

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Gyöngyösi Alexandra**

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

**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen  
2019**

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**Gyöngyösi Alexandra**

**Témavezető: Dr. Lekli István**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen  
2019**

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	5
I. Bevezetés .....	7
II. Irodalmi áttekintés .....	10
II. 1. Iszkémiás szívbetegségek .....	10
II. 2. Az oxidatív stressz és annak hatása a szívre .....	11
II. 3. Hipoxia és hiperoxia hatása a szívre .....	13
II. 4. Hipoxia és hiperoxia modellezése .....	14
II. 5. Az autofágia és szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben .....	17
II. 6. Hipoxia és hiperoxia hatása az autofágiára .....	23
II. 7. Hemoxigenáz-1 .....	24
II. 8. Hem toxicitás .....	33
II. 9. HO-1 és az autofágia kapcsolata .....	34
II. Célkitűzések .....	36
IV. Anyagok és módszerek .....	37
IV. 1. Kísérleti állatok és kezelési protokoll .....	37
IV. 2. Hemoglobin szint meghatározás .....	38
IV. 3. Oxidatív stressz meghatározása D-ROMs teszttel .....	39
IV. 4. DNS törés meghatározása immunfluoreszcens festéssel .....	39
IV. 5. Fehérje izolálás .....	40
IV. 6. Western blot analízis hagyományos és Stain-Free gélekkel .....	41
IV. 7. Sejttenyésztés .....	43
IV. 8. Hemin és CoPP <sub>IX</sub> oldatok elkészítése .....	43
IV. 9. Kezelési protokoll .....	44
IV. 10. Sejt életképességi vizsgálat .....	44
IV. 11. Oxidatív stressz szintjének vizsgálata DCF módszerrel .....	45
IV. 13. Cyto-ID festés .....	46
IV. 14. Statisztikai analízis .....	47
V. Eredmények .....	48
V. 1. Mérsékelt, krónikus hipoxia és hiperoxia hatásának vizsgálata egér szíven .....	48
V. 1. 1. Testtömeg változása a kezelést követően .....	48
V. 1. 2. A vér hemoglobin szintjében bekövetkezett változások .....	49

V.	1. 3. Oxidatív stressz mértékének meghatározása .....	50
V.	1. 4. Eltérő oxigén tartalmú levegő hatása a hipoxia szignalizációjára .....	52
V.	1. 5. Kezelés hatása a DNS fragmentálódás mértékére, valamint az apoptózis markerek szintjére.....	53
V.	1. 6. Különböző O <sub>2</sub> tartalmú levegő hatása a túlélési útvonalak aktiválására .....	55
V.	2. HO-1 indukáló szerek toxicitásának vizsgálata és hatása az autofágia folyamatára. ....	60
V.	2. 1. HO-1 indukáló szerek hatása a H9c2 szívizomsejtek életképességére.....	60
V.	2. 2. Magas koncentrációjú HO-1 indukáló szerek hatása az oxidatív stressz mértékére.....	61
V.	2. 3. HO-1 szint meghatározása a kezeléseket követően .....	63
V.	2. 4. A magas koncentrációjú hemin és CoPP <sub>IX</sub> hatása az autofágia folyamatára...63	
V.	2. 5. Magas koncentrációjú hemin és CoPP <sub>IX</sub> kezelés hatása az apoptózis aktiválódására .....	67
V.	Megbeszélés .....	69
VI.	Összefoglalás .....	77
VII.	Summary .....	79
VIII.	Főbb megállapítások .....	80
VIII.	1. Mérsékelt, krónikus hipoxia és hiperoxia vizsgálata egér szíven.....	80
VIII.	2. HO-1 indukáló szerek toxicitásának vizsgálata és hatása az autofágia folyamatára. ....	80
IX.	Irodalom jegyzék .....	81
X.	Tárgyszavak .....	95
XI.	Köszönetnyilvánítás .....	96
XII.	Függelékek .....	98

## Rövidítések jegyzéke

3-MA	3-metiladenin
AMPK	AMP-activated protein kinase
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
Atg	autophagy-related proteins
ATP	adenozin trifosz
Bach1	BTB and CNC homology 1
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bax	Bcl-2 associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3 interakting-domain death agonist
BNIP3	Bcl-2 adenovirus E1B nineteen-kilodalton interakting protein 3
b-ZIP	basic leucine-zipper
CAD	koszorúér betegség (coronary artery disease)
CH	krónikus hipoxia
CHA	krónikus hipoxia levegőztetéssel
CNC-bZIP	cap'n'collar/ basic-leucine zipper
CoPP <sub>IX</sub>	kobalt-protoporfirin
FADD	Fas associated death domain
FePP <sub>IX</sub>	vas-protoporfirin
FoxO3	forkhead box O3
GSH	glutation
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén-peroxid
HBO	túlnyomásos oxigén terápia (hyperbaric oxygen therapy)
HIF	hipoxia-indukálta transzkripció faktor
HO/HO-1	hemoxigenáz/hemoxigenáz-1
IH	időszakos hipoxia
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1

LC3-PE	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-phosphatidylethanolamine
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MI	miokardiális infarktus
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NOS	NO-szintáz
Nrf2	nuclear factor-like 2
PHD	prolil-hidroxiláz
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
ROS	reaktív oxigén származék
SnPP <sub>IX</sub>	ón-protoporfirin
SOD	szuperoxid-diszmutáz
SP-C	surfactant protein C
StRE	stressz-érzékeny szekvencia elem
TNF $\alpha$	tumor-nekrózis factor alfa
TNFR-1	tumor-nekrózis faktor receptor 1
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
ULK	unc-51-like kinase
VHL	von-Hippel-Lindau-féle tumorszupresszor
Vsp34	vacuolar protein sorting 34
XO	xantin-oxidáz
ZnPP <sub>IX</sub>	cink-protoporfirin

## I. Bevezetés

Az egyre sikeresebb gyógyszeres és intervenciós kezelések ellenére világviszonylatban továbbra is a kardiovaszkuláris betegségek jelentik a vezető halálokat. A kardiovaszkuláris halálozás és a kardiovaszkuláris kockázati tényezők számának szempontjából Magyarországot az európai országok 'élmezőnyében' helyezhetjük el [1].

A keringési rendszer betegségeit előidéző rizikófaktorok többek között a magas vérnyomás, a magas koleszterinszint, a cukorbetegség és a dohányzás. Emellett, a keringéssel összefüggő leggyakoribb haláloknak az iszkémiás szívbetegségek és a cerebrovaszkuláris betegségek (agyérbetegség) számítanak. Az iszkémiás szívbetegségek háttérében álló ateroszklerózis kialakulása elkezdődhet már akár gyermekkorban, és évekig, évtizedekig tünetmentesen fejlődhet tovább. Amennyiben ezt időben felismerik, a rizikófaktorok eliminálásával, életmódváltással, szükség esetén gyógyszeres kezeléssel megelőzhető, kezelhető a betegség. A kardiovaszkuláris prevenció célja tehát a kardiovaszkuláris mortalitás és morbiditás csökkentése [1].

A 2010-es évek elején a WHO célul tűzte ki a négy legtöbb áldozatot követelő, nem fertőző betegség (szív- és érrendszeri betegségek, diabetes mellitus, krónikus obstruktív légúti betegségek és daganatok) okozta halálozás 25%-kal való csökkentését 2025-re.

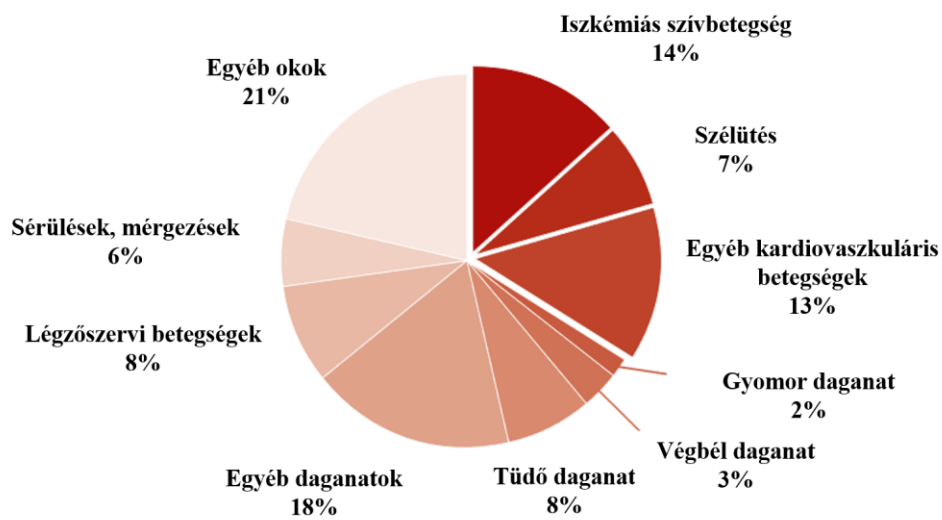
Az EUROSTAT adatai alapján, 2015-ben az EU 28 tagállamában 5,21 millió haláleset történt, melyből 1,9 millió esetben valamilyen szív- és érrendszeri betegség volt a kiváltó ok. Az iszkémiás szívbetegség standardizált halálozási aránya Litvániában, Lettországon, Magyarországon és Szlovákiában volt a legmagasabb (2014-ben a 100 000 lakosra jutó halálozások száma ezen országok esetében meghaladta a 350-et), míg ez az arány Franciaországban, Spanyolországban, Portugáliában, Benelux államokban, Dániában és Olaszországban, illetve Norvégiában és Svájcban volt a legalacsonyabb (itt 100 000 lakosra kevesebb, mint 100 ilyen halálozás jutott). Az iszkémiás szívbetegségek miatti halálozási arány minden uniós tagállamban

következésként magasabb volt a férfiak körében [1].

Ezen lesújtó statisztikai adatok alapján leszögezhető annak ténye, hogy az elmúlt évtizedek jelentős eredményei ellenére, melyek a szív- és érrendszeri betegségek gyógyítása és megelőzése terén születtek, még mindig kihívást jelent a kardiovaszkuláris betegségek számának csökkentése. Fontos feladatunk tehát alapkutatás szinten is a szív- és érrendszeri betegségek vizsgálata, lehetőséget adva a patomechanizmusok pontosabb megértésére, a háttérben zajló és a betegségek alapját képező molekuláris biológiai folyamatok feltérképezésére, valamint új prevenciók kezeléseinek kifejlesztésére, esetlegesen új támadáspontú gyógyszerek kifejlesztésére.

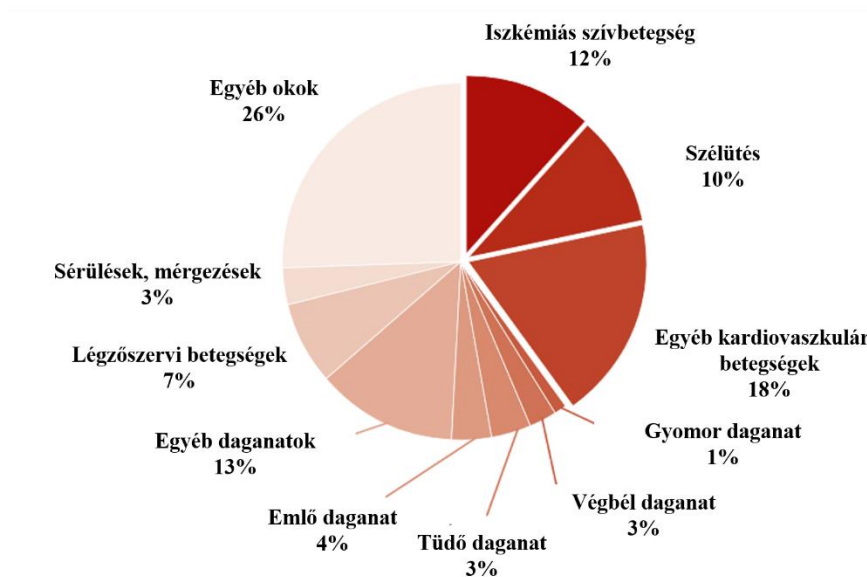
A

### Halálok – Férfiak esetében



B

### Halálok – Nők esetében



1. ábra: Legfőbb halálokok (A) férfiak és (B) nők esetében az Európai Unió tagországaiban a *European Cardiovascular Disease Statistics 2017 Edition* adatai alapján.

## II. Irodalmi áttekintés

### II. 1. Iszkémiás szívbetegségek

A modern világunkban évtizedek óta szembe kell néznünk a magas, sőt egyre növekvő számú kardiovaszkuláris megbetegedéssel, amely még ma is több ember halálát okozza, mint a rákos megbetegedések. A szív- és érrendszeri betegségek egyik fő típusa az iszkémiás szívbetegségek, melyek olyan kórállapotok, amelyek kialakulásában a szívizom elégtelen vérellátása játszik szerepet. A fejlett országokat egészségügyi és gazdasági szempontból is nyomasztja a kardiovaszkuláris betegségek okozta probléma. Olyan törekvésekkel lehetne ezeket megoldani, melyek során prevenciós stratégiák kerülnének kifejlesztésre. Ilyen például azon szűrő vizsgálatok általános bevezetése és elterjedése, melyek a hajlamosító tényezők korai felismerésével és megszüntetésével kezelhetővé vagy mérsékelhetővé tennék a problémát.

Az iszkémiás szívbetegség klinikai megjelenési formái között megkülönböztetünk stabil angina pectorist, instabil angina pectorist, „néma iszkémiát”, szívizom infarktust, iszkémiás eredetű szívelégtelenséget, valamint iszkémia eredetű hirtelen szívhalált. Mindezek hátterében a szívizom oxigénellátása és oxigénigénye közötti egyensúly felborulása áll.

A szívizom iszkémia a kontrakció és relaxáció zavarához, az előterhelés növekedéséhez, a diasztolés térfogat és a végdiasztolés nyomás növekedéséhez vezet. Mindezek okán a kamrafal feszülése nő, a kamrai compliance romlik, melyek az oxigénigény további növekedését eredményezik.

Iszkémia során számos metabolikus változás történik. Fokozódik az anaerob metabolizmus és az ATP-szint csökkenése miatt lecsökken az intracelluláris pH is. Elégtelenné válnak olyan aktív transzport mechanizmusok, mint a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz és a  $\text{K}^{+}$ -ATP-áz működése, fokozódnak a  $\text{Na}^{+}$ - $\text{H}^{+}$  és  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  cseretranszportok, melyek együttes hatására növekszik az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -

koncentráció. A reaktív oxigén származékok (ROS) által megnövekszik az oxidatív stressz szintje, amely számos gyulladáshoz vezető mediátor termelődését okozza, mindezek pedig különböző proteázok aktiválásán keresztül a pumpafunkciók zavarát, aritmiákat végül nekrozist és apoptózist eredményeznek a miokardiumban.

Az iszkémiás szívbetegség kezelésére elsősorban olyan gyógyszerek alkalmasak, amelyek az oxigénigény és az oxigénellátás között felborult egyensúlyt képesek helyreállítani. Mindezen gyógyszerek kifejlesztése során fontos volt a háttérben zajló molekuláris folyamatok tisztázása. További, hatékonyabb gyógyszeres terápia, valamint új preventív eljárások kifejlesztése érdekében a patomechanizmusok még alaposabb, új szempontokról történő tanulmányozása elengedhetetlen.

## **II. 2. Az oxidatív stressz és annak hatása a szívre**

A szívizomzat oxigén és tápanyagellátása életbevágóan fontos, ugyanis a szív az élet során folyamatosan működik, és energiaigényét csak oxigén jelenlétében képes megfelelően kielégíteni. Mivel a szív aerob anyagcserét folytat, az emlős szervek közül a legnagyobb oxigénigénnyel rendelkezik. Az oxigénnek azonban összetett szerepe van a legtöbb szervben, így a szívben is. Többek között részt vesz a NO termelődésében, amely kulcsfontosságú egyebek között az érrendszer tónusának, és a szív kontraktilitásának meghatározásában. Emellett fontos szerepe van ROS termelésében is [2]. A ROS fő termelője a mitokondrium, ahol szuperoxid-anion, hidrogén-peroxid és hidroxil gyökök képződnek. A szuperoxid aniont a szuperoxid diszmutázok (SOD-k) enzimatikusan alakítják át hidrogén peroxiddá ( $H_2O_2$ ). A szívben és egyéb szövetekben még olyan mechanizmusok hatására is alakulhatnak ki reaktív oxigéngyökök, mint a xantin-oxidáz (XO), NAD(P)H-oxidázok, citokróm-p450 azáltal, hogy a katekolaminok autooxidációja és az NO-szintáz (NOS) szétkapcsolása történik [3]. Mindezek előnyös szignálútvonalakban vehetnek részt,

vagy épp ellenkezőleg visszafordíthatatlan sejtkárosodásokat és sejthalált idézhetnek elő. Az, hogy melyik történik, a szervezet belső egyensúlyán múlik. Normál, fiziológias körülmények között a ROS termelődése és eltávolítása endogén antioxidánsok által egyensúlyban áll [2]. Az antioxidánsok olyan anyagok, melyek késleltetik vagy gátolják a szubsztrát oxidációját. Ilyen endogén antioxidáns rendszer például a glutation (GSH) és a SOD [4, 5]. Oxidatív stressznek nevezzük, ha ez az egyensúly felborul az oxidánsok „javára”, és károkat okoz a szervezetben. Számos tanulmány számolt be arról, hogy a GSH raktárak kimerülése DNS-fragmentálódást [6], apoptózist [7] vagy nekrozist vált ki.

A szívbetegségek egyik vezető oka a szívkoszorúerek megbetegedése (CAD), amely a szívizom károsodása és nekrozis következtében alakul ki. A ROS fontos szerepet játszhat a CAD kialakulásában és annak progressziójában [8, 9]. A ROS emelkedett szintje továbbá hozzájárulhat az oxidált LDL kialakulásához az erek falában, amely legfőképp az ateroszklerózis patogenezéséhez járul hozzá [10]. Akut miokardiális infarktus (MI) esetében is igazolták, hogy a megnövekedett ROS szerepet játszik a szöveti nekrozis és a reperfüziós sérülések kialakulásában [11, 12]. Mindemellett bizonyították, hogy a ROS jelátvitel erősen érintett a szív hipertrofiájának kifejlődésében [13]. A szívizomsejtek apoptózisa előfordulhat hipertrofiás, iszkémiás szívben és összeköthető a szívelégtelenség progressziójával. Kísérletes bizonyítékok utalnak arra, hogy a ROS számos mechanizmus által indukálhatja az apoptózist [13, 14].

Ismeretes, hogy az ionáramok megfelelő működése elengedhetetlen fontosságú a normál szív működés szempontjából. Bizonyítékok vannak arra, hogy a ROS hatással van az ioncsatornák működésére. A reaktív oxigén származékok célzottan károsíthatják az L-típusú kalcium csatornákat a szarkolemmán és elnyomhatják a kalcium áramot [15]. Képesek megváltoztatni továbbá a kardiális nátriumcsatornákat, a káliumcsatornákat, és a nátrium-kalcium kicserélődést, így csökkentik a szív kontraktilitását és a miofilamentumok kalciumérzékenységét [16, 17].

## II. 3. Hipoxia és hiperoxia hatása a szívre

A megnövekedett (hiperoxia) és csökkent (hipoxia) oxigén szint érzékelése speciális kemoreceptorok segítségével történik, melyek szabályozzák a szív- és érrendszert, valamint a légzést. Az oxigénkínálat csökkenése, amely a hipoxia kialakulásához vezet, jelentkezik az egész szervezet szintjén (generalizált hipoxia) vagy érinthet egyes szöveteket (szöveti hipoxia). A vaszkuláris simaizom sejtek jóvoltából hipoxia során a pulmonális vazokonstriktió egy gyors válaszreakció, amely a tüdőartériákban, a vénákban és a kis ellenállású artériákban alakul ki. Egy vagy több típusú  $K^+$  csatorna gátlása indítja el, melyek a membránpotenciált állítják be. Ez a depolarizáció aktiválja a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornákat, melyek növelik a citoszol kalcium szintjét, majd a vaszkuláris simaizom kontrakcióját okozzák [18]. A hipoxiás vazodilatáció a másik gyors reakció, mely növeli a hipoxiás szövet perfúzióját. Ez különösen jellemző a koszorúerekre és az agyi erekre. Az értágulást részben a vaszkuláris simaizom sejtek  $K_{ATP}$  csatornái közvetítik, amit az ATP hipoxia által kiváltott csökkenése okoz [19].

Ezen kívül minden maggal rendelkező sejt képes érzékelni az oxigén koncentrációt. A többi oxigén érzékeny ionmechanizmus valószínűleg a  $Ca^{2+}$  beáramlást szabályozza. Oxigénhiány esetén képesek percekben belül reagálni a már létező fehérjék aktiválásán, vagy krónikusan, órák múlva a gének transzkripciós szabályozásán keresztül. A hipoxia elleni védekezés a hipoxia indukálta transzkripciós faktoron (HIF) keresztül történik, amely az eritrocitózist, az angiogenezist, a glükóz metabolizmust, valamint a sejtproliferációt, túlélést stimuláló géneket aktiválja, és ezáltal védi a hipoxiás szöveteket. A HIF- $\alpha$  konstitutívan átíródik és a citoplazmából a sejtmagba transzlokálódik. Három izoformáját azonosították: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ . A HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  strukturálisan és funkcionálisan hasonló, míg a HIF-3 $\alpha$  esetében a COOH-részről hiányoznak a transzaktivációs struktúrák, és alternatív szerepet játszik a hipoxia indukálta gén expressziójának negatív szabályozójaként [20].

Normoxiás körülmények között a HIF-1 gyors proteaszómális degradáción esik át, féléletideje meglehetősen rövid, megközelítőleg 5 perc. Ennek oka az, hogy a transláció után közvetlenül hidroxilálják a PHD-k (prolil-hidroxiláz enzimek), majd kapcsolódnak a von-Hippel-Lindau-féle (VHL) tumorszupresszor fehérjékhez. A kötődést követően a poliubikvitinációjuk kezdődik meg, majd a proteaszómális degradációjuk [21]. Ezzel szemben a szövetek oxigén tenziójának csökkenésekor stabilizálódnak, mert a PHD-k inaktiválódnak, majd a sejtmagba transzlokálódnak, egy szupermolekuláris komplexet hozva létre, amely a DNS-hez kötődve [22] közel 60 különféle fehérjét szabályoz azáltal, hogy mennyisége jelentősen megemelkedik.

A szív- és érrendszeri megbetegedések gyakran társulnak miokardiális iszkémiával vagy elégtelen vérellátással. Ez nemcsak a tápanyaghiányt, az anyagcsere energiaellátásával kapcsolatos „üzemanyaghiányt” jelenti, hanem az alacsony oxigén kínálat miatt, hipoxia okozta iszkémiás sérüléseket is. A kontraktilis rendszerek, az energiaellátás és a kereslet egyensúlyának megteremtésével alkalmazkodnak az ATP raktárak kimerüléséhez. Azonban Allen és munkatársai is leírták, hogy abban az esetben, ha a szükséges oxigénellátás korlátozva van, gyors ATP kimerülés, intracelluláris kalcium túlterhelés jelentkezik, sejtpusztulás és nekrozis következik be [23].

#### **II. 4. Hipoxia és hiperoxia modellezése**

Érdemes tisztázni, hogy a hipoxia fogalmát széles körben használják. Annak érdekében, hogy ez ne okozzon zavart, megkülönböztetünk háromféle hipoxiás modellt. Krónikus hipoxia (CH) során az oxigénellátás és az oxigénigény közötti egyensúlyhiány folyamatosan fennáll. Ennek a lehetősége áll fenn nagy magasságban, krónikus obstruktív tüdő- és vesebetegségek esetén, anémia vagy CO mérgezés során, vagy ha krónikusan csökkent a szövetek perfúziója [24]. Egy második modellt a váltakozó hipoxiás modell (IH), amely során hosszabb vagy rövidebb

intervallumokban áll fenn a hipoxiás egyensúlyhiány. Ez a modell jól szemlélteti az obstruktív alvási apnoe, a sarlósejtes anémiás válságok klinikai képét [25]. Krónikus hipoxia levegőztetéssel (CHA) a két előző modell közé helyezhető, jól szemlélteti az az állatkísérletes modell, amikor az állatokat hipoxiás kamrákban tartják, de bizonyos időközönként (takarítás, etetés idejére) ezt megszakítják és reoxigenizációs események történnek. A CHA modell ezáltal segítségünkre lehet az iszkémia/reperfúziós károsodás különböző megnyilvánulásainak vizsgálata során, vagyis poszt-iszkémiás kontraktilis diszfunkció és aritmiák kialakulása esetén is [26].

Számos *in vivo* és *ex vivo* tanulmányt terveztek meg ezek tükrében. Hipoxiás körülményeket képesek előidézni műtéti eljárásokkal, melyek során megakadályozzák a teljes vér oxigenizációját a tüdőben. Technikailag olyan hipoxiás kamrák (az oxigén szint szabályozhatóságának köszönhetően hiperoxiás kamrák is) kerültek kifejlesztésre ahol CHA, vagy CH körülmények között is tarthatóak az állatok. A beépített oxigénszint mérőnek köszönhetően folyamatosan monitorozható a levegő összetétele. Kutatások is folytak, melyek összehasonlítják ezen hipoxiás körülmények hatásait. Milano és *mtsai*. például azt vizsgálta, hogy CH ( $FO_2=0,1$ , 15 napon keresztül) és CHA (+ 1 óra levegőztetés naponta) kamrákban tartva hogyan változik a szívizom toleranciájának mértéke. Eredményeik alapján, a CH-szívek magasabb végdiasztolés nyomást, és magasabb érrendszeri rezisztenciát mutatnak, mint az IH. [27]. Corno és munkatársai kutatásaik során azt tapasztalták, hogy a szív/testtömeg aránya, a jobb/bal kamrák aránya, a miokardiális hipertrófia, valamint a jobb kamra hipertrófia mértéke hasonlóan alakult CH és CHA körülmények között. Azonban a jobb kamrai nyomás magasabbnak bizonyult CH-t követően, mint a CHA kezelések után [28]. Egy későbbi tanulmányban, Farahani és társai újszülött egereket tartottak CH ( $FO_2=0,11$ , 4 héten keresztül) és IH (4 perc  $FO_2=0,11$  + 4 perc levegőztetés) kamrákban. Ez esetben a CH nagyobb mértékben gátolta az állatok növekedését valamint a szív/testsúly arányát, melynek okát a sejtek hipertrófiájában feltételezik [29].

