

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az oxidatív stressz és az autofágia szerepe a miokardiumban**

Gyöngyösi Alexandra

TÉMAVEZETŐ: Dr. Lekli István



DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
Debrecen  
2019

# **Az oxidatív stressz és az autofágia szerepe a miokardiumban**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Gyöngyösi Alexandra okleveles táplálkozástudományi szakember

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája  
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Lekli István, PharmD, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

Dr. Csont Tamás Bálint, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék Könyvtára

2019. június 3. 9 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Pósa Anikó, PhD

Dr. Kertész Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

Dr. Csont Tamás Bálint, PhD

Dr. Pósa Anikó, PhD

Dr. Kertész Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület  
2019. június 3. 13 óra

## Tartalomjegyzék

<b>I. Bevezetés és célkitűzés .....</b>	<b>4</b>
<b>II. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>7</b>
<b>III. Eredmények .....</b>	<b>17</b>
<b>IV. Megbeszélés .....</b>	<b>23</b>
<b>V. Összefoglalás .....</b>	<b>31</b>

## I. Bevezetés és célkitűzés

Minden évben a kardiovaszkuláris megbetegedések megközelítőleg 3,9 millió ember halálát okozzák Európában és több mint 1,8 millió ember halálát az Európai Unióban. Ezáltal a kardiovaszkuláris megbetegedések a halálozások 45%-ért felelősek Európában, és 37%-ért az Európai Unióban.

A szívbetegségek egyik vezető oka a szívkoszorúerek megbetegedése (CAD), amely a szívizom károsodása és nekrozis következtében alakul ki. A reaktív oxigén származékok (ROS) fontos szerepet játszhat a CAD kialakulásában és annak progressziójában. A ROS emelkedett szintje továbbá hozzájárulhat az oxidált LDL kialakulásához az erek falában, amely legfőképp az ateroszklerózis patogeneziséhez járul hozzá. Emellett Kísérletes bizonyítékok utalnak arra, hogy a ROS számos mechanizmus által indukálhatja az apoptózist. Azonban az emelkedett oxidatív stressz kapcsolata az autofágia folyamatával még nem egészen tisztázott a szívben.

Az autofágiának kritikus szerepe van a szív normál felépítésében és működésében. Normál körülmények között az autofágia konstitutív módon aktiválódik a szívizomsejtek szerkezetének és működésének fenntartása érdekében, valamint a szív élettani funkciójának megőrzésére szolgál öregedés során is. Továbbá, az autofágia fokozottan szabályozódik stressz hatására, mint például szívelégtelenség, nyomás-túlterhelés, tápanyaghiány, iszkémia-reperfúzió okozta sérülések és proteotoxikus betegségek során. Fő célunk ezáltal az volt, hogy vizsgáljuk az autofágia folyamatát különböző oxidatív stressz okozta körülmények között és az ezek mögött álló molekuláris biológiai folyamatokat igyekezzünk feltérképezni.

A kísérletsorozatok első részében a vizsgálat célja a krónikus mérsékelt hipoxia és hiperoxia szívre gyakorolt hatásának vizsgálata volt. Három okból kifolyólag kerültük a szélsőséges hipoxiás és hiperoxiás körülményeket: (1) a nem specifikus, potenciónalisán zavaró

jelek elkerülése érdekében; (2) a lehető legjobban szimuláljuk a hipoxiás betegek és az oxigén terápiaiban részt vevő betegek klinikai állapotát, és (3) egyenletesen elosztott oxigén szintek (10% - 21% - 30% O<sub>2</sub>) alkalmazása a kétféle stresszhelyzetre adott válaszok összehasonlíthatósága érdekében. Ezenkívül egy krónikus (4 hetes) állapotot választottunk annak érdekében, hogy felmérjük a miokardiális adaptáció kialakulásának lehetőségét. Ebben a vizsgálatban az az egyik nehézséget a hipoxia/hiperoxia hatása okozta a háztartási fehérjék szintjére, amelyeket általában a Western blot-analízisek során szoktunk kontrollként alkalmazni, így jelentős problémát okozva a célfehérjék kvantitatív értékelésében. Ezért arra törekedtünk, hogy egy alternatív, de megbízható kiértékeléssel dolgozzunk. Ezen munka célja tehát az volt, hogy megállapítsuk, hogy a megváltozott oxigéntartalmú légkör hatással van-e a stresszre gyakorolt néhány kulcsfontosságú miokardiális válaszra, különös tekintettel az apoptózisra és autofágiára, valamint néhány más a szív védelméért felelős tényezőre.

A második részben az hemin-toxicitás hatását vizsgáltuk az autofágia folyamatára. A hem egy „kétélű.kard”; kis mennyiségben funkcionális csoportként működik a hemfehérjékben és nélkülözhetetlen a sejtes funkciók biztosításában. Másrészt, ha nagy mennyiségű hem halmozódik fel, úgy találták, hogy mérgező is lehet, ami rendkívül változatos formában jelenik meg sokféle sejtípusban. Általában a hem-toxicitást a vasból származó reaktív oxigén gyökök (ROS), a DNS károsodás, a lipidek és fehérjék oxidációjának a fokozott generalizációja követ.

Egy kutatócsoport humán HO-1 rekombináns plazmával indukálta a HO-1 overexpresszióját, melyet követően azt tapasztalták, hogy az megakadályozta a streptozotocin indukálta diabéteszes egerek kardiális diszfunkcióját azáltal, hogy csökkentette a gyulladást, az oxidatív stresszt és az apoptózis mértékét a szívekben. Eredményeik azt mutatják, hogy a HO-1 fokozott aktivációja által megnövekszik az AMPK foszforilációja, és megemelkedik az LC3B-II és a Beclin-1 autofágiás fehérjék szintje is. Így tehát bizonyították annak tényét, hogy HO-1

expresszió emelkedése és az autofágia folyamata együtt fontos szerepet játszhat a diabétesz kardiális hatásainak megelőzésében. Kutatások számoltak be arról is, hogy a hemin különböző koncentrációkban alkalmazva indukálta a HO-1-et és megállapították, hogy a hemin mitokondriális diszfunkciókat okoz az endoteliális sejtekben a reaktív lipid és oxigén gyökök által okozott fehérjék poszttranszlációs módosításával. Továbbá, a hemin expozíció indukált a mitofágiát is, de ez nem volt elegendő a sejthalál megelőzéséhez. Podociták esetében is beszámoltak már arról, hogy lehetséges a HO-1 és az autofágia közötti kapcsolat, mikor vizsgálták a HO-1 fontosságát a magas-glükóz mediálta autofágiában. Annak ellenére, hogy tanulmányok vizsgálták a HO-1 és az autofágiás útvonal közötti összefüggést különböző sejtekben és tumorokban, a két folyamata kapcsolata ma is tisztázatlan a miokardiumban.

Munkánk céljaként tehát azt tűztük ki, hogy vizsgáljuk az autofágiát és az oxidatív stressz kapcsolatát szívben. Egyrészt, mérséklet, krónikus hipoxia és hiperoxia után vizsgáltuk egér szívben a légkör oxigén koncentrációjának korrelációját az oxidatív stresszel, a hipoxia szignalizációjával, a túlélési útvonalak aktiválódásával, az apoptózis, valamint az autofágia folyamatával. Továbbá vizsgáltuk a kezelések hatását a háztartási fehérjék szintjének változására. Másrészt, vizsgáltuk szívizomsejt tenyészetben a magas koncentrációjú hemoxigenáz-1 indukáló szerek hatását a ROS termelésére, az autofágia valamint az apoptózis folyamatára.

## II. Anyagok és módszerek

### II.1. Kísérleti állatok és kezelési protokoll

Kísérleteink során hét hetes Foxn1 egereket használtunk fel (Harlan Laboratory). A vizsgálatokat a Milánói Egyetem Laboratóriumi Állatokkal Foglalkozó Bizottságának (OBPA) jóváhagyásával végeztük. Munkánk során irányelveiket szem előtt tartottuk, az Európai Uniós- és a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival összhangban (NIH 85-23, revised 1996.). Az állatok általános rágcsálótápot és vizet kaptak *ad libitum*, 12 órás világos/sötét ciklusra akklimatizálódtak és  $25\pm 2$  °C környezeti hőmérsékleten elhelyezve. Az egerek testsúlya 27-30 g volt.

