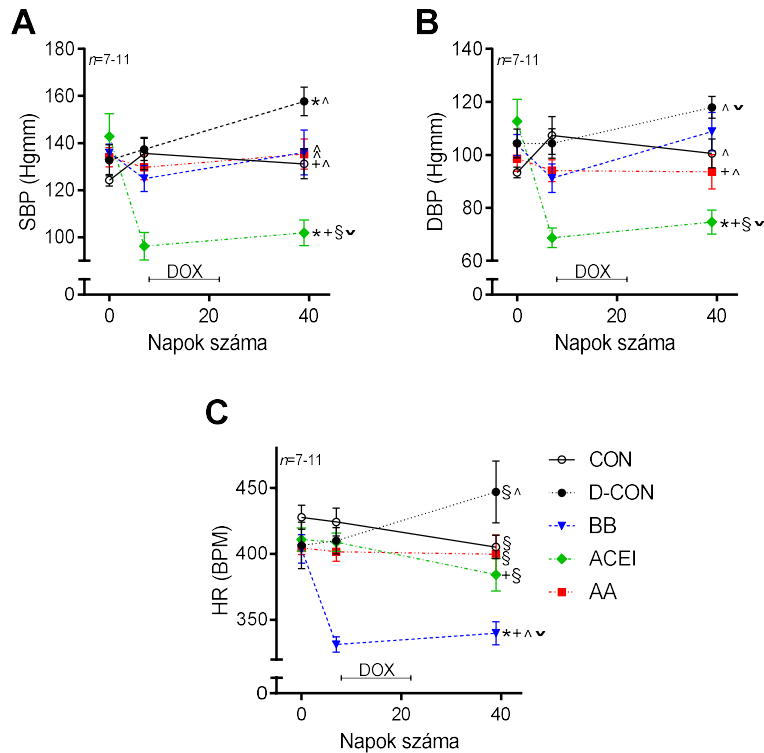


12. ábra. Biokémiai vizsgálatok. Minden DOX kezelt csoportban jelentősen csökkent PGC1 α szint volt megfigyelhető (A). A p-ACC/ACC arány tekintetében a D-CON csoportban megemelkedett, de statisztikailag jelentősen nem különböző szinteket mértünk a CON csoporthoz képest (B).

Hasonlóképpen nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét a P-TnI paraméterben mért emelkedés mértéke a D-CON csoportban a PRE csoporthoz képest (C). AU= optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve, RI=relatív intenzitás. n=állat/csoport, 1 mérés/állat. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik. NS=nem szignifikáns.

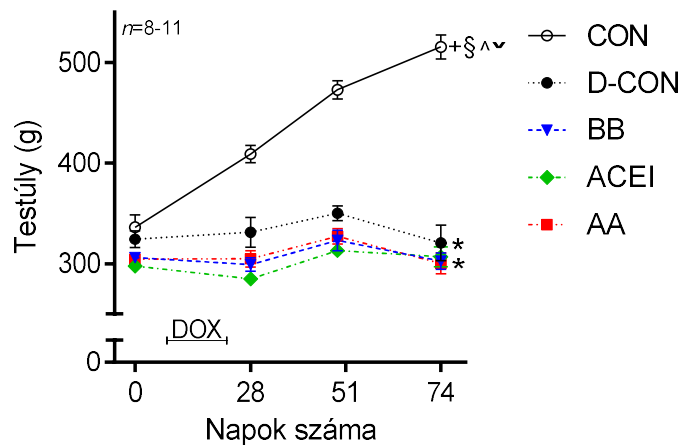
5.2. Kísérlet a profilaktikus gyógyszerek individuális hatásainak megállapítására

Az előző vizsgálatunk mintájára újabb kísérletsorozatot terveztünk, melyben a profilaktikusan alkalmazott gyógyszerek individuálisan kifejtett hatásait vizsgáltuk. Vizsgálataink során a profilaktikus ACEI kezelésben részesülő csoport állatainak szisztolés és diasztolés vérnyomása jelentősen alacsonyabbnak adódott a többi csoportéhoz képest (101,9±5,49/74,65±4,58 az ACEI csoportban, 131,16±6,39/100,53±5,45, 157,69±6,07/117,94±4,08, 136±9,65/108,85±7,32, 135,38±6,39/93,62±6,53 Hgmm, P=0,0037/P=0,0027, P=0,0012/P=0,0012, P=0,0083/P=0,0014, P=0,0015/P=0,0421 a CON, D-CON, BB és AA csoportokban, sorrendben). Ezzel szemben a DOX kezelés szignifikáns mértékben megnövelte a szisztolés vérnyomást a CON csoporthoz viszonyítva (157,69±6,07, illetve 131,16±6,39 Hgmm, sorrendben, P=0,0129).



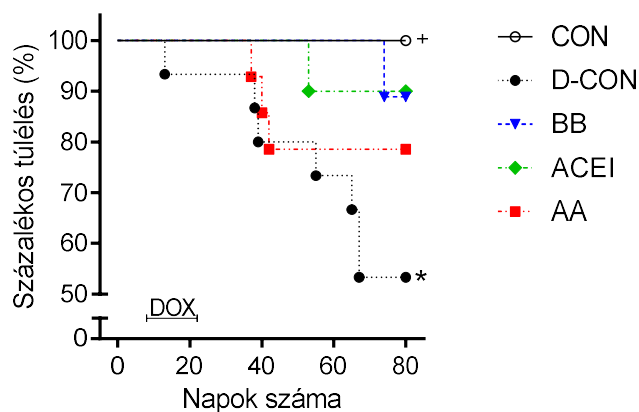
13. ábra. Az állatok vérnyomás értékei. A D-CON csoport állatainak szisztolés vérnyomásértéke emelkedést (A), míg az ACEI csoport állatainak szisztolés- (A) és diasztolés vérnyomásértékei (B) jelentős csökkenést mutattak a többi csoporthoz képest. A szívfrekvencia mérések során a BB csoport értékei szignifikánsan alacsonyabbnak adódtak (C). n =állat/csoport, 5 mérés/állat. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. *: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, +: $P \leq 0,05$ a D-CON csoporthoz képest, §: $P \leq 0,05$ a BB csoporthoz képest. ^: $P \leq 0,05$ az ACEI csoporthoz képest, ~: $P \leq 0,05$ az AA csoporthoz képest.

Az állatok testsúlyában bekövetkező változások hasonlóan adódtak, mint az előző kísérletsorozatunkban: a CON csoportban folyamatosan nőtt, míg a DOX kezelésben részesülő csoportokban nem változott az állatok testsúlya a kísérlet kezdőpontjához képest. Mindezen eredmények a CON és a DOX kezelt csoportok végponti testsúlyának szignifikáns különbségéhez vezettek ($P < 0,0001$).



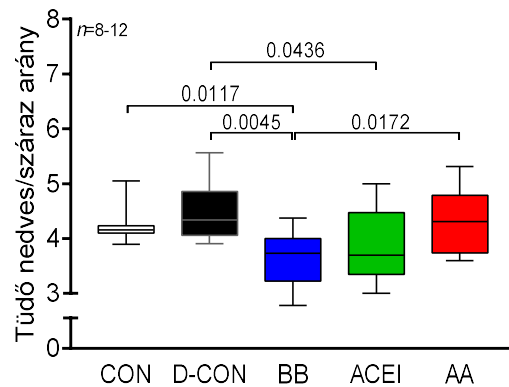
14. ábra. Az állatok testsúlyának változása a kísérlet alatt. A CON csoport állatainak testsúlya folyamatosan nőtt, míg a DOX kezelt állatoké nem változott a kísérlet kezdőpontjához képest. n =állat/csoport, 1 mérés/állat. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. *: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, +: $P \leq 0,05$ a D-CON csoporthoz képest, \$: $P \leq 0,05$ a BB csoporthoz képest. ^: $P \leq 0,05$ az ACEI csoporthoz képest, ~: $P \leq 0,05$ az AA csoporthoz képest.

A D-CON állatok túlélése jelentősen alacsonyabbnak adódott a CON csoporthoz képest ($P=0,0205$), míg a BB és ACEI kezelésben részesülő állatok túlélése érdemben javult, bár ezen változás jelen állatszám mellett volt statisztikailag szignifikáns ($P=0,0683$, illetve $P=0,0691$).