CH miokardiumban ismerték fel annak tényét, hogy a HIF-1 $\alpha$  szintje lassabban tér vissza a normoxiás szintre, míg agyban, izomban és vesében magasabb szintről is hamarabb képes stabilizálódni [30]. Sok esetben vizsgálták a HIF-1 $\alpha$  és az apoptózis közötti kapcsolatot is. Az elmúlt évek tanulmányai alapján kettős kép rajzolódik ki ez esetben is. Az azonban kijelenthető, hogy az anti- vagy proapoptikus útvonalak előfordulása nagyban függ a hipoxia okozta sérülés súlyosságától. CH esetén döntően a proapoptotikus útvonalak aktiválódnak a HIF-1 $\alpha$  hatására [31-33], míg IH esetén a szív adaptálódását segítő antiapoptotikus (Bcl-xL, Bcl-2) fehérjék szintje emelkedik meg [34, 35]. Még napjainkban is kevésbé feltárt terület a hiperoxia hatása a szívre, annak ellenére, hogy az oxigén terápia sok esetben nyújt segítséget olyan állapotokból történő felépüléshez, amelyek oxigénhiányhoz kapcsolódnak. Oxigénterápia során vagy rövid idejű oxigén belélegeztetéssel igyekeznek ellensúlyozni az oxigénhiányt a vérben és/vagy a szövetekben, vagy hosszú távon a krónikus légzési rendellenességek esetén [36]. A másik lehetőség a túlnyomásos oxigén terápia (HBO). Ez esetben a páciens 100% oxigénnel lélegeztetik (>1 atm), amely szintén segít a hipoxiával szemben azáltal, hogy növeli a plazmában oldott oxigén szintjét [37].

Tanulmányok számoltak be arról, hogy a hiperoxia érösszehúzóást okozhat, növeli a mikrocirkulációs heterogenitást, mely által veszélyeztetheti a perfúziót és így a tényleges oxigén szállítást [38, 39]. A hiperoxia emellett fokozza az oxidatív stressz mértékét [40] és a bypass műtétekhez társult szervkárosodás egyik okát, a szisztémás gyulladáshoz vezető válasz szindrómát. Olyan súlyos állapotok után, mint az iszkémiás szívbetegség, a stroke vagy a szívmegállás, a hiperoxia fokozott morbiditást és mortalitást eredményez [41]. Mindezek mellett vazokonstriktív ingere a hiperoxia rövid távú expozíciójának csökkentette patkányokban iszkémia-reperfúziós károsodásokat [42].

Érdekes módon, szívbetegségben szenvedő pácienseknél a súlyos hiperoxia ( $\text{PaO}_2 > 40$  kPa) csökkentette a túlélési rátát, addig mérsékelt hiperoxia esetén ( $\text{PaO}_2 > 13.3-40$  kPa) javította a

páciensek státuszát 14 óra elteltével. A hiperoxia által fokozott oxidatív stressz [43] és gyulladás [44] jelentősen befolyásolhatja a szív- és érrendszer teljesítményét. A hiperoxia által kiváltott vazokonstrikció [45], a paraszimpatikus aktivitás, a direkt negatív inotróp hatása, az elnyújtott szív relaxáció, a már említett miokardiális mikrocirkulációs vazokonstrikció, valamint a fokozott iszkémai/reperfúziós sérülés azt eredményezhetik, hogy nő a szív utóterhelése, csökken a szívfrekvencia, a verőtérfogat [46, 47], azáltal a perctérfogat és a kontraktilitás [47].

Tehát mind a hipoxia, mind pedig a hiperoxia esetében megfigyelhető, hogy minél kisebb mértékben tér el a normoxiás körülményektől, annál kevésbé terheli a szívet, azáltal, hogy káros és sokszor kivédhetetlen szignalizációs útvonalak aktiválódnak.

## **II. 5. Az autofágia és szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben**

Az autofágia az evolúció során konzerválódott folyamat, a sejtek önemésztő mechanizmusa, amely dinamikus és magasan szabályozott. Kulcsszerepet játszik a fehérje aggregátumok, a hosszú életidejű fehérjék, valamint a felesleges vagy sérült sejtorganellek eltávolításában, az intracelluláris homeosztázis fenntartása érdekében [48].

Három fajtáját különböztetjük meg: makroautofágia, mikroautofágia és chaperon mediált autofágia. Mikroautofágia során a lizoszóma membránja betüremkedik, majd a kialakult hólyag és citoplazma tartalma lefűződik, és így közvetlenül a lizoszóma belsejébe jutnak a citoplazma komponensek. A chaperon mediált autofágia szelektíven képes degradálni olyan fehérjéket, amelyek egy bizonyos pentapeptid motívumot (KFERQ) tartalmaznak. Ezeket a fehérjéket egy chaperon komplex ismeri fel és a lizoszómába juttatja egy specifikus lizoszóma-membránfehérjén keresztül. A makroautofágia (innenről csak autofágia) mennyiségileg és minőségileg a legjellemzőbb. Jellegzetessége a *de novo* kialakuló kettős membránnal rendelkező vakuólum, más néven autofagoszóma, amely a származását tekintve nem teljesen ismert fagofór vagy más néven

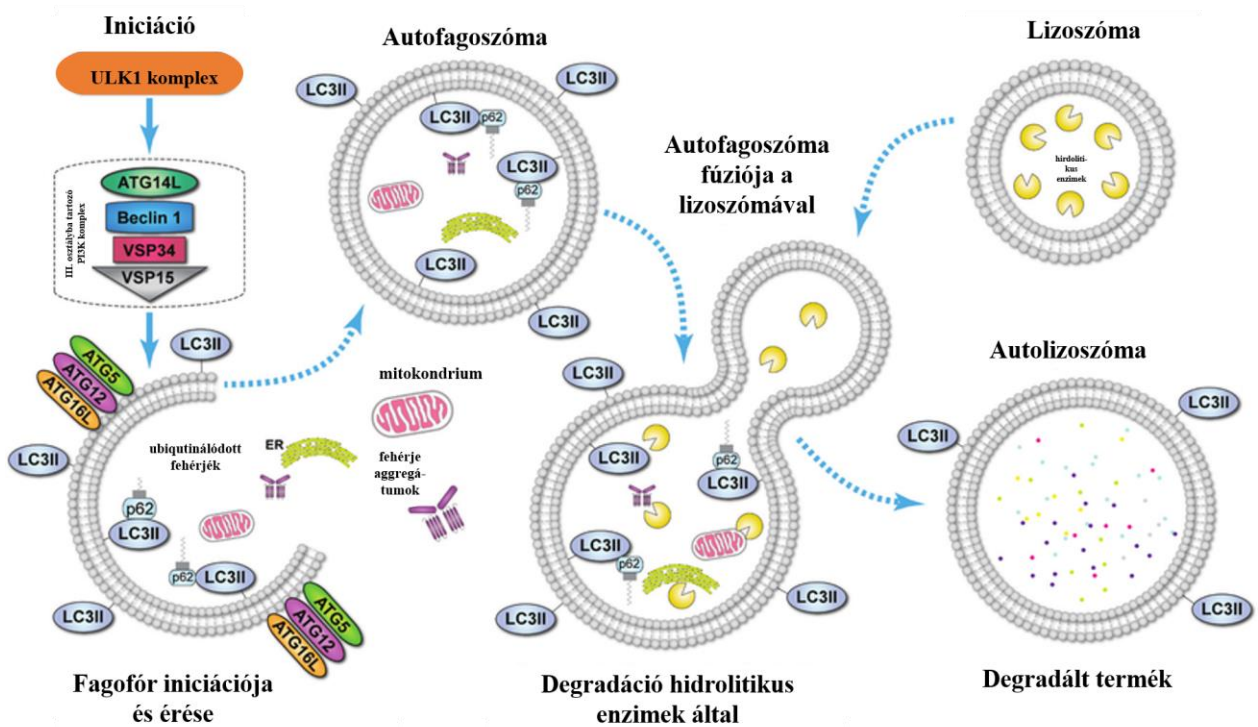
izolációs membránból fejlődik ki. A folyamat során (2. ábra) az izolációs membrán megnyúlását követően, az autofagoszóma érését, majd annak fúzióját egy lizoszómával figyelhetjük meg, és így alakul ki a degradációt végző autolizoszóma. A kettős membrán belső része a bekebelezett citoplazma komponensekkel együtt lebontásra kerül a lizoszóma savas hidrolázai (peptidázok, lipázok, nukleázok, glikozidázok) által fehérjékre, lipidekre, nukleinsavakra és szénhidrátokra, majd ezek újrahasznosításra kerülnek. Az ezekből származó tápanyagok alternatív tápanyagforrást biztosítanak a sejt számára, ezáltal elengedhetetlen a túléléshez [49].

A folyamat szelektív módon is végbemehet, mivel számos olyan fehérje ismeretes, melyek receptorként szolgálnak az autofágiás degradációhoz. Az említett receptorok először kapcsolódnak a lebontásra jelölt fehérjékhez és sejt szervecskékhöz (leggyakrabban a mitokondriumhoz), ezt követően pedig a keletkező izoláló membrán bizonyos komponenseihez. Ezáltal a sejtalkotók specifikusan kerülnek az autofagolizoszóma belsejébe lebontásra. Egyik legismertebb formája a mitofágia, amely a már említett károsodott mitokondriumokat specifikusan és tömegesen bontja le [50].

Az autofágia molekuláris mechanizmusáról és szabályozásáról a folyamat felfedezését követően hosszú évekig semmit sem tudtak. Ennek egyik oka, hogy az autofagoszómák és az autolizoszómák mindössze néhány mikrométer átmérőjű vezikulumok [50]. Az 1990-es években sikerült az elektronmikroszkópos azonosításon túl, fénymikroszkóp segítségével az autofágiás struktúrákat egyesjtű élesztőben azonosítani. Ezt felhasználva néhány év alatt számos, az autofágiában szerepet játszó (Atg) gént azonosítottak élesztőkben [51]. Kezdetben, magasabb rendűekben ezeket a géneket a nukleotid sorrendjüket összehasonlítva keresték, mivel a szekvenciális hasonlóság funkcionális konzervációban is megnyilvánul. Az Atg géneket funkciójuk alapján négy főbb csoportba sorolhatjuk: az indukciót szabályozó gének, az izoláló membrán növekedését szabályozó gének, az Atg8 konjugációt szabályozó gének és az

újrahasznosítást szabályozó gének. A folyamat fontos szabályozó komplexe emlősökben a TOR génen található két komplex: az mTORC1 és mTORC2. Növekedési faktorok, aminosavak, glükóz és egyéb tápanyagok segítik a mTORC1 működését, míg különböző stressz hatások gátolják azt [52]. A két komplexet Raptor és Rictor alegységek jelenléte határozza meg. A glükóz hiánya vagy hipoxiás körülmény hatására aktiválódik az AMPK [53, 54], amely hatására defoszforilálódik vagyis gátlódik az mTORC1 és az autofágia indukálódik. Az ULK-komplex (ULK1 vagy ULK2, Atg13, Atg101, FIP200) aktiválódása mellett az Atg9 szállít vezikulákat a létrejövő fagofór struktúrához. Az autofágia indukcióját a III. osztályú PI3K/Vps 34 és Beclin-1 (Atg6) komplex aktiválása okozza, amely az izolációs membrán kialakulását eredményezi, majd felveszi és magához kapcsolja az Atg fehérjéket (2. ábra) [55]. Az Atg12- Atg5 és az LC3-PE (microtubule associated protein light chain 3-phosphatidylethanolamine) vesz részt az izoláló membrán érésében. Az Atg12 kovalensen konjugálódik az Atg5 fehérjéhez, majd az Atg12 aktiválódik az ubiquitin-aktiváló E1 enzim (Atg7) által, és áttevődik az ubiquitin-konjugáló E2 enzimre (Atg10). Az Atg10 felszabadul, amikor az Atg12 kovalensen kapcsolódik az Atg5 lizin maradékához. Az Atg12-Atg5 ezután kötődik az Atg16-hoz, és ez a trimer komplex kapcsolódik az izoláló membrán külső membránjához, amely elengedhetetlen az LC3 felvételéhez és a membrán megnyúlásához. Az LC3 LC3-I-re konvertálódik az Atg4 cisztein-proteáz által. Az LC3-I aktiválódik az Atg7 által és átkerül az Atg3-ra majd kovalensen konjugálódik a PE-csoporttal. Az LC3-II-PE pedig Atg5-függő módon transzlokálódik az autofagoszóma membránra. A p62 az autofágia szubsztrátja, azaz szállítmány, amelyet az autofágia aktivitás riportereként is használnak. Ez a fehérje juttatja el az ubiquitinált fehérjéket a proteaszómához lebontásra. Ezen kívül a sejtmag és a citoplazma között ubiquitinált „rakományokhoz” kötődhet, és elősegíti a sejtmagi és citoszólikus fehérjék minőségének ellenőrzését. Szintje lecsökken az autofágia indukálásakor, viszont felhalmozódik ha

az autofágia gátlódik vagy hibásan működik, ezáltal használatos az autofágiás flux vizsgálatára [56].



2. ábra: Autofágia folyamat ábrája a résztvevő markerekkel A. Ndoye et. al 2016. alapján. Részletek a szövegben.

Az eukarióta sejtekben az autofágia konstitutíven alacsony szinten előforduló „háztartási” folyamat, de fokozottan aktiválódhat külső stresszorok (pl. éhezés [57], hormonális egyensúlyhiány [58], oxidatív stressz [59]) és belső igények (pl. fehérje aggregátumok eltávolítása) hatására. Az autofágia a szervezet adaptív válasza a kialakult körülményekre és patológias folyamatokra [60]. Számos bizonyíték utal arra, hogy az autofágia nem megfelelő működése szívbetegséghez (szívizom hipertrofia [61], kardiomiopátia [62], szívelégtelenség [63]), daganatos megbetegedésekhez [64], és neurodegeneratív rendellenességekhez (Alzheimer-kór, Parkinson-

kór) [65] is társul, ezek mellett szerepet játszik a fejlődésben, az öregedésben [66] és az immunitásban [67] is.

Normál vagy enyhén stresszes körülmények között az autofágia sejtvédő mechanizmusként bont le és hasznosít újra olyan citoplazma komponenseket, mint például hosszú életidejű fehérjék vagy organellumok, és a már említett szelektív úton eltávolítja a sérült mitokondriumokat [68]. A sérült mitokondriumok olyan proapoptotikus faktorokat szabadítanak fel, mint például a citokróm-c [69], és az autofágia folyamata így képes megakadályozni az apoptózis aktiválódását [70]. Emellett egy másik útvonalon, a Beclin-1 fehérje overexpressziója által csökken a Bax aktivitása, és ezáltal képes az autofágia kivédeni az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásokat a szív HL-1 sejtjeiben [71].

Számos tanulmány központi témáját képezte az elmúlt évtizedekben, hogy a szívszövetben miként változik meg az autofágia folyamata iszkémia/reperfúzió során. Kezdetben olyan kutatási eredmények láttak napvilágot, amelyek arról számoltak be, hogy magzati egér szív szervtenyészetben indukálódik az autofágia, ha hipoxiás körülmények mellett a glükóz hozzáférést is megvonjuk és ezt követően reperfúziót indukálunk [72]. Később Decker és *mtsai.* azt találták nyúl szívben, hogy 20 perces iszkémia nem változtatja meg az autofágia szintjét [73]. Habár már hosszabb idejű iszkémia (40 perc) az autofagoszómás vakuólumok számának növekedését okozza, és ez tovább emelkedik reperfúzió során. Így valószínűsíthető, hogy az iszkémia és a reperfúzió is indukálja az autofágia folyamatát. Továbbá Gurusamy és *mtsai.* 30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió után két autofágiás marker, a Beclin-1 és LC3B-II expresszió fokozódását tapasztalták [74]. Szintén emelkedett autofágiát és lizoszómális aktivitást tapasztaltak sertés szívben hat periódus iszkémiás prekondíciót követően [75].

Azonban az autofágia funkcionális szerepe a szívben jelenleg is intenzív vizsgálatok alatt áll, mind *in vitro*, mind *in vivo*. Kutatócsoportunk is vizsgálta korábban a reperfúzió során

megjelenő kamrafibrilláció és az autofágia kapcsolatát. Eredményeinkből kerdült, hogy azokban az egér szívekben, melyekben a reperfúzió elején kamrafibrilláció alakult ki, szignifikánsan megemelkedett a Beclin-1 szintje és az LC3B-II/LC3B-I aránya, viszont a Bcl-2 szintjében nem volt változás a nem fibrillálókhhoz képest [76]. Érdekes módon, számos tanulmány arról is beszámolt, hogy az autofágia szintjének fokozódása a szívben sejthalált is okozhat. Tanulmányok számoltak be arról, hogy a fokozott autofágia iszkémia/reperfúzió során hozzájárul a sejtek pusztulásához [77]. Aki és *mtsai.* kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a glükóz megvonást követően jelentős mértékben megnövekedett az autofágia és a sejthalál szintje is, majd a 3-metil-adenin (3-MA), az autofágia inhibitora csökkentette a sejtek pusztulásának mértékét. Az eredményeik tehát azt sugallják, hogy az autofágia hozzájárult a sejthalálhoz [78]. Egy másik tanulmány szerint azonban, ha gátoljuk az autofágia folyamatát a Beclin-1 downregulációja vagy 3-MA által, az csökkenti a szívizomsejtek pusztulását iszkémia/reperfúzió során [79]. Matsui és *mtsai.* egér szívek *in vivo* vizsgálata során emelkedett szintű autofágiát tapasztaltak már 20 perc iszkémiát követően, és az eredményeiből az is kiderül, hogy az autofagoszómák száma a reperfúzió során tovább emelkedett. Az autofagoszómák akkumulálódása iszkémia vagy iszkémia-reperfúzió során nagy valószínűséggel a lizoszómális degradáció hiányának tulajdonítható. Összehasonlítva az autofágia és az apoptózis megjelenésének idejét, vizsgálataik során az derült ki, hogy az autofágia folyamata az elsődleges és akut iszkémia során energiát termel és ezáltal védi a szívet, míg krónikus iszkémia vagy reperfúzió során a sérült organelumokat távolítja el, mely hátrányos is lehet, mivel sejthalált idézhet elő, akkor is ha más programozott sejthalál útvonal nem aktiválódik [80]. Az azonban még a mai napig nem ismert, mikor és hogyan dől el, hogy a fokozott autofágia protektív vagy káros hatásokat eredményez. Kutatások arról is beszámoltak, hogy BNIP3-indukált autofagoszómák a szívizomsejtekben sok esetben tartalmaznak fragmentálódott mitokondriumokat, amely arra utal, hogy autofágia által eltávolításra kerülnek azok a sérült

mitokondriumok, amelyek tovább fokozták a ROS-indukált ROS termelődést [70]. Döntő szerepe van az autofágia és az apoptózis között fennálló kapcsolatnak is. Rendkívül fontos a Beclin-1 és Bcl-2 közötti egyensúly [81].

Tudományos munkák jelentek meg arról is, hogy az autofágia folyamata Beclin-1-től független útvonalon is aktiválódhat. Egy neurotoxin neuroblasztóma sejtekben [82], míg a rezveratrol mellrákos sejtvonalban volt képes Beclin-1-től független útvonalon aktiválni az autofágiát [83]. Tian és kutatócsoportja pedig HeLa sejteken vizsgálták. Egy olyan új vegyületet tanulmányoztak, amely a Bcl-XL/Bcl-2-t gátolja, és meglepő módon, a Beclin-1 fehérjét is gátolva, indukálta az autofágiát az apoptózis megjelenése nélkül. Ebben az esetben autofagoszóma akkumuláció volt megfigyelhető, ami jól korrelált a vegyület által indukált sejthalállal [84].

## **II. 6. Hipoxia és hiperoxia hatása az autofágiára**

Néhány kutatás alapját képezte az elmúlt években annak vizsgálata, hogy különböző sejtekben, szövetekben hogyan változik az autofágia szintje hipoxiás és/vagy hiperoxiás körülmények között. Feng és munkatársai H9c2 és újszülött patkány kamrai szívizomsejteken végeztek kísérleteket. Ezen kísérletes elrendezésben a hipoxiás körülmények 48 órán keresztül 95% N<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> tartalmú levegőt jelentett, míg a normoxiás 21% O<sub>2</sub>, 74% N<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>-t. Eredményeik szerint a hipoxia időfüggő módon indukálta az autofágiát és az apoptózis folyamatát. További vizsgálatokat végeztek, hogy megértsék az autofágia gátlásának van-e hatása az apoptózisra. A vizsgálatok során kiderült, hogy a gátolt autofágia hatására tovább emelkedett az apoptózisra utaló Tunel-pozitív sejtek száma. Ezen eredmények háttérében a Forkhead box O3 (FoxO3)-indukálta BNIP3 (Bcl-2 adenovirus E1B nineteen-kilodalton interakting protein 3) expresszió változását valószínűsítik [85].

Egy másik vizsgálatban szintén H9c2 sejteket tartottak hipoxiás körülmények között (5%

CO<sub>2</sub>/95% sejttenyésztő inkubátor levegője) 24 órán keresztül. Eredményeik alapján a rövidebb expozíciós idő hatására is, a HIF-1 $\alpha$  overexpresszióján keresztül indukálódott az autofágia, és megemelkedett az LC3, Atg5, Atg7 és Beclin-1 fehérjék szintje [86].

Humán endotheliális sejtek (EAhy926) esetében is a hipoxia (1% O<sub>2</sub>- 94% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) idő-függő módon aktiválta az Beclin-1/PI3K-mediált és MAPK-független autofágia folyamatát. Eredményeik szerint az autofágia gátolta a hipoxia apoptózis indukáló hatását, melyben terápiás lehetőséget látnak a tumorsejtekkel szemben [87].

Zhang és kutatócsoportja újszülött Wistar patkányokat tartottak hiperoxiás (90% O<sub>2</sub>) kamrákban, valamint MLE-12 egér alveoláris II-es típusú epitheliális sejtjeit tenyésztették 80% O<sub>2</sub> tartalmú levegőben. Vizsgálatuk eredményeként elmondható, hogy hiperoxia hatására időfüggő módon megemelkedik az Atg7 expressziója, amely a JNK jelátviteli útvonalon keresztül okozza az SP-C (Surfactant protein C) felhalmozódását alveoláris II-es típusú epitheliális sejtjeiben. Ezen autofágiás útvonal gátlása új terápiás lehetőséget nyújt a hiperoxiás tüdőkárosodások esetében [88].

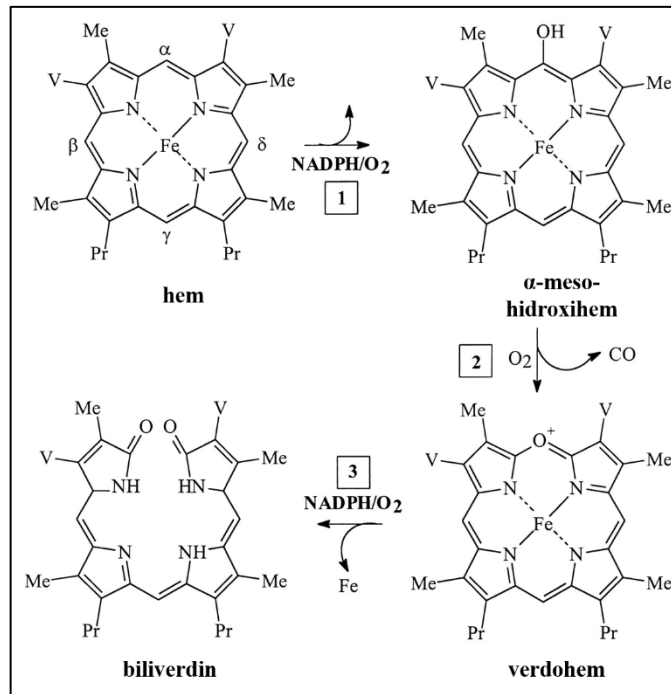
Tanaka és *mtsai.* vizsgálatai során C57BL/6 egerek voltak kitéve hiperoxiás (95% O<sub>2</sub> és 5 % N<sub>2</sub>) körülményeknek 72 órán keresztül, amely időfüggő módon megnövelte az LC3B fehérje szintjét az állatok tüdejében. Mind az egerek tüdejében, mind pedig a vizsgált hámsejtékben 24 órás expozíciót követően megnövekedett az autofagoszómás vakuólumok száma is. Eredményeikből az is kiderül, hogy az emelkedett LC3B szint protektív hatással van a sejtek apoptotikus elhalásával szemben [89].