Az egereket véletlenszerűen csoportosítva, két egymásra helyezett, szigetelt kamrákban tartottuk a kezelés során. A gázkamra egy 350x350x200 mm-es műanyag dobozból áll, egyetlen 165 mm átmérőjű ablakkal, mely a kompenzatórikus kamra irányából nyitható és zárható. Felette helyezkedik el a kompenzatórikus kamra, amely két ablakkal rendelkezik a szemben lévő falakon. A felső ablak szigetelése és az állatok mozgatása a két kamra között egy hosszú kesztyűvel lett megoldva. Ezeken az ablakokon keresztül történik a kamrák tisztítása, az állatok etetése és mérése is. Mindkét kamrát ugyanazzal a meghatározott összetételű gáz keverékkel öblítettük át, és folyamatos szabályozás alatt tartottuk. Az  $O_2$  szint módosítását követően a belélegeztetett levegő összetételét  $N_2$  gázzal egyensúlyoztuk. A kísérlet kezdetén három csoportot hoztunk létre: 10%  $O_2$  szint (hipoxia, n=6), 21%  $O_2$  (normoxia, n=6), 30%  $O_2$  (hiperoxia, n=6). Az állatokat először a kompenzatórikus kamrába helyeztük akklimatizálódni, majd ezután kerültek át a gázkamrába. A két kamrában lévő levegő oxigén szintje között sosem volt 1%-nál nagyobb különbség. A 28 napos expozíciót követően az állatokat kompenzatórikus kamrába áthelyezve elaltattuk intraperitonealisan adott nátrium-tiopentállal (100 mg/100 g), majd véralvadástgátlóként heparin injekciót alkalmaztunk szubkután adagolva (500 U/ttkg). Ezt követően torakotómiát végeztünk, a

szíveket izoláltuk, majd folyékony nitrogénnel történő fagyasztást követően felhasználásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

## **II.2. Hemoglobin szint meghatározás**

Altatást követően a vena jugularis externából vért vettünk, és a vér hemoglobin koncentrációját Drabkin módszerrel mértük.  $10\text{ }\mu\text{l}$  vért homogenizáltuk  $1\text{ ml}$  Drabkin reagenssel, majd  $30$  percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően abszorbancia mérést végeztünk  $540\text{ nm}$ -es hullámhosszon. A koncentrációt  $\epsilon=11\ 05\text{ cm}^{-1}\text{ mM}^{-1}$  segítségével számoltuk ki.

## **II.3. Oxidatív stressz meghatározása D-ROMs teszttel**

Az oxidatív stressz szintjének mérése céljából meghatároztuk a mintában levő oxidánsok mennyiségét (ROS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  és hipoklórsav). A szerves molekulák támadásával ezek az anyagok stabil reaktív  $\text{O}_2$  metabolitokat (ROM-okat) képeznek, amelyek elsősorban hidroperoxidokat (ROOH) tartalmaznak. Az oxidatív stressz meghatározására a vérplazmában a fotometriai D-ROM tesztet (Diacron International srl, Grosseto, Olaszország) használtuk.  $10\text{ }\mu\text{l}$  vérplazmához  $1\text{ ml}$  acetát puffert ( $\text{pH} = 4,8$ ) adtunk, és  $505\text{ nm}$ -en abszorbancia értéket mértünk. Ezáltal az *in vivo* képződött ROOH kapacitást mértük, amely az alkoxil ( $\text{RO}\bullet$ ) és a peroxil ( $\text{ROO}\bullet$ ) gyökök előállításából eredt, a vérplazmából felszabaduló vas és savas puffer jelenlétében. Az adatokat  $\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dL}$  értékben fejeztük ki. Az adatokat lehetőség van átalakítani Carratelli Unit (U CARR) formába.  $1\text{ U CARR} = 0,08\text{ mg H}_2\text{O}_2$ .

## **II.4. DNS törés meghatározása immunfluoreszcens festéssel**

Fagyasztott egér szív mintákat beágyazó pufferbe helyeztük (OCT-Compound, Leica Instruments, Nussloch, Németország), majd  $5\text{ }\mu\text{m}$  vastag szeleteket vágunk kriosztát (Leica CM1510) segítségével  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A szívszövet darabokat Superfrost Plus tárgylemezre helyeztük, és  $2$  percig szobahőmérsékleten száradni hagytuk. Ezt követően a metszeteket hideg,

4%-os pufferolt formalinnal fixáltuk 4 °C-on 45 percig, majd kétszer 5 percig mostuk PBS-sel (pH: 7,4). Utófixálásként 2:1 (v/v) etanol-ecetsav keverékével inkubáltuk a metszeteket -20 °C-on 5 percig, majd 5 percig hideg, másik 5 percig szobahőmérsékletű PBS-sel mostuk őket. Következő lépésként forrásban lévő citrát pufferbe (pH: 6,0) helyeztük a tárgylemezeket és 12 percig főztük, majd 20 percig szobahőmérsékleten hűlni hagytuk. Két PBS-sel történő mosást követően 9:1 (TMR-red nukleotidok: TdT) arányban összekevert reakció eleggyel párasító kamrában inkubáltuk a metszeteket 37 °C-on egy órán keresztül. Újabb mosást követően DAPI-val megfestettük a sejtmagokat, majd fedőanyaggal és üveg lemezzel lefedtük őket. A mikroszkópos képeket konfokális mikroszkóppal készítettük (Leica SP2 konfokális mikroszkóp, He / Kr és Ar lézerekkel; Heidelberg, Németország). A kék és piros csatornák összevonása után a lila foltokat TUNEL pozitív magként, míg a kék foltokat TUNEL negatív, ép magként azonosítottuk (Adobe Photoshop CC 2017, San Jose, CA, USA). A DNS törés mértékét a TdT-pozitív magok/ép magok arányával számszerűsítettük és százalékos formában fejeztük ki.

## **II.5. Fehérje izolálás**

Állatkísérletünk során 50-80 mg fagyasztott szívszövetet homogenizáltunk üveg-csiszoló csőben 1:3 (w/v) arányban az alábbi „lízis puffer A” segítségével (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 10 mM KCl és 10% proteináz inhibitor koktél, pH 7,9). A homogenizátumot 20 percig jégen tartottuk, majd centrifugáltuk (14000 rpm, 4 °C, 20 perc). A pelletet ismét szuszpendáltuk, és centrifugáltuk. A két centrifugálásból származó felülúszót összekevertük egy tiszta csőben, majd ezt használtuk citoszolikus frakcióként. A kapott pelletet az alábbi „izoláló puffer B”-vel homogenizáltuk (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 420 mM NaCl; 0,2 mM EDTA; 25% glicerol és 10% proteináz inhibitor koktél, pH 7,9). A homogenizátumot 20 percig jégen tartottuk, majd centrifugáltuk (14000 rpm, 4 °C, 20 perc).

A pufferek valamennyi összetevőjét a Sigma-Aldrich olaszországi képviselőjétől rendeltük. A fehérje koncentráció meghatározása céljából Comassie Protein Assay Kitet alkalmaztunk (Thermo Scientific, Rockford, IL).

H9c2 sejtek tenyésztése fehérje izolálás céljából 75 cm<sup>2</sup> sejttenyésztő flaskában történt 4x10<sup>5</sup> sejtsűrűséggel. A sejteket izoláló pufferben szuszpendáltuk. Az izoláló puffer összetétele az alábbi volt: 25 mM Tris-HCl; 25 mM NaCl; 1 mM Na-ortovanadát; 10 mM NaF; 10 mM Na-pirofoszfát; 10 mM okadánsav; 0,5 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1x proteáz inhibitor koktél; 0,01% TritonX-100 és desztillált víz. A homogenizáló oldat valamennyi összetevője a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől származott. Három egymást követő fagyasztásos-felolvasztásos ciklust követően szonikáltuk a szuszpenziót, majd 14000 rpm fordulaton 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk. Bicinchoninsav (BCA)-kittel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) határoztuk meg a fehérje koncentrációt.

## **II.6. Western blot analízis hagyományos és Stain-Free gélekkel**

Az állatkísérlet során 70 µg fehérjét 8-15% SDS-PAGE (Sigma-Aldrich, Schellendorf, Németország) módszerrel szeparáltunk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). A membránok blokkolása frissen készített 5 %-os (m/v %) zsírszegény tejpor szuszpenziójával történt. A primer antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat 4 °C-on. Kísérleteink során az alábbi primer antitesteket használtuk a megadott hígításban: anti-Akt (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-phospho-Akt-Ser<sup>473</sup> (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), anti-AMPK (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), anti-phospho-AMPK-Thr<sup>172</sup> (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000). A következő napon, háromszor megismételt 5 perces mosás után a blottokat egy órán át tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az alábbi másodlagos antitesteket alkalmaztuk: Peroxidase-conjugated AffiniPure

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 1:10000), Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 1:10000). Végül, 3 alkalommal történő 10 perces mosást követően a membránokat Lite Ablot chemiluminescence szubsztráttal inkubáltuk, és digitalizáltuk a vizsgált fehérjék expressziójának intenzitását (UVITEC Ltd., Cambridge, UK). A képfájlokon a jelek intenzitását UVI-1D szoftverrel mértük.

Emellett szeparáltunk 70  $\mu$ g fehérjét TGX Stain-Free™ 7,5%-os akrilamid géleken. Ezt követően a géleket UV fénnel exponáltuk, így a gél trihalo csoportjai kovalensen kapcsolódtak a fehérjék triptofán oldalláncaihoz. A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd egy újabb rövid besugárzást követően rögzítettük a fluoreszcens szignál képét, amely a teljes fehérje mennyiséget mutatta oszloponként. A membránokat ezt követően frissen készített 5%-os (m/v) zsírszegény tejpor szuszpenziójával blokkoltuk. A primer antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat 4 °C-on. Kísérleteink során az alábbi primer antitesteket használtuk a megadott hígításban: anti- $\alpha$ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), anti-aktin (Sigma Aldrich, St Louis, 1:2000), anti-GAPDH (Sigma Aldrich, St Louis, 1:15000), anti-Becclin-1 ( Epitomics, Abcam Company, 1:3000), anti-LC3B (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-p62 (Abcam, 1:1000), anti-HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, 1:300), anti-HIF-2 $\alpha$  (Abcam, 1:300), anti-NOX4 (Abcam, 1:5000). A következő napon, háromszor megismételt 5 perces mosás után a blottokat egy órán át tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az alábbi másodlagos antitesteket alkalmaztuk: Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 1:10000), Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 1:10000). Végül, 3x10 perc mosást követően a membránokat Lite Ablot chemiluminescence szubsztráttal inkubáltuk és digitalizáltuk a vizsgált fehérjék expressziójának intenzitását (UVITEC Ltd., Cambridge, UK). A

képfájlokon a jelek intenzitását UVI-1D szoftverrel mértük. A kiértékelések során teljes fehérje alapú normalizálást alkalmaztunk. A fehérjék expressziójának szintjét a vizsgált célfehérje kemilumineszcens intenzitása / teljes fehérje mennyisége alapján számoltuk. Ennek a módszernek az az előnye, hogy eliminálja az instabil háztartási fehérjékkel történő normalizálás hibáját [185].