15. ábra. Az állatok túlélése. A D-CON csoportban jelentősen alacsonyabb volt a túlélés a DOX kezelés hatására, míg a BB és ACEI kezelésekre az állatok túlélése érdemben javult. Statisztika: log-rank próba.

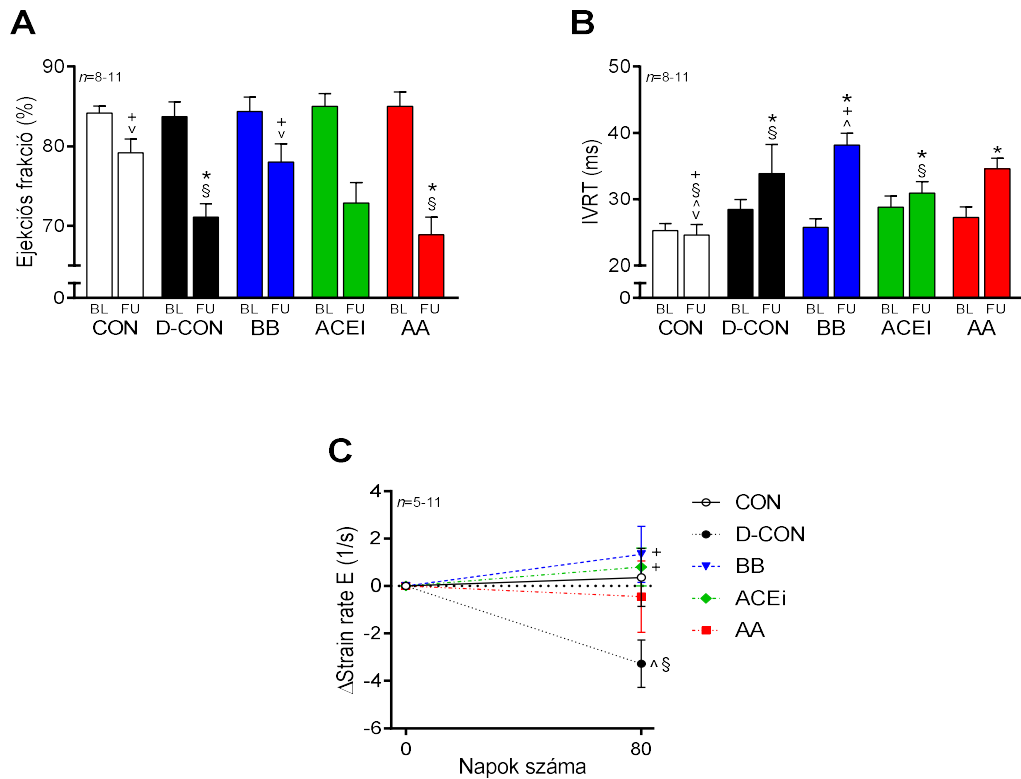
A tüdő szövetek nedves, illetve száraz tömegeinek aránya szignifikánsan alacsonyabbak voltak a BB és ACEI csoportokban D-CON-hoz viszonyítva ($3,67 \pm 0,17$, $3,89 \pm 0,22$, $4,51 \pm 0,16$, sorrendben; $P=0,0045$, illetve $P=0,0436$, sorrendben) (16. ábra).



16. ábra. Tüdő nedves/száraz arányok. A BB és ACEI csoportokban szignifikánsan alacsonyabb értékek voltak megfigyelhetőek a D-CON csoporthoz képest. n =állat/csoport, 1 mérés/állat. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik.

Az echokardiográfias mérések csökkent EF-t igazoltak a D-CON állatokban a CON csoporthoz képest ($71,08 \pm 1,69\%$, illetve $79,19 \pm 1,73\%$ sorrendben, $P=0,0046$). Ezen változás kivédhetőnek bizonyult a profilaktikus BB kezelés alkalmazásával ($78 \pm 2,28\%$, $P=0,0357$ a D-CON csoporthoz viszonyítva), viszont a profilaktikus AA terápiával nem ($68,88 \pm 2,23\%$, $P=0,4717$ a D-CON csoporthoz viszonyítva). Habár az ACEI csoportban szignifikáns EF csökkenés volt megfigyelhető a kiindulási értékekhez képest ($P=0,0022$), a végponti EF értéke jelen állatszám mellett nem különbözött szignifikáns mértékben a CON csoport értékétől ($P=0,0586$) (17. ábra A panel). A DOX kezelésben részesülő csoportokban jelentősen megnyúlt IVRT értékek igazolódtak a negatív kontroll állatokhoz képest, függetlenül a profilaktikusan alkalmazott kezelésektől ($33,88 \pm 4,41$, $38,17 \pm 1,8$, $30,93 \pm 1,73$, $34,6 \pm 1,58$, illetve $24,63 \pm 1,59$ a D-CON, BB, ACEI, AA, illetve CON csoportokban, $P=0,0343$, $P<0,0001$, $P=0,0165$, illetve $P=0,0003$ a CON csoporthoz viszonyítva, sorrendben) (17. ábra B panel). A diasztolés strain rate eredményeket a jobb vizsgálhatóság érdekében a kiindulási értékekre normalizáltuk. A D-

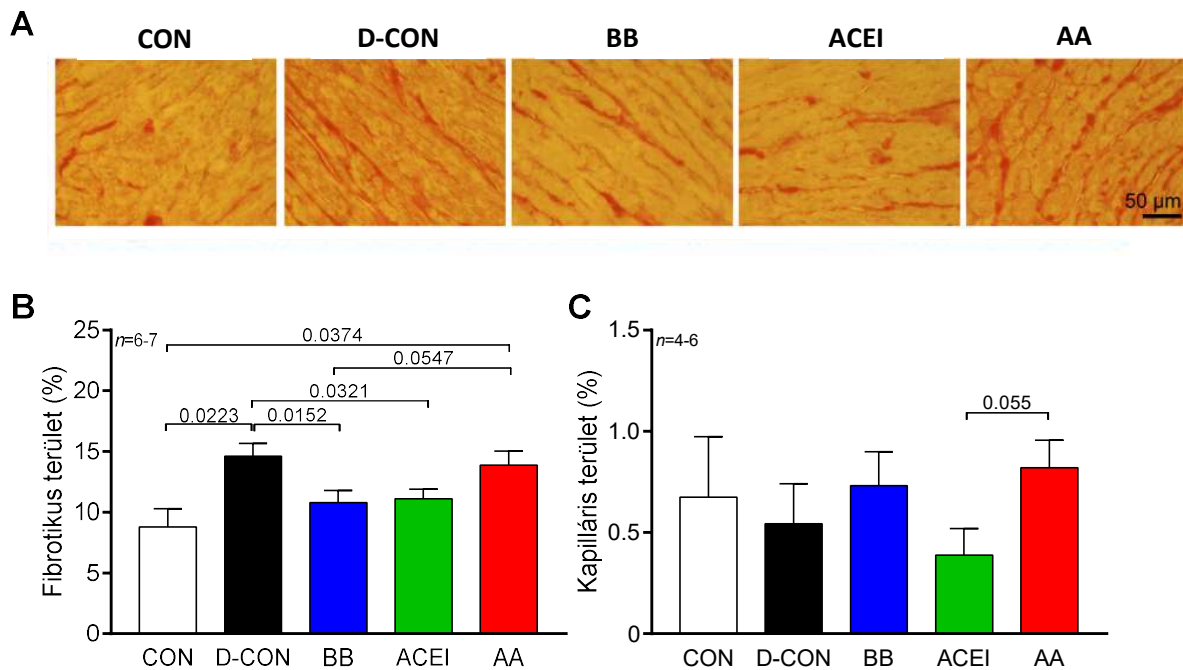
CON csoportban jelentős diasztolés strain rate csökkenés volt megfigyelhető a BB és ACEI állatokhoz viszonyítva (17. ábra C panel).



17. ábra. Echokardiográfias eredmények. Szignifikáns mértékben csökkent a D-CON, ACEI és AA állatok EF értéke, míg a BB csoportban ezen változás megelőzhetőnek bizonyult (A). Az IVRT DOX okozta megnyúlását egyik kezelés sem volt képes kivédeni (B). A D-CON csoportban a diasztolés strain rate jelentős csökkenése volt megfigyelhető (C). n =állat/csoport, 3 mérés/állat az EF és az IVRT esetében, 1 mérés/állat a strain rate E esetében. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. *: $P \leq 0,05$ a CON csoporthoz képest, +: $P \leq 0,05$ a D-CON csoporthoz képest, §: $P \leq 0,05$ a BB csoporthoz képest. ^: $P \leq 0,05$ az ACEI csoporthoz képest, ~: $P \leq 0,05$ az AA csoporthoz képest.

