

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés**

**Farmakológiai beavatkozások és kardiotoxicitás vizsgálata a szívizomban: az autofágia jelentősége**

Zilinyi Rita

Témavezető: Prof. Dr. Tószaki Árpád



**DEBRECENI EGYETEM**

**Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola**

Debrecen  
2019

*„A tudományos munkát nem a közvetlen haszna alapján kell megítélni.  
Önmagáért, a tudomány szépségéért kell végezni”*

*Marie Curie*

<b>Rövidítések jegyzéke</b> .....	5
<b>Bevezetés</b> .....	7
Kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás .....	7
Szívelégtelenség és kezelésének lehetőségei .....	10
Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás .....	12
Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás .....	17
Az autofágia szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben .....	19
Az autofágia, az apoptózis és nekrozis .....	21
<b>Célkitűzések</b> .....	24
<b>Anyagok és módszerek I: Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás</b> .....	25
I/1. Kísérleti állatok .....	25
I/2. A kísérleteinkben felhasznált anyagok .....	25
I/3. Kísérleti elrendezés .....	26
I/4. Szérum biomarkerek meghatározása .....	28
I/5. Izolált dolgozó szív preparátum .....	30
I/6. Miofibrillumok vastagságának meghatározása .....	31
I/7. Lipidperoxidációs assay .....	32
I/8. Fehérje izolálás és Western blot .....	32
I/9. Statisztika .....	34
<b>Anyagok és módszerek II: Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás</b> .....	35
II/1. Kísérleti állatok .....	35
II/2. A kísérleteinkben felhasznált anyagok .....	35
II/3. Kísérleti elrendezés .....	36
II/4. Szérum biomarkerek meghatározása .....	37
II/5. Izolált dolgozó szív preparátum és az infarktusz terület .....	38
II/6. Az apoptózis meghatározása .....	38

II/7. Fehérje izolálás és Western blot .....	39
II/8. Statisztika.....	39
<b>Eredmények I: Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás.....</b>	<b>40</b>
I/1. A doxorubicin és metformin hatása a szívfunkcióra.....	40
I/2. A doxorubicin és metformin hatása a szérumbiomarkerekre.....	41
I/3. A doxorubicin és metformin hatása a miofibrillumra .....	42
I/4. A doxorubicin és metformin hatása a lipidperoxidációra .....	44
I/5. A doxorubicin és metformin hatása az autofágias markerek expressziójára .....	44
<b>Eredmények II: Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás .....</b>	<b>47</b>
II/1. Isoproterenol hatása a túlélésre .....	47
II/2. Isoproterenol hatása a szérumbiomarkerekre.....	48
II/3. Isoproterenol és az infarktusz terület .....	49
II/4. Isoproterenol és az apoptózis.....	50
II/5. Isoproterenol és az autofágiára .....	52
<b>Diszkusszió .....</b>	<b>54</b>
I. Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás.....	54
II. Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás .....	59
<b>Megállapításaink .....</b>	<b>63</b>
<b>A tanulmányok limitáló tényezői .....</b>	<b>64</b>
<b>Összefoglalás .....</b>	<b>64</b>
<b>Summary .....</b>	<b>66</b>
<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>67</b>
<b>Tárgyszavak.....</b>	<b>78</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>79</b>

## Rövidítések jegyzéke

ADP: adenzin-5'-difoszfát (adenosine-5'-diphosphate)

AF: aorta átfolyás (aorta flow)

AMP: adenzin-5'-monofoszfát (adenosine-5'-monophosphate)

AMPER: ammónium-persulfát (ammonium persulfate)

AMPK: AMP-aktivált protein kináz (AMP-activated protein kinase)

AoP: aortanyomás (aorta pressure)

Atg: autofágiához szükséges gén (autophagy related gene)

ATP: adenzin-5'-trifoszfát (adenosine-5'-triphosphate)

BCA: bikinkonin sav (bichoninic acid)

BHT: butil-hidroxi-toluol (butyl-hydroxytoluene)

BSA: marha szérum albumin (bovine serum albumin)

CaMKK: kalcium/kalmodulin-függő fehérje kináz kináz 2 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2)

CAT: kataláz (catalase)

CF: koronária átfolyás (coronary flow)