Kísérletsorozatunk második részében 25 µg fehérjét szeparáltunk 12% -os TGX Stain-Free™ géleken (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) és a fentebb említett módon végeztük a szeparálást, a transzferálást és a blokkolást. A kísérletek során az alábbi primer antitesteket használtuk a megadott hígításban: anti-hemoxigenáz-1 (Abcam, 1:1000), anti-Becin-1 (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-LC3B (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-p62 (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-prokaspáz-3 (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-hasított kaszpáz-3 (Cell Signaling Technology, 1:500). A következő napon 3x5 perc TBST-vel történő mosást követően 1,5 órán keresztül tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitesttel (Cell Signaling Technology, 1:3000) inkubáltuk a blottokat. Végezetül, 3x10 perc mosást követően a membránokat enhanced chemiluminescence reagens (ECL) segítségével exponáltuk ChemiDoc Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékben. A képfájlokat ImageLab szoftverrel elemeztük, teljes fehérje alapú normalizálást alkalmazva.

## **II.7. Sejtenyésztés**

A kísérletekhez használt H9c2 kardiomiocita sejtvonal az ATCC-től (CRL-1446, LGC Standard GmbH Wesel, Németország) származott. A sejtenyésztés során a sejteket fiziológias körülményekhez hasonló, letapadó sejtkultúrához alkalmas sejtenyésztő edényben, 10% (v/v) főtális szarvasmarha szérumot és 1% (v/v) penicillin-streptomycin antibiotikumot tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) folyékony tápoldatban növesztettük 37 °C-on CO<sub>2</sub> termosztátban (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). A tápoldat cseréjét lamináris áramlású steril fülke alatt végeztük.

60%-os konfluens kultúrával dolgoztunk minden kísérlet esetén. A kísérletben alkalmazott sejtek passzázs-száma 10 és 25 között volt.

## **II.8. Hemin és CoPP<sub>IX</sub> oldatok elkészítése**

A hemin és CoPP<sub>IX</sub> oldatokat a felhasználás napján készítettük el. Oldószerként 20 mM NaOH-t használtunk. A hemint és CoPP<sub>IX</sub>-t feloldottuk és spektrofotométerrel 405 nm hullámhosszon abszorbanciát mértünk.  $\epsilon=85820$ ,  $MW_{\text{hemin}}=652$  g/mol,  $MW_{\text{CoPP}_{IX}}=655$ g/mol értékeket alkalmaztuk a koncentráció számításához.

## **II.9. Kezelési protokoll**

A szívizomsejteket az alábbi kezelési protokollal használtuk fel a különböző kísérletekhez: kezeletlen kontroll, kezelt kontroll (20 mM NaOH), 3; 10; 30; 100  $\mu$ M hemin, 2,5; 25; 100  $\mu$ M CoPP<sub>IX</sub>. A kezelések ideje minden esetben 24 óra volt.

## **II.10. Sejt életképességi vizsgálat**

Az életképességi vizsgálatok során a H9c2 sejtek mitokondriális aktivitás változását mértük spektrofotometriás MTT módszer segítségével. A módszer elve, hogy az életképes sejtek mitokondriumainak belső membránjában és mátrixában zajló oxidatív reakciókban részt vevő dehidrogenázok a sárga színű 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromidot (MTT) lila színű vízben oldhatatlan formazán kristályokká redukálja. Csak azokat a sejteket tekintjük életképesnek, amelyek a formazán előállítására képesek, mivel a mitokondriális elektrontranszport és energiatermelés alapvető feltétele a sejtműködésnek. A lila szín intenzitása jól korrelál az életképesség arányával. Ezen vizsgálathoz a H9c2 sejteket 96 lyukú tenyésztő plate-ben  $2 \times 10^4$  sejt/lyuk sejtsűrűséggel szélesztettük. A kezeléseket követően 24 órával, amely során pozitív kontrollként 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot alkalmaztunk, 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot pipettáztunk minden lyukba és 37 °C-on 3,5 órán keresztül inkubáltuk. A tápoldat eltávolítása után a sejteket 200  $\mu$ l isopropanol hozzáadásával lizáltuk, majd plate olvasó (FLUOstar Optima, BMG Labtech)

segítségével abszorbancia értéket mértünk 570 és 690 nm-en. Korrigálásként kivontuk az 570 nm-en mért abszorbancia értékekből a 690 nm-en mért abszorbancia értékeit. A kapott eredményeket a kezeletlen kontroll értékeihez hasonlítottuk és fejeztük ki százalékos formában. Így kaptuk meg a különböző koncentrációjú HO-1 indukáló szerekre jellemző értéket.

### **II.11. Oxidatív stressz szintjének vizsgálata DCF módszerrel**

H<sub>2</sub>DCF-DA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) festést végeztünk a reaktív oxigén származékok kimutatására. A 2',7'-diklór-fluoreszciun-diacetát (DCFDA) egy fluorogén festék, amely a sejten belül a hidroxil, peroxil és más reaktív oxigénfajták (ROS) aktivitását méri. A DCFDA sejtbe történő diffúziója után az észterázok deacetilezik azt egy nem fluoreszcens vegyületté, amelyet később a ROS oxidálja 2',7'-diklór-fluoreszceinné (DCF).

A H9c2 sejteket fekete színű 96 lyukú tenyésztő plate-ben  $2 \times 10^4$  sejt/lyuk sejtsűrűséggel szélesztettük. A sejtek letapadását követően a táptalajt eltávolítottuk, és a sejteket PBS-sel mostuk. 50  $\mu$ M DCFDA festéket adtunk a sejtekhez, és sötétben, 37 °C-on, 1 órán keresztül hagytuk, hogy a festék a sejtekbe diffundáljon. Az inkubációs periódus végétével a festéket eltávolítottuk és friss tápoldatot pipettáztunk a sejtekre. 30 perc elteltével kezeltük a sejteket heminnel és CoPP<sub>IX</sub>-nel (100  $\mu$ M). 24 órával később a tápoldatot újra eltávolítottuk, és PBS-sel mostuk a sejteket, majd fluoreszcens plate olvasó (FLUOstar Optima, BMG Labtech) segítségével mértük a vegyület fluoreszcens intenzitását (485 nm és 528 nm).

### **II.12. Oxidatív stressz szintjének vizsgálata MitoSOX festés segítségével**

A mikroszkópos vizsgálatokhoz H9c2 sejteket szélesztettünk üveg fedőlemezekre 24 lyukú plateben  $2,5 \times 10^4$  sejtsűrűséggel. A sejteket 100  $\mu$ M heminnel és CoPP<sub>IX</sub>-nel kezeltük 24 órán keresztül. Ezt követően a tápközeget eltávolítottuk, és háromszor mostuk a sejteket PBS-sel, majd MitoSOX<sup>TM</sup> Red-dal inkubáltuk (Life Technologies, Paisley, Skócia) 10 percre, 37 ° C-on, sötétben. A MitoSOX<sup>TM</sup> vörös reagens bejut az élő sejtekbe, és szelektíven festi azok

mitokondriumát. Más reaktív oxigén származékok (ROS) és reaktív nitrogén származékok (RNS) által nem, de szuperoxidok által gyorsan oxidálódik. Az oxidált termék a nukleinsavakhoz kötődve fluoreszcens jelet ad. Az inkubációs idő leteltével a festéket eltávolítottuk, és a sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd a sejtmagokat megfestettük DAPI-val (4', 6-diamidino-2-fenil-indol). 4%-os formaldehiddel fixáltuk a sejteket, majd a korongokat tárgylemezre helyezve, száradás után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket Zeiss Axio Scope A1 típusú (HBO 100 lamp) mikroszkóppal (Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Németország) és a hozzá tartozó ZEN 2011 v1.0.1.0. szoftverrel készítettük. Minden kísérlet során 100 sejtet vizsgáltunk csoportonként. A vörös szín átlagos intenzitását Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) szoftverrel számszerűsítettük.