## **II. 7. Hemoxigenáz-1**

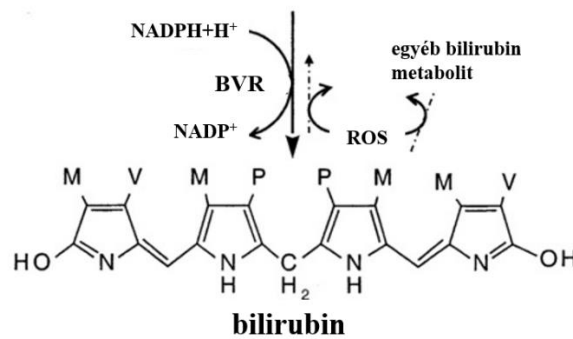
A hemoxigenázok (HO) az evolúció során konzerválódott enzimek, melyek a hem, vagyis a vas-protoporfirin (FePP<sub>IX</sub>) lebontásának első és sebesség meghatározó lépését katalizálják. A

hem, a hemoproteinek (pl. hemoglobin, mioglobin) prosztetikus csoportját képezi, amely egy porfirinvázból és egy központi vas (Fe(II)) atomból áll. A porfirinvázat négy piroldgyűrű alkotja, amelyeket metin hidak kötnek össze. A hemoxigenáz-aktivitás kulcsfontosságú anyagcsere funkciót jelent. Oxidáció során az enzim a hem  $\alpha$ -metin hídjait hasítja [90]. A teljes folyamathoz három oxigén molekula és hét elektron szükséges, melyek a NADPH-citokrómp450-reduktáztól érkeznek. A NADPH jelenlétében a gyűrűben lévő vas redukálódik, és így egy hidroperoxid intermedier keletkezik. Majd ez a hem gyűrű  $\alpha$ -metin hídjának szénatomját hidroxilálja, így átalakul a hem  $\alpha$ -mezo-hidroxihemmé. Az  $\alpha$ -mezo-hidroxihem könnyen reakcióba lép az oxigénnel, és így képez másik két oxidációs lépésen keresztül verdohemet és szén-monoxidot (CO). A verdohem végül oxigén molekula és a NADPH-citokrómp450-reduktáz jelenlétében biliverdin-IX $\alpha$ -vá alakul és emellett szabad vas keletkezik. A keletkezett biliverdin-IX $\alpha$ -t a biliverdin-reduktáz redukálja bilirubin-IX $\alpha$ -vá, míg a felszabadult vas-ionok egy részét a ferritin tárolja [91-93].

**A**



**B**



**3. ábra:** A hem lebontásának folyamata. A. panel: a hemoxigenáz által katalizált reakciósor. B. panel: a biliverdin reduktáz által katalizált reakciósor.

Emberben és rágcsálókban három HO izoformát azonosítottak, HO-1 (~32 kDa), HO-2 (~36 kDa) és HO-3 (~33 kDa) melyeket a HMOX1, HMOX2 és HMOX3 gének kódolnak [94-96]. A HMOX1 és HMOX2 gén termékei az elsődleges aminosav szekvenciában és biokémiai, biofizikai tulajdonságokban különböznek [97]. A HO-1 expressziója indukálható, bár fiziológias

körülmények között a legtöbb szövetben alacsony szinten fordul elő, kivéve a lépet, amely fontos szerv a hemoglobin és a vörösvérsejtek lebontása szempontjából. Oxidatív stressz esetén gyors indukálhatóságának köszönhetően eliminálja a szabad hemet és így számos útvonalon keresztül képes csökkenteni a szabad hem prooxidáns hatást [98]. Ezzel ellentétben a HO-2 nem indukálható, konstitutívan expresszálódik bazális körülmények között a legtöbb emberi szövetben, beleértve a heréket, a lépet, a májat, a veséket, a szív- és érrendszert, valamint az idegrendszert. Ez is rendelkezik katalitikus aktivitással, de oxidatív mechanizmusokra nem tud mennyiségi növekedéssel reagálni [97]. A HO-3-at patkányban azonosították, de még ma is kevés információ áll rendelkezésünkre erről az izoformáról [96]. Kutatások arról is beszámoltak, hogy a HO-1 és HO-2 expressziója és aktivitása nemi függést is mutat. Nőstény patkányokban szignifikánsan magasabb expressziót és aktivitást mutattak ki mindkét fehérje esetében [99].

A legfrissebb tanulmányok szerint a HO-1 lokalizálódhat a plazmamembránban [100], a mitokondriumban [101] és a sejtmagban is [102]. A HO-1 sejtmagi formája potenciálisan transzkripciós szabályozó funkcióval bír [102]. A HO-1-et kódoló gén transzkripciója valamint a fehérje szintézise a sejtek általános válasza a stresszre [103, 104]. Magán a szubsztráton túl, még számos stimulusra indukálódhat a fehérje expressziója. Ilyenek a nitrogén-monoxid (NO), citokinek, nehézfémek, hormonok, növekedési faktorok, oxidánsok, extrém oxigén koncentrációjú környezet (anoxia, hipoxia, hiperoxia), iszkémiás/reperfúziós sérülések és ultraibolya sugárzás [105]. Ezek közül valamennyi az oxidatív stressz ellen, védekező mechanizmusként indukálja a HO-1-et [104], például a nukleáris faktor eritroid 2-höz kapcsolódó faktor-2 vagyis Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2)-n keresztül [106].

A HO-1 szabályozása, néhány kivételtől eltekintve, transzkripciós szinten történik, hipoxia [107] vagy acidózis [108] során viszont mRNS szintű stabilizáció jellemző. Továbbá a HO-1 enzimatis aktivitása szabályozható, például hiperoxia esetén [109]. Az oxidatív stressz

különböző formái a HMOX1 gén transzkripcióján keresztül a HO-1 indukciójával növelik a hem-katabolizmus sebességét [110]. A HMOX1 gén promoterén három szabályozó régiót ismerünk, amelyekhez a transzkripciós faktorok kötődhetnek: a transzkripció iniciációs pontjától egy proximálisan és kettő disztálisan helyezkedik el [111]. Jelenlegi ismereteink alapján, a HO-1 gén aktiválódásában fontos szerepet játszanak a különböző transzkripciós faktorok stressz-érzékeny szekvencia elem (stress-response element-StRE) egységekhez való kötődése. Ilyen faktorok a p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1 és Bach2, amelyek a basic-leucine zipper (b-ZIP) fehérje szupercsalád és Cap'n'collar/ basic-leucine zipper (CNC-bZIP) alcsalád tagjai. A Bach1 fehérje (~82 kDa) egy transzkripciós represszor molekula, mely normál körülmények között a HO-1 promoter StRE-ekhez kötődve gátolja a génátíródást [112], azonban hem jelenlétében ez a gátlás megszűnik. Specifikus kötőhelyekhez kapcsolódva a fehérje konformáció változását okozza, így a Bach1-StRE kapcsolat megszűnik [113]. A Bach1 eliminálódik a sejtmagból, majd proteolitikus útvonalon lebontásra kerül [112]. Oxidatív stressz hatására a ROS a Bach1 szulfhidril csoportjait oxidálhatja, így meggátolva a fehérje kötődését a StRE régiókhoz, ezt követően a Bach1 kijut a sejtmagból és lebontódik [114]. A Bach1 eltávolítását követően a transzkripció olyan pozitív regulátorai kötődnek a StRE régiókhoz, mint az Nrf2. Oxidatív stressz esetén Keap1-el komplexet alkotva a cisztein régiói érzékelik a megváltozott redox környezetet. A Keap1 szerkezete megváltozik, mely hatására stabilizálódik az Nrf2, majd transzlokálódik a sejtmagba. A nukleáris áthelyeződés következtében az Nrf2 heterodimerizálódik a Maf és Jun b-ZIP transzkripciós faktorokkal, majd az StRE régióhoz kapcsolódik, és segíti az antioxidáns enzimek génátíródását [115]. A HO-1 transzkripciója olyan indukálható faktorok hatására is szabályozható, mint például a hipoxiás körülmények között aktiválódó hipoxia-indukált-faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) [116] és a gyulladáskeltő és toxikus anyagok által aktivált NF- $\kappa$ B [117].

A HO-1 központi szerepét a vaszkuláris és szöveti homeosztázisban jól szemlélteti a humán

HO-1 hiányának esete, amely az egyén halálát okozta még a felnőttkor elérése előtt. A beteg emiatt tartós hemolitikus anaemiától szenvedett, amely során az eritrociták fragmentálódtak és intravaszkuláris hemolízis alakult ki. Fokozott volt a szérumban a haptoglobin és alacsony a szérumban a bilirubin szintje. Rendellenességet mutatott a véralvadási rendszere, amely az emelkedett thrombomodulin és von Willebrand faktorról összefüggésben, súlyos és tartós endothel károsodást okozott [118]. A HO-1 génnel nem rendelkező (*Hmox1*<sup>-/-</sup>) egerek vizsgálata szintén alátámasztotta, hogy a HO-1-nek fontos szerepe van a stresszre adott válaszokra, valamint a vas-homeosztázisban [119, 120]. Továbbá, a *Hmox1*<sup>-/-</sup> egerekből származó endotél sejtek érzékenyebbek voltak a prooxidáns ingerekre, mint például a hem vagy hidrogén-peroxid által kiváltott citotoxicitásra, valamint több ROS-t termeltek az ilyen ingerekre [120]. Krónikus hipoxia során a *Hmox1*<sup>-/-</sup> egerek jobb kamrai tágulást és szívinfarktust szenvedtek a vad típusú egerekhez képest, melyeknél nem alakult ki semmiféle szívbetegség [121]. Számos tanulmány HO-1 transzgenikus egerekkel igyekezett alátámasztani a HO-1 által közvetített védekező mechanizmusokat. Például kardialis, humán HO-1 túlzott expressziója megvédte a transzgenikus egereket a I/R okozta károsodásuktól [122], továbbá javította reperfüzió után a funkcionális regenerációt és csökkentette az apoptózis szintjét [123]. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatok során azt tapasztalta, hogy az infarktusz terület mérete 20 perc iszkémiát és 120 perc reperfüziót követően szignifikánsan csökken HO-1 transzgenikus egerek szívében, míg HO-1 KO egerekben szignifikánsan emelkedik, a vad típusú állatokhoz képest [124].

Azáltal, hogy a HO-1 védi a sejteket a fizikai, kémiai és biológiai stressztől [125], valamint HO-1 termékei is védelmi effektor molekuláknak tekinthetők, a fehérje expressziójának indukálása farmakológiai módszerekkel hozzájárulhat újabb terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez. A HO-1 előnyös indukcióját azonban meg kell különböztetni a toxikus hem koncentrációk által okozott stressz választól, amelyek hem toxicitást okozhatnak. Fontos tényező azonban az is, hogy vannak

olyan vegyületek, amelyek *in vitro* indukálják a HO-1-et sejtekben, de *in vivo* hatástalanok [126].

A HO-1 szintézisének fokozása történhet számos citotoxikus szerrel, szulfhidril reagensekkel, hidrogén-peroxiddal, tumor promoterekkel, nehézfémekkel, ultraibolya A (UVA: 320-380 nm) sugárzással [103, 127]. Azok az anyagok, amelyek oxidatív stresszt indukálnak, a ROS termelés révén, indukálják a HO-1 gént is. Emellett, számos növényi komponenst azonosítottak az elmúlt évtizedekben, melyek indukálják a HO-1-et, protektív mechanizmusokat aktiválva. Ezek között szerepel a kurkumin [128, 129], a rezveratrol [130, 131], a ginkgo biloba extraktum [132], valamint a kutatócsoportunk által vizsgált meggy mag őrlemény összetevői is [133]. Továbbá a hem prekursorai a metalloporfirinek, melyek a vas helyett más központi fématomot tartalmaznak, szintén a HO-1 indukáló szerekként működnek [134]. Másrészt, a SnPP<sub>IX</sub> és a ZnPP<sub>IX</sub> indukálhatják a HO-1 transzkripcióját, de kompetitíven gátolhatják is azt, *in vivo* és *in vitro* körülmények között is [135]. Paradox módon a CoPP<sub>IX</sub> *in vivo* körülmények között képes indukálni a HO-1-et, viszont *in vitro* enzim inhibitornak bizonyult, amely hatás az alkalmazott koncentrációtól függ [135, 136]. A molekuláris oxigénnel nem lépnek kapcsolatba a nikkell- és mangán-protoporfirinek, ezek nem szubsztrátjai az enzimnek, viszont kompetitíven képesek gátolni a működését [137]. A protoporfirin is képes önmagában aktiválni a HO-1-et, viszont csak kizárólag meghatározott hullámhosszú fényel történő fotoaktivációt követően [138].

A HO-1 citoprotektív hatását először Tyrrell és kollégái írták le, ugyanis humán fibroblaszt tenyészetben azt tapasztalták, hogy a HO-1 expressziójának indukálása adaptív citoprotektív válaszreakciót vált ki oxidatív stressz hatására [139, 140]. Nem sokkal később Balla és munkacsoportja ugyanezt találta endothel sejtenyészetben [110]. Ezt követően számos tanulmány készült a pontos hatásmechanizmusok feltérképezése érdekében. Kiderült, hogy a HO-1 megvédi a sejteket az apoptózissal szemben [141]. A TNF $\alpha$ , lymphotoxin vagy Fas számos olyan jelátviteli útvonalat indítanak el, mint például a kaszpázok, vagy a cisztein-proteázok aktiválása. A kaszpáz

aktiválás felelős az apoptózisért, a programozott sejthalál egyik típusáért, valamint annak főbb biokémiai és morfológiai eseményeiért, mint a sejtek zsugorodása, a mitokondriális diszfunkció, a kromatin kondenzáció és a DNS fragmentáció [142, 143]. A FADD (Fas-associated death domain) és kaszpáz-8 komplexbe történő felvétele elősegíti a kaszpáz-8 aktiválódását, amely kiváltja a külső és/vagy belső apoptotikus utak aktiválódását. A külső útvonal az effektor kaszpázok, mint kaszpáz-3 aktiválódásával jár, míg a belső útvonal további mitokondriális amplifikációs hurok aktiválását vonja maga után, bevonva a Bid (BH3 interakting domain) valamint a Bcl-2 család tagjait (Bax és Bak) is. Ezután a citokróm-c kötődik az Apaf-1 (apoptotic peptidase-activating factor-1) fehérjéhez, amely az apoptoszóma kialakulásához vezet és aktiválja a kaszpáz-9, majd kaszpáz-3 fehérjéket [144].

Bizonyítottá vált, hogy a HO-1 az endotheliális sejtekben véd a TNF $\alpha$ -közvetített apoptózis ellen [145], majd számos más proapoptotikus agonistával szemben is különböző sejtípusokban. Ezután megállapították, hogy a CO utánozhatja a HO-1 citoprotektív hatását, majd ez oda vezetett, hogy a HO-1 citoprotektív hatását a CO-termelés közvetítheti [146-148]. A HO-1 sejtvédő hatása függ a p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) jelátviteli útvonalától is, mivel kimutatták, hogy a p38 $\alpha$  és p38 $\beta$  MAPK izoformák farmakológiai gátlása csökkenti a HO-1 antiapoptotikus hatását [149, 150]. A p38 MAPK aktiválása HO-1 által szintén a BCL-x<sub>L</sub> expressziójának növekedését okozza a PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase) jelátvitelen keresztül, így gátolva az apoptózis belső (mitokondriális) útvonalát. Emellett a PI3K/Akt aktiválása indukálja a HO-1 expresszióját, és modulálja annak aktivitását a Ser188 foszforilációján keresztül [151]. Mindemellett a tartós testmozgás révén indukálódott HO-1 képes csökkenteni a TNF- $\alpha$  mellett az IL-1 $\beta$  és IL-6 szintjét is, valamint ezáltal csökkenti a testzsírt, és javítja a kardiometabolikus kockázati tényezőket [152, 153].

Úgy gondolják, a HO-1 sejtvédő hatása az enzimatis aktivitásából ered, vagyis a szabad

hem katabolizmusából, valamint a reakció végtermékeiből, melyek a CO, Fe<sup>2+</sup> és biliverdin. Bizonyított, hogy a belélegeztetett CO protektív hatással van hiperoxiás [154] és iszkémiás [155] tüdőszérülésekkel szemben, továbbá szívátültetést követően a szerv kilökődése ellen [156]. A CO fiziológiás körülmények között gáztranszmitterként működik. Citoprotektív hatása valószínűleg abból ered, hogy képes kölcsönhatásba lépni kétértékű fémekkel, például a Fe<sup>2+</sup>-vel, a hemoproteinek hem prosztetikus csoportjában. Ekkor a hemoproteinek terminális akzeptorként funkcionálnak a mitokondriális elektrontranszport láncban. Mikor a sejtek CO-nak vannak kitéve kis mennyiségű ROS-t szabadítanak fel, feltételezhetően a CO citokró-m-c oxidáz hemcsoportjához való kapcsolódása miatt. A ROS felszabadulás aktiválhatja a p38 MAPK szignálút vonalat, amely így a CO esetében is egy fontos védelmi út vonal az antiapoptotikus izoformának köszönhetően [157]. Emellett, gyulladáscsökkentő [157, 158] és a sejtosztódást gátló [159] hatása is hangsúlyos. A CO hatására keletkező ROS a HIF-1 $\alpha$  aktiválódását is előidézheti, ami által szintén képes sejtvédő hatásokat közvetíteni [160].

A folyamat másik végterméke, a hem katabolizmusa során a protoporfirin gyűrűből származó Fe<sup>2+</sup>. Mivel képződését tekintve elég labilis, katalizálhatja a szabadgyökök termelődését a Fenton-reakció révén, így citotoxikus prooxidánsként is viselkedhet. Azonban vannak mechanizmusok, melyek hatására neutralizálódik a prooxidáns aktivitású szabad vas [161]. A ferritin H láncának expressziójával képes a sejtet megvédeni a TNF-mediálta apoptózistól azáltal, hogy megakadályozza a szabad vas prooxidáns hatását, mivel aktiválja a JNK (c-jun-N-terminal kinase) szignál transzdukciós út vonalat [162].

A biliverdint a biliverdin-reduktáz alakítja át bilirubinná, amely erősen antioxidáns [163]. Emellett védelmet biztosít a nekrozissal szemben, amelyet az oxidatív stressz indukál [164]. Az apoptózissal ellentétben a nekrozis aktiválódása nem igényli a kaspázok aktiválódását. Ezen jelátviteli út vonalat különféle citotoxikus agonisták indíthatják el a magas szintű szabadgyökök

termeléssel [165]. Továbbá olyan halál receptorok indukálása, mint a Fas vagy a TNFR-1, kapcsolódhatnak a nekrozis folyamatához, osztozva az apoptózis néhány biokémiai jellemzőjével, kialakítva így a nekroptózis folyamatát [166]. A biliverdin-bilirubin rendszer viszont védelmet nyújt az NO [167], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [168] és a hipoxia [169] által indukált nekrozisban.

## **II. 8. Hem toxicitás**

A hem azonban kettős szerepet tölt be a szervezetben [170]. Kis mennyiségben a hem fehérjék funkcionális csoportjaként működik, azonban nagy mennyiségben képes felhalmozódni és toxikus folyamatokat elindítani sokféle sejttípusban [171]. Vannak olyan patológiás állapotok, melyek során magas koncentrációjú hem akkumulálódik, a hem fiziológiás eltávolító mechanizmusai összeomlanak, a hem detoxifikációs rendszerek túlterhelté válnak, és nem képesek kompenzálni a szabad hem káros hatásait [172]. Ilyen kórállapot a sarlósejtes vérszegénység, iszkémia/reperfúzió, nagyméretű vérrög kialakulása vagy pedig a malária súlyos hemolízise, amelyek esetében a szabad hem szintje magasabb, mint 20  $\mu$ M [149]. A szabad hem károsítja a lipideket, fehérjéket és a DNS-t a ROS generálásán keresztül. A hemnek és a hem fehérjéknek számos toxikus hatása van a lipidek oxidációjára [170]. A szabad hem az oxidatív stressz révén toxikus hatást fejt ki a szövetekre és a szervekre. A hem szintje befolyásolja a vese [173], az idegsejtek [174], a szívizomsejtek [175], a májsejtek [176] és a perifériás leukociták [177] működését is. Ennek okán, számos vizsgálat történt annak érdekében, hogy elemezzék a hemin és a CoPP<sub>IX</sub> – mint a HO-1 indukáló szerei – citotoxikus hatásait különböző sejttípusokon. Cai és munkatársai 0-80  $\mu$ M CoPP<sub>IX</sub>-t alkalmaztak és megállapították, hogy 10-40  $\mu$ M CoPP<sub>IX</sub> kezelés 24 órán keresztül nincs káros hatással a humán kardiális őssejtekre [178]. Ezzel szemben, további sejtenyésztési kísérletek azt mutatják, hogy 3-30  $\mu$ M hemin elegendő a tenyésztett neuronok és asztrociták életképességének 30-40%-os romlásához [179]. Szarvasmarha aorta endothel sejteiben

50  $\mu\text{M}$  heminnel történő 24 órás kezelés szintén szignifikánsan csökkentette az életképes sejtek számát [180]. Érdekes módon, Ishikawa és *mtsai*. szerint 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációig a hemin nem befolyásolja szignifikánsan a CaCo-2 sejtek vitalitását. Mindazonáltal, 1000  $\mu\text{M}$  már szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét [181]. Gemelli és kutatócsoportja is vizsgálta a hemin (0,1-10 mM) citotoxikus hatásait 6 és 24 órás kezeléseket követően a vastagbél epithelialis sejtvonalán. Ők azt tapasztalták, hogy a hemin koncentráció és időfüggő módon csökkenti az életképes sejtek számát, és a maximális hatást 500  $\mu\text{M}$  és 1 mM között állapították meg [182].

## II. 9. HO-1 és az autofágia kapcsolata

Az elmúlt évtizedekben néhány tanulmány foglalkozott a HO-1 és az autofágiás folyamat közötti kapcsolat vizsgálatával különböző sejtek és tumorok esetében, azonban máig tisztázatlan a két rendszer között fennálló esetleges kapcsolat mibenléte, különösen a szívben.

Zhao és kutatócsoportja humán HO-1 rekombináns plazmával indukálták a HO-1 overexpresszióját, melyet követően azt tapasztalták, hogy ez megakadályozta a streptozotocin indukálta diabéteszes egerek kardiális diszfunkcióját, azáltal, hogy csökkentette a gyulladást, az oxidatív stressz 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 [183].

Higdon és *mtsai*. különböző koncentrációjú (10–25  $\mu\text{M}$ ) hemin oldatokat alkalmaztak a HO-1 indukálására. Megállapították, hogy a hemin az endotheliális sejtekben a mitokondriális funkció romlását eredményezi a fehérjék lipid és oxigén gyökök által indukált módosításával. Továbbá a hemin expozíció hatására az autofágiás vakuólumok akkumulálódtak a sejtekben,

azonban ez az indukált mitofágia sem volt elegendő az endothel sejtek pusztulásának megakadályozásához [180].

## **II. Célkitűzések**

Munkánk során célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk az autofágiát és annak más molekuláris mechanizmusokkal történő kapcsolatát a szívben.

- I. Tanulmányozni kívántuk, hogy vajon egér szív modellen, a mérsékelt, krónikus hipoxia és hiperoxia hatására milyen korrelációs kapcsolat áll fenn a levegő oxigén koncentrációja és az oxidatív stressz, a hipoxia szignalizációja, a túlélési útvonalak aktiválódása, az apoptózis, valamint az autofágia folyamata között.
- II. Célkitűzéseink között szerepelt annak vizsgálata is, hogy szívizomsejt tenyészetben a magas koncentrációjú hemoxigenáz-1 indukáló szerek milyen hatással vannak a ROS termelésére, az autofágia valamint az apoptózis folyamatára.

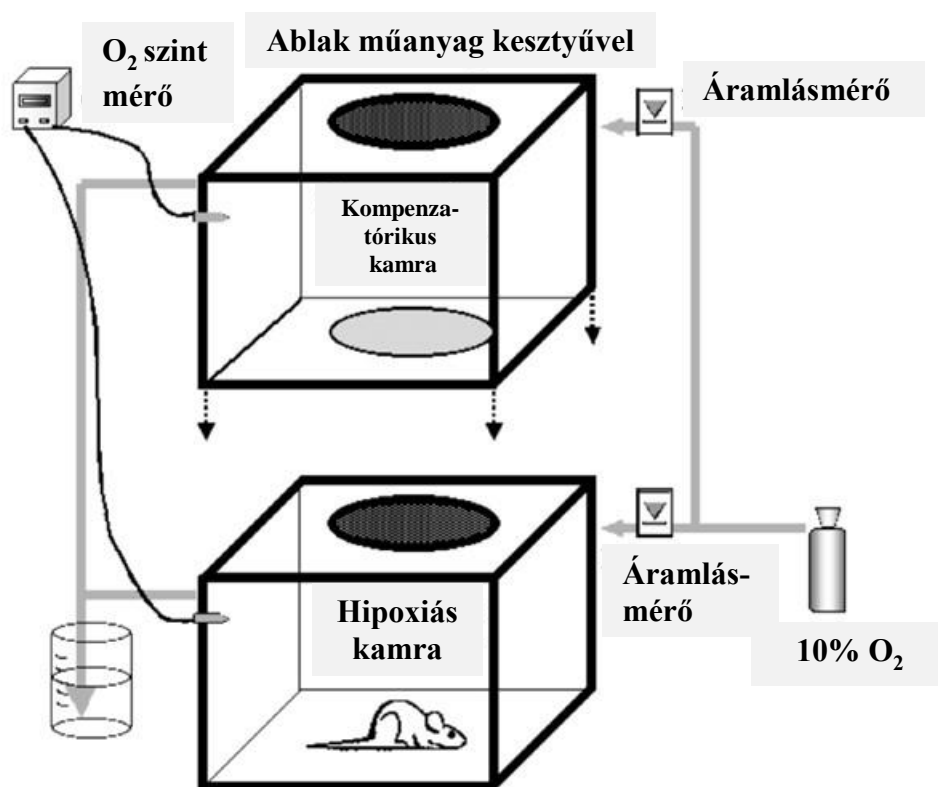
## IV. Anyagok és módszerek

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

Kísérleteink során hét hetes hím 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 Unió- 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 voltak elhelyezve. Az egerek testsúlya 27-30 g volt.