CK-MB: kreatin-kináz MB izotípus (creatine kinase-MB)

CO: perctérfogat (cardiac output)

CVD: kardiovaszkuláris betegség (cardio vascular disease)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DNS: dezoxi-ribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)

DOX: doxorubicin

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)

eNOS: endoteliális-nitrogén-monoxid-szintáz (endothelial nitric oxide synthase)

EU: Európai Unió (European Union)

GP<sub>x</sub>: glutathion peroxidáz (glutathione peroxidase)

GSH: glutathion (glutathione)

HR: szívfrekvencia (heart rate)

ISO: isoproterenol

i.p.: intra peritoneális (intra peritoneal)

LC3-I: mikrotubulus asszociált könnyű lánc fehérje 3A (microtubule-associated light chain protein 3A)

LC3-II: mikrotubulus asszociált *könnyű lánc* fehérje 3B (microtubule-associated light chain protein 3B)

LDH: laktát-dehidrogenáz (lactate-dehydrogenase)

LVDP: szisztolés nyomás – diasztolés nyomás (left ventricular developed pressure)

MDA: malondialdehid (malondialdehyde)

MET: metformin

mTOR: emlős rapamycin célfehérje (mammalian target of rapamycin)

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid (nicotinamide-adenine-dinucleotide)

PARP: poli(ADP-ribóz) polimeráz

PBS: fiziológiás foszfát só puffer (phosphate-buffer saline)

p62: ubiquitin kötő fehérje (ubiquitin binding protein)

PDGFR: trombocita-derivált növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethylsulfonyl-fluoride)

PVDF: polivinil-difluorid (polyvinylidene-difluoride)

RNS: ribonukleinsav (ribonucleic acid)

ROS: reaktív oxigén gyök (reactive oxygen species)

rpm: percenkénti fordulatszám (rotate per minute)

SD: átlag körüli szórás (standard deviation)

SDS: nátrium-dodecyl-szulfát (sodium dodecyl sulfate)

SEM: középérték közepes hibája (standard error of mean)

SOD: szuperoxid-diszmutáz (superoxid-dismutase)

SV: verőtérfogat (stroke volume)

TBA: tiobarbitursav (thiobarbituric acid)

TBST: tris puffer Tween 20 (tris-buffered saline Tween 20)

TEMED: tetrametil-etilén-diamin (tetramethylethylenediamine)

TrT: troponin T (troponine T)

ULK-1: unc-51-szerű autofágiát aktiváló kináz 1 (unc-51-like autophagy activating kinase 1)

VPS34: vezikulum-mediált vakuoláris fehérje válogatás 34 (vesicle-mediated vacuolar protein sorting 34)