### **II.13. Cyto-ID festés**

A mikroszkópos vizsgálatokhoz H9c2 sejteket szélesztettünk üveg fedőlemezekre 24 lyukú plateben  $1 \times 10^4$  sejt/sűrűséggel. A sejteket  $100 \mu\text{M}$  heminnel és  $\text{CoPP}_{\text{IX}}$ -el, valamint pozitív kontrollként  $5 \mu\text{M}$  rapamycinnel kezeltük 24 órán át. A kezelés 6. órájában az autofágia folyamatát, a lizoszómák működésén keresztül gátoltuk, 18 óra 10  $\mu\text{M}$  Klorokin kezelést alkalmazva. A kezeléseket követően a tápoldatot eltávolítottuk, és a sejtek felszínét a gyártó által mellékelt egyszeres pufferrel mostuk. Minden lyukba  $100 \mu\text{l}$  Microscopy Dual Detection Reagentet pipettáztunk, amely 2:1 arányban tartalmazta a Cyto-ID Green detektáló reagenst (Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY, USA), és Hoechst 33342 sejtmag festéket, és 30 percig  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -n inkubáltuk a sejteket. A Cyto-ID Green detektáló reagensnek köszönhetően a lizoszómáisan gátolt sejtekben mérni tudjuk az autofágiás vakuolumok számát és az autofágiás fluxot, mivel a festék csak az élő sejtekben felhamozódott autofágiás vakuolumokba jut be. Egy mosást követően 4%-os formaldehiddel fixáltuk a sejteket, majd tárgylemezre helyezve, száradás után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk mintáinkat. A képeket Zeiss Axio Scope A1 típusú (HBO 100 lamp)

mikroszkóppal (Carl Zeiss Microscopy GMBH, München, Németország) és a hozzá tartozó ZEN 2011 v1.0.1.0. szoftverrel készítettük.

Az áramlási citometria vizsgálatokhoz tenyésztő flaskában  $2,5 \times 10^5$  sejtsűrűséggel szélesztettük a szívizomsejteket. A kezelés a fentebb említett módon történt. A kezelési idő elteltével a már említett módon centrifugacsőbe gyűjtöttük a sejteket, majd puffereket mostuk. Centrifugálás után (5 perc, 1000 rpm) a felülúszót eltávolítva 250  $\mu$ l Cyto-ID Green festékkel szuszpendáltuk a pelletet és sötétben inkubáltuk 30 percig 37 °C-on. Centrifugáltuk, kétszer mostuk, és 20 perc 1% formaldehiddel történő fixálást követően azonnal vizsgáltuk a sejtpopulációt FC-500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA). Az analízishez CPX szoftvert használtunk. Az autofluoreszcencia flux mérése érdekében meghatároztuk a  $\Delta$ MFI értékét ( $\Delta$ MFI: MFI Klorokins minta – MFI Klorokin nélküli minta).

#### **II.14. Statisztikai analízis**

Kísérletsorozatunk első részében minden adat átment a Kolmogorov-Smirnov normalitás teszten ( $\alpha = 0,05$ ). Kétféle analízissel hasonlítottuk össze a csoportokat. Először három független csoportként (hipoxia, normoxia, hiperoxia) vizsgáltuk őket, és egy utas ANOVA analízist követően (ha ANOVA  $p < 0,05$ ) Tukey poszt tesztet végeztünk. Másrészt, az adatokat folyamatosnak tekintettük az  $O_2$  szintre vonatkoztatva (10%, 21% és 30%), és lineáris regresszió analízist végeztünk. Ha a lineáris korrelációja nullától különbözött, akkor megállapítottuk, hogy a két változó lineáris kapcsolatban állt egymással.

Kísérletsorozatunk második részében a kapott eredményeinket minden esetben a számtani átlag  $\pm$  középérték standard hibája szerint ábrázoltuk. A statisztikai analízisekhez GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). ANOVA tesztet és Dunnett poszt hoc tesztet alkalmaztunk. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha  $p < 0,05$  volt.

### **III. Eredmények**

#### **III. 1. Mérsékelt, krónikus hipoxia és hiperoxia hatásának vizsgálata egér szíven**

##### **III. 1. 1. Testtömeg változása a kezelést követően**

Az állatok kiindulási testtömegében nem volt szignifikáns eltérés. Minden állat túlélte a kezelési időszakot. Tukey poszt tesztet alkalmazva nem volt különbség a 21% O<sub>2</sub> és 10% O<sub>2</sub> csoportok, valamint a 21% O<sub>2</sub> és 30% O<sub>2</sub> csoportok között. 10% O<sub>2</sub> és 30% O<sub>2</sub> csoportokat összehasonlítva azonban szignifikáns különbség figyelhető meg. A kapott adatok pontfelhőjére illesztett lineáris regressziós egyenes alapján, amelynek korrelációja szignifikánsan eltért nullától, feltételezhető, hogy pozitív lineáris kapcsolat áll fenn az állatok testtömege és az O<sub>2</sub> szintjének változása között.

##### **III.1.2. Vér hemoglobin szintjében bekövetkezett változások**

A különböző oxigén koncentrációjú belélegeztetett levegő hatással volt az állatok hemoglobin szintjére. Míg az alacsony O<sub>2</sub> megemelte a vér hemoglobin szintjét, addig a magasabb O<sub>2</sub> koncentráció csökkentette azt a normoxiás körülményekhez viszonyítva. Megfigyelhető, hogy ezen paraméter változása szoros összefüggésben áll a levegő oxigén tartalmával. Így tehát fordított lineáris kapcsolat figyelhető meg a vér hemoglobin szintje és a levegő O<sub>2</sub> koncentrációja között.

##### **III.1.3. Oxidatív stressz mértékének meghatározása**

A D-ROM teszt lehetővé tette a reaktív O<sub>2</sub> metabolitok szintjének meghatározását biológiai mintáinkban, amely az oxidatív stressz mértékére utal. A vérplazmából mért reaktív O<sub>2</sub> metabolitok szintjét a 21% O<sub>2</sub> csoportban a szakirodalom alapján normál szintnek tekintettük. A 10% O<sub>2</sub> tartalmú légkörben tartott állatok esetében viszont szignifikáns növekedést tapasztaltunk a metabolitok szintjében, mind a normoxiás, mind a hiperoxiás kezeléshez képest. A hiperoxiás környezet azonban nem volt hatással a szisztémás prooxidáns oldalra a kontroll körülményekhez viszonyítva. Ez azt jelzi, hogy hipoxiás állapotban borul fel jelentősen a szisztémás redox

egyensúly. Ezek alapján elmondható, hogy egy erős, statisztikailag szignifikáns inverz kapcsolat áll fenn az oxidatív stressz szintje és az O<sub>2</sub> koncentrációjának változása között.

A mitokondriumok károsodása felelős lehet az oxigén szabadgyökök produkciójának emelkedéséért. A NADPH-oxidázok általa termelnek szuperoxid aniont, hogy egy elektrotranszfert hajtanak végre a felszínükön lévő NOX segítségével a NADPH-ról a molekuláris oxigénre. A NOX4 ennek egy mitokondriumban elhelyezkedő izoformája, mely fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusában. Western blot segítségével vizsgáltuk ezen fehérje expressziójának változását. Megemelkedett expressziós szint figyelhető meg a hipoxiás körülmények között tartott állatok szívében, összehasonlítva a normoxiás és hiperoxiás állatokéval. Ezáltal egy fordított lineáris kapcsolat figyelhető meg a NOX4 fehérje és a változó O<sub>2</sub> koncentráció között is.

#### **III.1.4. Eltérő oxigén tartalmú légkör hatása a hipoxia szignalizációjára**

A miokardium citoszólikus frakciójának felhasználásával vizsgáltuk a HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  fehérjék expressziójának változását. Eredményeink azt mutatják, hogy a 10% O<sub>2</sub> tartalmú légkör a HIF-1 $\alpha$  upregulációját eredményezi a hiperoxiás körülményekkel összehasonlítva. Tehát fordított lineáris kapcsolat áll fenn a két paraméter között. Ezzel szemben, a különböző O<sub>2</sub> koncentrációjú kezelés nem volt szignifikáns hatással a HIF-2 $\alpha$  expressziójának változására.

#### **III.1.5. Kezelés hatása a DNS törés mértékére valamint az apoptózis markerek szintjére**

A szívszövetben aktiválódó apoptózis vizsgálatához elemeztük a Bax/Bcl<sub>2</sub> arányát, amely segítségével következtetni lehet arra, hogy a különböző oxigén koncentrációjú belélegeztetett levegő hatással volt-e az apoptózis folyamatára. A Bax/Bcl<sub>2</sub> arányát ugyanazon gélen vizsgáltuk, elkerülve a háztartási fehérjék instabilitásának befolyásoló hatását. Eredményeink azt mutatják, hogy a Bax/Bcl<sub>2</sub> arány megemelkedik hiperoxiás közegben a 10% és 21% O<sub>2</sub> tartalmúakhoz viszonyítva. Így tehát, lineáris kapcsolat áll fel az O<sub>2</sub> koncentráció és Bax/Bcl<sub>2</sub> arány emelkedése

között.

Az apoptotikus magok közvetlen detektálása immunfluoreszcens TUNEL festést alkalmazva azonban eltérő eredményt adott. A DNS törésen átesett sejtmagok aránya 10%, 21% és 30% O<sub>2</sub> esetén a következőképp alakult: míg a normoxiás állatok szíve nagyon alacsony, addig a hipoxiás állatoké magasabb, és hiperoxiásoké még magasabb arányú DNS törést mutatott. Ezáltal a TdT-pozitív sejtmagok aránya nem áll lineáris kapcsolatban az O<sub>2</sub> koncentrációval, hanem egy U-alakú trend figyelhető meg.