Az állatok szívizom szövetéből ezúttal is végeztünk fibrózisra irányuló, valamint elektronmikroszkópos vizsgálatokat. A pikroszíriusz vörös festés során jelentősen nagyobb mértékű fibrózis ábrázolódott a D-CON és AA csoportok mintáiban a CON csoporthoz képest ($14,62 \pm 1,06$, $13,88 \pm 1,16$, illetve $8,8 \pm 1,51\%$, sorrendben, $P=0,0223$, illetve $P=0,0374$, sorrendben), míg a BB és ACEI kezelésben részesülő állatok mintáiban ez a változás jelentős

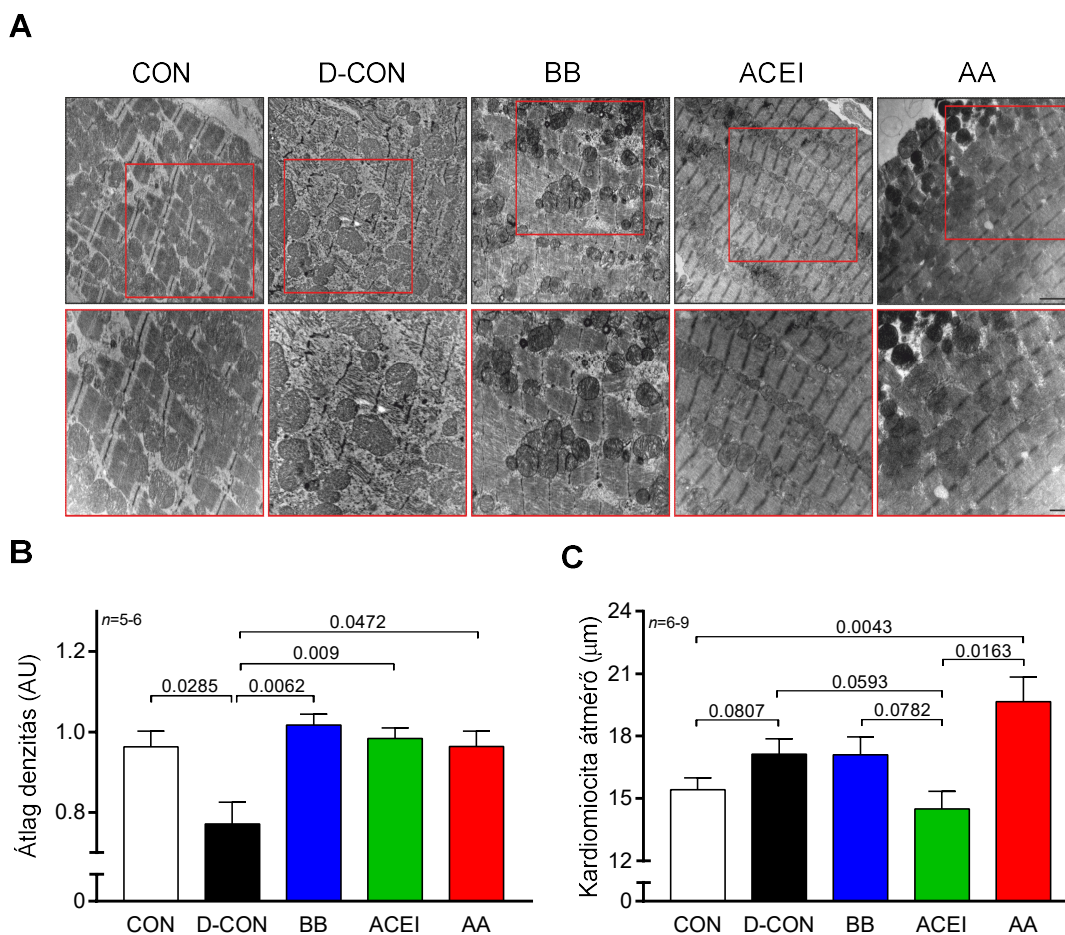
mértékben kivédhető volt ($10,8\pm 0,99$, illetve $11,12\pm 0,79\%$, sorrendben, $P=0,0152$, illetve $P=0,0321$ a D-CON csoporthoz viszonyítva, sorrendben) (18. ábra A-B panelek). A kapilláris terület arányok vizsgálata során nem találtunk érdemi, szignifikáns különbségeket a csoportok között (18. ábra C panel).



18. ábra. Szövettan. A) Reprezentatív metszetek az állatok szívmintáiból pikroszíriusz vörös festést követően, melyeken a fibrózis piros színnel jelenik meg. B) A fibrotikus területek kvantitatív vizsgálatának eredménye. Míg a D-CON és AA csoportokban jelentősen megnövekedett fibrózis látható, ennek mértéke a BB és ACEI kezelésekkel csökkenthető volt. C) A kapillárisok terület arányában nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. n =állat/csoport, 9 kép/állat a fibrózis esetében, 1-5 kép a kapilláris terület arány esetében. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a korábbi kísérleteink kapcsán látott, DOX okozta károsodások ábrázolódtak a D-CON állatok miokardiumában: miofibrillolízis, vakuolizáció, mitokondriális károsodás, Z-vonal degeneráció és sejtmag kromatinállomány szétcsapzódás (19. ábra A panel). Ezen ultrastrukturális sérülések csökkent denzitometriás értékeket eredményeztek a D-CON csoportban ($0,77\pm 0,05$, illetve $0,96\pm 0,04$ a D-CON és a

CON csoportokban, sorrendben, $P=0,0285$). A károsodások jelentős részét bármely profilaktikus kezelés képes volt kivédeni ($1,02\pm 0,03$, $0,98\pm 0,03$ és $0,96\pm 0,04$ a BB, ACEI és AA csoportokban, sorrendben, $P=0,0062$, $P=0,009$, illetve $P=0,0472$, sorrendben, a D-CON állataihoz viszonyítva) (19. ábra B panel). Jellemzően az összes csoportból származó miokardiumban találtunk apoptotikus sejtmagokat, azonban ezek nem bizonyultak kvantitatíve kiértékelhetőnek. A sejtmagok szintjében végzett szívizomsejt átmérő meghatározások jelentős hipertrófiát igazoltak az AA csoportban a CON csoporthoz képest ($19,65\pm 1,19$, illetve $15,42\pm 0,57$ μm , sorrendben, $P=0,0043$), míg ez a paraméter az ACEI csoportban szignifikánsan kisebbnek adódott ($14,49\pm 0,87$ μm , $P=0,0163$ az AA csoporthoz viszonyítva) (19. ábra C panel).

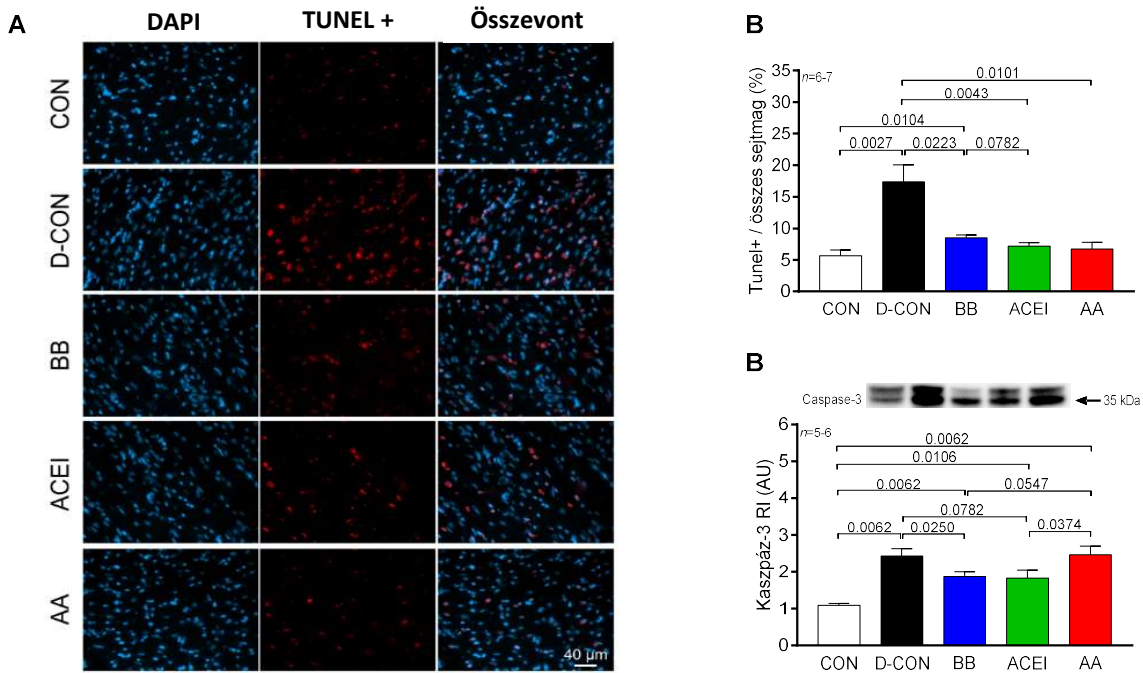


19. ábra. Elektronmikroszkópia. A) Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek az állatok miokardiumából. B) Az elektronmikroszkópos képek denzitometriai elemzése alacsony értéket