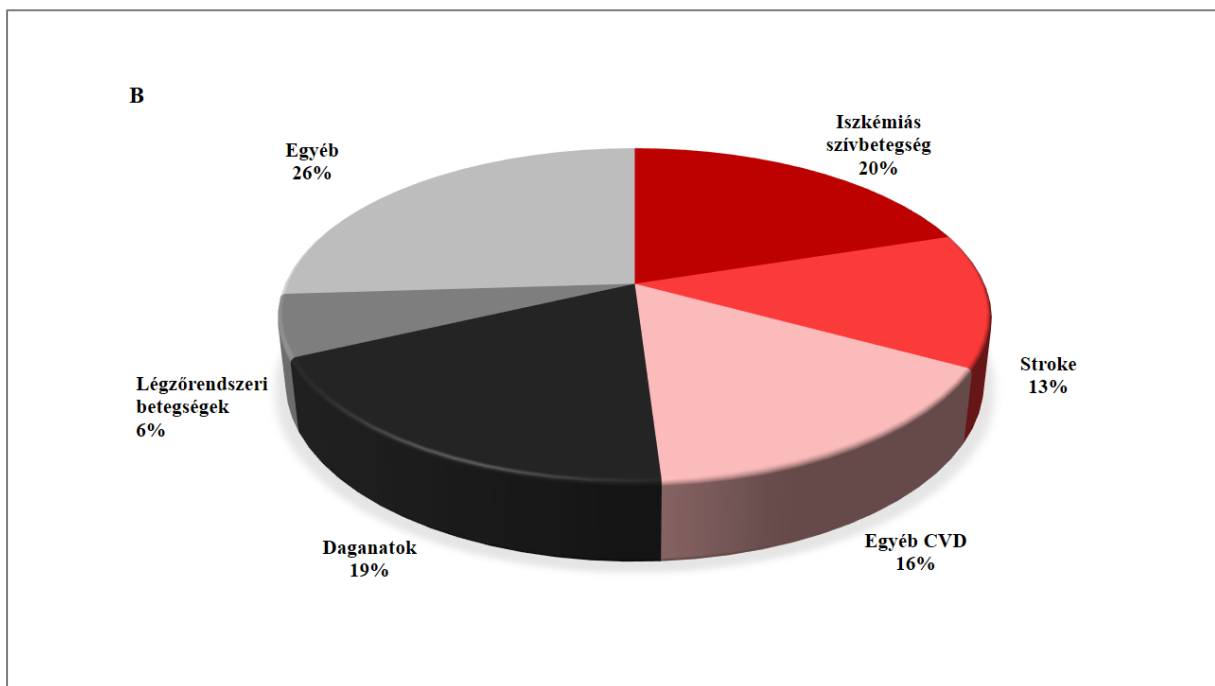
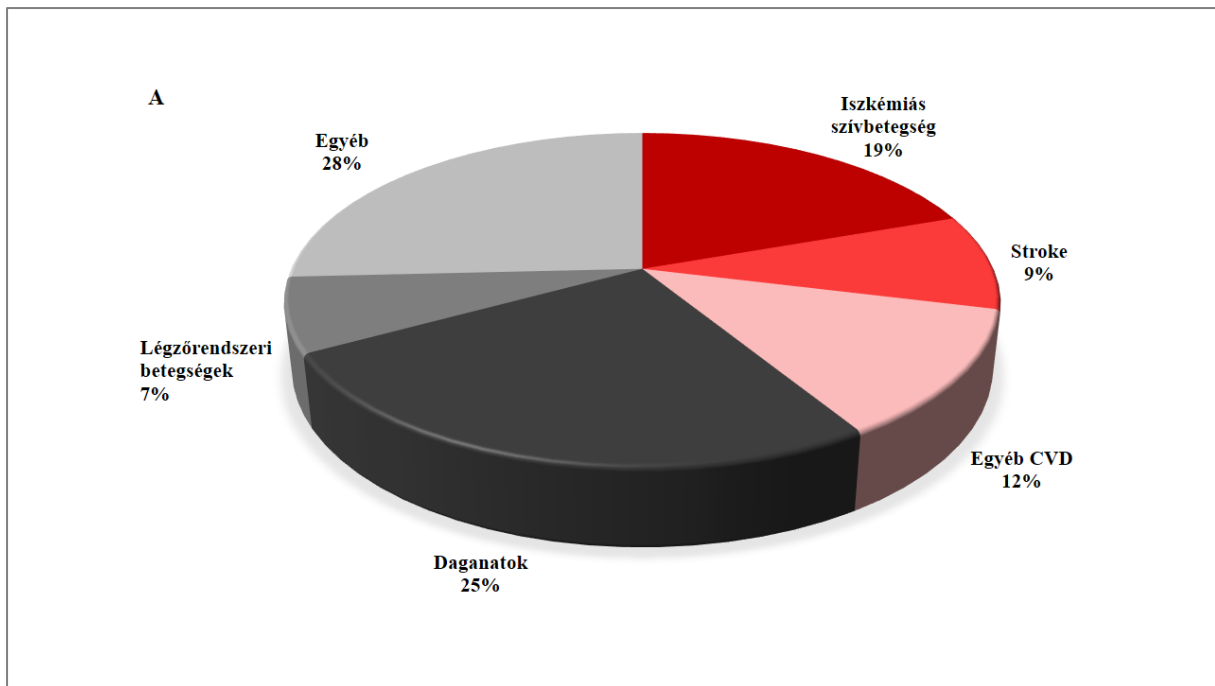
# Bevezetés

## Kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás

A szív- és érrendszeri megbetegedések világszerte növekvő és súlyosbodó egészségügyi problémát jelentenek. A kardiovaszkuláris betegségek következtében kialakult halálozások a mai napig vezetnek a mortalitási statisztikát. Ez éves szinten megközelítőleg 17 millió ember életét jelenti az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai alapján. Magyarországon az elhalálozások több mint 50%-át valamilyen kardiovaszkuláris eredetű kórkép okozza. A szív- és érrendszeri betegségekben elhunytak több mint háromnegyede az alacsony illetve közepes jövedelmű országokban fordul elő. Ennek hátterében az áll, hogy ezekben a régiókban gyakran nem érhetőek el olyan integrált alapellátási programok, amelyek biztosítani tudják a kockázati tényezők korai felismerését és a megfelelő kezelést. Egy érdekes tényező, hogy az Egészségügyi Világszervezet Európai Régiójának 53 tagországában az évi 4 millió elhalálozásból 1,8 millió az Európai Unió (EU) országokban történik. Valamint azt is kimutatták, hogy az úgynevezett EU13-ban (ami az EU-hoz 2004 májusában s utána csatlakozott országokat jelenti) kedvezőtlenebb a lakosság egészségügyi állapota, mint azokban az EU-s országokban, amelyek 2004 májusa előtt csatlakoztak az Unióhoz, az úgynevezett EU15-ben. A mortalitási arány azonban javuló tendenciát mutat a közép-kelet-európai országokban az 1990-es években tetőződő epidemiológiai válság és az utóbbi évtizedekben tett erőfeszítéseknek köszönhetően. Azonban megjegyzendő az a tény, hogy a kardiovaszkuláris betegségek okozta halálozások relatív kockázata napjainkban is lényegesen kedvezőtlenebb az EU13-ban. 2015-ben több mint 85 millió európai ember volt valamilyen kardiovaszkuláris megbetegedéssel (CVD) regisztrálva, ebből 49 millió EU-s országban <sup>1</sup>. Magyarországon az utóbbi 2 évtizedben csökkent a CVD által elhalálozottak száma, köszönhetően részben annak, hogy jelentősen javult hazánkban a beteg ellátás, sorra nyíltak a katéteres laborok, s ennek köszönhetően a CVD-ben szenvedő betegek sürgősségi ellátása is megtörténik néhány órán belül. Megemlítené azonban az is, hogy ha a hazai szív- és érrendszeri betegségek mortalitási mutatóit nézzük, az országon belül, régióként eltérő a depriváció mértéke, és a betegek felelősségtudata. Egy 2012-es statisztikai felmérés alapján, a CVD előfordulása az ország hátrányos régióiban az országos átlag felett van <sup>1</sup>. Továbbá az is kiderült a Háziiorvosi Morbiditási Adatgyűjtés Programból, amelyben jelenleg körülbelül 150 háziorvos vesz részt, hogy a biztosítás nélküli, teljes árat fizető betegek igénye sokkal alacsonyabb a gyógyszer beállításra, valamint hajlamosak a gyógyszer nem-kiváltására is, főleg olyan kórképeknél, mint

a hipertónia, ahol a betegnek több gyógyszert kell egyidőben kiváltani. Ezek mind szignifikáns meghatározói a kardiovaszkuláris betegségek kimenetelének.

A kardiovaszkuláris betegségek hátterében a leggyakrabban álló kockázati tényezők a magas vérnyomás, zsírsavcsere zavarai, cukorbetegség, elhízás, amelyek főleg az egészségtelen (transzzsír-savakban, telítetlen zsírsavakban gazdag, de zöldségekben, gyümölcsökben és rostokban szegény) táplálkozásra, és a megfelelő mennyiségű mozgás hiányával magyarázható. Becslések szerint a fejlett ipari országokban, a betegségteher több mint 30%-a az alkoholfogyasztás, dohányzás, magas vérnyomás, és elhízás következménye. Ezen felül más egyéb tényezők is szerepet játszanak, mint például a genetikai faktorok és az egészségügyi rendszer anomáliái. Azonban a CVD okozta korai halálozást nagymértékben befolyásolhatják a viszonylag kisszámú és megelőzhető kockázati tényezők, úgy mint a dohányzás, a mértéktelen alkoholfogyasztás, valamint a helytelen táplálkozás és a mozgásszegény életmód. A rizikófaktorok csökkentése és a prevenció fontossága vitathatatlan a szív- és érrendszeri betegségekben, ezért fontos hangsúlyt fektetni a primer prevenció (szív- és érrendszeri betegségben nem szenvedőknél a klinikailag manifeszt betegség megelőzése), szekunder prevenció (a betegség progressziójának lassítása illetve megakadályozása), valamint az úgynevezett populációs (a teljes lakosság rizikóstatusát csökkenteni próbáló tevékenység) stratégiákra.