### **III.1.6. Különböző O<sub>2</sub> tartalmú légkör hatása a túlélési útvonalak aktiválására**

Kísérleteink során két a szívizomban aktiválódó túlélési útvonalat vizsgáltunk. Az egyik az Akt, egy szerin/treonin kináz volt, amelyről kimutatták, hogy központi szerepet játszik a túlélések elősegítésében és véd az apoptózis ellen. Eredményeink alapján, az O<sub>2</sub> koncentráció változása nem volt hatással az Akt útvonal aktiválódására. pAkt<sup>Ser473</sup>/Akt arány egyik esetben sem változott szignifikáns mértékben.

A másik vizsgált releváns védelmi mechanizmus az AMP-aktivált protein-kináz (AMPK) volt, egy olyan energiaérzékelő rendszer, amely az oxidatív stressz (reaktív O<sub>2</sub> fajok (ROS)) növekedése által is aktiválódik. Hasonlóképpen a másik útvonalhoz, a p-AMPK/AMPK arányának változása sem volt megfigyelhető a csoportok között. Nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció a vizsgált túlélési útvonalak aktiválódása és az O<sub>2</sub> koncentráció változása között.

### **III.1.7. Módosított O<sub>2</sub> tartalmú légkör hatása az autofágiára**

Annak érdekében, hogy megtudjuk milyen hatással van a módosított oxigén tartalmú légkör az autofágia folyamatára, vizsgáltunk néhány markert Western blot segítségével. A III. típusú foszfoinozid-3 kináz komplex tagját képező Beclin-1 szintjének emelkedése az autofágiás vezikulum kialakulásához szükséges. Azt tapasztaltuk, hogy a Beclin-1 szintje hipoxia során szignifikánsan megemelkedik a 30% O<sub>2</sub> tartalmú légkörhöz viszonyítva. A kapott intenzitás értékek

alapján feltételezhető egy erős, fordított lineáris kapcsolat a Beclin-1 expresszió szintjének változása és az oxigén szint között. Érdekes módon, normoxiás és hiperoxiás körülmények között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a fehérje expressziójában. Ezáltal lehetséges, hogy a 30% O<sub>2</sub> tartalmú légkör hatására nem indukálódik az autofágia folyamata.

Az LC3B-II és p62 autofágiás markerekre nem volt szignifikáns hatással a különböző O<sub>2</sub> koncentrációjú levegő. Tehát ezen fehérjék szintje valószínűleg nem áll kapcsolatban a levegő O<sub>2</sub> szintjével.

### **III.1.8. Háztartási fehérjék szintjének változása az O<sub>2</sub> koncentráció hatására**

Western blot analízissel meghatároztuk a különböző oxigén koncentrációjú levegő hatását három háztartási fehérje ( $\alpha$ -tubulin, aktin és GAPDH) szöveti intenzitására is. Ezekben a kísérletekben a célfehérje szintjét teljes fehérje mennyiségre vonatkoztatva mértük. Meglepő módon, a Tukey poszt teszt alapján elmondható, hogy az  $\alpha$ -tubulin és GAPDH esetében is a hipoxiás közeg szignifikánsan megemelte a fehérje kifejeződését a hiperoxiás körülményekkel összehasonlítva. Ez a trend az aktin esetében is megfigyelhető volt, de statisztikailag nem volt szignifikáns a változás. Eredményeink alapján elmondható, hogy O<sub>2</sub> koncentrációjának emelkedése inverz lineáris kapcsolatban áll a vizsgált háztartási fehérjék szintjével is.

## **III.2. HO-1 indukáló szerek toxicitásának vizsgálata és hatása az autofágia folyamatára**

### **III.2.1. HO-1 indukáló szerek hatása a H9c2 szívizomsejtek életképességére**

A HO-1 indukáló szerek (hemin és CoPPIX) sejtleletképesség változásra gyakorolt hatását MTT citotoxicitási teszttel vizsgáltuk. A 3-10-30-100  $\mu$ M heminnel és 2,5-25-100  $\mu$ M CoPPIX-nel történő 24 órás kezelése a szívizomsejtek életképességének koncentrációfüggő romlását okozott. A legmagasabb hemin koncentráció hatása majdnem elérte, viszont a legmagasabb CoPPIX koncentráció már elérte az IC<sub>50</sub>-es értéket.

### **III.2.2. Magas koncentrációjú HO-1 indukáló szerek hatása az oxidatív stressz mértékére**

Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk az oxidatív stressz szerepét H9c2 sejtekben, a magas koncentrációjú hemin és CoPP<sub>IX</sub>-kezelésekkel indukált toxikus hatásban, DCF és MitoSOX festést végeztünk. A DCF festés általános ROS kimutatást tesz lehetővé, míg a MitoSOX a mitokondriális szuperoxid szintet mutatja meg. Eredményeink alapján elmondható, mind a hemin, mind a CoPP<sub>IX</sub>-kezelések hatására szignifikáns mértékben fokozódott a ROS szintje, DCF festést alkalmazva. Ugyanez a szignifikáns növekedés figyelhető meg a mitokondriális szuperoxidok esetében is. Mindkét eredmény azt szemlélteti, hogy az oxidatív stressz szerepet játszhat az indukálós szerek és hem okozta toxikus hatásban.

### **III.2.3. HO-1 szint meghatározása a kezeléseket követően**

Western-blot adataink szerint, mindkét indukáló szer sikeresen fokozta a HO-1 expresszióját. A fehérje szintjének fokozódása, ahogyan az várható is volt, koncentrációfüggő módon mutatkozott meg.

### **III.2.4. A magas koncentrációjú hemin és CoPP<sub>IX</sub> hatása az autofágia folyamatára**

Miután markáns HO-1 expresszió növekedést tapasztaltunk a 100 µM hemin és 100 µM CoPP<sub>IX</sub> esetében is, arra voltunk kíváncsiak ez milyen hatással van az autofágiás markerek szintjére. Beclin-1, LC3B-II és p62 fehérjék szintjét vizsgáltuk Western blot segítségével. Meglepő módon, a Beclin-1 esetében változatlan szintet tapasztaltunk mindkét indukáló szerrel történő kezelést követően. Ezzel ellentétben mind az LC3B-II, mind a p62 szintje szignifikánsan megemelkedett a 100 µM hemin és 100 µM CoPP<sub>IX</sub> csoportokban is a kontrollhoz képest. Ez arra enged következtetni, hogy az autofágia folyamata ugyan aktiválódott, de az emelkedett p62 szint miatt valószínűleg nem megy végbe a teljes folyamat.

Western blot eredményeink igazolása érdekében Cyto-ID Green festést alkalmaztunk és mintáinkat mikroszkóp és áramlási citométer segítségével vizsgáltuk. Az autofágiás flux monitorozása céljából klorokine-nel is kezeltük a sejteket. Ezen szer hatására a lizoszómális

degradáció gátlódik.

Mikroszkópos vizsgálatunk alapján, számos autofágiás vakuólum helyezkedik el a perinukleáris térben és a számuk meg is emelkedik klorokine jelenlétében a kezeletlen csoportban és a 20 mM NaOH kezelés hatására, mely azt jelzi, hogy az autofágiás flux jól funkcionált. Rapamycint használtunk pozitív kontrollként. Ezekben a mintákban emelkedett számú autofágiás vakuólum volt megfigyelhető a klorokine jelenlétében és hiányában is. Habár a CoPP<sub>IX</sub> kezelést követően találtunk néhány vakuólumot, de ezek száma jelentősen kevesebb volt, mint a kezeletlen csoportban, továbbá nem volt jelentősebb különbség klorokine jelenlétében és hiányában. Összehasonlítva a hemin és hemin + klorokine kezelt csoportokat ugyancsak nem volt tapasztalható szignifikáns különbség.

Eredményeink számszerűsítése érdekében áramlási citométerrel mértük mintáink  $\Delta$ MFI értékét. A kapott adatok, alátámasztják mikroszkópos vizsgálataink eredményét. Így tehát arra lehet következtetni, hogy az autofágia folyamata Beclin-1 független útvonalon ugyan aktiválódik, de nem funkcionál megfelelően.

### **III.2.5. Magas koncentrációjú hemin és CoPP<sub>IX</sub> kezelés hatása az apoptózis aktiválódására**

Western blot vizsgálatink során azt tapasztaltuk, hogy a pro-kaspáz-3 fehérje expressziós szintje szignifikánsan lecsökken az indukáló szerek hatására a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a hasított-kaspáz-3 szintjét is, amely pedig mindkét magas koncentrációjú indukáló szer hatására megemelkedett. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a kaspáz-3 fehérje aktiválódik és a magas koncentrációjú hemin és CoPP<sub>IX</sub> hatására indukálódik az apoptózis folyamata.

## IV. Megbeszélés

### IV. 1. Mérsékelt, krónikus hipoxia és hiperoxia hatásának vizsgálata egér szíven

Kísérleteink első részében azt vizsgáltuk, hogy a 28 napon át tartó, 10% - 21% és 30% oxigén tartalmú légkörben tartott egerek szívében milyen szignalizációs változások alakulnak ki. A kezelési időszak alatt, a beállított oxigén koncentráció értékek állandóak voltak, nem történtek reoxigenizációs, deoxigenizációs események. A választott oxigén koncentrációk terápiásan relevánsak, mivel a 10%-os, hipoxiás körülmény ismertén szubletális metabolikus és szignalizációs változásokat okoz a miokardiumban. A 30%-os, hiperoxiás körülmény pedig imitálja azt a gyakori helyzetet, amikor egy tüdőbeteg páciens légzését hordozható oxigénpalackkal támogatják. Fontos volt még továbbá, hogy a lineáris progresszió a megválasztott oxigén koncentrációk esetében lehetővé tegye a lineáris korrelációs vizsgálatokat a különböző szignalizációs folyamatokban.