eredményezett a D-CON csoportban, míg a profilaktikus kezelések ezt a változást sikeresen kivédtek.

C) Az AA csoportban mintáiban jelentős szívizomsejt hipertrófia ábrázolódott, míg az ACEI csoportban mért szívizomsejt átmérők szignifikánsan kisebbnek adódtak. AU=optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve. n =állat/csoport, 1-3 kép/állat a denzitometriai elemzések során, 2-5 kép/állat a szívizomsejt átmérő mérések során. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik.

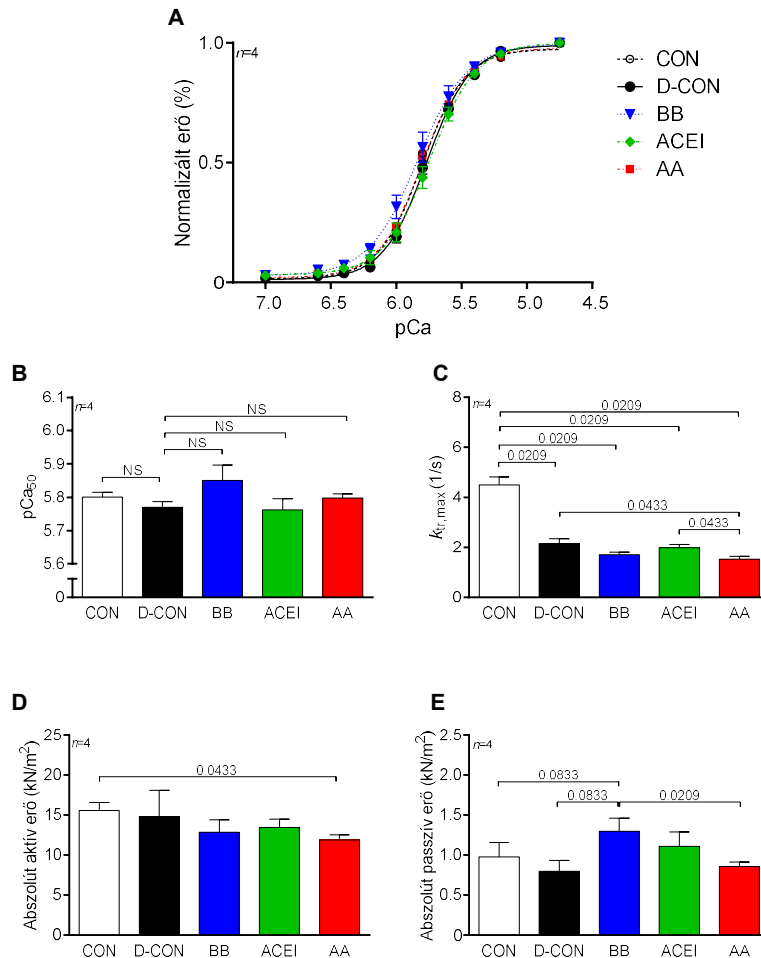
A TUNEL esszé során megnövekedett TUNEL pozitív sejtmag szám igazolódott a D-CON csoportban ($17,36 \pm 2,72\%$), ami jelentősen különbözött az összes többi csoporttól ($5,65 \pm 0,92$, $8,49 \pm 0,44$, $7,19 \pm 0,53$, $6,71 \pm 1,09\%$; $P=0,0027$, $P=0,0223$, $P=0,0043$, $P=0,0101$ a CON, BB, ACEI és AA csoportokhoz viszonyítva, sorrendben) (20. ábra A-B panelek). A kaszpáz-3 relatív mennyisége minden DOX kezelt csoportban magasabbnak adódott a CON állataihoz képest ($2,42 \pm 0,21$, $1,87 \pm 0,13$, $1,83 \pm 0,21$, $2,46 \pm 0,24$, illetve $1,09 \pm 0,05$ a D-CON, BB, ACEI, AA és CON csoportokban, sorrendben, $P=0,0062$ a D-CON, BB és ACEI csoportokban a CON-hoz viszonyítva, míg $P=0,0106$ az ACEI és a CON csoportok között). Ugyanakkor a BB és ACEI csoportok esetében jelentős mérséklődés volt megfigyelhető a relatív fehérje mennyiség emelkedésben a D-CON vagy AA csoportokhoz képest (20. ábra C panel).



20. ábra. Apoptózis vizsgálat. *A)* Reprezentatív felvételek az állatok miokardiumából. A kék szín a DAPI festéssel ellátott összes sejtmagot, a piros szín az apoptotikus sejtmagokat jelöli. *B)* Szignifikánsan emelkedett TUNEL pozitív sejtmag számot találtunk a D-CON csoportban, mely eltérést a profilaktikus kezelésekkel meg lehetett előzni. *C)* A kaspáz-3 fehérje relatív mennyisége szignifikánsan magasabbnak adódott a DOX kezelésben részesülő csoportokban a CON állataihoz viszonyítva. Ugyanakkor a fehérje mennyiség emelkedés a BB és ACEI csoportokban jelentősen alacsonyabb mértékű volt a D-CON vagy AA csoportokhoz képest. AU= optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve, RI=relatív intenzitás. *n*=állat/csoport, 12 kép/állat a TUNEL esszé, 2-4 mérés/állat a kaspáz-3 Western immunoblot esetében. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik.

Az izolált, permeabilizált szívműködésben végzett mechanikai mérések során nem találtunk különbséget az egyes csoportokból származó sejtpreparátumok Ca^{2+} -érzékenységében (21. ábra A-B panel). Ugyanakkor a $k_{tr,max}$ paraméter szignifikánsan csökkenést mutatott a DOX kezelésben részesülő összes csoportban a CON csoporthoz képest ($2,16 \pm 0,19$, $1,7 \pm 0,1$, $1,99 \pm 0,11$, $1,53 \pm 0,11$, illetve $4,51 \pm 0,31$ 1/s a D-CON, BB, ACEI, AA és CON csoportokban, sorrendben, $P=0,0209$) (21. ábra C panel). Az AA kezelésben részesülő állatokból származó

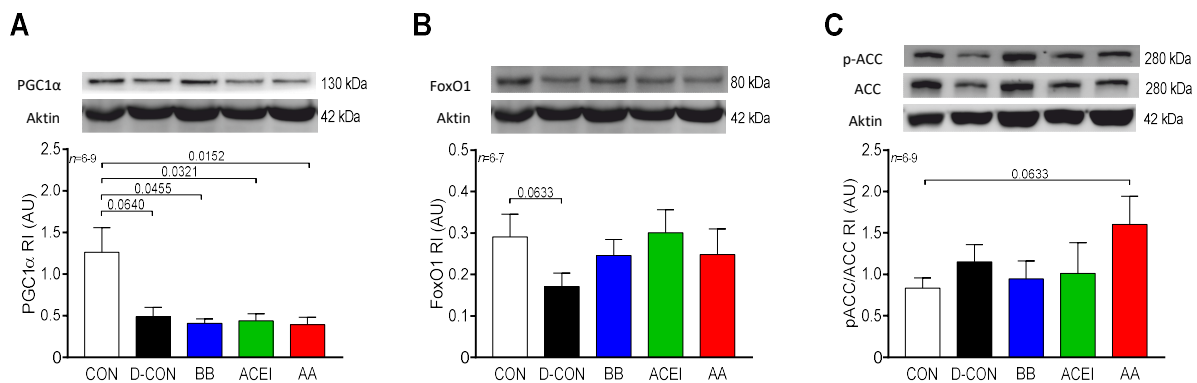
szívizomsejtek aktív erejében szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a negatív kontroll csoporthoz képest ($11,88 \pm 0,64$, illetve $15,59 \pm 1$ kN/m², sorrendben, $P=0,0433$), míg a BB-val kezelt csoport szívizomsejtjeinek passzív erejében nem találtunk szignifikáns emelkedést a CON csoporthoz ($1,3 \pm 0,16$, illetve $0,97 \pm 0,18$ kN/m², sorrendben, $P=0,0833$) (21. ábra D-E panel).