Az egereket véletlenszerűen csoportosítva, az 4. ábrán látható 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<sub>2</sub> szint módosítását követően a belélegeztetett levegő összetételét N<sub>2</sub> gázzal egyensúlyoztuk. A kísérlet kezdetén három csoportot hoztunk létre: 10% O<sub>2</sub> szint (hipoxia, n=6), 21% O<sub>2</sub> (normoxia, n=6), 30% O<sub>2</sub> (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

véralvadásgátlóként 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.



**4. ábra:** Sematikus ábra a kamrák felépítéséről G. Milano et. al 2002. alapján.

#### IV. 2. Hemoglobin szint meghatározás

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

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

Az oxidatív stressz szintjének mérése céljából meghatároztuk a mintában levő oxidánsok mennyiségét (ROS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és hipoklórsav). A szerves molekulák támadásával ezek az anyagok stabil reaktív O<sub>2</sub> 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 µl vérplazmához 1 ml acetát puffert (pH = 4,8) adtunk, és 505 nm-en abszorbancia értéket mértünk. Ezáltal az *in vivo* képződött ROOH kapacitást mértük, amely az alkoxil (RO•) és a peroxil (ROO•) gyökök előállításából eredt, a vérplazmából felszabaduló vas és savas puffer jelenlétében. Az adatokat mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /dL értékben fejeztük ki. Az adatokat lehetőség van átalakítani Carratelli Unit (U CARR) formába. 1 U CARR = 0,08 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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

Fagyasztott egér szív mintákat beágyazó pufferbe helyeztük (OCT-Compound, Leica Instruments, Nussloch, Németország), majd 5 µm vastag szeleteket vágunk kriosztát (Leica CM1510) segítségével -22 °C-on. A szívszövet darabokat Superfrost Plus tárgylemezekre 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.

#### **IV. 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> sejtenyésző flakában 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, Rochford, IL, USA) határoztuk meg a fehérje koncentrációt.

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

Az állatkísérlet során 70 µg fehérjét 8-15% SDS-PAGE (Sigma-Aldrich, Schelldorf, 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 Ablo 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 µg fehérjét TGX Stain-Free™ 7,5%-os akrilamid géleken. Ezt követően a géleket UV fényvel 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 tejpör 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 [184].

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 kaspáz-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.

#### **IV. 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.

#### **IV. 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,  $MW_{\text{CoPP}_{\text{IX}}}= 655$ g/mol értékeket alkalmaztuk a koncentráció számításához.

#### **IV. 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  $\mu\text{M}$  hemin, 2,5; 25; 100  $\mu\text{M}$  CoPP<sub>IX</sub>. A kezelések ideje minden esetben 24 óra volt.

#### **IV. 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%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -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  $\mu\text{l}$  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.

#### **IV. 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 tápoldajt 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 végeztével 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).

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

A mikroszkópos vizsgálatokhoz H9c2 sejteket szélesztettünk üveg fedőlemezek 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-del inkubáltuk (Life Technologies, Paisley, Skócia) 10 percig, 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.

#### **IV. 13. Cyto-ID festés**

A mikroszkópos vizsgálatokhoz H9c2 sejteket szélesztettünk üveg fedőlemezeken 24 lyukú plateben  $1 \times 10^4$  sejtsűrűséggel. A sejteket 100  $\mu$ M heminnel és CoPP<sub>IX</sub>-el, valamint pozitív kontrollként 5  $\mu$ M rapamycinnel kezeltük 24 órán át. A kezelés 6. órájában az autofágia folyamatát, a lizoszómák működésén keresztül gátoltuk, 18 órás 10  $\mu$ M Klorokin kezelést alkalmazva. A kezeléseket követően a tápoldatot eltávolítottuk, és a sejtek felszínét a gyártó által mellékelt egyszeres pufferrel mostuk. Minden lyukba 100  $\mu$ 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 °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 autofágiás flux mérése érdekében meghatároztuk a  $\Delta$ MFI értékét ( $\Delta$ MFI: MFI Klorokins minta – MFI Klorokin nélküli minta).

#### **IV. 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.

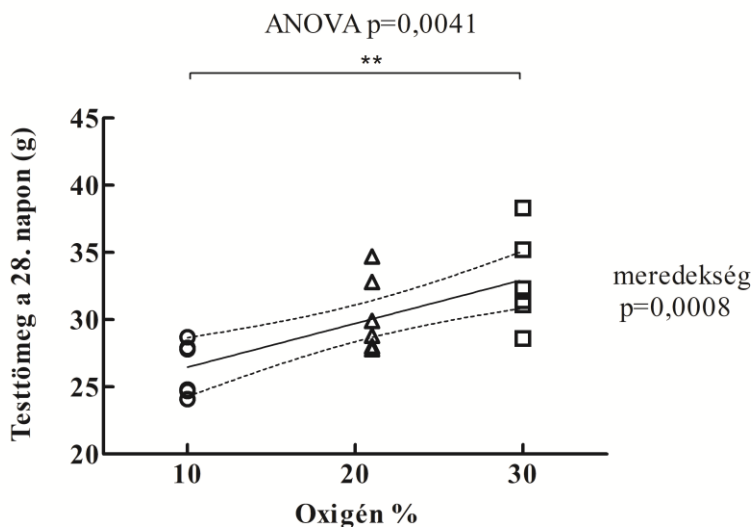
Kísérletsorozatunk második részében a kapott eredményeinket minden esetben a számtani átlag  $\pm$  középérték standard hibája szerint ábrázoltuk. A statisztikai analízisekhez GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). ANOVA tesztet és Dunnett poszt hoc tesztet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

## V. Eredmények

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

#### V. 1. 1. Testtömeg változása a kezelést követően

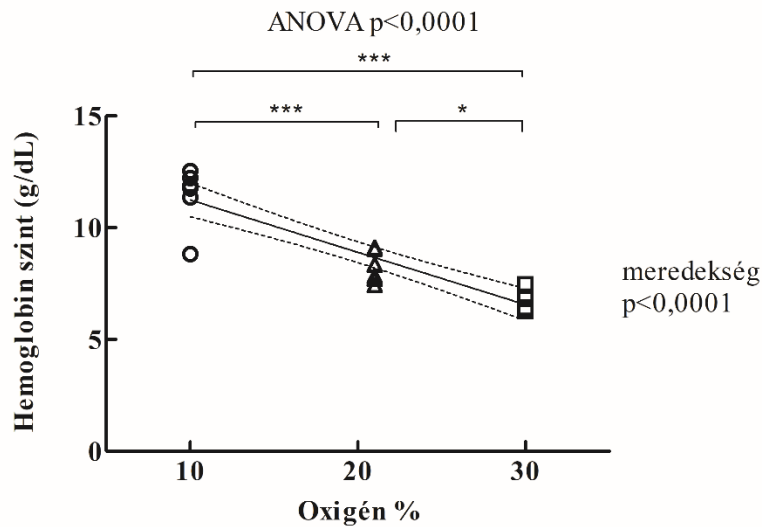
Az állatok kiindulási testtömegében nem volt szignifikáns eltérés,  $27,8 \pm 0,6$  g. Minden állat túlélte a kezelési időszakot. A 28 napos különböző oxigén koncentrációjú kezelést követően az állatok testtömege az 5. ábrán látható és az alábbiak szerint alakult: 10% O<sub>2</sub> esetében  $26,3 \pm 0,82$  g, 21% O<sub>2</sub> tartalmazó levegő esetén  $30,3 \pm 1,14$  g, míg hiperoxia esetén  $32,8 \pm 1,39$  g volt. 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 a nullától, feltételezhető, hogy pozitív lineáris kapcsolat áll fenn az állatok testtömege és az O<sub>2</sub> szintjének változása között.



**5. ábra:** Az állatok testtömege a kezelés 28. napján. Pozitív lineáris kapcsolat áll fenn az állatok testtömege és a levegő O<sub>2</sub> szintjének változása között. n=6 minden csoportban, \*\*p < 0,01.

### V. 1. 2. A vér hemoglobin szintjében bekövetkezett változások

A különböző oxigén koncentrációjú belélegeztetett levegő hatással volt az állatok hemoglobin szintjére. Míg az alacsony  $O_2$  megemelte ( $11,42 \pm 0,54$  g/dL) a vér hemoglobin szintjét, addig a magasabb  $O_2$  koncentráció csökkentette azt ( $6,78 \pm 0,17$  g/dL) a normoxiás körülményekhez viszonyítva ( $8,25 \pm 0,28$  g/dL). Jól megfigyelhető, hogy ezen paraméter változása szoros összefüggésben áll a levegő oxigén tartalmával. A 6. ábrán fordított lineáris kapcsolat látható a vér hemoglobin szintje és a levegő  $O_2$  koncentrációja között.



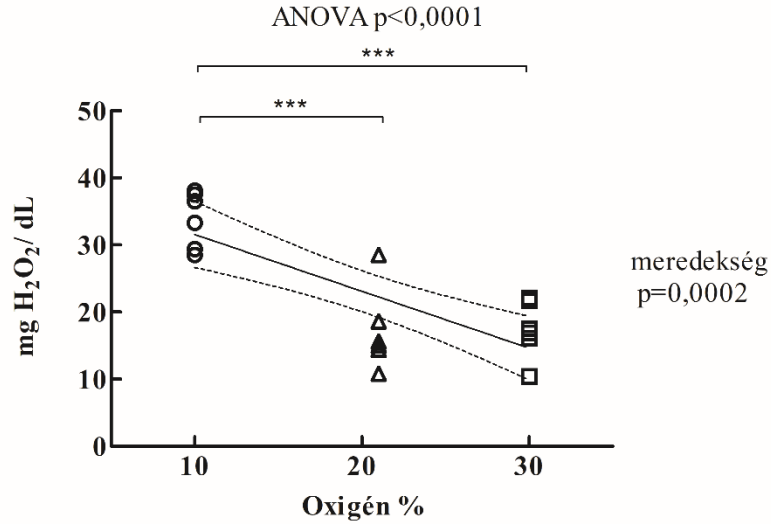
**6. ábra:** A különböző kezelések hatása az állatok hemoglobint szintjére. Fordított lineáris kapcsolat áll fenn az állatok hemoglobint szintje és az  $O_2$  szintjének változása között.  $n=6$  minden csoportban,  $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ .

### V. 1. 3. Oxidatív stressz mértékének meghatározása

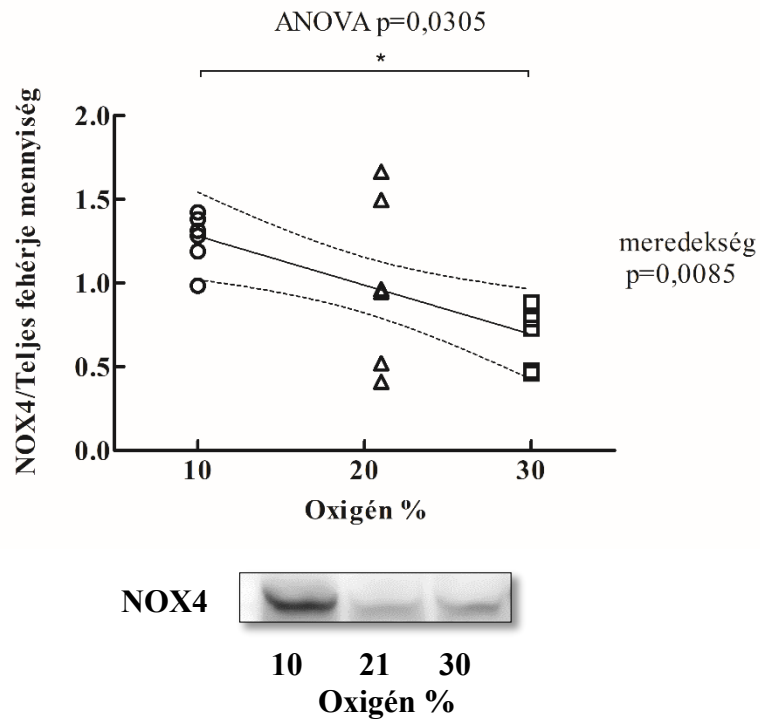
A D-ROM teszt lehetővé tette a reaktív O<sub>2</sub> metabolitok szintjének meghatározását biológiai mintáinkban, amely az oxidatív stressz mértékére utalt. A 7. ábra a vérplazmából mért reaktív O<sub>2</sub> metabolitok szintjét ábrázoltuk mgH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL-ben. A 21% O<sub>2</sub> csoportban a tapasztalt  $17,15 \pm 2,48$  mgH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL értéket a szakirodalom alapján normál szintnek tekintettük. A 10% O<sub>2</sub> tartalmú levegőben tartott állatok esetében szignifikáns (ANOVA  $p < 0,0001$ ) növekedést tapasztaltunk a metabolitok szintjében ( $33,88 \pm 1,7$  mgH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL), mind a normoxiás, mind a hiperoxiás kezeléshez képest. A hiperoxiás környezet azonban nem volt hatással a szisztémás prooxidáns oldalra ( $17,45 \pm 1,74$  mgH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL) 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 (meredekség  $p=0,0002$ ).

A mitokondriumok károsodása felelős lehet az oxigén szabadgyökök termelésének emelkedéséért. A NADPH-oxidázok által 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 ( $1,26 \pm 0,06$ ) a hipoxiás körülmények között tartott állatok szívében, összehasonlítva a normoxiás ( $1 \pm 0,2$ ) és hiperoxiás ( $0,66 \pm 0,08$ ) állatokéval (ANOVA  $p=0,0305$ ). Ezáltal egy fordított lineáris kapcsolat figyelhető meg a NOX4 fehérje és a változó O<sub>2</sub> koncentráció között (meredekség  $p=0,0085$ ).

**A**



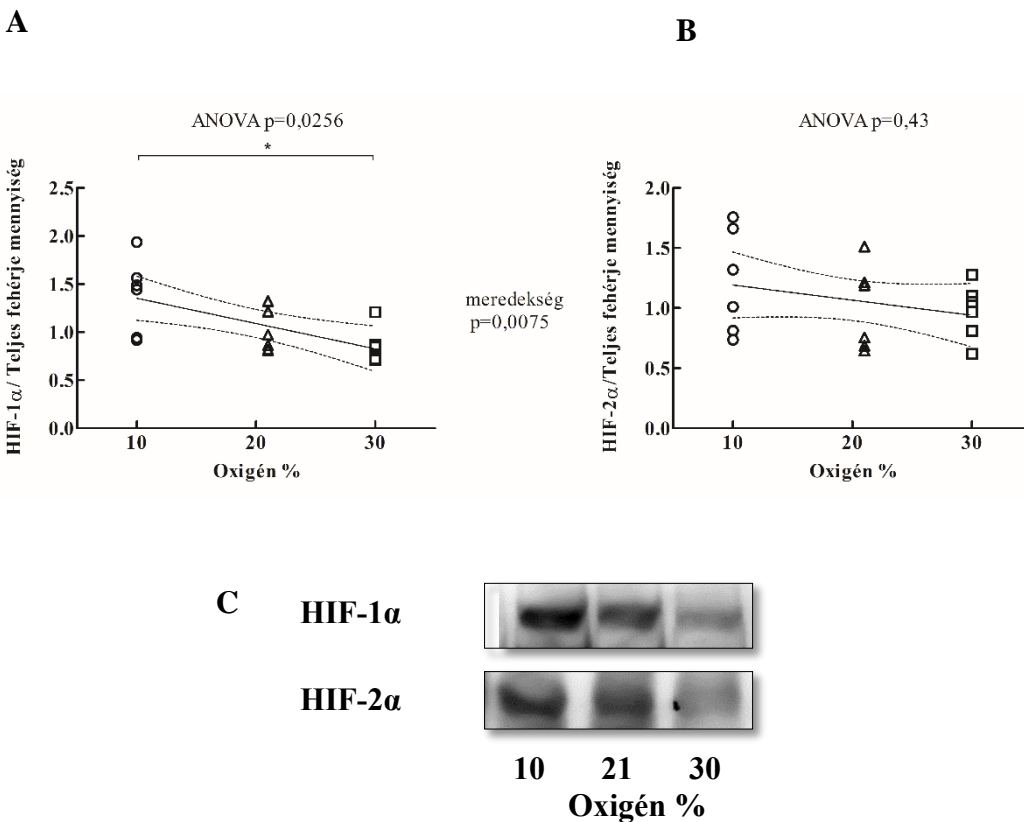
**B**



**7. ábra:** Az oxidatív stressz szintje a kezelések végén. **(A)** D-ROM (reaktív  $O_2$  metabolitok) teszt eredménye  $mgH_2O_2/dL$ -ben kifejezve.  $n = 6$  minden csoportban. **(B)** NOX4 fehérje expressziójának változása a különböző oxigén tartalmú belélegeztetett levegő hatására, reprezentatív Western-blot képpel.  $n = 6, 6, 5$ . Lineáris kapcsolat áll fenn az oxidatív stressz és az  $O_2$  szintjének változása között.  $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ .

#### V. 1. 4. Eltérő oxigén tartalmú levegő 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 levegő a HIF-1 $\alpha$  indukcióját eredményezi ( $1,38 \pm 0,15$ ) a hiperoxiás körülményekkel összehasonlítva ( $0,86 \pm 0,09$ ), (ANOVA  $p=0,0256$ ). Tehát fordított lineáris kapcsolat áll fenn a két paraméter között (meredekség  $p=0,0075$ ). Ezzel szemben, a különböző O<sub>2</sub> koncentrációjú kezelés nem volt szignifikáns hatással a HIF-2 $\alpha$  expressziójának változására (ANOVA  $p=0,43$ ).

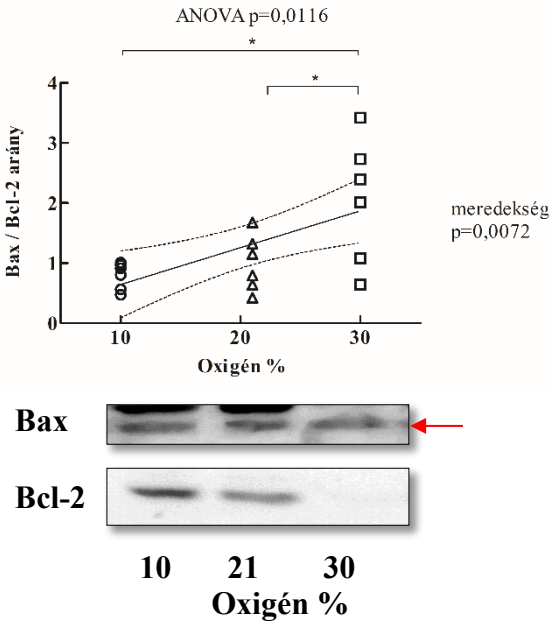
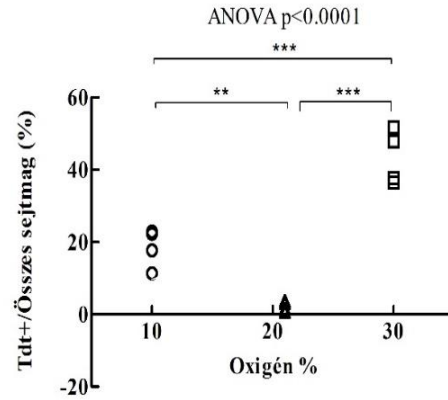
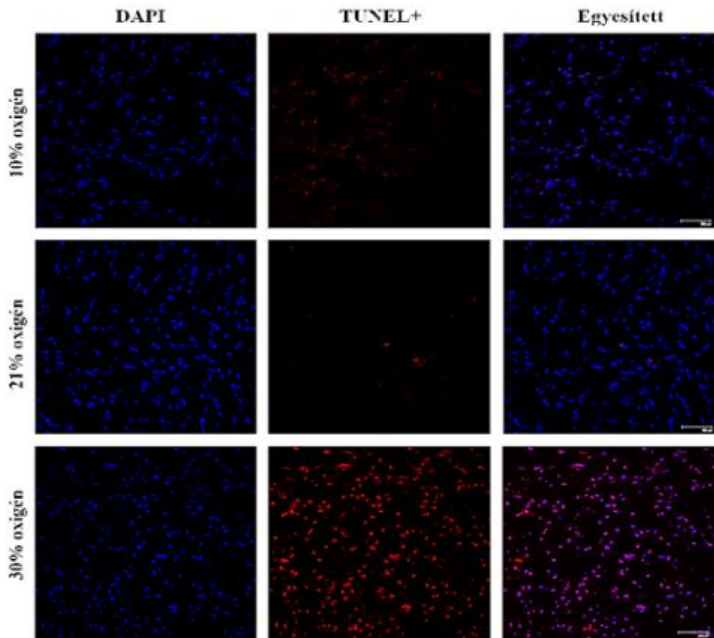


**8. ábra:** A kezelés hatása a hipoxia szignalizációjára (A) HIF-1 $\alpha$  expressziójának változása az oxigén szint változása során.  $n=6,6,5$ . (B) HIF-2 $\alpha$  expressziójának változása az oxigén szint változása során. (C) HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  reprezentatív Western-blot képe.  $n=6$  minden csoportban. Fordított lineáris kapcsolat áll fenn a HIF-1 $\alpha$  expressziója és az O<sub>2</sub> szintjének változása között.  $*p < 0,05$ .

### **V. 1. 5. Kezelés hatása a DNS fragmentálódás mértékére, valamint az apoptózis markerek szintjére**

A szívszövetben aktiválódó apoptózis vizsgálatához elemeztük a Bax/Bcl-2 arányát, amely segítségével következtetni lehet arra, hogy a különböző oxigén koncentrációjú belélegeztetett levegő hatással volt-e az apoptózis folyamatára. A Bax/Bcl-2 arányát ugyanazon gélen vizsgáltuk, elkerülve a háztartási fehérjék instabilitásának befolyásoló hatását. Eredményeink azt mutatják, hogy a Bax/Bcl-2 arány megemelkedik a hiperoxiás közegben ( $2,04 \pm 0,42$ ) a 10% ( $0,78 \pm 0,09$ ) és 21%  $O_2$  tartalmúakhoz ( $1 \pm 0,19$ ) viszonyítva (ANOVA  $p = 0,0116$ ). Ahogyan az a 9. ábrán is látható, lineáris kapcsolat áll fenn az  $O_2$  koncentráció és Bax/Bcl-2 arány emelkedése között (meredekség  $p = 0,0072$ ).

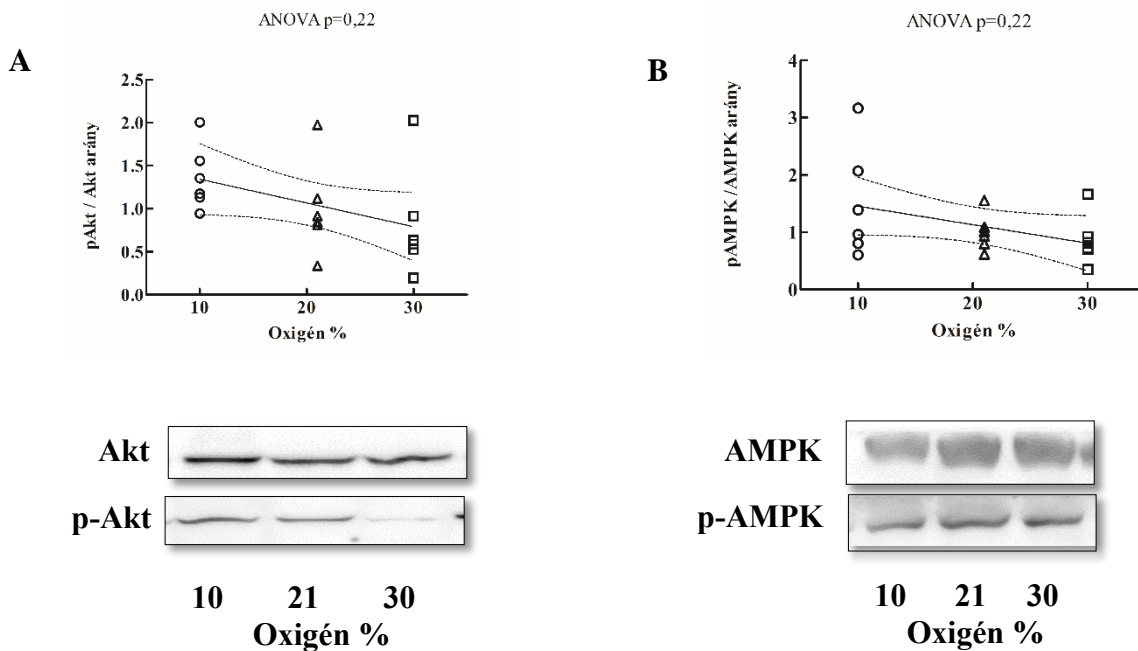
Az apoptotikus magok közvetlen detektálása immunfluoreszcens TUNEL festést alkalmazva azonban eltérő eredményt adott. A DNS fragmentálódáson átesett sejtmagok aránya 10%, 21% és 30%  $O_2$  esetén a következőképp alakult:  $18,6 \pm 2,7 \%$ ;  $2,3 \pm 0,7 \%$  és  $43,4 \pm 3,8\%$ . A 9. ábrán jól látható, hogy míg a normoxiás állatok szíve nagyon alacsony, addig a hipoxiás állatoké magasabb, és hiperoxiásoké még magasabb arányú DNS törést mutatott, (ANOVA  $p < 0,0001$ ). Ezáltal a TdT-pozitív sejtmagok aránya nem áll lineáris kapcsolatban az  $O_2$  koncentrációval, hanem egy U-alakú trend figyelhető meg.