Eredmények szerint, a hiperoxiás csoportban a redox egyensúly felborulása nem volt kifejezetten tapasztalható. Egy másik tanulmány során, patkányokat tartottak 24 óráig 14,4%, 20,9%, 35,5%, 39,8%, 62,5%, és 82,2% oxigén tartalmú légkörbe, ez követően szintén D-ROM teszttel vizsgálták a redox egyensúlyt. Vizsgálataikból kiderült, hogy >40% O<sub>2</sub> koncentráció oxidatív stresszt okozott. Ezzel összhangban vizsgálataink során mi sem tapasztaltunk jelentős eltérést a normoxia és a 30% O<sub>2</sub> tartalomú légkör között.

A hipoxia szignalizációs folyamatában részt vevő HIF transzkripciós faktorok  $\alpha$ - alegységét az oxigén szint közvetlenül szabályozza. Eredményeink azt mutatják, hogy a krónikus hipoxia (10% O<sub>2</sub>) indukálta a HIF-1 $\alpha$ -t, amely a szakirodalmi adatokból valószínűsíthetően összefüggésben van az emelkedett oxidatív stresszel. Hiperoxiás körülmények között azonban, mind a HIF-1 $\alpha$ , mind pedig a HIF-2 $\alpha$  szintje változatlan maradt. Egyéb kutatások is beszámoltak arról, hogy azoknál a patkányoknál, amelyek 3 héten át 50% O<sub>2</sub>-nek voltak kitéve, az expozíció első hétben mind a HIF-1 $\alpha$ , mind a HIF-2 $\alpha$  szintje megemelkedett az agyszövetben, majd

fokozatosan lecsökkent. Azoknál az egereknél pedig, amelyek 28 napig 30% O<sub>2</sub> tartalmú levegőt lélegeztek be, jelentősen megemelkedett a neuronokban a nukleáris HIF-2 $\alpha$ , ami nem volt oxidatív stresszhez kapcsolható. Újszülött patkányok szívét vizsgálva szintén érdekes eredmények láttak napvilágot, ugyanis 2 hét 60% O<sub>2</sub> és 95% O<sub>2</sub> kezelést követően a kifejezettebb hiperoxia hatására nőtt meg szignifikáns mértékben a HIF-1 $\alpha$  nukleáris transzlokációja, míg az alacsonyabb oxigén koncentráció hatására annak szintje változatlan maradt. Emellett Zara és kutatócsoportja azt is jelentették, hogy ugyanebben a kifejezett hiperoxiás csoportban az apoptotikus sejtek százalékos aránya is jelentősen megnövekedett, amely a ROS által közvetített membrán sérülésnek volt köszönhető. Mindezen szakirodalmi ismereteket és vizsgálatainkban alkalmazott kísérleti körülményeket figyelembe véve, ahol hiperoxia során nem találtunk releváns növekedést sem a HIF-1 $\alpha$ , sem pedig a HIF-2 $\alpha$  esetében valószínű, hogy a 30% O<sub>2</sub> koncentráció nem elegendő a HIF-ek indukálására a miokardiumban, vagy ahogy azt az agyszövetben kimutatták, a 4. hétre visszatért az eredeti szintre.

Az apoptózist, mint programozott sejthalált, sajátos morfológiai tulajdonságok és energiatfüggő biokémiai mechanizmusok jellemzik. Az apoptotikus sejtek zsugorodnak, felszínükről kisebb-nagyobb citoplazma darabok fűződnek le (bleb képződés), a kromatin állomány erősen kondenzálódik, a DNS töredezik és utóbb a mag is feldarabolódik. Számos eredmény utal arra, hogy a HIF-1 $\alpha$  is részt vesz az apoptózis folyamatának megindításában. Amikor az alveoláris epithelialis sejtek krónikus hipoxiának voltak kitéve, azokban túlzott mértékben megemelkedett a HIF-1 $\alpha$  szintje, amely fokozott apoptózist eredményezett. Közvetlen kapcsolatot mutattak ki a Bcl-2 alcsalád proapoptikus tagja a Nip3 és a HIF-1 $\alpha$  között is, amely valószínűleg a HIF-1 $\alpha$  közvetlen célgénje. Másrészt bizonyítást nyert az is, hogy hipoxia során a Bax-on keresztül indukálódik a HIF-1 $\alpha$ -függő p53 által közvetített apoptózis is. Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk alkalmazott kísérletes elrendezésben lineáris kapcsolat áll fenn a levegő

oxigén szintjének változása és az apoptózisra utaló Bax/Bcl-2 arány között. Mindemellett, az apoptózis egyik morfológiai sajátossága a DNS törés szintje jól korrelál hipoxiás körülmények között a HIF-1 $\alpha$  szintjével, mivel TUNEL vizsgálattal hipoxiás és hiperoxiás körülmények között is megnövekedett DNS törést tapasztaltunk, bár a TdT-pozitív sejtmagok száma fokozottabb volt hiperoxiát követően.

Gyakran ugyanabban a sejtben előfordul autofágia és apoptózis is, főleg olyan sorrendben, ahol az autofágia megelőzi az apoptózist. Ugyan az autofágiának fontos szerepe van a sejtek homeosztázisának fenntartásában, segíti az alkalmazkodást a különféle stresszhelyzetekhez, viszont a masszív autofágia sejthalált eredményezhet. H9c2 szívizomsejtekben akut (48 órás) hipoxiát imitáló körülmények között megemelkedett az apoptózis mértéke, autofagoszómák halmozódtak fel, és megnövekedett az LC3-II, Atg5 és Beclin-1 autofágiás markerek szintje is, valószínűsíthetően a BNIP3-on keresztül [86], mivel az megzavarja a Beclin-1 és a Bcl-2 fehérjék között lévő gátló kölcsönhatást. A ROS is az autofágia fontos aktivátora szívizomsejtekben a reperfüzió során, ezáltal a ROS megkötő vegyületek, növényi hatóanyagok megvédhetik a szívet az iszkémia/reperfüzió által bekövetkező sérülésektől, az autofágia szabályozásán keresztül. Western-blot eredményeiből kiderül, hogy a hipoxiás (10% O<sub>2</sub>) kezelés hatására megnövekedett a Beclin-1 fehérje szintje, ezáltal aktiválódott az autofágia folyamata. Tüdőepiteliális sejteken végzett vizsgálatok kapcsán pedig azt figyelték meg, hogy hosszantartó hiperoxia (95% O<sub>2</sub>, 72 óra) hatására megnövekedett az autofagoszómák képződése és az LC3B expressziója [91]. Az általunk végzett vizsgálatok során azonban a hiperoxiás (30% O<sub>2</sub>) csoportban nem változott az autofágiás folyamatot kezdeményező Beclin-1 szintje, továbbá egyik kezelt csoport esetében sem volt eltérés az LC3 és p62 fehérjék szintjében. Mivel az autofágiás fluxot nem mértük, nem tudunk végleges következtetést levonni a szívben lévő autofágia és a magas oxigén koncentráció között fennálló kapcsolatról. Viszont érdekes az a tény, hogy az általunk vizsgált hiperoxia során az

autofágia szintje nem változik, míg az apoptózis megemelkedik, így felmerülhet a kérdés a két folyamat szinkronizációját illetően. Korábbi megállapítások alapján lehetséges, hogy a Beclin-1-et az oxidatív stressz indukálja hosszabb, mérsékelt hipoxia (10% O<sub>2</sub>) esetén és ez okozhatja a Bax/Bcl-2 arány emelkedését, lehetőséget adva a szívizomsejteknek az alkalmazkodásra. Mindazonáltal, hosszantartó hiperoxiában (30% O<sub>2</sub>) az oxidatív stressz relatív hiánya miatt nem emelkedik a Beclin-1 szintje, ami fokozott DNS töréshez vezethet.

Vizsgálatunk kezdetén hagyományos Western-blotot alkalmaztunk. Meglepően tapasztaltuk, hogy a denzitometriai értékek normalizálására alkalmazott referencia fehérjék expressziós szintje jelentős ingadozást mutat. Ezt követően teljes fehérje alapú normalizálást alkalmaztunk, amely megerősítette a gyanút, hogy ezen háztartási fehérjék szintje is modulálódik az oxigén koncentráció függvényében. Eredményeink azt mutatják, hogy a hipoxiás (10% O<sub>2</sub>) kezelés hatására megnövekedik a vizsgált háztartási fehérjék expressziója. Ezzel a meglepő megfigyeléssel összhangban, humán szívizomban és más kísérletes körülmények között is tapasztalták már a GAPDH, az aktin és a tubulin jelentős változását. Továbbá, egér tüdőben, hiperoxia (90-95% O<sub>2</sub>, 1-3 nap) által kiváltott alveoláris károsodásban is vizsgálták már a háztartási fehérjék expressziójának változását, ahol a GAPDH mRNS szintje növekedett meg szignifikánsan. Az általunk bemutatott váratlan eredmények tehát azt sugallják, a háztartási fehérjékre normalizált adatokat óvatosan kell kezelni azokban a vizsgálatokban, ahol az egyik változó a belélegeztetett oxigén koncentrációja.