21. ábra. Izolált, permeabilizált szívizomsejtekben végzett erőmérések. A szívizomsejtek Ca²⁺-érzékenységében nem mutatkoztak szignifikáns különbségek (A és B). A DOX kezelésben részesült állatok miokardiumából izolált szívizomsejtek k_{tr,max} paraméterében szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető, melyet érdemben egyik kezelés sem befolyásolt (C). Az abszolút aktív erő jelentősen kisebbnek adódott AA csoportban (D), míg a passzív erő enyhén emelkedést mutatott a BB csoportban (E). pCa₅₀=az izometriás erő Ca²⁺-érzékenysége, k_{tr,max}=az erő regenerálódás sebességi állandója.

n =állat/csoport, 2-3 kardiomiocita/állat. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik. NS=nem szignifikáns.

Biokémiai vizsgálataink során megpróbáltuk feltárni a miokardium ultrastrukturális károsodásának okait. Meghatároztuk a szívizomsejtek energia háztartásában kulcsfehérjeként nyilvántartott PGC1 α , FoxO1, ACC, valamint utóbbi foszforilált formájának (p-ACC) szintjeit Western immunoblot segítségével. A DOX kezelésben részesülő csoportokban alacsony PGC1 α relatív fehérjemennyiségeket az alkalmazott profilaktikus kezelésektől függetlenül ($0,49\pm 0,11$, $0,41\pm 0,05$, $0,44\pm 0,08$, $0,39\pm 0,09$, illetve $1,26\pm 0,3$ AU a D-CON, BB, ACEI, AA, illetve CON csoportokban, sorrendben, $P=0,064$, $P=0,0455$, $P=0,0321$, $P=0,0152$, sorrendben, a CON csoporthoz viszonyítva) (22. ábra A panel). A D-CON csoportban enyhe csökkenés volt megfigyelhető a FoxO1 relatív mennyiségében, ez azonban nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($0,17\pm 0,03$, illetve $0,29\pm 0,05$ AU a D-CON, illetve a CON csoportokban, sorrendben, $P=0,0633$) (22. ábra B panel). A pACC/ACC arányaiban nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között (22. ábra C panel).



22. ábra. Western immunoblot. Minden DOX kezelésben részesülő csoport esetében csökkent PGC1 α szintek voltak megfigyelhetőek (A). A D-CON csoportban enyhe csökkenés volt megfigyelhető a FoxO1 fehérje relatív mennyiségében a CON állatokhoz képest (B). A pACC és ACC arányaiban nem mutatkozott szignifikáns különbség a csoportok között (C). AU= optikai denzitás arbitrális egységekben kifejezve, RI=relatív intenzitás. n = állat/csoport, 1-4 mérés/állat. Statisztika: Wilcoxon-féle rangösszeg próba. A számok a P értéket jelölik.

6. Megbeszélés

A DOX okozta kardiomiopátia napjainkban is lényeges, megoldásra váró problémának számít. A területen zajló intenzív kutatás ellenére jelenleg sem rendelkezünk még egységes állásponttal a DOX kardiotoxicitás megelőzésére vonatkozóan. Bár a korábban végzett klinikai tanulmányok egy része támogatta bizonyos preventív gyógyszeres protokollok alkalmazását, főként nagy rizikójú betegekben, ezen intézkedések szélesebb körben történő érvényesítése előtt fontos, hogy megértsük a DOX okozta szívelégtelenség során alkalmazott kardioprotektív gyógyszerek pontos hatásmechanizmusait. Emiatt elengedhetetlen megfelelő transzlációs állatmodellek létrehozása, melyekben egyaránt jól tanulmányozhatóak a DOX miokardiális hatásai, valamint a kardioprotektív gyógyszerelések *in vivo* és *in vitro* fiziológiás hatásai is⁷.

Kísérleteink során sikeresen modelleztük a humán onkoterápiás protokollokból származtatott DOX kemoterápiát patkányban, így vizsgálhatóvá váltak mind a DOX, mind az alkalmazott kardioprotektív gyógyszerek hosszútávú hatásai. Kísérleti elrendezésünk megfelel a korábban közölt ajánlásoknak⁷: a) kis dózisu DOX-t alkalmaztunk intravénásan, több ciklusban, több héten keresztül, b) az alkalmazott preventív gyógyszereket gyomorszondán keresztül *per os* adagoltuk, c) a kemoterápiát követően hosszútávú utánkövetést alkalmaztunk, d) célzottan vizsgáltuk az alkalmazott szívelégtelenség terápiaik profilaktikus időzítésének szerepét, valamint az egyes gyógyszerkomponensek izolált hatásait.

A vizsgálatunkban használt β -blokkoló bisoprolol, ACE-gátló perindopril és aldoszteron antagonistá eplerenon már korábbi szívelégtelenséget vizsgáló tanulmányokban is bizonyították hatásukat. Mindhárom gyógyszer hatékonyan javította a csökkent EF-val bíró betegek hospitalizációs és mortalitási rizikóját⁵⁸⁻⁶⁰, mely tényezők kiemelt figyelmet érdemelnek a DOX okozta szívelégtelenségben is^{4,61-63}. Tekintve, hogy az Európai Kardiológiai Társaság útmutatása alapján mindhárom gyógyszeres csoport IA ajánlással rendelkezik a csökkent EF-val bíró betegek kezelésében, ezek a vegyületek az onkológiai betegek kardioprotektív

terápiájában is kulcsfontosságúak lehetnek. Nagy kardiovaszkuláris rizikóval rendelkező betegek esetében jelenleg is ajánlott a kemoterápia mellett kardiovaszkuláris szupportív terápia alkalmazása. Ugyanez azonban nem mondható el egyelőre a kis kardiovaszkuláris rizikójú betegekről³⁻⁶. Egy korábban megjelent meta-analízis szerint a β -blokkolók esetében 70%-os, az ACE-gátlók esetében 90%-os relatív rizikó csökkenés volt megfigyelhető a szívelégtelenség kialakulására nézve⁴⁶. Ezen adatokból arra következtethetünk, hogy a betegek kemoterápia előtt történő hemodinamikai paramétereinek optimalizálásával, illetve a megfelelő neurohormonális környezet biztosításával mérsékelni lehet a DOX okozta szívizomsejt károsodást⁶⁴.

Korábbi humán tanulmányokban már részletesen vizsgálták a profilaktikus terápia kombinációs alkalmazásának hatásait. A carvedilol és az enalapril kombinációjának alkalmazásával csökkent a mortalitás vagy a szívelégtelenség, valamint a mortalitás, szívelégtelenség vagy a 45% alatti EF kombinált végpontjainak előfordulása gyógyszeres prevencióban részesülő, malignus hemopátiában szenvedő betegeknél⁶⁵. Ezen eredményekkel összhangban az általunk vizsgált állatmodellben a profilaktikus kombinációs kezelés (PRE) jelentősen javította az állatok túlélését a D-CON csoporthoz képest, továbbá megőrzött maradt a bal kamrai EF. *In vivo* vizsgálataink során az EF-ban tapasztalt DOX okozta csökkenés a pozitív kontroll (D-CON) csoportban az 1. hónapban még nem volt szignifikáns, viszont a DOX expozíciót követő 2. hónapban már jelentős EF romlás volt megfigyelhető a kezdeti állapothoz képest. Ez a hatás még figyelemreméltóbb lehet akkor, ha egy esetleges pozitív szelekcióval is kalkulálunk, ami a D-CON csoport állatainak 2. hónapra bekövetkező jelentős mértékű mortalitásából fakadhat (adatsorunk csak a legszívósabb, túlélő D-CON állatok EF értékeit tartalmazza).