**A****B****C**

**9. ábra:** A kezelés hatása a DNS törés mértékére és az apoptózis markerek szintjére (A) Bax/Bcl-2 arány az oxigén szint változása során, Western-blot reprezentatív képpel.  $n=6$  minden csoportban. (B) DNS törés mértéke az oxigén koncentráció változásának függvényében.  $n=4$  minden csoportban. (C) Immunfluoreszcens TUNEL festés reprezentatív képe. Lineáris kapcsolat áll fenn a Bax/Bcl-2 arány és az  $O_2$  szintjének változása között. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### V. 1. 6. Különböző O<sub>2</sub> tartalmú levegő 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 túlélés elősegítésében és véd az apoptózis ellen. Az 10. ábrán látható, az O<sub>2</sub> koncentráció változása nem volt hatással az Akt útvonal aktiválódására.  $pAkt^{Ser473}/Akt$  arány egyik esetben sem változott szignifikáns mértékben. A másik vizsgált releváns védelmi mechanizmus az AMP-aktivált protein-kináz (AMPK) volt, egy olyan energiaérzékelő rendszer része, amely az oxidatív stressz 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.

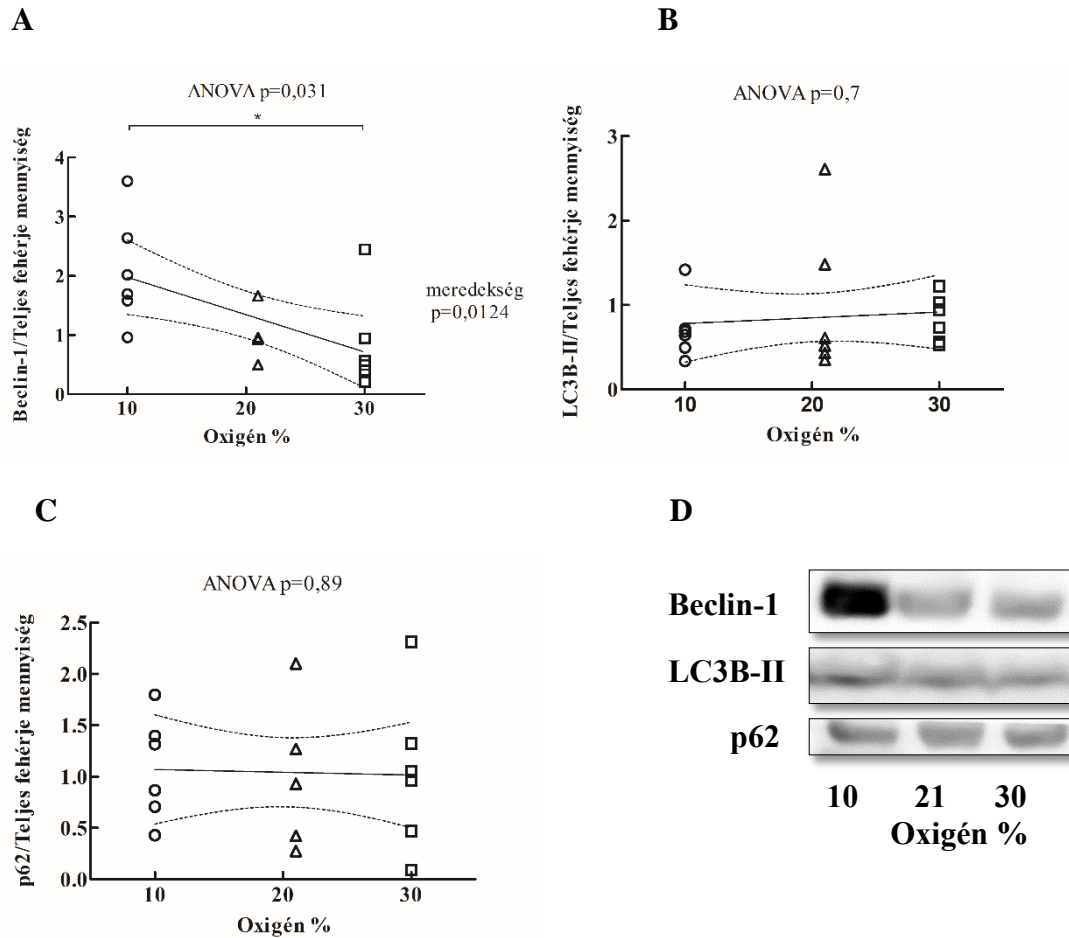


**10. ábra:** Különböző oxigén tartalmú levegő hatása a túlélési útvonalak aktiválására (A)  $pAkt/Akt$  arány változása, reprezentatív Western-blot képpel.  $n=6$  minden csoportban. (B)  $pAMPK/AMPK$  arány változása, reprezentatív Western-blot képpel.  $n=6$  minden csoportban. Nincs szignifikáns korreláció a vizsgált túlélési útvonalak és az O<sub>2</sub> szintjének változása között.

### **V. 1. 7. Módosított O<sub>2</sub> tartalmú levegő hatása az autofágiára**

Annak érdekében, hogy megtudjuk milyen hatással van a módosított oxigén tartalmú levegő az autofágia folyamatára, vizsgáltunk néhány markert Western blot segítségével. A III. típusú foszfoinozítid-3 kináz komplex tagját képező Beclin-1 szintjének változása látható az 11. ábrán. Ez a fehérje az autofágiás vezikulum kialakulásához szükséges. Azt tapasztaltuk, hogy a Beclin-1 szintje hipoxia során szignifikánsan megemelkedik ( $2,08 \pm 0,37$ ) a 30% O<sub>2</sub> tartalmú levegőhöz viszonyítva ( $0,84 \pm 0,33$ ). 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 levegő 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. Az 11. ábrán is látható, hogy ezen fehérjék szintje valószínűleg nem áll kapcsolatban a levegő O<sub>2</sub> szintjével.

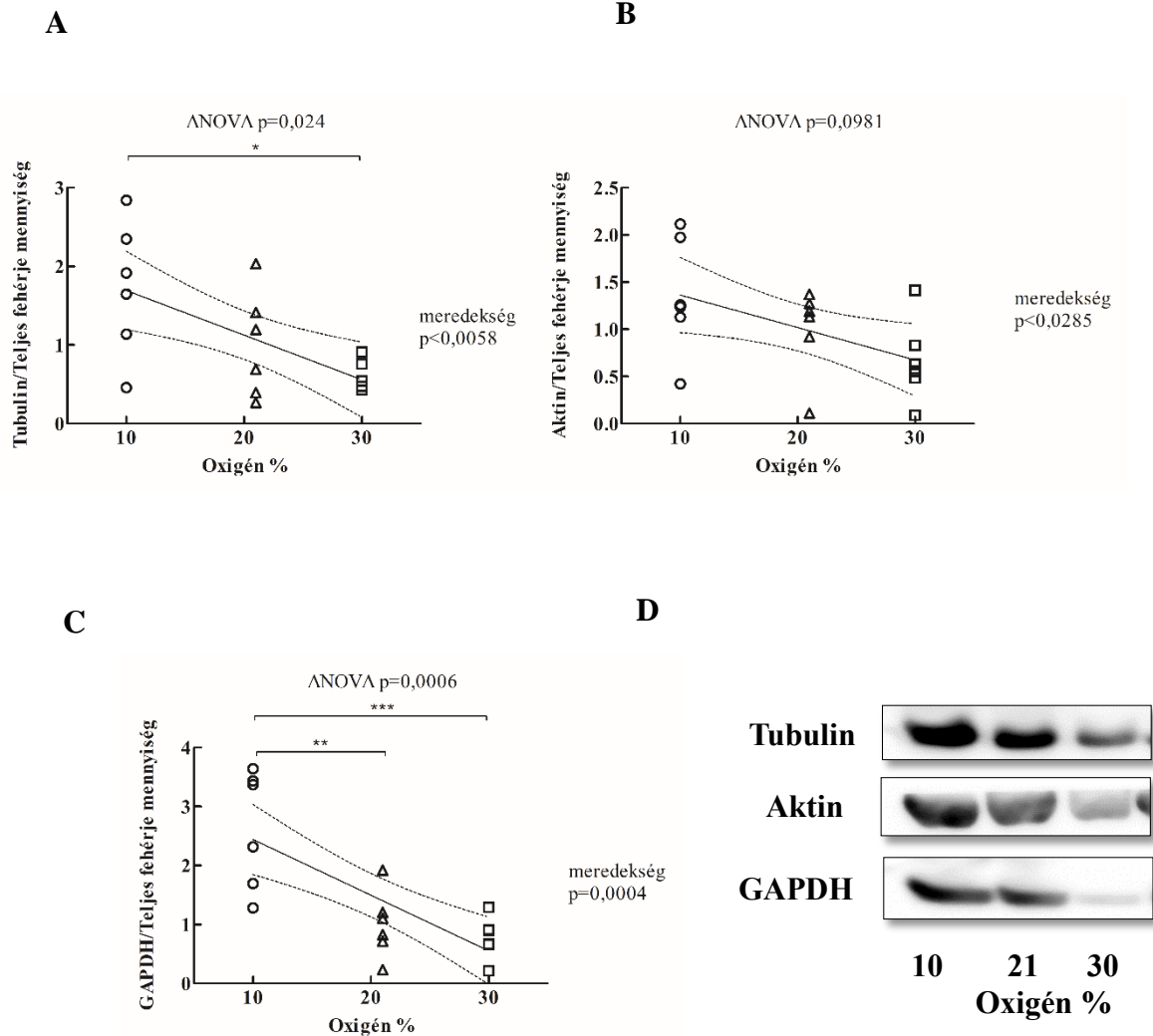


**11. ábra:** Módosított oxigén tartalmú levegő hatása az autofágiára (A) Beclin-1 expressziójának változása.  $n=6,5,6$ . (B) LC3B-II expressziójának változása.  $n=6$  minden csoportban. (C) p62 expressziójának változása.  $n=6,5,6$ . Fordított lineáris kapcsolat áll fenn a Beclin-1 expressziója és az  $O_2$  szintjének változása között.  $*p < 0,05$ .

### V. 1. 8. Háztartási fehérjék szintjének változása az $O_2$ koncentráció hatására

A 12. ábrán látható, hogy Western blot analízissel meghatároztuk a különböző oxigén koncentrációjú levegő hatását három háztartási fehérje ( $\alpha$ -tubulin, aktin és GAPDH) szöveti intenzitására. Ezekben a kísérletekben a célfehérje szintjét teljes fehérje mennyiségre

vonatkoztatva mértük. Meglepő módon, a Tukey poszt teszt alapján elmondható, hogy a hipoxiás közeg az  $\alpha$ -tubulin ( $1,72 \pm 0,34$ ) és GAPDH ( $2,62 \pm 0,4$ ) esetében is szignifikánsan megemelte a fehérje kifejeződését a hiperoxiás körülményekkel összehasonlítva ( $0,59 \pm 0,07$  és  $0,77 \pm 0,14$ ). Ez a trend az aktin esetében is megfigyelhető volt, de statisztikailag nem volt szignifikáns a változás (10% O<sub>2</sub>:  $1,35 \pm 0,25$ ; 30% O<sub>2</sub>:  $0,66 \pm 0,17$ ). Eredményeink alapján elmondható, hogy az O<sub>2</sub> koncentrációjának emelkedése inverz lineáris kapcsolatban áll a vizsgált háztartási fehérjék szintjével.



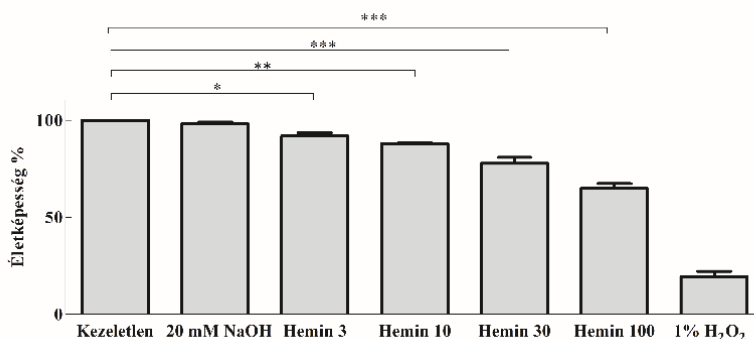
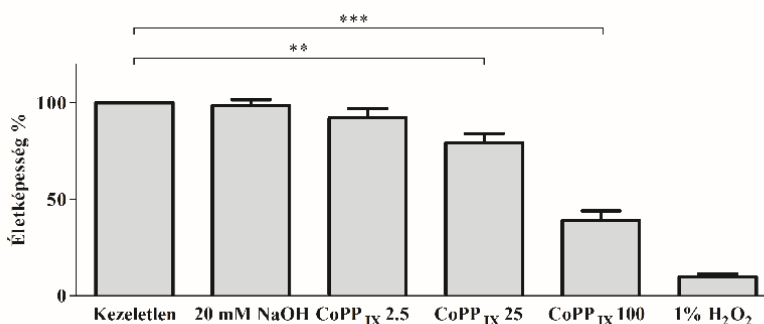
**12. ábra:** Háztartási fehérjék szintjének változása a különböző oxigén koncentrációk hatására (A) Tubulin expressziójának változása.  $n=6$  minden csoportban (B) Aktin expressziójának változása.  $n=6$  minden csoportban. (C) GAPDH expressziójának változása.  $n=6$  minden csoportban. (D) Western-blot reprezentatív képek mindhárom vizsgált fehérje expressziójáról. Fordított lineáris kapcsolat áll fenn a háztartási fehérjék expressziója és az  $O_2$  szintjének változása között. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

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

### V. 2. 1. HO-1 indukáló szerek hatása a H9c2 szívizomsejtek életképességére

A HO-1 indukáló szerek (hemin és CoPP<sub>IX</sub>) sejtleletkéesség változásra gyakorolt hatását MTT citotoxicitási teszttel vizsgáltuk. A 3-10-30-100 µM heminnel és 2,5-25-100 µM CoPP<sub>IX</sub>-nel történő 24 órás kezelés a szívizomsejtek életképességnek koncentrációfüggő romlását okozta (13. ábra). Eredményeink alapján már a 3 és 10 µM koncentrációjú hemin is szignifikánsan csökkentette az életképességet ( $91,6 \pm 1,7\%$  és  $87,6 \pm 0,6\%$ ), habár a két magasabb, 30 és 100 µM-os koncentráció még markánsabb csökkenést eredményezett ( $77,7 \pm 2,9\%$ ;  $64,7 \pm 2,5\%$ ) a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (a kezelt kontrollhoz viszonyított eredmények a 2. Függeléken láthatóak). A legmagasabb hemin koncentráció hatása majdnem elérte az IC<sub>50</sub>-es értéket.

Hasonló eredményeket kaptunk a CoPP<sub>IX</sub> esetében is. A 25 és 100 µM-os koncentráció  $79,3 \pm 4,9\%$  és  $39,1 \pm 4,8\%$ -ra csökkentette az életképes sejtek mennyiségét. A legmagasabb koncentráció már elérte az IC<sub>50</sub> értékét a H9c2 kardiomioblasztokon.

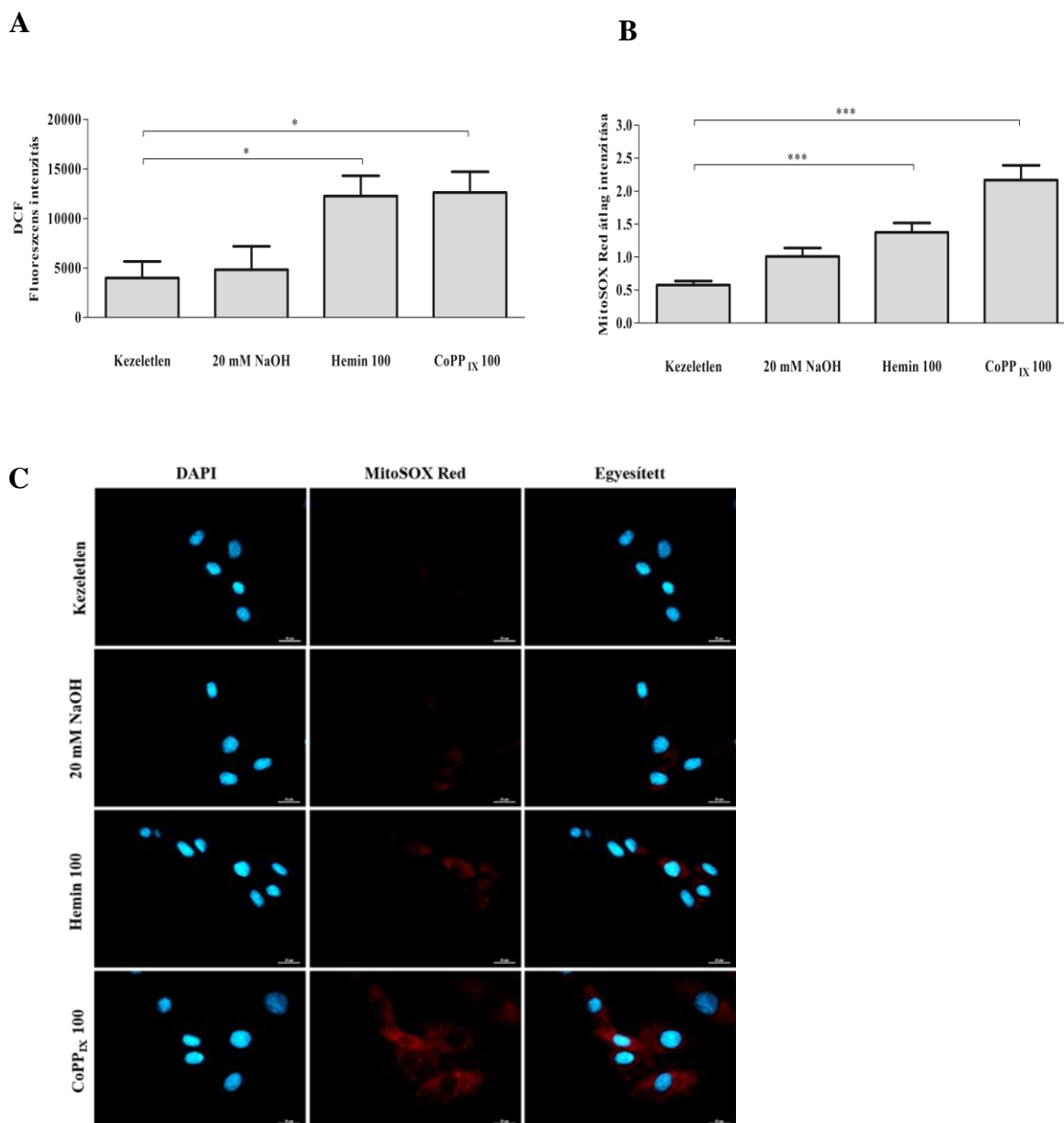
**A****B**

**13. ábra:** Különböző koncentrációjú (A) hemin és (B) CoPP<sub>IX</sub> hatása a H9c2 sejtek életképességére. 4 és 6 megismételt kísérlet eredménye. Kontroll csoport sejtjeinek életképességéhez (100%) viszonyítva. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### V. 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. Amint az 14. ábra A paneljén is látható, mind a hemin, mind a CoPP<sub>IX</sub>-kezelések hatására szignifikáns mértékben fokozódott a ROS szintje a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (a kezelt kontrollhoz viszonyított eredmények a 2. Függeléken láthatóak). Ugyanez a szignifikáns növekedés figyelhető meg a mitokondriális szuperoxid esetében

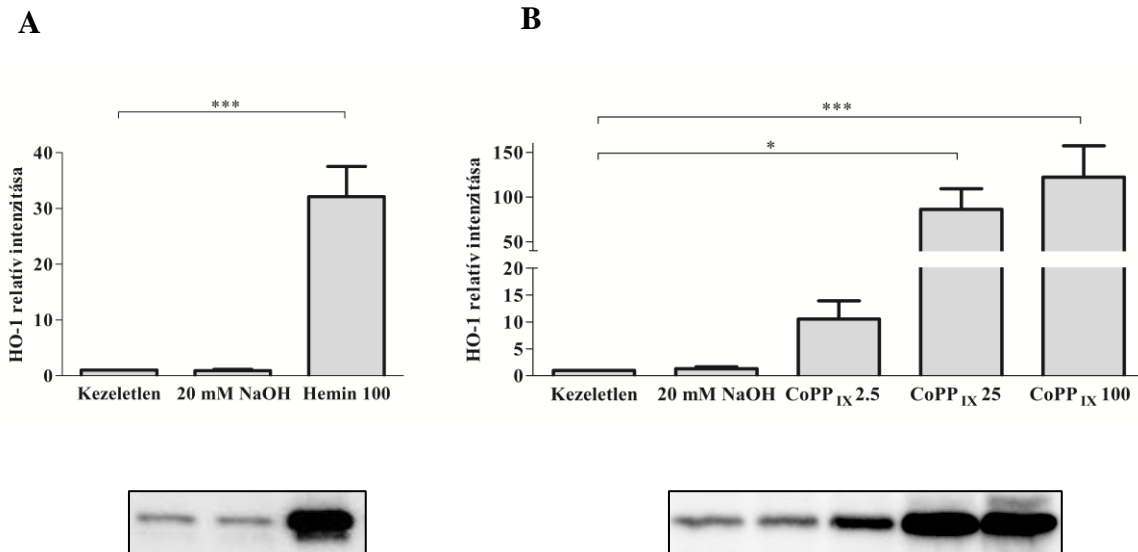
az 14. ábra B paneljén is. Mindkét eredmény azt szemlélteti, hogy az oxidatív stressz szerepet játszhat az indukáló szerek és hem okozta toxikus hatásban.



**14. ábra:** Az oxidatív stressz mértékének változása a magas koncentrációjú HO-1 indukáló szerek hatására (A) A DCF festés fluoreszcens intenzitásának eredménye a kezeléseket követően.  $n=5$  csoportonként. (B) A MitoSOX festés eredménye a mitokondriális szuperoxidok fluoreszcens intenzitása alapján. Csoportonként 100 darab sejt, háromszor megismételt vizsgálat. (C) MitoSOX festés reprezentatív mikroszkópos képei 63x nagyításon. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### V. 2. 3. HO-1 szint meghatározása a kezeléseket követően

Ahogy az 15. ábrán is látható, mindkét indukáló szer sikeresen fokozta a HO-1 expresszióját. A fehérje szintjének fokozódása, ahogy az várható is volt, koncentrációfüggő módon mutatkozott meg.



**15. ábra:** Hemoxigenáz-1 expressziójának változása a (A) hemin és (B) CoPP<sub>IX</sub> kezelésekre hatására, reprezentatív Western-blot képekkel.  $n=8$  és  $6$ . \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

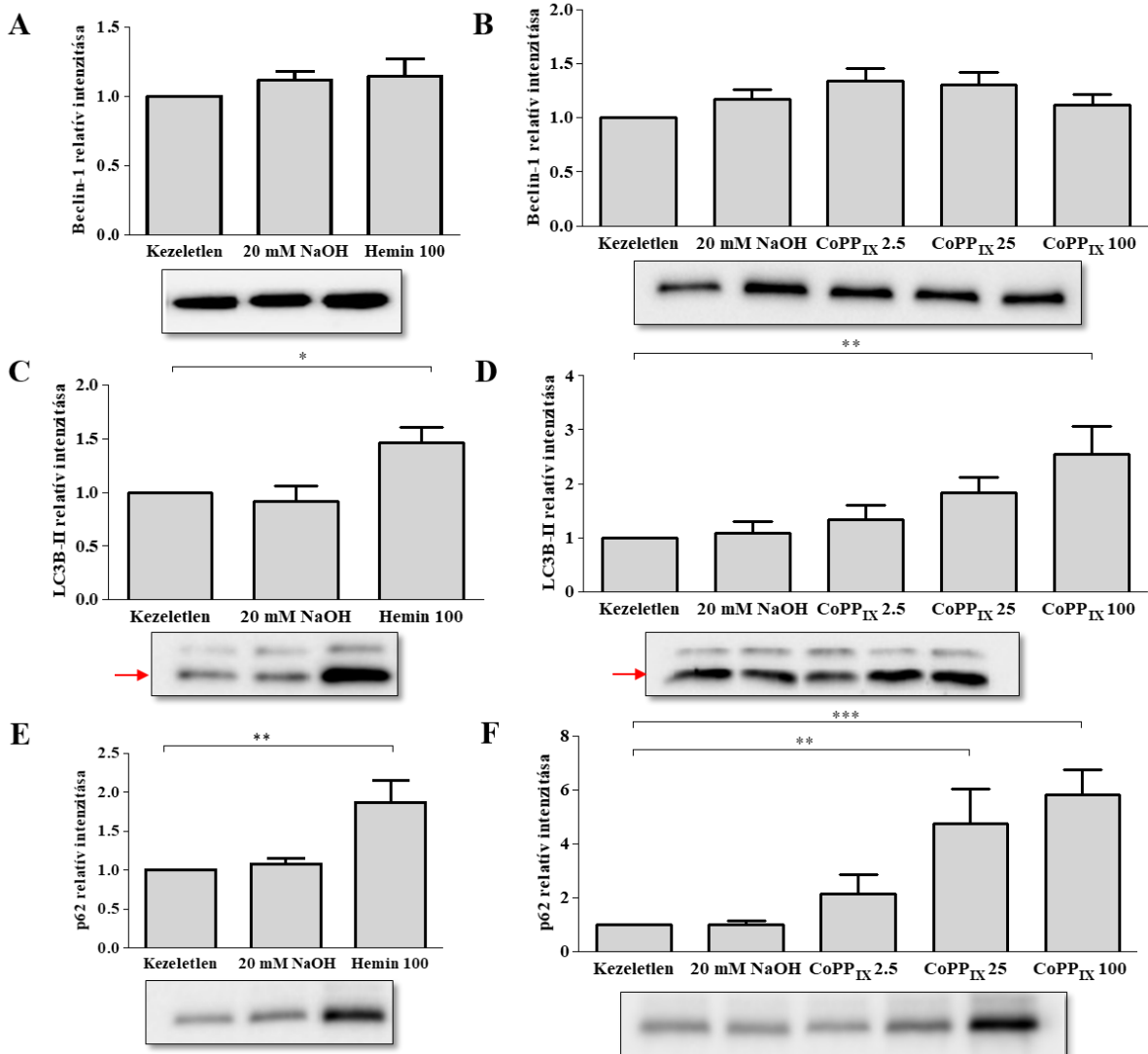
### V. 2. 4. A magas koncentrációjú hemin és CoPP<sub>IX</sub> hatása az autofágia folyamatára

Miután markáns HO-1 expresszió növekedést tapasztaltunk a 100  $\mu$ M hemin és 100  $\mu$ M 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  $\mu$ M hemin és 100  $\mu$ M CoPP<sub>IX</sub> csoportokban is a kontrollhoz képest (a kezelt kontrollhoz viszonyított eredmények a 2. Függeléken láthatóak). Ez arra enged következtetni, hogy az autofágia folyamata ugyan aktiválódott, de az emelkedett p62 szint miatt valószínűleg nem megy

végbe a teljes folyamat.