Eredményeinket összegezve tehát elmondhatjuk, hogy a hipoxiás körülmények között tartott állatok szívében az emelkedett oxidatív stressz és a HIF-1 $\alpha$  hatására, továbbá az általunk vizsgált túlélési útvonalak protektív jelenlétének hiányában, aktiválódott az autofágia és az apoptózis folyamata is. Érdekes módon a programozott sejthalál útvonal szintjében történt emelkedés mégis a hiperoxiás csoport esetében volt sokkal kifejezettebb, annak ellenére, hogy

sem az oxidatív stressz, sem pedig a HIF-1 $\alpha$  szintje nem emelkedett meg szignifikáns mértékben. Mindemellett, az is megfigyelhető, hogy a 30% O<sub>2</sub> tartalmú légkör hatására egyik autofágiás marker szintje sem változott meg. Így valószínűsíthető, hogy az autofágia folyamatának aktiválódása hiányában emelkedhetett meg ilyen jelentős mértékben (hipoxiához és normoxiához viszonyítva is) a DNS törés mértéke és a Bax/Bcl-2 aránya is a hiperoxiás csoportban. Azonban további vizsgálatok szükségesek annak érdekében, hogy megértsük az autofágia ez esetben is valószínűsíthető apoptózist antagonizáló hatását.

#### **IV.2. HO-1 indukáló szerek toxicitásának vizsgálata és hatása az autofágia folyamatára**

Másik kísérleti sorozatunkban H9c2 sejteken végeztünk vizsgálatokat és arra kerestük a választ, hogy milyen szerepe van autofágiának a hem toxicitásban szívizomsejteken. Az autofágián keresztül a szabad hemből eredő toxicitás terápiás lehetőséget adhat a hemolízis vagy különböző szívrendellenességek kezelése során, ahol kiterjedt a szabad hem képződése.

A hemoxigenáz-1 indukció, a hem toxicitás és az autofágia közötti kapcsolat még mindig nem egyértelmű a szívizomsejtekben. Jelenlegi vizsgálataink azt mutatják, hogy különböző HO-1 induktorok (hemin, CoPPIX) nagy koncentrációi (100  $\mu$ M) toxikus hatást gyakorolnak a H9c2 sejtekre. Az általunk tapasztalt toxikus hatást az autofágia hibás működése kíséri. Számos korábbi tanulmány jelezte, hogy a hemin különböző koncentrációi (0,1-1000  $\mu$ M) növelhetik a HO-1 expresszióját, azonban az alkalmazott koncentrációtól függően pozitív kimenetelű vagy citotoxikus hatás is lehetséges. A közelmúltban került publikálásra az a tanulmány melyben kimutatták, hogy a HO-1 indukálása 20  $\mu$ M CoPPIX-nel védte a szívizomsejteket a hipoxia/reoxigenáció ellen az apoptózis csökkentésén keresztül. Jelen vizsgálatunkban azonban magasabb CoPPIX koncentrációt alkalmaztunk, amely toxikusnak bizonyult. Amikor a szabad hem mennyisége meghaladja a detoxifikáló enzimek kapacitását a szabad hem toxikus hatást fejt ki, amely a ROS termelődése és gyulladás kialakulása okoz. Mint amire számítottunk is a kísérleteinkben alkalmazott különböző

hemin és CoPP<sub>IX</sub> koncentrációk koncentrációfüggő módon indukálták a HO-1-et. Ezzel párhuzamosan viszont a sejtek életképességének vizsgálata során ugyancsak koncentrációfüggő életképesség csökkenés mutatkozott. A szakirodalmi adatokkal összhangban pedig, mindkét magas koncentrációjú (100  $\mu$ M hemin és 100  $\mu$ M CoPPIX) csoportban megnövekedett ROS szintet mértünk. Így valószínűsíthető, hogy a vizsgálatok során alkalmazott kísérletes körülmények között a megemelkedett ROS szint hozzájárul a sejthalálhoz.

Számos kutatócsoport vizsgálta a HO-1 indukció és az autofágia folyamata közötti kapcsolatot különböző szövetekben. Lin és mtsai. Arról számoltak be, hogy a resveratrol indukálta HO-1 expressziójának növekedése fokozott neurotoxicitást eredményezett az emelkedett számú autofagoszómák kialakulásával. Emellett, a HO-1 fokozott expressziója a máj szepszise során adaptív válasz lehet az autofágia folyamatának aktiválódását eredményezi. Az autofágia szerepének megértése szívizomsejtekben új dimenziót nyithat a HO-1-et érintő vizsgálatokban. Az azonban lényeges, hogy az autofágia funkciója a szív- és érrendszerben a mai napig ellentmondásos. A folyamat vizsgálata során leggyakrabban alkalmazott fehérje az LC3B és a p62. Autofágia indukálása során rendszerint megnő a lipidált, aktív, feltehetően autofagoszóma asszociált LC3B-II szintje, ezzel párhuzamosan pedig a p62 szintje lecsökken. A p62 közvetlenül kötődik az LC3 és a GABARAP fehérjecsaldhoz és szelektíven lebomlik autofágia során. A fehérje felhalmozódik, amikor az autofágiát gátoljuk, viszont csökkent szintjét akkor is kimutatták mikor az oxidatív stressz indukálta az autofágiát. Továbbá a p62 szintje sejtekben, szövetekben akkor is megnövekedhet, amikor az autofágia folyamata károsodik, így felhasználható markerként az autofágiás flux tanulmányozására. Eredményeinkből is egyértelműen látszik, hogy az alkalmazott két HO-1 induktor aktiválja az autofágiát. Érdekes módon, a folyamat iniciációjáért felelős Beclin-1 szintje egyik indukáltszer esetében sem változott. Számos kutatás utal arra, hogy az autofagoszómák képződése Beclin-1 független útvonalon is megvalósulhat. Viszont, a magas

koncentrációjú indukáló szerekkel kezelt sejtekben mind az LC3B-II, mind pedig a p62 szintje megemelkedett. HO-1 indukálta autofágia esetében, már beszámoltak arról, hogy az autofágiás flux sérülhet. Ezen kutatás szerint HO-1 indukció alkalmával fokozott p62 szintet is kimutattak SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon, amely arra utal, ami esetünkben is lehetséges, hogy károsodott az autofágia folyamata. Az autofágiás flux további vizsgálatához a szívizomsejteket klorokine-nel is kezeltük, ami gátolja az autofágiát azáltal, hogy megakadályozza az autofagoszóma és a lizoszóma fúzióját. A fluoreszcens mikroszkópos képek és az áramlási citometriás eredmények azt mutatják, hogy a kontroll és a rapamycin kezelt szívizomsejtekben az autofagoszómák száma megnövekedett a klorokine hatására. Azonban Western blot adatainkkal összhangban, az autofagoszómák számát illetően, nem találtunk különbséget a magas koncentrációjú HO-1 induktorokkal kezelt csoportokban, a klorokine jelenlétében és hiányában, amely tovább erősíti azt a feltételezésünket, hogy a hibás autofágia hozzájárulhat a szívizomsejtek hemotoxicitásához.

Az autofágiát leíró kutatások arról is beszámoltak, hogy ezen útvonal mennyire fontos a sérült sejtorganellek eltávolításában, ellenben a folyamat sikertelensége vagy túlterheltsége esetén, ezek a sérült organellek/makromolekulák fokozhatják az apoptotikus sejthalált. Western blot analízisünk során vizsgáltuk az apoptózis szintjét is. Eredményeink azt mutatják, hogy a prokaspáz-3 fehérje szintje a magas koncentrációjú HO-1 induktorok hatására lecsökken, a hasított kaspáz-3 pedig megemelkedik. Így tehát a nagy mennyiségű hemin és CoPP<sub>IX</sub> a sérült autofágiás folyamat aktiválódása mellett indukálta az apoptózis programozott sejthalál útvonalát is.

Összességében elmondható tehát, hogy a magas koncentrációban alkalmazott HO-1 indukáló szerek (hemin és CoPP<sub>IX</sub>) túlzott mértékben fokozták a HO-1 expresszióját, és ez hemotoxicitást okozott a vizsgált H9c2 szívizomsejtekben, melynek hátterében valószínűleg a fokozott ROS szint, a hibás autofágia valamint az aktiválódott apoptózis állnak.

Kutatásaink eredményeit összegezve, rámutattunk arra, hogy megváltozott oxigén tartalmú légkörben tartott állatok esetében, valamint szívizomsejtek magas koncentrációjú HO-1 induktorokkal történő kezelése során is kapcsolat állhat fenn az autofágia és az oxidatív stressz indukálta változások kivédése között. A szívizomsejtek túlélésének biztosításához mindkét esetben szükség volna a megfelelően funkcionáló autofágia folyamatára, amely képes lenne kivédeni az emelkedett szintű apoptózis végzetes hatását. Így további feladatunk megtalálni annak okát, hogy miért nem megy végbe a teljes autofágiás folyamat; miért akad meg az “újrahasznosítás”, ezáltal lehetőséget adva a sejteknek az alkalmazkodásra, és miként tudnánk csökkenteni apoptózis súlyos hatásait.