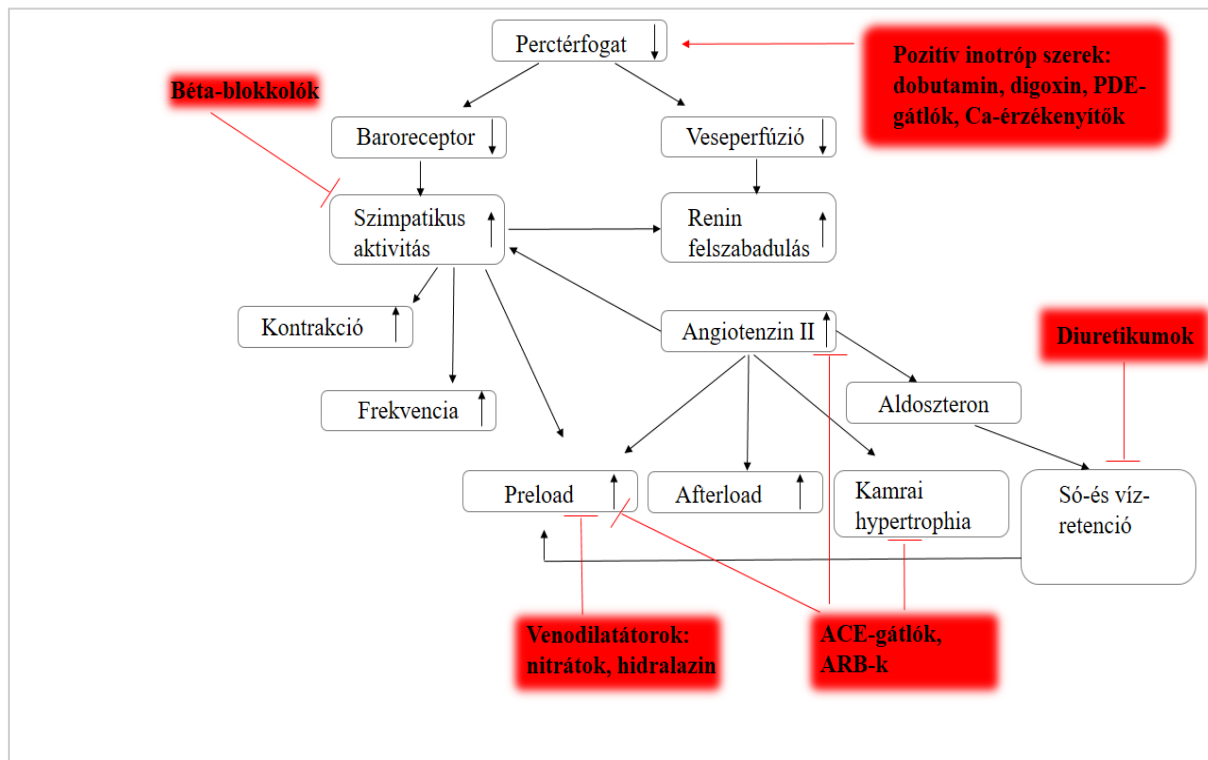


**1. ábra** A férfiak (A) és nők (B) halálzásának leggyakoribb okai Európában, az Európai Kardiovaszkuláris Betegségek Statisztikája 2017-es felmérése alapján (szerkesztette Zilinyi Rita).