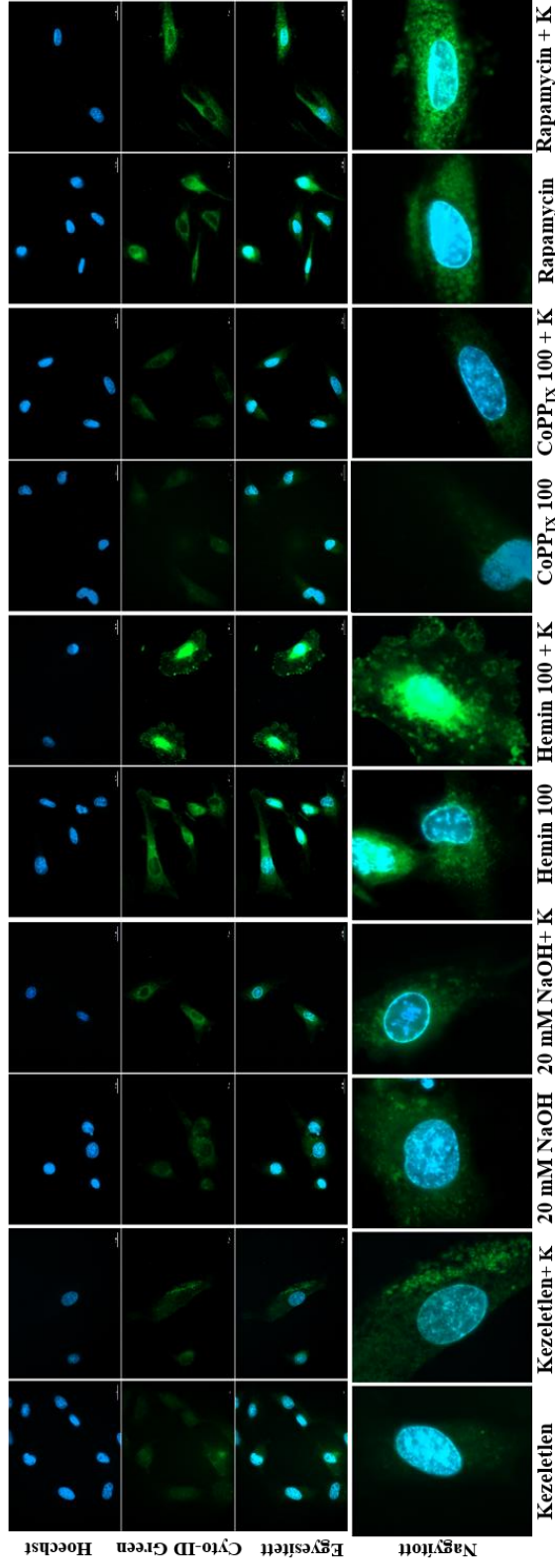
Western blot eredményeink igazolása érdekében Cyto-ID Green festést alkalmaztunk és mintáinkat mikroszkóp és áramlási citométer segítségével vizsgáltuk. Az autofágiás flux monitorozása céljából Klorokin-nel is kezeltük a sejteket. Ezen szer hatására a lizoszómális degradáció gátlódik. Ahogyan az a 17. ábrán is megfigyelhető, számos autofágiás vakuólum helyezkedik el a perinukleáris térben, és számuk meg is emelkedik Klorokin 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 Klorokin 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 Klorokin jelenlétében és hiányában. Összehasonlítva a hemin és hemin + Klorokin kezelt csoportokat, ugyancsak nem volt tapasztalható szignifikáns különbség.

Eredményeink számszerűsítése érdekében áramlási citométerrel mértük mintáink  $\Delta$ MFI értékét. A kapott adatok, melyek a 17. ábrán láthatóak (a kezelt kontrollhoz viszonyított eredmények a 2. Függeléken láthatóak), alátámasztják mikroszkópos vizsgálataink eredményét. Így tehát arra lehet következtetni, hogy az autofágia folyamata Beclin-1 független útvonalon ugyan aktiválódik, de nem funkcionál megfelelően.

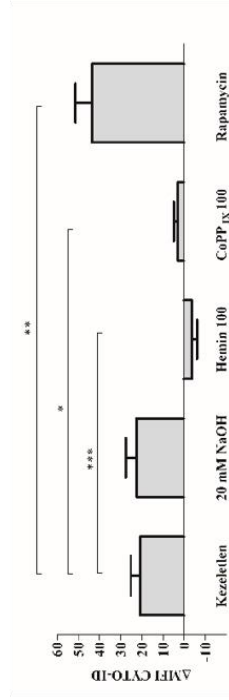


**16. ábra:** Autofágiás markerek expressziójának változása a kezelések hatására. Beclin-1 szintjének változása (A) hemin és (B) CoPP<sub>IX</sub> kezelések követően, Western-blot reprezentatív képekkel, n=8-15. LC3B-II expressziójának változása (C) hemin és (D) CoPP<sub>IX</sub> kezelések hatására, n=6. Továbbá, (E) a hemin és (F) CoPP<sub>IX</sub> kezelések hatásának eredménye a p62 szintjére, n=6 és 11. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

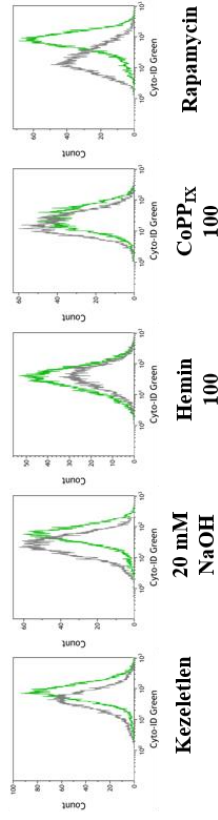
A



B



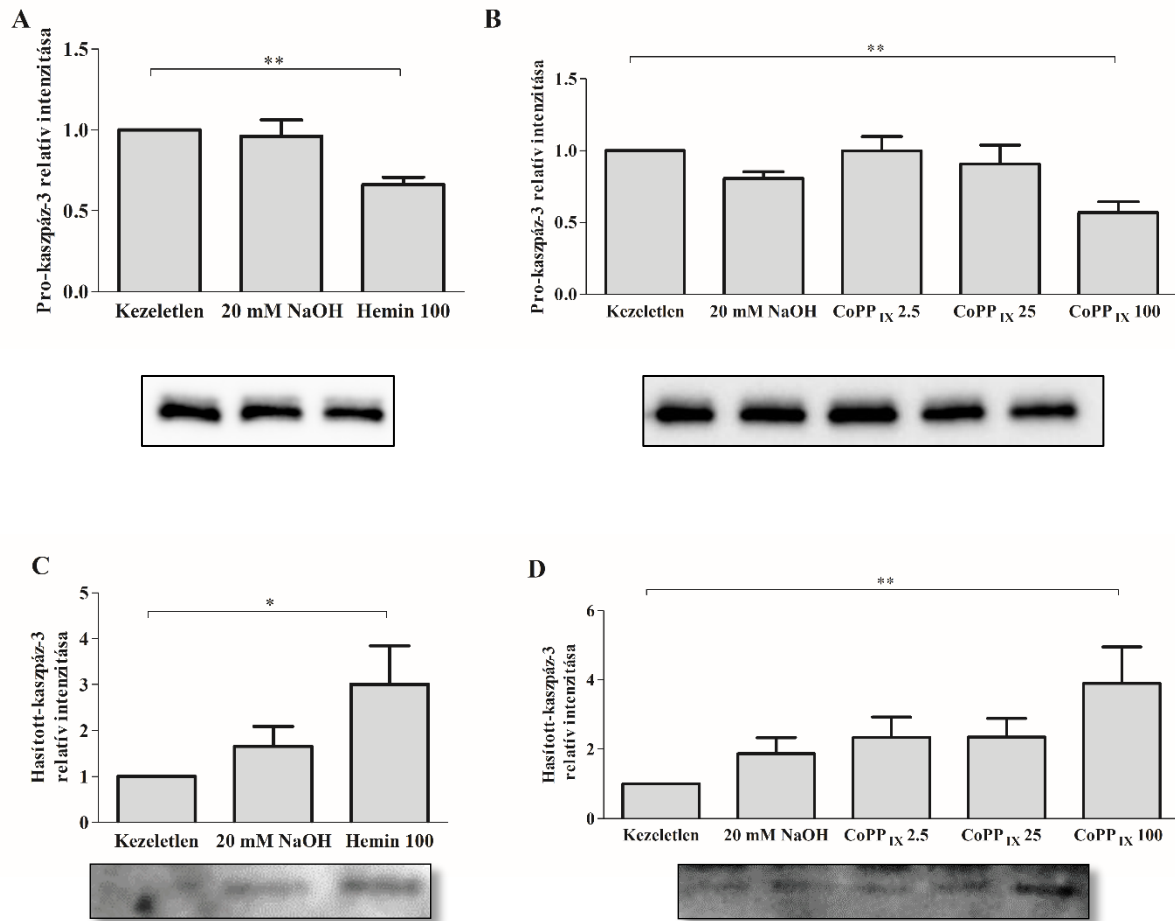
C



**17. ábra:** A magas koncentrációjú hemin és CoPP<sub>IX</sub> kezelések hatása az autofágias fluxra. (A) Cyto-ID Green festés mikroszkópos reprezentatív képei 63x nagyításon. (B) Cyto-ID Green festést követően áramlási citométerrel mért fluoreszcens intenzitás változása az autofagoszómáknak. n=7 csoportonként. (C) Áramlási citometria reprezentatív histogram képei. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

## **V. 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 (a kezelt kontrollhoz viszonyított eredmények a 2. Függeléken láthatóak). Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a hasított-kaspáz-3 szintjét is, amely 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.



**18. ábra:** Hemin és CoPP<sub>IX</sub> kezelések hatása az apoptózis mértékére. Pro-kaspáz-3 szintjének változása (A) hemin, (B) CoPP<sub>IX</sub> kezelést követően, reprezentatív Western-blot képekkel. n=6-9. Hasított kaspáz-3 expressziójának változása (C) hemin és (D) CoPP<sub>IX</sub> hatására, reprezentatív Western-blot képekkel. n=6-7. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

## V. Megbeszélés

Az alap kutatások egyik fő feladata, történjen az kardiovaszkuláris vagy egyéb betegségekkel kapcsolatban, hogy feltérképezze azok pontos patomechanizmusát. Ennek megértésében fontos a különböző molekuláris biológiai útvonalak közötti kapcsolatok tisztázása, amelyek által érthetőbbé válik a betegség kialakulása, lezajlása, valamint esetlegesen új terápiás lehetőségek nyílhatnak, és ezáltal megelőzhetőbb, kezelhetőbb a kór állapot.

Számos protektív hatásmechanizmus ismeretes, amelyek a szív- és érrendszeri megbetegedésekben is kimagasló eredményekkel kecsegtetnek. Ilyen az autofágia folyamata, amely szerepét mi is igyekeztünk tisztázni. Az autofágia kapcsolatát vizsgáltuk az oxigén koncentráció változásával egér szív modellen, valamint HO-1 indukáló szerek által kiváltott hem toxicitásban betöltött funkcióját szívizomsejtekben.

Kísérleteink első részében azt vizsgáltuk, hogy a 28 napon át tartó, 10% - 21% és 30% oxigén tartalmú levegőben 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 levegőben, ez követően szintén D-ROM teszttel vizsgálták a redox egyensúlyt. Vizsgálataikból kiderült, hogy >40% O<sub>2</sub> koncentráció

oxidatív stresszt okozott [185]. Ezzel összhangban vizsgálataink során mi sem tapasztaltunk jelentős eltérést a normoxia és a 30% O<sub>2</sub> tartalomú levegő 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 [186]. Azoknál az egereknél pedig, amelyek 28 napig 30% O<sub>2</sub> tartalmú levegőt lélegeztek be, jelentősen megemelkedett a neuronokban a sejtmagi HIF-2 $\alpha$ , ami nem volt oxidatív stresszhez kapcsolható [187]. 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 [188]. 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 energiafüggő 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 [189]. Számos eredmény utal arra, hogy a HIF-1 $\alpha$  is részt vesz az apoptózis folyamatának megindításában. Amikor az alveoláris epithel sejtek krónikus hipoxiának voltak kitéve, azokban túlzott mértékben megemelkedett a HIF-1 $\alpha$  szintje, amely fokozott apoptózist eredményezett [190]. 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 [191]. Másrészt bizonyítást nyert az is, hogy hipoxia során a Bax-on keresztül indukálódik a HIF-1 $\alpha$ -függő, p53 által közvetített apoptózis is [192]. 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 [144]. 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 [85], mivel az megzavarja a Beclin-1 és a Bcl-2 fehérjék között lévő gátló kölcsönhatást [193]. 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. Tüdő epithel 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 [89]. 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 kapcsolatáról. 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 [194] 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 a DNS fokozott fragmentálódásához 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 [195, 196], az aktin és a tubulin [197, 198] 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 [199]. 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 levegő 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.

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 szívizomsejteken. Jelenlegi vizsgálataink azt mutatják, hogy különböző HO-1 induktorok (hemin, CoPP<sub>IX</sub>) nagy koncentrációja (100  $\mu$ M) toxikus hatást gyakorol 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  $\mu\text{M}$ ) növelhetik a HO-1 expresszióját [182], azonban az alkalmazott koncentrációtól függően pozitív kimenetelű [200] vagy citotoxikus hatás [170] is lehetséges. A közelmúltban került publikálásra az a tanulmány melyben kimutatták, hogy a HO-1 indukálása 20  $\mu\text{M}$  CoPP<sub>IX</sub>-nel védte a szívizomsejteket a hipoxia/reoxigenáció ellen az apoptózis csökkentésén keresztül [200]. Jelen vizsgálatunkban azonban magasabb CoPP<sub>IX</sub> koncentrációt alkalmaztunk, amely toxikusnak bizonyult. Amikor a szabad hem mennyisége meghaladja a detoxifikáló enzimek kapacitását a szabad hem toxikus hatást fejt ki, amely az oxidatív stressz indukálódásából és a gyulladás kialakulásából ered [201]. A várakozásnak megfelelően 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 összehangban pedig, mindkét magas koncentrációjú (100  $\mu\text{M}$  hemin és 100  $\mu\text{M}$  CoPP<sub>IX</sub>) 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 rezveratrol által indukált HO-1 expresszió növekedés fokozott neurotoxicitást és emelkedett számú autofagoszóma képződést eredményezett [202]. Emellett a HO-1 fokozott expressziója májkárosodás során adaptív válasz lehet, mely az autofágia folyamatának aktiválódását eredményezi [203]. 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 [50]. Eredményeinkből is egyértelműen látszik, hogy az alkalmazott két HO-1 induktor aktiválja az autofágiát. Érdekes módon, a folyamat iniciációjáért felelős Beclin-1 szintje egyik indukáló szer esetében sem változott. Számos kutatás utal arra, hogy az autofagoszómák képződése Beclin-1 független útvonalon is megvalósulhat [84, 204]. 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 [202]. Az autofágiás flux további vizsgálatához a szívizomsejteket Klorokin-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 rapamycinnel kezelt szívizomsejtekben az autofagoszómák száma megnövekedett a Klorokin hatására. Azonban Western blot adatainkkal összhangban, az autofagoszómák számában nem találtunk különbséget a magas koncentrációjú HO-1 induktorokkal kezelt csoportokban, a Klorokin jelenlétében és hiányában, amely tovább erősíti azt a feltételezésünket, hogy a hibás autofágia hozzájárulhat a szívizomsejtek hem toxicitásához.

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 organellumok/makromolekulák fokozhatják az apoptotikus sejthalált [205]. Western blot analízisünk során vizsgáltuk az apoptózis szintjét is. Eredményeink azt mutatják, hogy a pro-kaspáz-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 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 hem toxicitást 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 levegőben 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.

## VI. Összefoglalás

A munkám első felében vizsgáltuk a krónikus hipoxia és hiperoxia különböző szignalizációs folyamatokra gyakorolt hatását szívizomban. A 28 napon át módosított oxigén tartalmú levegőben 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 $\alpha$ -t, 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 kapcsolatot 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 adatok 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. Azonban az LC3B-II és p62 szignifikánsan magasabb expressziós szintje a kezelt csoportokban megkérdőjelezi a folyamat teljességét. Ezen eredményeinket alátámasztva, a 100 µM hemin és CoPP<sub>IX</sub> mellett Klorokinl 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, valamint a hasított kaspáz-3 emelkedése, az apoptózis aktiválódására enged következtetni. Eredményeink alapján a magas koncentrációjú HO-1 indukáló szerek okozta sejttöxicitás az emelkedett oxidatív stresszből, a nem megfelelően funkcionáló autofágiából és a magas szintű apoptózisból eredhet.

## VII. Summary

In the first part of our experiments, we investigated the effects of the different inhaled O<sub>2</sub> tensions (10-21-30%) on various pathways in myocardium. 10% O<sub>2</sub> appears to cause a considerable level of oxidative stress in heart tissue, which increases the expression of HIF-1 $\alpha$ , while 30% O<sub>2</sub> does not cause significant oxidative stress as evidenced by unaltered level of ROM derivatives. However, both hypoxia and hyperoxia elevate TUNEL positivity. Alterations in Beclin-1 protein level suggest that altered O<sub>2</sub> tensions may have an impact on autophagy. Although a definitive conclusion can not be drawn because the autophagy flux was not measured, a crosstalk between apoptosis and autophagy may have been established under these circumstances. Furthermore, we found that the level of the commonly used housekeeping proteins such as  $\alpha$ -tubulin, actin and GAPDH may be altered. Thus, these proteins should be used with caution as loading controls, in experiments when the O<sub>2</sub> tension of inhaled air is a variable, and the alternative method to normalize densitometry values against total protein content is to be taken into consideration.

In the other study we also investigated the influence of toxic dosis of HO-1 inducers (hemin and CoPP<sub>IX</sub>) on level of oxidative stress, the pathway of autophagy and apoptosis in H9c2 cells. Our results showed decreased cell viability at high dose of hemin and CoPP<sub>IX</sub> treated H9c2 cells in a dose-dependent manner. As expected both treatments induced a robust elevation of HO-1 level. Furthermore, at concentration of the inducers used in the present study, a significantly enhanced level of ROS was detected. In addition, the Beclin-1- independent autophagy was significantly increased, but it caused a defective autophagic flux with triggered activation of apoptosis.

## VIII. Főbb megállapítások

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

1. Pozitív lineáris kapcsolat áll fenn az állatok testtömege és a levegő oxigén szintjének változása között. Fordított lineáris kapcsolat áll fenn az állatok hemoglobin szintje és a levegő oxigén szintjének változása között. A DROMs teszt és a NOX4 fehérje expressziós változása alapján elmondhatjuk, hogy a hipoxia magasabb szintű oxidatív stresszt indukált az állatokban, mint a hiperoxia. Hipoxia hatására a HIF-1 $\alpha$  indukálódott, míg a HIF-2 $\alpha$  szintje változatlan maradt.
2. Lineáris kapcsolatot tapasztaltunk a levegő oxigén szintjének változása és a Bax/Bcl-2 aránya között. A DNS törés mértéke, mind a hipoxia, mind a hiperoxia hatására megnövekedett. Hipoxia hatására szignifikáns emelkedés figyelhető meg a Beclin-1 autofágias fehérje esetében, míg az LC3B-II és p62 fehérjék szintje változatlan.
3. Fordított lineáris kapcsolat figyelhető meg három háztartási fehérje (tubulin, aktin és GAPDH) expressziós szintje és az állatokkal belélegeztett levegő oxigén szintje között.

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

1. A hemin és CoPP<sub>IX</sub> koncentrációfüggő módon indukálták a HO-1-et, és ezzel párhuzamosan csökkent a sejtek életképessége. Mindkét magas koncentrációjú indukáló szer emelte a ROS szintjét.
2. Eredményeinkből az is egyértelműen látszik, hogy az alkalmazott két HO-1 induktor aktiválja az autofágiát. Mind az LC3B-II, mind pedig a p62 szintje megemelkedett. Továbbá a Klorokin kezelés megerősítette azt a feltételezésünket, hogy a hibásan működő autofágia hozzájárulhat a szívizomsejtek hem toxicitásához.
3. Eredményeink azt mutatják, hogy a magas koncentrációjú HO-1 induktorok hatására csökken a pro-kaspáz-3, és emelkedik a hasított-kaspáz-3 expresszió.

## IX. Irodalom jegyzék

1. 2018 E. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-statistical-books/-/KS-HA-18-001>.
2. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:1-31. PubMed PMID: 8660387.
3. McQuaid KE, Keenan AK. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp Physiol.* 1997;82(2):369-76. PubMed PMID: 9129951.
4. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993;215(2):213-9. PubMed PMID: 7688300.
5. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(4):379-88. doi: 10.1006/jmcc.2002.1526. PubMed PMID: 11991728.
6. Hemnani T, Parihar MS. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1998;42(4):440-52. PubMed PMID: 10874342.
7. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5(6):731-40. doi: 10.1089/152308603770380034. PubMed PMID: 14588146.
8. Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest.* 2001;107(7):853-60. doi: 10.1172/JCI11194. PubMed PMID: 11285304; PubMed Central PMCID: PMC199570.
9. Khatri JJ, Johnson C, Magid R, Lessner SM, Laude KM, Dikalov SI, et al. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation.* 2004;109(4):520-5. doi: 10.1161/01.CIR.0000109698.70638.2B. PubMed PMID: 14744973.
10. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1785-92. doi: 10.1172/JCI115499. PubMed PMID: 1752940; PubMed Central PMCID: PMC199570.
11. Asimakis GK, Lick S, Patterson C. Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts. *Circulation.* 2002;105(8):981-6. PubMed PMID: 11864929.
12. Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS, Das DK. Targeted disruption of the mouse Sod I gene makes the hearts vulnerable to ischemic reperfusion injury. *Circ Res.* 2000;86(3):264-9. PubMed PMID: 10679476.
13. Pimentel DR, Amin JK, Xiao L, Miller T, Viereck J, Oliver-Krasinski J, et al. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2001;89(5):453-60. PubMed PMID: 11532907.
14. Adeghate E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol Cell Biochem.* 2004;261(1-2):187-91. PubMed PMID: 15362503.
15. Guerra L, Cerbai E, Gessi S, Borea PA, Mugelli A. The effect of oxygen free radicals on calcium current and dihydropyridine binding sites in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 1996;118(5):1278-84. PubMed PMID: 8818354; PubMed Central PMCID: PMC199584.
16. Goldhaber JJ. Free radicals enhance Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):H823-33. doi: 10.1152/ajpheart.1996.271.3.H823. PubMed PMID: 8853314.

17. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115(3):500-8. doi: 10.1172/JCI24408. PubMed PMID: 15765131; PubMed Central PMCID: PMC1052012.
18. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol.* 1992;262(4 Pt 1):C882-90. doi: 10.1152/ajpcell.1992.262.4.C882. PubMed PMID: 1566816.
19. Dart C, Standen NB. Activation of ATP-dependent K<sup>+</sup> channels by hypoxia in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol.* 1995;483 ( Pt 1):29-39. PubMed PMID: 7539841; PubMed Central PMCID: PMC1157869.
20. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *J Biol Chem.* 2002;277(36):32405-8. doi: 10.1074/jbc.C200328200. PubMed PMID: 12119283.
21. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997;272(36):22642-7. PubMed PMID: 9278421.
22. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 2005;105(2):659-69. doi: 10.1182/blood-2004-07-2958. PubMed PMID: 15374877.
23. Allen DG, Orchard CH. Intracellular calcium concentration during hypoxia and metabolic inhibition in mammalian ventricular muscle. *J Physiol.* 1983;339:107-22. PubMed PMID: 6887018; PubMed Central PMCID: PMC1199151.
24. Ghimire LV. Congenital Heart Disease and High Altitude: Is Chronic Hypoxia a Common Factor in Intellectual Impairment? *High Alt Med Biol.* 2017;18(3):299-300. doi: 10.1089/ham.2017.0043. PubMed PMID: 28485995.
25. McGrath JJ, Prochazka J, Pelouch V, Ostadal B. Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *J Appl Physiol.* 1973;34(3):289-93. doi: 10.1152/jappl.1973.34.3.289. PubMed PMID: 4265849.
26. Neckar J, Szarszoi O, Koten L, Papousek F, Ost'adal B, Grover GJ, et al. Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res.* 2002;55(3):567-75. PubMed PMID: 12160954.
27. Milano G, Corno AF, Lippa S, Von Segesser LK, Samaja M. Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227(6):389-97. PubMed PMID: 12037128.
28. Corno AF, Milano G, Morel S, Tozzi P, Genton CY, Samaja M, et al. Hypoxia: unique myocardial morphology? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(5):1301-8. doi: 10.1016/j.jtcvs.2003.06.012. PubMed PMID: 15115986.
29. Farahani R, Kanaan A, Gavrialov O, Brunnert S, Douglas RM, Morcillo P, et al. Differential effects of chronic intermittent and chronic constant hypoxia on postnatal growth and development. *Pediatr Pulmonol.* 2008;43(1):20-8. doi: 10.1002/ppul.20729. PubMed PMID: 18041750.
30. Bianciardi P, Fantacci M, Caretti A, Ronchi R, Milano G, Morel S, et al. Chronic in vivo hypoxia in various organs: hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(3):875-80. PubMed PMID: 16596722.
31. Shroff EH, Snyder C, Chandel NS. Bcl-2 family members regulate anoxia-induced cell death. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(9):1405-9. doi: 10.1089/ars.2007.1731. PubMed PMID: 17627475.