Korábban állatkísérletes körülmények között kimutatták, hogy a carvedilol és az enalapril egyaránt mérsékelni tudta a DOX okozta kardiotoxikus mellékhatásokat. Bizonyos humán vizsgálatokban mégis egymásnak ellentmondó eredmények születtek⁶⁵⁻⁷⁰. Kísérleteink

során bizonyítani tudtuk, hogy hasonlóan a profilaktikusan alkalmazott kombinált gyógyszeres kezeléshez, az izolált BB kezelés elősegíti a bal kamrai EF megőrzését. Ezen hatás háttérében kimutattuk a csökkent mértékű miokardiális fibrózist, a szívizomsejtek ultrastruktúrájának megőrzését, valamint azok apoptózisának jelentős csökkenését. Habár az ACEI csoportban megfigyelhető volt némi EF csökkenés a kezdeti értékhez képest, azonban ez a különbség nem adódott szignifikánsnak, viszont *in vitro* szinten ez a kezelés is képes volt megőrizni a szívizomsejtek ultrastruktúráját, valamint csökkenteni a miokardiumban előforduló apoptózist és fibrózist.

Korábban az AA típusú gyógyszerek közül a spironolaktonnal születtek pozitív eredmények a kardiotoxikus mellékhatások kiküszöbölésére mind állatkísérletes, mind klinikai tanulmányokban^{71,72}. Az általunk választott eplerenon, mely szintén egy AA típusú gyógyszer, a korábbi állatkísérletes elrendezésekben ellentmondó eredményekhez vezetett a kardioprotekciót tekintve^{73,74}. Jelen kísérletünkben a profilaktikusan alkalmazott eplerenon, bár nem szignifikáns mértékben, de növelni tudta az állatok túlélését, ugyanakkor nem volt képes megelőzni a DOX okozta EF csökkenést és fibrózist.

Kísérleteink során a szisztolés funkció DOX okozta csökkenése mellett diasztolés diszfunkció is megjelent, ami az IVRT paraméter növekedésében, valamint a diasztolés strain rate csökkenésében nyilvánult meg. Míg az előbbi paraméter érdemben nem volt befolyásolható egyik alkalmazott kardioprotektív kezeléssel sem, függetlenül annak típusától vagy időzítésétől, a diasztolés strain rate egyedi profilaktikus gyógyszerek mellett megfigyelhető normalizálódása arra utal, hogy bizonyos kardioprotektív kezelésekkel a szisztolés diszfunkcióhoz hasonlóan enyhíthető a DOX okozta diasztolés diszfunkció is.

Reprezentálandó azon klinikai megfigyelést, hogy a DOX okozta szívelégtelenség gyakran már csak egy késői stádiumban kerül felfedezésre, kísérleteink első felében létrehoztunk egy olyan állatcsoportot, melynél a kombinált szívelégtelenség terápia csak egy

hónappal a DOX kezelés befejezését követően, már a manifeszt szívelégtelenség stádiumában került elindításra (POST). Érdekes módon ezen csoportban az állatok túlélése jól tükrözte a szupportív terápia elindításának időzítését, hiszen a protektív kezelés bevezetése után már nem tapasztaltunk további elhullást. *In vitro* kísérleteink alapján azonban ezen késői kezelés sem volt képes kivédeni az állatok bal kamrai EF-jának jelentős mértékű csökkenését, miokardiumának ultrastrukturális károsodását, valamint a kaszpáz-3 szintjének megemelkedését a profilaktikusan alkalmazott kombinált kezeléssel szemben. Ezen eredményeink a kardioprotektív terápia időzítésének fontosságára hívják fel a figyelmet.

Szintén a korai megelőzést hangsúlyozza egy korábbi állatkísérletes tanulmány, melyben már 1 héttel a DOX kezelés befejezését követően kardiális fibrózist találtak nyulakban. Ebben a modellben a szisztolés diszfunkció még nem volt tetten érhető echokardiográfiás vizsgálatokkal, azonban megnövekedett bal kamrai átmérők jelentek meg, valamint kimutatható volt a szívizom óriásfehérjéjének, a titinnek a megváltozott expressziója és foszforilációs státusza is. Ugyanakkor ebben a korai stádiumban még nem volt változás az izolált, permeabilizált szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységében, illetve aktív és passzív erejében a DOX-t kapó és a kontroll csoportok között⁷⁵. Az izolált szívizomsejtekben végzett erőméréseink során mi sem találtunk eltérést a CON és a D-CON állatokból nyert sejtpreparátumok aktív és passzív ereje, valamint azok Ca^{2+} -érzékenysége között. Erre részben magyarázatot adhat az a tény, hogy az erőmérések során kizárólag csak intakt szívizomsejtekben van lehetőség aktivációs-relaxációs ciklusokat rögzíteni, ami egyfajta pozitív szelekciót jelenthet a mérési eredményeinkre nézve. Elmondható ugyanakkor, hogy az izolálások során jellemzően kevesebb mérésre alkalmas szívizomsejtet találtunk a D-CON csoport állatainak mintáiban az egészséges patkányokéval összevetve. Mindezek ellenére kimutattuk, hogy a $k_{\text{tr,max}}$ paraméter értéke a DOX hatására jelentősen csökken, ami arra utal,

hogy a DOX expozíciónak kitett állatokban zavart szenved az aktin-miozin keresztkötési ciklus kinetikája, ami nem befolyásolható egyik gyógyszeres kezeléssel sem.

A DOX egyik fő hatása a ROS képzés, mely nem csak a tumorsejteket érinti. Közismert, hogy a szívizomsejtek különösen érzékenyek az oxidatív stresszre, így nem meglepő, hogy a DOX kemoterápia során kifejezett szívizomsejt sérülések figyelhetőek meg. A mitokondriumok elektron-transzport láncának megzavarásával a DOX fokozott szuperoxid gyök képződéshez vezet, mely jellegzetes ultrastrukturális változásokat eredményez a miokardiumban: a mitokondriumok megduzzadnak, illetve mielinszerű képződmények jelennek meg bennük⁷⁶⁻⁷⁸. Az általunk létrehozott, hosszú utánkövetésű modellben szintén megfigyelhető volt a mitokondriumok DOX hatására történő ultrastrukturális károsodása, mely a belső membránok integritásának megszakadásával, valamint speciális struktúrák, úgynevezett „vakuólumok” megjelenésével volt jellemezhető (utóbbiak feltehetőleg korábban mitokondriumok voltak). A DOX további ultrastrukturális károsító hatásával összefüggésben a D-CON csoportban a miofibrillumok szétesése, valamint a Z-vonalak degradációja volt megfigyelhető a károsodott szívizomsejtek sejtmagjainak helyenként észlelhető apoptotikus megjelenése mellett. Ezen ultrastrukturális eltéréseket a profilaktikus kezelések, egyedileg vagy kombinációban alkalmazva is sikeresen kivédtek, szemben a későbbi időpontban elindított kombinált terápiával.

Kísérleteink alátámasztották a szívizomsejtek energiaháztartásában fontos szerepet játszó, a mitokondriális biogenezis aktivátoraként számon tartott PGC1 α fehérje mennyiségének korábbról ismert DOX okozta csökkenését is⁷⁹⁻⁸¹. Ugyanakkor ezt a változást sem az individuálisan, sem pedig a kombinációban alkalmazott kezelések nem voltak képesek megelőzni. Ez arra is enged következtetni, hogy az alkalmazott terápiás protokollok valószínűleg nem avatkoznak bele a DOX daganatellenes hatásaiba, hanem a szív funkciójának támogatásával járulnak hozzá a kardiotoxicitás megelőzéséhez.

A DOX a fokozott ROS produkció által, de akár önmagában is a kaszpáz-3 fehérje aktivációjához, ezáltal pedig apoptózishoz vezethet^{78,82}. Kísérleteinkben még jóval a DOX expozíciót követően is emelkedett volt a kaszpáz-3 fehérje relatív mennyisége a D-CON csoportban, továbbá a sejtmagok fokozott TUNEL-pozitivitása is megfigyelhető volt a miokardiumban. Ezen eredményekkel összhangban a D-CON csoport állatainak szívizommintáiban nagyobb mértékű fibrózis volt jelen. Mind az apoptózist, mind a fibrózis mértékét sikerült érdemben csökkenteni a profilaktikusan alkalmazott BB és ACEI kezeléssel, ami arra utal, hogy ezen gyógyszerek elsődleges hemodinamikai hatásaik mellett egyéb, molekuláris szinten megvalósuló jótékony hatásokkal is bírhatnak.