## Szívelégtelenség és kezelésének lehetőségei

A szív- és érrendszeri betegségek közül kiemelendő halálozási ok a szívelégtelenség (kardiális dekompenzáció). Az utóbbi 10-15 évben nagymértékű fejlődésen ment keresztül a szívelégtelenség gyógyszeres és nem gyógyszeres terápiája, azonban a szívelégtelenségben elhunytak száma a mai napig emelkedő tendenciát mutat. A European Society of Cardiology (ESC) adatai szerint 51 országban közel 15 millió ember szenved szívelégtelenségben <sup>2</sup>. A betegség incidenciája a társadalom elöregedésével emelkedik: a szívelégtelenségben szenvedő betegek 75 éves kor alatt a populáció 2-3%-át érinti, míg 70-80 éves kor között ez az arány 10-20% körül van <sup>3</sup>. Prognózisa rossz, gyógyszeres kezelés nélkül a betegek 60%-a meghal a diagnózis felállításától számított 5 éven belül, azonban a megfelelő gyógyszeres terápiával a betegség prognózisa késleltethető, és a betegek életminősége javítható. A szívelégtelenséget úgy lehetne a legjobban definiálni, mint a szív képtelenségét arra, hogy megfelelő töltőnyomás mellett megfelelő perctérfogatot tartson fenn: lényegében olyan mértékű a perctérfogat csökkenés, amely már nem lesz elegendő a szervezet megfelelő oxigénellátásához és szöveti perfúzióhoz. Azonban egy ideig a kompenzációs mechanizmusok biztosítani tudják a megfelelő szöveti perfúziót, bár ezek a folyamatok további terhet fognak róni a szívre, amely dekompenzálódik. A szívelégtelenség kialakulásának hátterében multifaktoriális mechanizmusok állnak: hipertónia, koronária betegség, illetve kardiomiopátia, (dilatatív kardiomiopátia, hipertrófiás kardiomiopátia és restriktív kardiomiopátia), melyek végül a szív kamráinak telítődési vagy ürülési rendellenességéhez vezetnek. Ez utóbbi eredhet a perikardium, miokardium vagy endokardium rendellenességéből, azonban alapvetően a bal kamra elégtelensége dominál. Megemlítendő, hogy a dilatatív kardiomiopátia kialakulásának hátterében az esetek 30%-ában genetikai okot lehet kimutatni <sup>4</sup>. A szívelégtelenségben szenvedő betegeknél a bal kamra insuficiencia egészen széles spektrumával társulhat: megtartott ejekciós frakció és normál kamrai méretektől a súlyos mértékben csökkent ejekciós frakcióig és/vagy súlyos bal kamrai disztenziilitásig. Megjegyzendő az, hogy a betegek túlnyomó esetében, az ejekciós frakció mértékétől függetlenül fennáll a bal kamra szisztolés és diasztolés elégtelensége <sup>5</sup>. A szívelégtelenség komplex és széles spektrumú tünetegyüttes, ebből adódóan nincs olyan diagnosztikai eljárás mely önmagában kimutatná a betegség fennállását, ebből adódóan a vizsgálat a kórtörténeten és az alapos fizikai vizsgálaton alapul, ahol a specifikus panaszok meglétével (gyengeség, sípoló nehéz légzés, ödéma) alá tudjuk támasztani a diagnózist <sup>6</sup>. A szívelégtelenség kezelésének lehetőségei közé tartoznak a pozitív inotróp hatású szerek, ezek elsősorban fokozzák a kontrakciós erőt, és kevésbé okoznak