32. Webster KA. Puma joins the battery of BH3-only proteins that promote death and infarction during myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H20-2. doi: 10.1152/ajpheart.00111.2006. PubMed PMID: 16772523.
33. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394(6692):485-90. doi: 10.1038/28867. PubMed PMID: 9697772.
34. Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM, Zhou ZN. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res*. 2003;13(5):385-91. doi: 10.1038/sj.cr.7290184. PubMed PMID: 14672562.
35. Park AM, Nagase H, Vinod Kumar S, Suzuki YJ. Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(2):H751-7. doi: 10.1152/ajpheart.01016.2006. PubMed PMID: 17098826.
36. Hanania NA, Ambrosino N, Calverley P, Cazzola M, Donner CF, Make B. Treatments for COPD. *Respir Med*. 2005;99 Suppl B:S28-40. doi: 10.1016/j.rmed.2005.09.013. PubMed PMID: 16239101.
37. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM*. 2004;97(7):385-95. PubMed PMID: 15208426.
38. Cornet AD, Kooter AJ, Peters MJ, Smulders YM. Supplemental oxygen therapy in medical emergencies: more harm than benefit? *Arch Intern Med*. 2012;172(3):289-90. doi: 10.1001/archinternmed.2011.624. PubMed PMID: 22231614.
39. Sjoberg F, Singer M. The medical use of oxygen: a time for critical reappraisal. *J Intern Med*. 2013;274(6):505-28. doi: 10.1111/joim.12139. PubMed PMID: 24206183.
40. Inoue T, Ku K, Kaneda T, Zang Z, Otaki M, Oku H. Cardioprotective effects of lowering oxygen tension after aortic unclamping on cardiopulmonary bypass during coronary artery bypass grafting. *Circ J*. 2002;66(8):718-22. PubMed PMID: 12197594.
41. Decalmer S, O'Driscoll BR. Oxygen: friend or foe in peri-operative care? *Anaesthesia*. 2013;68(1):8-12. doi: 10.1111/anae.12088. PubMed PMID: 23130783.
42. Tahep Id P, Valen G, Starkopf J, Kairane C, Zilmer M, Vaage J. Pretreating rats with hyperoxia attenuates ischemia-reperfusion injury of the heart. *Life Sci*. 2001;68(14):1629-40. PubMed PMID: 11263675.
43. Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1982;217(2):411-21. PubMed PMID: 7138014.
44. Nagato AC, Bezerra FS, Lanzetti M, Lopes AA, Silva MA, Porto LC, et al. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. *Int J Exp Pathol*. 2012;93(4):269-78. doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00823.x. PubMed PMID: 22804763; PubMed Central PMCID: PMC3444983.
45. Farquhar H, Weatherall M, Wijesinghe M, Perrin K, Ranchord A, Simmonds M, et al. Systematic review of studies of the effect of hyperoxia on coronary blood flow. *Am Heart J*. 2009;158(3):371-7. doi: 10.1016/j.ahj.2009.05.037. PubMed PMID: 19699859.
46. Bak Z, Sjoberg F, Rousseau A, Steinvall I, Janerot-Sjoberg B. Human cardiovascular dose-response to supplemental oxygen. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;191(1):15-24. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01710.x. PubMed PMID: 17506865.
47. Shibata S, Iwasaki K, Ogawa Y, Kato J, Ogawa S. Cardiovascular neuroregulation during acute exposure to 40, 70, and 100% oxygen at sea level. *Aviat Space Environ Med*. 2005;76(12):1105-10. PubMed PMID: 16370259.

48. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290(5497):1717-21. PubMed PMID: 11099404; PubMed Central PMCID: PMCPMC2732363.
49. Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(11):2201-14. doi: 10.1089/ars.2010.3482. PubMed PMID: 20712405.
50. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356. PubMed PMID: 26799652; PubMed Central PMCID: PMCPMC4835977.
51. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(7):458-67. doi: 10.1038/nrm2708. PubMed PMID: 19491929.
52. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):729-34. doi: 10.1038/nrc1974. PubMed PMID: 16915295.
53. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):51-6. doi: 10.1016/j.gde.2009.10.009. PubMed PMID: 19942427; PubMed Central PMCID: PMCPMC2822127.
54. Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;196(1):65-80. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01972.x. PubMed PMID: 19245654; PubMed Central PMCID: PMCPMC2760308.
55. Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 2):259-70. doi: 10.1242/jcs.02735. PubMed PMID: 16390869.
56. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*. 2009;452:181-97. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4. PubMed PMID: 19200883.
57. Khambu B, Yan S, Huda N, Liu G, Yin XM. Homeostatic Role of Autophagy in Hepatocytes. *Semin Liver Dis*. 2018;38(4):308-19. doi: 10.1055/s-0038-1669939. PubMed PMID: 30357768.
58. Sinha RA, Singh BK, Yen PM. Reciprocal Crosstalk Between Autophagic and Endocrine Signaling in Metabolic Homeostasis. *Endocr Rev*. 2017;38(1):69-102. doi: 10.1210/er.2016-1103. PubMed PMID: 27901588.
59. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):377-88. doi: 10.1038/cdd.2014.150. PubMed PMID: 25257172; PubMed Central PMCID: PMCPMC4326572.
60. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75. doi: 10.1038/nature06639. PubMed PMID: 18305538; PubMed Central PMCID: PMCPMC2670399.
61. Yamamoto S, Sawada K, Shimomura H, Kawamura K, James TN. On the nature of cell death during remodeling of hypertrophied human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(1):161-75. doi: 10.1006/jmcc.1999.1064. PubMed PMID: 10652200.
62. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*. 2000;406(6798):906-10. doi: 10.1038/35022604. PubMed PMID: 10972294.
63. Martinet W, Knaapen MW, Kockx MM, De Meyer GR. Autophagy in cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2007;13(11):482-91. doi: 10.1016/j.molmed.2007.08.004. PubMed PMID: 18029229.

64. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):961-7. doi: 10.1038/nrc2254. PubMed PMID: 17972889; PubMed Central PMCID: PMC2866167.
65. Winslow AR, Rubinsztein DC. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(12):723-9. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.06.010. PubMed PMID: 18644437; PubMed Central PMCID: PMC2597715.
66. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682-95. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030. PubMed PMID: 21884931.
67. Lunemann JD, Munz C. Autophagy in CD4+ T-cell immunity and tolerance. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):79-86. doi: 10.1038/cdd.2008.113. PubMed PMID: 18636073.
68. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):245-53. doi: 10.1016/j.abb.2007.03.034. PubMed PMID: 17475204; PubMed Central PMCID: PMC2756107.
69. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol*. 2003;23(6):447-59. PubMed PMID: 15031632.
70. Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, et al. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ*. 2007;14(1):146-57. doi: 10.1038/sj.cdd.4401936. PubMed PMID: 16645637.
71. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2006;281(40):29776-87. doi: 10.1074/jbc.M603783200. PubMed PMID: 16882669.
72. Sybers HD, Ingwall J, DeLuca M. Autophagy in cardiac myocytes. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1976;12:453-63. PubMed PMID: 1032000.
73. Decker RS, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol*. 1980;98(2):425-44. PubMed PMID: 7355988; PubMed Central PMCID: PMC21903416.
74. Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med*. 2009;13(2):373-87. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00495.x. PubMed PMID: 18793351; PubMed Central PMCID: PMC23823363.
75. Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masarekar M, Massover WH, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13807-12. doi: 10.1073/pnas.0506843102. PubMed PMID: 16174725; PubMed Central PMCID: PMC1224362.
76. Meyer G, Czompa A, Reboul C, Csepanyi E, Czeglédi A, Bak I, et al. The cellular autophagy markers Beclin-1 and LC3B-II are increased during reperfusion in fibrillated mouse hearts. *Curr Pharm Des*. 2013;19(39):6912-8. PubMed PMID: 23590156.
77. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res*. 2009;104(2):150-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.187427. PubMed PMID: 19179668; PubMed Central PMCID: PMC2765251.
78. Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, Mizukami Y. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene*. 2003;22(52):8529-35. doi: 10.1038/sj.onc.1207197. PubMed PMID: 14627994.
79. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, et al. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40(6):846-52. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.03.428. PubMed PMID: 16697404.

80. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res.* 2007;100(6):914-22. doi: 10.1161/01.RES.0000261924.76669.36. PubMed PMID: 17332429.
81. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005;122(6):927-39. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.002. PubMed PMID: 16179260.
82. Chu CT, Zhu J, Dagda R. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy.* 2007;3(6):663-6. PubMed PMID: 17622797; PubMed Central PMCID: PMCPMC2779565.
83. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(8):1318-29. doi: 10.1038/cdd.2008.51. PubMed PMID: 18421301.
84. Tian S, Lin J, Jun Zhou J, Wang X, Li Y, Ren X, et al. Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18. *Autophagy.* 2010;6(8):1032-41. doi: 10.4161/auto.6.8.13336. PubMed PMID: 20818185.
85. Feng CC, Lin CC, Lai YP, Chen TS, Marthandam Asokan S, Lin JY, et al. Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1alpha-IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP3 expression. *Growth Factors.* 2016;34(3-4):73-86. doi: 10.1080/08977194.2016.1191480. PubMed PMID: 27366871.
86. Gui L, Liu B, Lv G. Hypoxia induces autophagy in cardiomyocytes via a hypoxia-inducible factor 1-dependent mechanism. *Exp Ther Med.* 2016;11(6):2233-9. doi: 10.3892/etm.2016.3190. PubMed PMID: 27284306; PubMed Central PMCID: PMCPMC4887955.
87. Zhang R, Zhu F, Ren J, Huang L, Liu P, Wu G. Beclin1/PI3K-mediated autophagy prevents hypoxia-induced apoptosis in EAhy926 cell line. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011;26(3):335-43. doi: 10.1089/cbr.2010.0814. PubMed PMID: 21711108.
88. Zhang L, Zhao S, Yuan LJ, Wu HM, Jiang H, Zhao SM, et al. Autophagy regulates hyperoxia-induced intracellular accumulation of surfactant protein C in alveolar type II cells. *Mol Cell Biochem.* 2015;408(1-2):181-9. doi: 10.1007/s11010-015-2494-z. PubMed PMID: 26122393.
89. Tanaka A, Jin Y, Lee SJ, Zhang M, Kim HP, Stolz DB, et al. Hyperoxia-induced LC3B interacts with the Fas apoptotic pathway in epithelial cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46(4):507-14. doi: 10.1165/rcmb.2009-0415OC. PubMed PMID: 22095627; PubMed Central PMCID: PMCPMC3359946.
90. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;61(2):748-55. PubMed PMID: 4386763; PubMed Central PMCID: PMCPMC225223.
91. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 1969;244(23):6388-94. PubMed PMID: 4390967.
92. Liu Y, Moenne-Loccoz P, Loehr TM, Ortiz de Montellano PR. Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents. *J Biol Chem.* 1997;272(11):6909-17. PubMed PMID: 9054378.
93. Matera KM, Takahashi S, Fujii H, Zhou H, Ishikawa K, Yoshimura T, et al. Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of alpha-hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase. *J Biol Chem.* 1996;271(12):6618-24. PubMed PMID: 8636077.
94. Wilks A. Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4(4):603-14. doi: 10.1089/15230860260220102. PubMed PMID: 12230872.

95. Li C, Stocker R. Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. *Redox Rep.* 2009;14(3):95-101. doi: 10.1179/135100009X392584. PubMed PMID: 19490750.
96. McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* 1997;247(2):725-32. PubMed PMID: 9266719.
97. Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;141(2):528-33. PubMed PMID: 3099789.
98. Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, et al. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 2005;112(7):1030-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528802. PubMed PMID: 16087796.
99. Posa A, Kupai K, Menesi R, Szalai Z, Szabo R, Pinter Z, et al. Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:521563. doi: 10.1155/2013/521563. PubMed PMID: 24163720; PubMed Central PMCID: PMC3791627.
100. Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J.* 2004;18(10):1080-9. doi: 10.1096/fj.03-1391com. PubMed PMID: 15226268.
101. Slebos DJ, Ryter SW, van der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, et al. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(4):409-17. doi: 10.1165/rcmb.2006-0214OC. PubMed PMID: 17079780; PubMed Central PMCID: PMC1899328.
102. Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, et al. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20621-33. doi: 10.1074/jbc.M607954200. PubMed PMID: 17430897.
103. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(1):99-103. PubMed PMID: 2911585; PubMed Central PMCID: PMC286411.
104. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* 1991;51(3):974-8. PubMed PMID: 1988141.
105. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* 2006;86(2):583-650. doi: 10.1152/physrev.00011.2005. PubMed PMID: 16601269.
106. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13291-5. doi: 10.1074/jbc.R900010200. PubMed PMID: 19182219; PubMed Central PMCID: PMC2679427.
107. Panchenko MV, Farber HW, Korn JH. Induction of heme oxygenase-1 by hypoxia and free radicals in human dermal fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(1):C92-C101. doi: 10.1152/ajpcell.2000.278.1.C92. PubMed PMID: 10644516.
108. Christou H, Bailey N, Kluger MS, Mitsialis SA, Kourembanas S. Extracellular acidosis induces heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(6):H2647-52. doi: 10.1152/ajpheart.00937.2004. PubMed PMID: 15681695.

109. Dennery PA, Rodgers PA, Lum MA, Jennings BC, Shokoohi V. Hyperoxic regulation of lung heme oxygenase in neonatal rats. *Pediatr Res.* 1996;40(6):815-21. doi: 10.1203/00006450-199612000-00007. PubMed PMID: 8947956.
110. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 1992;267(25):18148-53. PubMed PMID: 1517245.
111. Alam J, Cook JL. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(2):166-74. doi: 10.1165/rcmb.2006-0340TR. PubMed PMID: 16990612.
112. Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, et al. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol Cell Biol.* 2007;27(19):6962-71. doi: 10.1128/MCB.02415-06. PubMed PMID: 17682061; PubMed Central PMCID: PMCPMC2099246.
113. Hira S, Tomita T, Matsui T, Igarashi K, Ikeda-Saito M. Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure. *IUBMB Life.* 2007;59(8-9):542-51. doi: 10.1080/15216540701225941. PubMed PMID: 17701549.
114. Ishikawa M, Numazawa S, Yoshida T. Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(10):1344-52. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.021. PubMed PMID: 15855052.
115. Hayes JD, McMahon M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett.* 2001;174(2):103-13. PubMed PMID: 11689285.
116. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem.* 1997;272(9):5375-81. PubMed PMID: 9038135.
117. Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(13):5987-91. PubMed PMID: 8016102; PubMed Central PMCID: PMCPMC44122.
118. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest.* 1999;103(1):129-35. doi: 10.1172/JCI4165. PubMed PMID: 9884342; PubMed Central PMCID: PMCPMC407858.
119. Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10919-24. PubMed PMID: 9380735; PubMed Central PMCID: PMCPMC23531.
120. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10925-30. PubMed PMID: 9380736; PubMed Central PMCID: PMCPMC23533.
121. Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, et al. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest.* 1999;103(8):R23-9. doi: 10.1172/JCI6163. PubMed PMID: 10207174; PubMed Central PMCID: PMCPMC408281.
122. Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, et al. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res.* 2001;89(2):168-73. PubMed PMID: 11463724.

123. Vulapalli SR, Chen Z, Chua BH, Wang T, Liang CS. Cardioselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(2):H688-94. doi: 10.1152/ajpheart.00133.2002. PubMed PMID: 12124217.
124. Juhasz B, Varga B, Czompa A, Bak I, Lekli I, Gesztelyi R, et al. Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium. *J Cell Mol Med*. 2011;15(9):1973-82. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01153.x. PubMed PMID: 20716121; PubMed Central PMCID: PMC3918052.
125. Durante W. Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease. *J Cell Physiol*. 2003;195(3):373-82. doi: 10.1002/jcp.10274. PubMed PMID: 12704646.
126. Stocker R, Perrella MA. Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation*. 2006;114(20):2178-89. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.598698. PubMed PMID: 17101869.
127. Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett*. 1989;245(1-2):173-6. PubMed PMID: 2924920.
128. Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ, Motterlini R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol*. 2002;61(3):554-61. PubMed PMID: 11854435.
129. Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J*. 2003;371(Pt 3):887-95. doi: 10.1042/BJ20021619. PubMed PMID: 12570874; PubMed Central PMCID: PMC1223348.
130. Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(4):993-1000. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.237. PubMed PMID: 15882976.
131. Juan SH, Cheng TH, Lin HC, Chu YL, Lee WS. Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(1):41-8. doi: 10.1016/j.bcp.2004.09.015. PubMed PMID: 15588712.
132. Yao P, Li K, Song F, Zhou S, Sun X, Zhang X, et al. Heme oxygenase-1 upregulated by Ginkgo biloba extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(8):1333-42. doi: 10.1016/j.fct.2007.01.016. PubMed PMID: 17467134.
133. Czompa A, Gyongyosi A, Czegledi A, Csepanyi E, Bak I, Haines DD, et al. Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;64(5):412-9. doi: 10.1097/FJC.000000000000132. PubMed PMID: 24949584.
134. Yoshida T, Biro P, Cohen T, Muller RM, Shibahara S. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *Eur J Biochem*. 1988;171(3):457-61. PubMed PMID: 3345742.
135. Sardana MK, Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(8):2464-8. PubMed PMID: 3470805; PubMed Central PMCID: PMC304672.
136. Drummond GS, Kappas A. The cytochrome P-450-depleted animal: an experimental model for in vivo studies in chemical biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(7):2384-8. PubMed PMID: 6954546; PubMed Central PMCID: PMC346198.
137. Maines MD, Kappas A. Enzymatic oxidation of cobalt protoporphyrin IX: observations on the mechanism of heme oxygenase action. *Biochemistry*. 1977;16(3):419-23. PubMed PMID: 836794.

138. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(2):289-309. PubMed PMID: 11281297.
139. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(7):2607-10. PubMed PMID: 8146161; PubMed Central PMCID: PMCPMC43418.
140. Reeve VE, Tyrrell RM. Heme oxygenase induction mediates the photoimmunoprotective activity of UVA radiation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):9317-21. PubMed PMID: 10430940; PubMed Central PMCID: PMCPMC17780.
141. Chen GG, Liu ZM, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC, van Hasselt CA. Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 2004;92(6):1246-56. doi: 10.1002/jcb.20157. PubMed PMID: 15258907.
142. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6. doi: 10.1038/35037710. PubMed PMID: 11048727.
143. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:331-67. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.331. PubMed PMID: 10358762.
144. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):741-52. doi: 10.1038/nrm2239. PubMed PMID: 17717517.
145. Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, et al. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med.* 1998;4(9):1073-7. doi: 10.1038/2063. PubMed PMID: 9734404.
146. Ke B, Buelow R, Shen XD, Melinek J, Amersi F, Gao F, et al. Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Hum Gene Ther.* 2002;13(10):1189-99. doi: 10.1089/104303402320138970. PubMed PMID: 12133272.
147. Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E, et al. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4(2):321-9. doi: 10.1089/152308602753666370. PubMed PMID: 12006183.
148. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med.* 2000;192(7):1015-26. PubMed PMID: 11015442; PubMed Central PMCID: PMCPMC2193315.
149. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol.* 2004;173(3):2023-30. PubMed PMID: 15265937.
150. Zhang X, Shan P, Alam J, Fu XY, Lee PJ. Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol Chem.* 2005;280(10):8714-21. doi: 10.1074/jbc.M408092200. PubMed PMID: 15590660.
151. Salinas M, Wang J, Rosa de Sagarra M, Martin D, Rojo AI, Martin-Perez J, et al. Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 2004;578(1-2):90-4. doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.077. PubMed PMID: 15581622.
152. Linden MA, Pincu Y, Martin SA, Woods JA, Baynard T. Moderate exercise training provides modest protection against adipose tissue inflammatory gene expression in response to

high-fat feeding. *Physiol Rep*. 2014;2(7). doi: 10.14814/phy2.12071. PubMed PMID: 25347855; PubMed Central PMCID: PMC4187542.

153. Varga C, Veszelka M, Kupai K, Borzsei D, Deim Z, Szabo R, et al. The Effects of Exercise Training and High Triglyceride Diet in an Estrogen Depleted Rat Model: The Role of the Heme Oxygenase System and Inflammatory Processes in Cardiovascular Risk. *J Sports Sci Med*. 2018;17(4):580-8. PubMed PMID: 30479526; PubMed Central PMCID: PMC6243614.

154. Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol*. 1999;276(4 Pt 1):L688-94. PubMed PMID: 10198367.

155. Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, et al. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med*. 2001;7(5):598-604. doi: 10.1038/87929. PubMed PMID: 11329062.

156. Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol*. 2001;166(6):4185-94. PubMed PMID: 11238670.

157. Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, d'Avila JC, Rao J, Billiar TR, et al. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J*. 2007;21(4):1099-106. doi: 10.1096/fj.06-6644com. PubMed PMID: 17264172.

158. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000;6(4):422-8. doi: 10.1038/74680. PubMed PMID: 10742149.

159. Otterbein LE, Otterbein SL, Ifedigbo E, Liu F, Morse DE, Fearn C, et al. MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2555-63. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63610-3. PubMed PMID: 14633627; PubMed Central PMCID: PMC1892354.

160. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, Wang HJ, Macdonald T, Zhang XC, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5109-14. doi: 10.1073/pnas.0609611104. PubMed PMID: 17360382; PubMed Central PMCID: PMC1820823.

161. Cozzi A, Levi S, Corsi B, Santambrogio P, Campanella A, Gerardi G, et al. Role of iron and ferritin in TNFalpha-induced apoptosis in HeLa cells. *FEBS Lett*. 2003;537(1-3):187-92. PubMed PMID: 12606055.

162. Morse D, Pischke SE, Zhou Z, Davis RJ, Flavell RA, Loop T, et al. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem*. 2003;278(39):36993-8. doi: 10.1074/jbc.M302942200. PubMed PMID: 12857751.

163. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235(4792):1043-6. PubMed PMID: 3029864.

164. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16093-8. doi: 10.1073/pnas.252626999. PubMed PMID: 12456881; PubMed Central PMCID: PMC138570.

165. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(9-10):1371-87. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.06.014. PubMed PMID: 16950166.

166. Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y, Nagata S. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol*. 2000;151(6):1247-56. PubMed PMID: 11121439; PubMed Central PMCID: PMC190580.

167. Reiter TA, Pang B, Dedon P, Demple B. Resistance to nitric oxide-induced necrosis in heme oxygenase-1 overexpressing pulmonary epithelial cells associated with decreased lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 2006;281(48):36603-12. doi: 10.1074/jbc.M602634200. PubMed PMID: 17020887.
168. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(5):2445-50. PubMed PMID: 10051662; PubMed Central PMCID: PMCPMC26804.
169. Pachori AS, Smith A, McDonald P, Zhang L, Dzau VJ, Melo LG. Heme-oxygenase-1-induced protection against hypoxia/reoxygenation is dependent on biliverdin reductase and its interaction with PI3K/Akt pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(5):580-92. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.08.003. PubMed PMID: 17920074; PubMed Central PMCID: PMCPMC2699998.
170. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood.* 2000;95(11):3442-50. PubMed PMID: 10828027.
171. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 2002;100(3):879-87. PubMed PMID: 12130498.
172. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 2005;157(3):175-88. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.03.004. PubMed PMID: 15917143.
173. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* 2001;59(1):106-17. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00471.x. PubMed PMID: 11135063.
174. Goldstein L, Teng ZP, Zeserson E, Patel M, Regan RF. Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J Neurosci Res.* 2003;73(1):113-21. doi: 10.1002/jnr.10633. PubMed PMID: 12815715.
175. Bhoite-Solomon V, Kessler-Icekson G, Shaklai N. Myocyte injury by hemin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993;29A(8):636-42. PubMed PMID: 8376316.
176. Kim EY, Kim JS, Kim MY, Koh WS, Guengerich FP, Yun CH. Non-specific inhibition of human cytochrome P450-catalyzed reactions by hemin. *Toxicol Lett.* 2004;153(2):239-46. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.04.017. PubMed PMID: 15451555.
177. Tsuji A, Wang J, Stenzel KH, Novogrodsky A. Immune stimulatory and anti-tumour properties of haemin. *Clin Exp Immunol.* 1993;93(3):308-12. PubMed PMID: 8370158; PubMed Central PMCID: PMCPMC1554895.
178. Cai C, Teng L, Vu D, He JQ, Guo Y, Li Q, et al. The heme oxygenase 1 inducer (CoPP) protects human cardiac stem cells against apoptosis through activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK)/NRF2 signaling pathway and cytokine release. *J Biol Chem.* 2012;287(40):33720-32. doi: 10.1074/jbc.M112.385542. PubMed PMID: 22879597; PubMed Central PMCID: PMCPMC3460469.
179. Regan RF, Wang Y, Ma X, Chong A, Guo Y. Activation of extracellular signal-regulated kinases potentiates hemin toxicity in astrocyte cultures. *J Neurochem.* 2001;79(3):545-55. PubMed PMID: 11701758.
180. Higdon AN, Benavides GA, Chacko BK, Ouyang X, Johnson MS, Landar A, et al. Hemin causes mitochondrial dysfunction in endothelial cells through promoting lipid peroxidation: the protective role of autophagy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(7):H1394-409. doi:

10.1152/ajpheart.00584.2011. PubMed PMID: 22245770; PubMed Central PMCID: PMC3330785.