Összességében elmondható, hogy kísérleteinkkel igazoltuk mind a kombinációban, mind pedig az egyedileg alkalmazott profilaktikus BB és ACEI gyógyszerek előnyeit a DOX okozta kardiomiopátia megelőzésére nézve. Feltételezhetően ezek a szerek a korábbi hipotézishez⁶⁴ híven képesek olyan kedvező hemodinamikai paramétereket teremteni, melyek segítenek a szívnek a DOX okozta káros hatások kompenzálásában. Emellett valószínűsíthető, hogy ezen gyógyszerek egyéb kedvező tulajdonságokkal is rendelkeznek, melyek tetten érhetőek pl. a szívizomsejtek apoptózisának mérséklésében. Eredményeink megerősítésére és humán gyógyászatban történő alkalmazására további klinikai vizsgálatok szükségesek. Fontos azonban megjegyezni, hogy a standardizált körülmények között nyert eredményeink támpontot jelenthetnek a későbbi vizsgálatokhoz, elősegítve a DOX kardiotoxicitás molekuláris folyamatainak mélyebb megismerését.

7. A disszertáció legfontosabb eredményei, új tudományos megállapítások

- Létrehoztunk egy doxorubicin-kardiomiopátia kisállatmodellt, amely jól mintázza a humán onkológiai gyakorlatot, és megfelel a nemrég megjelent transzlációs kísérletek elvégzésére alkalmas experimentális modellekkel szemben támasztott követelményeknek.
- A modellben a késői időpontban alkalmazott kombinált szívelégtelenség-terápia (POST) jól reprezentálja azt a klinikai gyakorlatot, ahol a kardioprotektív kezelés csak az ejekciós frakció romlását követően indul el, ami a hosszútávú klinikai prognózis szempontjából kedvezőtlennek mondható.
- A profilaktikusan indított kombinált szívelégtelenség terápia képes megelőzni az ejekciós frakció doxorubicin okozta csökkenését, ezáltal jelentősen növeli az állatok túlélését.
- In vitro méréseink azt igazolják, hogy a profilaktikus kombinált kezelés szintén megelőzi a miokardium ultrastrukturális károsodásait, valamint csökkenti az apoptotikus sejtmagok számát.
- Az egyedileg alkalmazott bisoprolol kezelés képes megelőzni az ejekciós frakció romlását, csökkenti a fibrotikus terület nagyságát a miokardiumban, elősegíti az ultrastruktúra megőrzését, továbbá csökkenti az apoptotikus sejtmagok számát.
- Az egyedileg alkalmazott perindopril kezelés nem képes kivédeni az ejekciós frakció romlását, viszont hozzájárul a miokardiális ultrastruktúra megőrzéséhez, egyaránt csökkentve a fibrotikus terület nagyságát és az apoptotikus sejtmagok számát.
- Az eplerenon kezelés egyedileg alkalmazva sem az ejekciós frakció csökkenést, sem a miokardiális fibrózist nem képes mérsékelni, azonban a szívizom ultrastrukturális károsodásait a szer jelentős mértékben enyhíti.

- Egyetlen kardioprotektív kezelés sem képes megelőzni a PGC1 α fehérje mennyiségének csökkenését, ami a doxorubicin egyik daganatellenes hatásának, azaz a csökkent mértékű mitokondriális biogenezisnek az alapja.

8. 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 szívimsejtek 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.

9. Summary

Doxorubicin- (DOX) induced cardiomyopathy is still an unresolved clinical problem in oncological patients. Although several animal experiments and clinical trials have investigated possible approaches to the treatment of DOX cardiotoxicity, current guidelines include no substantive preventive strategy for oncological patients at a low risk of cardiovascular disease.

In the course of our experiments, we developed a rat model which closely mimicked human oncotherapeutic protocols. Thus, the effects of single or combined heart failure medications (BB, ACEI, AA) for preventing DOX-induced cardiomyopathy could be examined, with special respect to the timing of treatments. According to our results, the prophylactic application of combined heart failure therapy prevented the DOX-induced reduction of EF, damage in the myocardial ultrastructure, as well as cardiomyocyte apoptosis, which eventually led to the better survival of the animals. In contrast, combination therapy applied only at a later stage did not exert these beneficial effects. When examining the effects of the individual components of prophylactic therapy, the best effect on EF could be achieved by BB treatment, while the higher apoptotic activity could be partially reduced by both BB or ACEI treatments. At the same time, the myocardial ultrastructure was successfully conserved by all three drugs. Thus, the highest survival rate could be observed in the BB and ACEI groups.

Taken together, our results suggest that both bisoprolol and perindopril, or preferably the combination of these drugs could potentially attenuate DOX cardiotoxicity when commenced before chemotherapy.

10. Irodalomjegyzék

1. You W, Henneberg M. Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection. *Evol Appl.* 2017;11(2):140-152.
2. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in europe: Epidemiological update 2016. *Eur Heart J.* 2016;37:3232-3245.
3. Virani SA, Dent S, Brezden-Masley C, et al. Canadian cardiovascular society guidelines for evaluation and management of cardiovascular complications of cancer therapy. *Can J Cardiol.* 2016;32(7):831-841.
4. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Munoz D, et al. 2016 ESC position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC committee for practice guidelines: The task force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the european society of cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016;37(36):2768-2801.
5. Curigliano G, Lenihan D, Fradley M, et al. Management of cardiac disease in cancer patients throughout oncological treatment: ESMO consensus recommendations. *Ann Oncol.* 2020;31(2):171-190.
6. Armenian SH, Lacchetti C, Barac A, et al. Prevention and monitoring of cardiac dysfunction in survivors of adult cancers: American society of clinical oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol.* 2017;35(8):893-911.
7. Lipshultz SE, Herman EH. Anthracycline cardiotoxicity: The importance of horizontally integrating pre-clinical and clinical research. *Cardiovasc Res.* 2018;114(2):205-209.

8. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*. 1969;11(6):1101-1110.
9. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: Mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem*. 2000;207(1-2):77-86.
10. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973;32(2):302-314.
11. Sawyer DB. Anthracyclines and heart failure. *N Engl J Med*. 2013;368(12):1154-1156.
12. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18(11):1639-1642.
13. Geisberg CA, Sawyer DB. Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(6):404-410.
14. Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2):436-444.
15. Sehested M, Jensen PB, Sørensen BS, Holm B, Friche E, Demant EJ. Antagonistic effect of the cardioprotector (+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) on DNA breaks and cytotoxicity induced by the topoisomerase II directed drugs daunorubicin and etoposide (VP-16). *Biochem Pharmacol*. 1993;46(3):389-393.
16. Singal PK, Pierce GN. Adriamycin stimulates low-affinity Ca²⁺ binding and lipid peroxidation but depresses myocardial function. *Am J Physiol*. 1986;250(3 Pt 2):H419-25.
17. Singal PK, Panagia V. Direct effects of adriamycin on the rat heart sarcolemma. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1984;43(1):67-77.

18. Revis NW, Marusic N. Glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the hearts of doxorubicin-treated rabbits. *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10(10):945-951.
19. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation.* 1994;89(6):2829-2835.
20. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med.* 1991;324(12):808-815.
21. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23(12):2629-2636.
22. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation.* 2015;131(22):1981-1988.
23. Eschenhagen T, Force T, Ewer MS, et al. Cardiovascular side effects of cancer therapies: A position statement from the heart failure association of the european society of cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2011;13(1):1-10.
24. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: Clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(3):213-220.
25. Speyer JL, Green MD, Dubin N, et al. Prospective evaluation of cardiotoxicity during a six-hour doxorubicin infusion regimen in women with adenocarcinoma of the breast. *Am J Med.* 1985;78(4):555-563.

26. Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, et al. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med.* 1982;96(2):133-139.
27. Shapira J, Gotfried M, Lishner M, Ravid M. Reduced cardiotoxicity of doxorubicin by a 6-hour infusion regimen. A prospective randomized evaluation. *Cancer.* 1990;65(4):870-873.
28. Weiss RB. The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* 1992;19(6):670-686.
29. Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: Changing toxicity profiles. *Drug Saf.* 2001;24(12):903-920.
30. Pisano C, Cecere SC, Di Napoli M, et al. Clinical trials with pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of ovarian cancer. *J Drug Deliv.* 2013;2013:898146.
31. Liu W, Yang M, Ping L, et al. Chemotherapy with a pegylated liposomal doxorubicin-containing regimen in newly diagnosed hodgkin lymphoma patients. *Cardiovasc Toxicol.* 2020.
32. Li R, Tian F, Qi Y, et al. Pegylated liposomal doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel as neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer (registration number: ChiCTR1900023052). *Sci Rep.* 2019;9(1):18135-019-54387-5.
33. Chang AE, Wu QV, Jenkins IC, et al. Phase I/II trial of combined pegylated liposomal doxorubicin and cyclophosphamide in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2018;18(1):e143-e149.
34. Gordon AN, Granai CO, Rose PG, et al. Phase II study of liposomal doxorubicin in platinum- and paclitaxel-refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18(17):3093-3100.

35. Singal PK, Tong JG. Vitamin E deficiency accentuates adriamycin-induced cardiomyopathy and cell surface changes. *Mol Cell Biochem.* 1988;84(2):163-171.
36. Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol.* 1980;99(1):13-42.
37. Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA, Pinedo HM. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res.* 1980;40(6):2033-2038.
38. Shimpo K, Nagatsu T, Yamada K, et al. Ascorbic acid and adriamycin toxicity. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(6 Suppl):1298S-1301S.
39. Speyer JL, Green MD, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 1992;10(1):117-127.
40. Herman EH, Ferrans VJ. Reduction of chronic doxorubicin cardiotoxicity in dogs by pretreatment with (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187). *Cancer Res.* 1981;41(9 Pt 1):3436-3440.
41. Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, et al. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 1997;15(4):1318-1332.
42. Sparano JA, Speyer J, Gradishar WJ, et al. Phase I trial of escalating doses of paclitaxel plus doxorubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(3):880-886.

43. Hochster H, Liebes L, Wadler S, et al. Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(22):1725-1730.
44. Spalato Ceruso M, Napolitano A, Silletta M, et al. Use of cardioprotective dexrazoxane is associated with increased myelotoxicity in anthracycline-treated soft-tissue sarcoma patients. *Chemotherapy.* 2019;64(2):105-109.
45. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation.* 1995;91(1):10-15.
46. Kalam K, Marwick TH. Role of cardioprotective therapy for prevention of cardiotoxicity with chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2013;49(13):2900-2909.
47. Herman EH, El-Hage AN, Ferrans VJ, Witiak DT. Reduction by ICRF-187 of acute daunorubicin toxicity in syrian golden hamsters. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1983;40(2):217-231.
48. Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, et al. Androgen receptor counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. *Mol Endocrinol.* 2010;24(7):1338-1348.
49. Green DM, Grigoriev YA, Nan B, et al. Congestive heart failure after treatment for wilms' tumor: A report from the national wilms' tumor study group. *J Clin Oncol.* 2001;19(7):1926-1934.
50. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, et al. Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med.* 1995;332(26):1738-1743.

51. Zhang J, Knapton A, Lipshultz SE, Cochran TR, Hilaragi H, Herman EH. Sex-related differences in mast cell activity and doxorubicin toxicity: A study in spontaneously hypertensive rats. *Toxicol Pathol.* 2014;42(2):361-375.
52. Jenkins GR, Lee T, Moland CL, et al. Sex-related differential susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity in B6C3F(1) mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;310:159-174.
53. Somogyi P. The study of golgi stained cells and of experimental degeneration under the electron microscope: A direct method for the identification in the visual cortex of three successive links in a neuron chain. *Neuroscience.* 1978;3(2):167-180.
54. Papp Z, Szabo A, Barends JP, Stienen GJ. The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 2002;543:177-189.
55. Czuriga D, Toth A, Pasztor ET, et al. Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2012;107:244.
56. Balogh A, Santer D, Pasztor ET, et al. Myofilament protein carbonylation contributes to the contractile dysfunction in the infarcted LV region of mouse hearts. *Cardiovasc Res.* 2014;101:108-119.
57. Czompa A, Gyongyosi A, Szoke K, et al. Effects of momordica charantia (bitter melon) on ischemic diabetic myocardium. *Molecules.* 2017;22(3):10.3390/molecules22030488.
58. CIBIS-II Investigators and Committees. The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): A randomised trial. *Lancet.* 1999;353(9146):9-13.
59. Cleland JG, Tendera M, Adamus J, et al. The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur Heart J.* 2006;27(19):2338-2345.

60. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1309-1321.
61. Couch RD, Loh KK, Sugino J. Sudden cardiac death following adriamycin therapy. *Cancer*. 1981;48(1):38-39.
62. Wortman JE, Lucas VS, Jr, Schuster E, Thiele D, Logue GL. Sudden death during doxorubicin administration. *Cancer*. 1979;44(5):1588-1591.
63. Tsuda N, Oka R, Kajino H, Kajino M, Okuno A. Sudden death of a patient in complete remission after anthracycline therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*. 2000;42(3):319-321.
64. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(11):620.
65. Bosch X, Rovira M, Sitges M, et al. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: The OVERCOME trial (prevention of left ventricular dysfunction with enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive chemotherapy for the treatment of malignant hemopathies). *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(23):2355-2362.
66. Cardinale D, Ciceri F, Latini R, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: A multicenter randomised trial comparing two strategies for guiding prevention with enalapril: The international CardioOncology society-one trial. *Eur J Cancer*. 2018;94:126-137.

67. Avila MS, Ayub-Ferreira S, de Barros Wanderley, M. R., Jr., et al. Carvedilol for prevention of chemotherapy-related cardiotoxicity: The CECCY trial. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71:2281-2290.
68. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(11):2258-2262.
69. Chen YL, Chung SY, Chai HC, et al. Early administration of carvedilol protected against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;355:516-527.
70. Georgakopoulos P, Roussou P, Matsakas E, et al. Cardioprotective effect of metoprolol and enalapril in doxorubicin-treated lymphoma patients: A prospective, parallel-group, randomized, controlled study with 36-month follow-up. *Am J Hematol.* 2010;85(11):894-896.
71. Akpek M, Ozdogru I, Sahin O, et al. Protective effects of spironolactone against anthracycline-induced cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2015;17(1):81-89.
72. Liu G, Liu Y, Wang R, et al. Spironolactone attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cardiovasc Ther.* 2016;34:216-224.
73. Hullin R, Metrich M, Sarre A, et al. Diverging effects of enalapril or eplerenone in primary prevention against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res.* 2018;114:272-281.
74. Lothar A, Bergemann S, Kowalski J, et al. Inhibition of the cardiac myocyte mineralocorticoid receptor ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res.* 2018;114:282-290.
75. Rodrigues PG, Miranda-Silva D, Costa S, et al. Early myocardial changes induced by doxorubicin in the non-failing dilated ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018.

76. Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: Alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest.* 1980;65(1):128-135.
77. Cole MP, Chaiswing L, Oberley TD, et al. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res.* 2006;69:186-197.
78. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:1213-1225.
79. Wu R, Wang HL, Yu HL, et al. Doxorubicin toxicity changes myocardial energy metabolism in rats. *Chem Biol Interact.* 2016;244:149-158.
80. van der Pluijm I, Burger J, van Heijningen PM, et al. Decreased mitochondrial respiration in aneurysmal aortas of fibulin-4 mutant mice is linked to PGC1A regulation. *Cardiovasc Res.* 2018;114(13):1776-1793.
81. Gupte AA, Hamilton DJ, Cordero-Reyes AM, et al. Mechanical unloading promotes myocardial energy recovery in human heart failure. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7(3):266-276.
82. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2006;101(2):151-158.

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., Csipó, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., **Lódi, M.**, Papp, Z.: A szív pozitív inotrop támogatása a miozin-aktivátor hatású omecamtiv-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.





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.



11. Tárgyszavak

Állatmodell, kardio-onkológia, kardiotoxicitás, doxorubicin, megelőzés, szívelégtelenség

Animal model, cardio-oncology, cardiotoxicity, doxorubicin, prevention, cardiomyopathy

12. 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 téve 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 Hamdani-t, 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 Ph.D-s éveimet végig csinálni.

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.

13. Fűggelék