## V. Összefoglalás

A munkám első felében vizsgáltuk a krónikus hipoxia és hiperoxia különböző szignalizációs folyamatokra gyakorolt hatását szívizomban. A 28 napon át tartó módosított oxigén tartalmú légkörben tartott állatok szívében korrelációs összefüggéseket tapasztaltunk az oxigén koncentráció változása és egyes útvonalak aktiválódása között. A redox egyensúly felborulása kifejezettebb volt hipoxiás, mint hiperoxiás körülmények között. A krónikus hipoxia (10% O<sub>2</sub>) indukálta a HIF-1 $\alpha$ , amely valószínűsíthetően összefüggésben van az emelkedett oxidatív stresszel. Hiperoxiás körülmények között azonban, sem a HIF-1 $\alpha$ , sem pedig a HIF-2 $\alpha$  szintje nem változott. Lineáris kapcsolat tapasztaltunk a levegő oxigén szintjének változása és az apoptózisra utaló Bax/Bcl-2 arány között, továbbá TUNEL vizsgálattal hipoxiás és hiperoxiás körülmények között is megnövekedett DNS törést detektáltunk, bár a TdT-pozitív sejtmagok száma fokozottabb volt hiperoxiát követően. Western-blot eredményeinkből kiderült, hogy a hipoxiás (10% O<sub>2</sub>) kezelés hatására megnövekedett a Beclin-1 fehérje szintje, ezáltal aktiválódott az autofágia folyamata, azonban az LC3B-II és p62 szintje is változatlan maradt, amely arra enged következtetni, hogy nem megy végbe a teljes folyamat. A módosított oxigén tartalmú levegő nem volt hatással az általunk vizsgált túlélési útvonalak aktiválódására. Azonban, eredményeink azt sugallják, hogy a belélegeztetett oxigén koncentrációjának változtatása hatással van a tubulin, az aktin és a GAPDH fehérjék szintjére is, amely felhívja a figyelmet a háztartási fehérjékkel történő normalizált adatokat óvatos kezelésére.

Tanulmányoztuk továbbá a magas koncentrációjú hemoxigenáz-1 indukáló szerek hatását is szívizomsejteken, keresve arra a választ, hogy a HO-1 magas expressziója milyen hatással van az autofágia folyamatára. Eredményeink alapján elmondható, hogy a hemin és CoPP<sub>IX</sub> koncentrációfüggő módon csökkentette a H9c2 sejtek életképességét. A legmagasabb koncentráció, mindkét indukáló szer esetében, megközelítette vagy el is érte a toxikus IC<sub>50</sub>-es

értéket. Továbbá, a hemin és CoPP<sub>IX</sub> esetében is sikeres és koncentrációfüggő HO-1 expresszió emelkedést tapasztaltunk. Az általunk vizsgált két indukáló szer 100 µM-os koncentrációban szignifikánsan emelte a ROS szintjét, amely jelentős mértékű oxidatív stresszre utal, és ez egy magyarázat lehet a sejtek életképességének csökkenésére. Eredményeinkből egyértelműen látszik, hogy a 100 µM hemin és CoPP<sub>IX</sub> Beclin-1 független útvonalon aktiválja az autofágiát. A szignifikánsan magasabb LC3B-II és p62 expressziós szintje a kezelt csoportokban azonban megkérdőjelezi a folyamat teljességét. Ezen eredményeinket alátámasztva, a 100 µM hemin és CoPP<sub>IX</sub> mellett klorokinél is kezeltük a szívizomsejteket és Cyto-ID Green festéssel vizsgáltuk az autofágiás flux változását. Mikroszkópos és áramlási citometriás kísérleteink is támogatták azon feltételezésünket, hogy a toxikus koncentrációjú hemin és CoPP<sub>IX</sub> emelkedett, ám funkcióját veszített autofágiát indukálnak. Az autofágia mellett tanulmányoztuk az apoptózis szintjét is. Vizsgáltuk a pro-kaspáz-3-at, amely expressziójának csökkenése az apoptózis emelkedésére enged következtetni. Eredményeink alapján a magas koncentrációjú HO-1 indukáló szerek okozta sejtoxicitás az emelkedett oxidatív stresszből, a nem megfelelően funkcionáló autofágiából és a magas szintű apoptózisból eredhet.

## **IX. Köszönetnyilvánítás**

Legmélyebb hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Lekli Istvánnak, aki áldozatos munkájával, támogatásával és folyamatos iránymutatásával lehetővé tette az értekezés alapjául szolgáló és az azon túl végzett kísérletes munkáim elvégzését. Nemcsak szakmai mentorként számíthattam rá az elmúlt évek során, hanem egy életre szóló mintául is szolgál emberi példamutatásával. A Debreceni Egyetemen töltött éveim során Ő gyakorolta a legnagyobb hatást emberi- és szakmai fejlődésemre.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Tószaki Árpád Professor Úrnak, aki lehetősége adott, hogy bekapcsolódjak a tanszékén végzett kutatásokba, továbbá lehetővé tette, hogy kutatási eredményeimet számos színvonalas hazai és nemzetközi konferencián bemutathassam. Köszönöm, hogy bármikor szakmai tanácsra volt szükségem időt szánt rám. Továbbá köszönettel tartozom témavezetőmnek és Professor Úrnak azért is, hogy mindvégig stabil anyagi háttérrel biztosítottak a vizsgálatok elvégzésére.

Köszönöm milánói kollaborátorainknak Michele Samaja Professor Úrnak és Laura Terraneanak, hogy Velük dolgozhattam. Hálás vagyok, hogy kinn tartózkodásom alatt mindvégig támogattak szakmai iránymutatásukkal és biztatásukkal, melynek eredményeként közös publikációm születhetett és azt doktori értekezésemhez is felhasználhattam.

Köszönettel tartozom volt és jelenlegi munkatársaimnak Dr. Bak Istvánnak, Dr. Czompa Attilának, Dr. Csépanyi Evelinnek, Czeglédi Andrásnak, Zilinyi Ritának, dr. Szőke Kittinek és Szabados- Fürjesi Péternek, Berczi-Kun Enikőnek, Kalmár Andreának és Füzesi Tibornak, dr. Fésűs Adinának hogy munkájukkal, szakmai támogatásukkal hozzájárultak eredményeimhez, valamint barátságukkal és humorukkal segítették a hosszú munkaórák átvészelését.

Szeretném megköszönni szerzőtársaimnak Paola Bianciardinak, Dr. Fenyvesi Ferencnek,

Dr. Fejes Zsoltnak, Bekéné Debreceni Ildikónak és Dr. Nagy Bélának, hogy értékes munkájukkal és észrevételeikkel emelték a kutatásunk színvonalát.

Köszönettel tartozom barátaimnak, kiemelve Gajtkó Andreának, aki barátságával és támogatásával a legnehezebb időszakokban is mellettem állt, a sikeres pillanatokban pedig velem örült.

Végül, de nem utolsó sorban, kiemelt köszönetemet fejezném ki Édesanyámnak, Nagyszüleimnek, a családom minden tagjának, akik egész tanulmányaim során hittek bennem, lelkesítettek és nyugodt családi háttérrel biztosítottak a munka elvégzéséhez.

Az értekezés elkészítését a GINOP- 2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)" című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. További támogatások: Campus Mundi (Tempus Közalapítvány), „Nemzet Fialal Tehetségeiért Ösztöndíj" NTP-NFTÖ-16 és Nemzeti Kiválóság Program: TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001.



Nyilvántartási szám: DEENK/158/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gyöngyösi Alexandra  
Neptun kód: FV726O  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10047921

### **A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények**

1. **Gyöngyösi, A.**, Szőke, K., Fenyvesi, F., Fejes, Z., Bekéné Debreceni, I., Nagy, B. J., Tósaki, Á., Lekli, I.: Inhibited autophagy may contribute to heme toxicity in cardiomyoblast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 511 (4), 732-738, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.140>  
IF: 2.559 (2017)
2. **Gyöngyösi, A.**, Terraneo, L., Bianciardi, P., Tósaki, Á., Lekli, I., Samaja, M.: The Impact of Moderate Chronic Hypoxia and Hyperoxia on the Level of Apoptotic and Autophagic Proteins in Myocardial Tissue. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018, 1-12, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/5786742>  
IF: 4.936 (2017)





**További közlemények**

3. Czompa, A., Szőke, K., Prokisch, J., **Gyöngyösi, A.**, Bak, I., Balla, G., Tósaki, Á., Lekli, I.: Aged (Black) versus Raw Garlic against Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Complications. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (4), 1-13, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041017>  
IF: 3.687 (2017)
4. Czompa, A., **Gyöngyösi, A.**, Szőke, K., Bak, I., Csépanyi, E., Haines, D. D., Tósaki, Á., Lekli, I.: Effects of Momordica charantia (Bitter Melon) on Ischemic Diabetic Myocardium. *Molecules.* 22 (3), 488, 2017.  
IF: 3.098
5. Czompa, A., **Gyöngyösi, A.**, Czeglédi, A., Csépanyi, E., Bak, I., Haines, D. D., Tósaki, Á., Lekli, I.: Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 64 (5), 412-419, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.000000000000132>  
IF: 2.135

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,415**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
7,495**

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, 2019.04.16.