181. Ishikawa S, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, Itoh M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1182-91. doi: 10.1002/mnfr.200900348. PubMed PMID: 20112302.

182. Gemelli C, Dongmo BM, Ferrarini F, Grande A, Corsi L. Cytotoxic effect of hemin in colonic epithelial cell line: involvement of 18 kDa translocator protein (TSPO). *Life Sci*. 2014;107(1-2):14-20. doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.026. PubMed PMID: 24792517.

183. Zhao Y, Zhang L, Qiao Y, Zhou X, Wu G, Wang L, et al. Heme oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy. *PLoS One*. 2013;8(9):e75927. doi: 10.1371/journal.pone.0075927. PubMed PMID: 24086665; PubMed Central PMCID: PMC3782439.

184. Gurtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2013;433(2):105-11. doi: 10.1016/j.ab.2012.10.010. PubMed PMID: 23085117.

185. Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Ishihara A. Oxygen concentration-dependent oxidative stress levels in rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:381763. doi: 10.1155/2012/381763. PubMed PMID: 22988483; PubMed Central PMCID: PMC3440952.

186. Benderro GF, Sun X, Kuang Y, Lamanna JC. Decreased VEGF expression and microvascular density, but increased HIF-1 and 2alpha accumulation and EPO expression in chronic moderate hyperoxia in the mouse brain. *Brain Res*. 2012;1471:46-55. doi: 10.1016/j.brainres.2012.06.055. PubMed PMID: 22820296; PubMed Central PMCID: PMC3454487.

187. Terraneo L, Paroni R, Bianciardi P, Giallongo T, Carelli S, Gorio A, et al. Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *Redox Biol*. 2017;11:12-20. doi: 10.1016/j.redox.2016.10.018. PubMed PMID: 27835780; PubMed Central PMCID: PMC5107733.

188. Zara S, Macchi V, De Caro R, Rapino M, Cataldi A, Porzionato A. pPKCalpha mediated-HIF-1alpha activation related to the morphological modifications occurring in neonatal myocardial tissue in response to severe and mild hyperoxia. *Eur J Histochem*. 2012;56(1):e2. doi: 10.4081/ejh.2012.e2. PubMed PMID: 22472890; PubMed Central PMCID: PMC3352131.

189. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PubMed PMID: 17562483; PubMed Central PMCID: PMC2117903.

190. Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(5):395-403. doi: 10.1165/rcmb.2004-0314OC. PubMed PMID: 15695738.

191. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9082-7. PubMed PMID: 10922063; PubMed Central PMCID: PMC16825.

192. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):889-92. PubMed PMID: 12213583.

193. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*.

- 2008;283(16):10892-903. doi: 10.1074/jbc.M800102200. PubMed PMID: 18281291; PubMed Central PMCID: PMCPMC2447655.
194. Xia S, Lv J, Gao Q, Li L, Chen N, Wei X, et al. Prenatal exposure to hypoxia induced Beclin 1 signaling-mediated renal autophagy and altered renal development in rat fetuses. *Reprod Sci.* 2015;22(2):156-64. doi: 10.1177/1933719114536474. PubMed PMID: 24872334; PubMed Central PMCID: PMCPMC4287595.
195. Brattelid T, Winer LH, Levy FO, Liestol K, Sejersted OM, Andersson KB. Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies. *BMC Mol Biol.* 2010;11:22. doi: 10.1186/1471-2199-11-22. PubMed PMID: 20331858; PubMed Central PMCID: PMCPMC2907514.
196. Pilbrow AP, Ellmers LJ, Black MA, Moravec CS, Sweet WE, Troughton RW, et al. Genomic selection of reference genes for real-time PCR in human myocardium. *BMC Med Genomics.* 2008;1:64. doi: 10.1186/1755-8794-1-64. PubMed PMID: 19114010; PubMed Central PMCID: PMCPMC2632664.
197. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics.* 2005;5(2):566-71. doi: 10.1002/pmic.200400941. PubMed PMID: 15627964.
198. Eaton SL, Roche SL, Llaverro Hurtado M, Oldknow KJ, Farquharson C, Gillingwater TH, et al. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One.* 2013;8(8):e72457. doi: 10.1371/journal.pone.0072457. PubMed PMID: 24023619; PubMed Central PMCID: PMCPMC3758299.
199. Shimada I, Matsui K, Iida R, Tsubota E, Matsuki T. Time course of housekeeping gene expression changes in diffuse alveolar damage induced by hyperoxia exposure in mice. *Leg Med (Tokyo).* 2009;11 Suppl 1:S151-4. doi: 10.1016/j.legalmed.2009.02.008. PubMed PMID: 19272828.
200. Li C, Zhang C, Wang T, Xuan J, Su C, Wang Y. Heme oxygenase 1 induction protects myocardial cells against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis : The role of JNK/c-Jun/Caspase-3 inhibition and Akt signaling enhancement. *Herz.* 2016;41(8):715-24. doi: 10.1007/s00059-016-4424-6. PubMed PMID: 27220977.
201. Delanghe JR, Langlois MR. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clin Chim Acta.* 2001;312(1-2):13-23. PubMed PMID: 11580905.
202. Lin TK, Chen SD, Chuang YC, Lin HY, Huang CR, Chuang JH, et al. Resveratrol partially prevents rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through induction of heme oxygenase-1 dependent autophagy. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):1625-46. doi: 10.3390/ijms15011625. PubMed PMID: 24451142; PubMed Central PMCID: PMCPMC3907890.
203. Carchman EH, Rao J, Loughran PA, Rosengart MR, Zuckerbraun BS. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice. *Hepatology.* 2011;53(6):2053-62. doi: 10.1002/hep.24324. PubMed PMID: 21437926.
204. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Ghidoni R, Codogno P. Non-canonical autophagy: an exception or an underestimated form of autophagy? *Autophagy.* 2008;4(8):1083-5. PubMed PMID: 18849663.
205. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(2):81-94. doi: 10.1038/nrm3735. PubMed PMID: 24401948; PubMed Central PMCID: PMCPMC3970201.

## **X. Tárgyszavak**

Iszkémia/reperfúzió

Szív

Oxigén

Hipoxia

Hiperoxia

Hemoxigenáz-1

Hem Toxicitás

Oxidatív stressz

Hipoxia indukált faktor

Apoptózis

Autofágia

Háztartási fehérje

Ischemia/Reperfusion

Heart

Oxygen

Hypoxia

Hyperoxia

Hemoxygenase-1

Hem toxicity

Oxidative stress

Hypoxia inducible factor

Apoptosis

Autophagy

Housekeeping protein

## **XI. 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 fejlődésekre.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Tósaki 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 Terraneonak**, hogy Velük dolgozhattam. Hálás vagyok, hogy kinn tartózkodásom alatt mindvégig támogattak szakmai iránymutatásukkal és biztatásukkal, melynek eredményeként közös publikációnk 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.

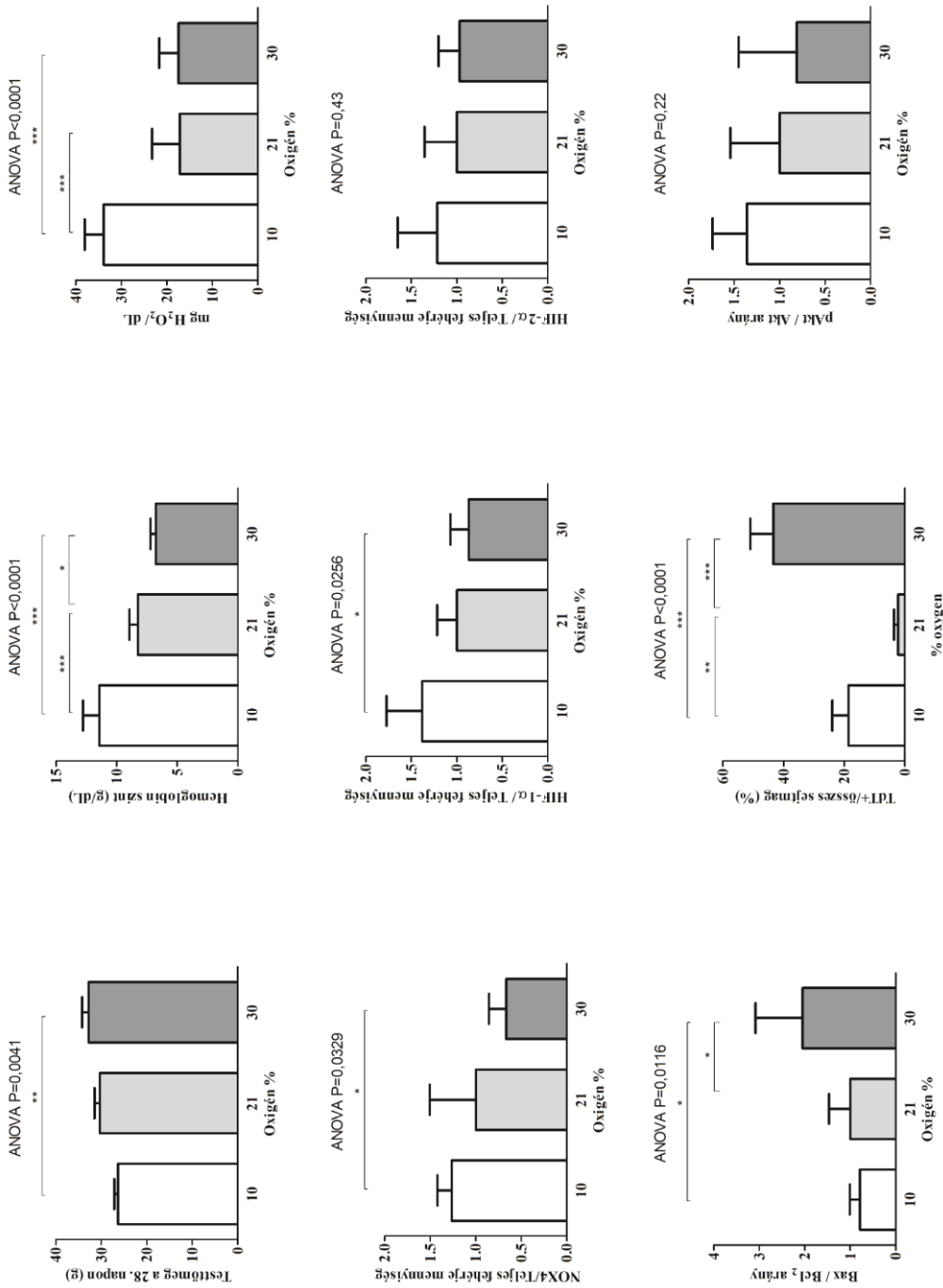
Végül, de nem utolsó sorban, kiemelt köszönetemet fejezném ki **Édesanyámnak, Nagyszüleimnek, a családom minden tagjának**, akik egész tanulmányaim során hittek bennem, lelkesítettek és nyugodt családi háttérrel biztosítottak a munka elvégzéséhez.

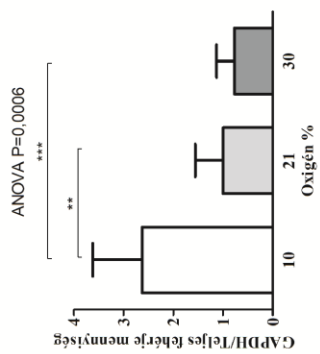
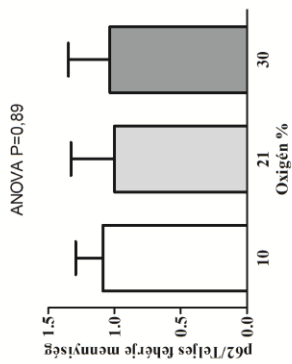
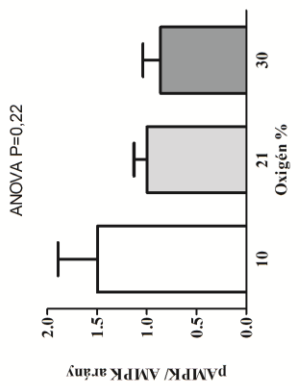
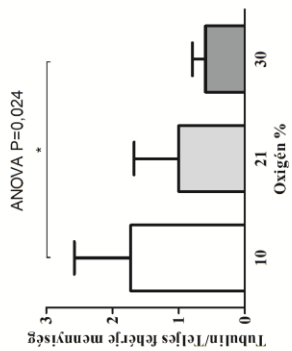
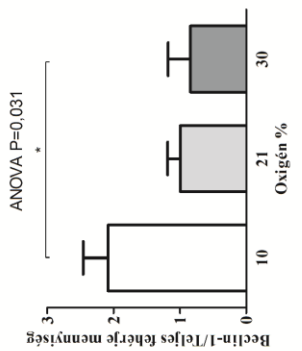
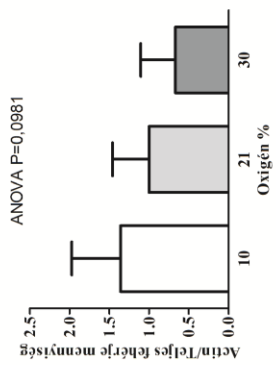
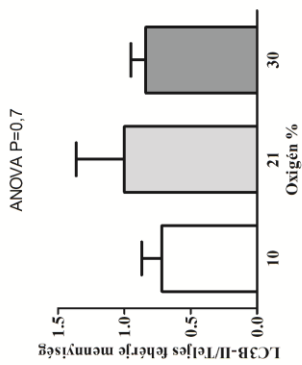
Az értekezés elkészítését a GINOP- 2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. További támogatások: Campus Mundi (Tempus Közalapítvány),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

## XII. Függelékek

### Függelék 1.

Mérsékelt, krónikus hipoxia és hiperoxia hatásának vizsgálata egér szíven – oszlopdiagrammok.



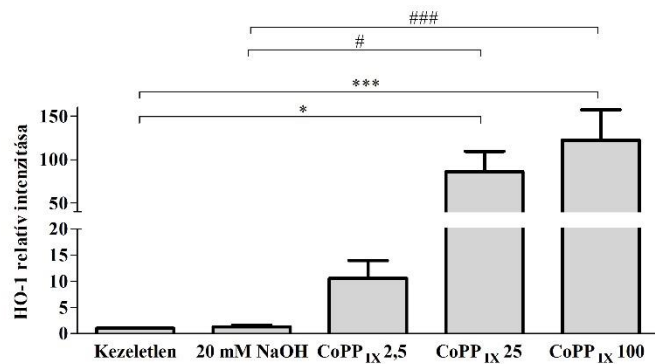
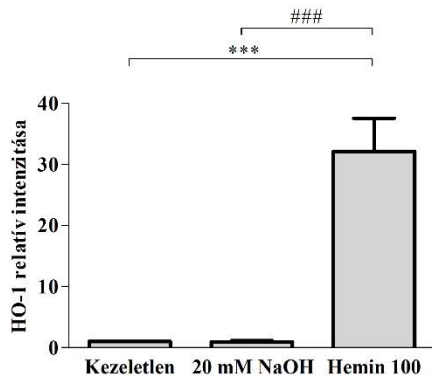
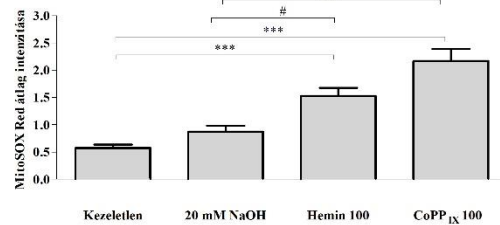
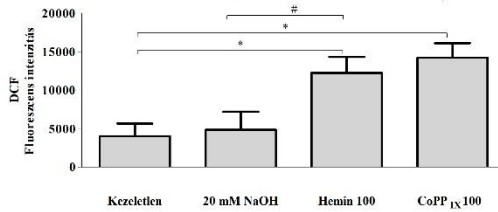
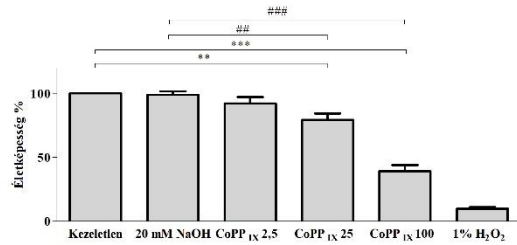
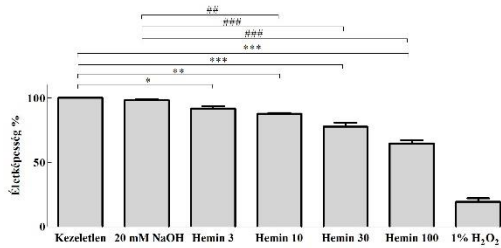


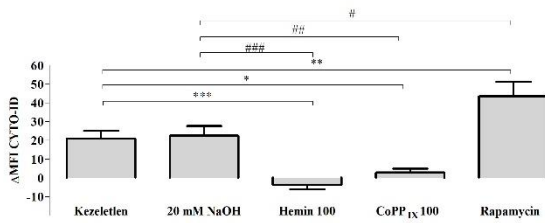
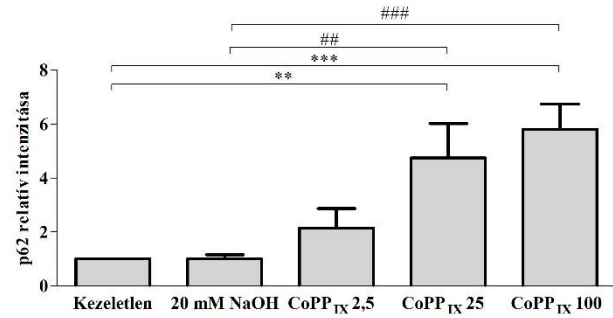
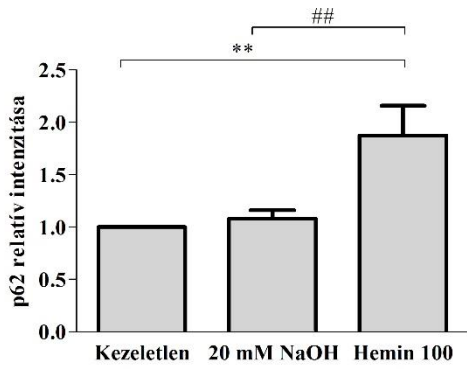
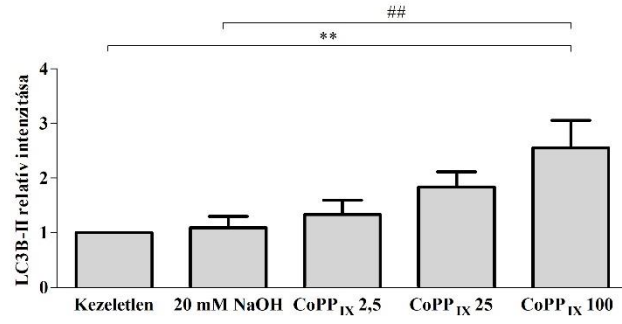
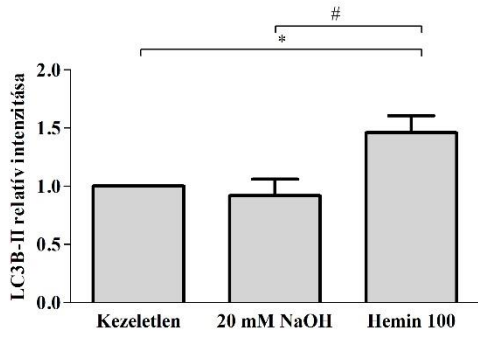
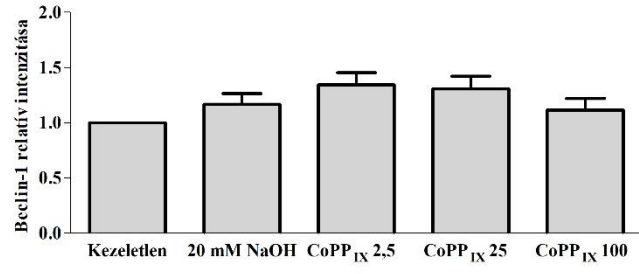
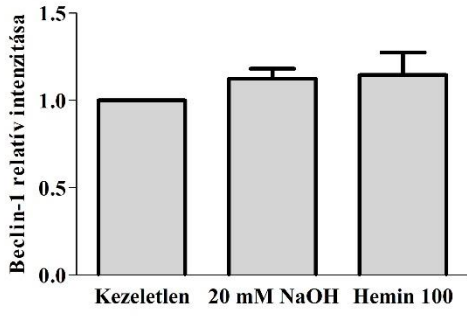
## Függelék 2:

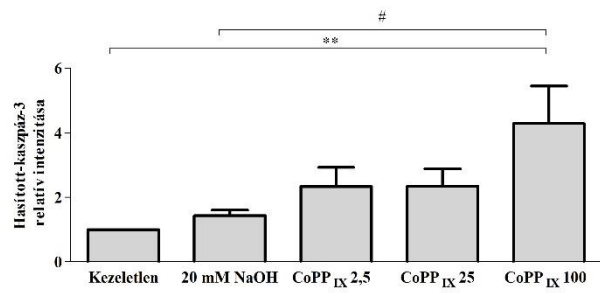
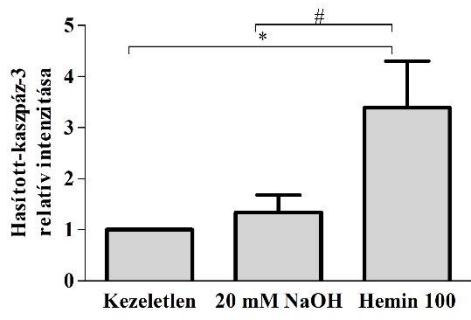
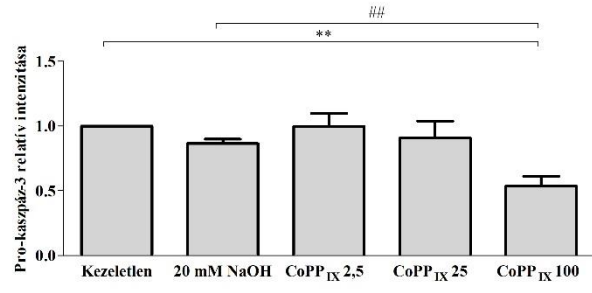
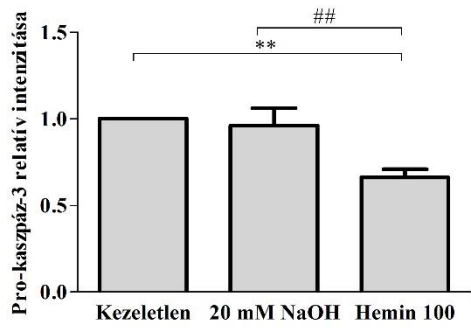
### HO-1 indukáló szerek toxicitásának vizsgálata és hatása az autofágia folyamatára

Kezeletlen vs. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

20 mM NaOH vs. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$







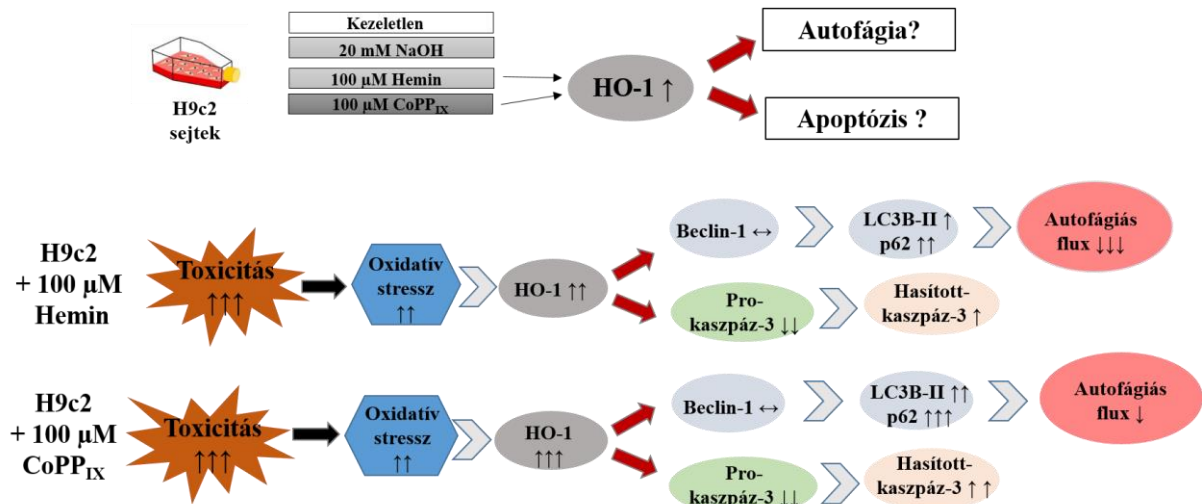
### Függelék 3:

Mérsékelt, krónikus hipoxia és hiperoxia hatásának vizsgálata egér szíven - összegző táblázat.

	Hipoxia	Hiperoxia
Testtömeg	↓	↑
Hemoglobin	↑	↓
D-ROMs	↑	↔
NOX4	↑	↔
HIF-1 $\alpha$	↑	↔
HIF-2 $\alpha$	↔	↔
Bax/Bcl-2	↔	↑
DNA törés	↑	↑
p-Akt	↔	↔
p-AMPK	↔	↔
Beclin-1	↑	↔
LC3B-II	↔	↔
p62	↔	↔
Tubulin	↑	↔
GAPDH	↑	↔
Aktin	↔	↔

## Függelék 4:

HO-1 indukáló szerek toxicitásának vizsgálata és hatása az autofágia folyamatára - összefoglaló ábra.





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

- 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)
- 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 alapjául 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.