frekvencianövekedést, így hatnak a kalciumérzékenyítők és a szívglükozidok. Az előterhelés (preload) csökkentése révén könnyíthetjük a szív munkáját, és mérséklődik az oxigénigény is, valamint a pulmonalis pangás csökkentése megszünteti a tüdőödémát, így hatnak a diuretikumok és értágítók. Nem csak az előterhelést (preload), de az utóterhelést (afterload) is csökkenthetjük, azzal, hogy mérsékeljük a kamrai kilökőerővel szemben fennálló ellenállás mértékét, részben így hatnak az angiotenzin-konvertáz enzim gátlók (ACE-gátlók), és az angiotenzin II-receptor-blokkolók. A nem kívánatos katecholaminhatás, például arhythmia, és a túlzott kompenzatorikus tachykardia kivédésére alkalmasak a  $\beta_1$ -adrenerg-receptor gátlók. Az érintett betegek gyógyszeres terápiájának alapja leggyakrabban egy hármas kombinációból épül fel: 1) inotróp szerek, 2) dilatátorok, 3) diuretikumok <sup>7</sup>. A diuretikum alkalmazásával csökkenthetjük a betegek perifériás és/vagy pulmonális pangásos tüneteit. A terhelhetőség javítása és a szív ritmus stabilizálása érdekében a terápiát digitálissal kiegészíthetjük <sup>8</sup>. Digoxin használata javasolt pitvarfibrilláció esetén, valamint a 40% alatti ejekciós frakciónál béta blokkolóval kombinálva. Ha az ejekciós frakció 40% felett van pitvarfibrilláció ritmus kontrollra diltiazem vagy verapamil adható monoterápiában vagy akár digoxinnal együttesen. Kiemelendő azonban kontraindikációja: korábbi digoxin intolerancia, preexitációs szindróma, vezetékes zavarok úgy mint másod- és harmadfokú blokk megléténél <sup>9</sup>. Azon betegek esetében, ahol intrakardiális trombust mutatnak ki, vagy permanens, perzisztens vagy paroxizáló pitvarfibrilláció áll fenn antikoaguláns terápia is javasolt <sup>10</sup>. Az akut és krónikus szívelégtelenség terápiája nagyban eltér egymástól: a végstádiumú szívelégtelenség kezelése többek között keringést támogató orvostechikai eszközökkel kezelhető. A szívelégtelenség gyógyszeres terápiáján felül a következő sebészeti lehetőségek állnak rendelkezésre: modern mitrális billentyű sebészet, verőszíves koronária sebészet, műszív terápia, és szívatültetés.



**2. ábra** Sematikus ábra a szívelégtelenség patofiziológiájáról és annak kezelésére alkalmazott főbb gyógyszercsoportok támadáspontjairól (Fürst Zsuzanna Farmakológia és Klinikai Farmakológia könyv alapján).

### Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás

A doxorubicin (DOX) egy széleskörűen alkalmazott, nem-szelektív antraciklin típusú antibiotikum, melynek leggyakoribb felhasználási területe az akut leukémiák, malignáns limfómák, és az emlő daganatok kezelése<sup>11,12</sup>. Hatását az extrém gyors ütemben proliferálódó daganatos sejteken fejt ki, interkalálódik és kovalensen kötődik a sejtek DNS állományába, gátolva ezzel a DNS polimeráz és a nukleinsavak szintézisét. Ezen felül a DOX kereszt kötéseket létesít a Topoizomeráz-II $\alpha$  (TOPII $\alpha$ ) és a DNS között, és egy úgynevezett TOPII $\alpha$ -DOX-DNS komplexet képez, mely a gyorsan osztódó daganatos sejtek DNS lánc törését, végül a sejtek halálát okozza<sup>13,14</sup>. A DOX egy nagyon hatékony antineoplasztikus szer, azonban klinikai felhasználásának limitáló tényezője a kumulatív és irreverzibilis kardiotoxicitás, mely végül bal kamrai diszfunkcióhoz, dilatált kardiomiopátiához és szívelégtelenség kialakulásához vezet, évekkal azután, hogy a kemoterápiát a beteg abbahagyta<sup>15-17</sup>. Mivel a DOX irreverzibilis szívelégtelenség kialakulásához vezet, megállapítottak egy

maximális kumulatív dózist, ami  $500 \text{ mg/m}^2$ , azonban a küszöbérték alatt maradván tapasztaltak a betegek esetében a kezelést követően kardiális diszfunkciót<sup>12</sup>. A DOX-indukálta kardiotoxicitás multifaktoriális, hátterében számos bonyolult molekuláris mechanizmusok állnak, melyek a mai napig nem teljesen tisztázottak, ilyenek például: a mitokondriális diszfunkció, az oxidatív stressz, a lipidperoxidáció, az apoptózis, és az autofágia abnormális működése<sup>18,19</sup>.

Koleini és munkatársai által 2017-ben kiadott publikációban a doxorubicint mitokondriális mérregnek nevezi, és a szerzők úgy tartják, hogy a DOX-indukálta toxicitás genezise a mitokondriális diszfunkció, amely végül a kardiomiociták halálát okozza<sup>20</sup>. A szív működéséhez felhasznált energiát a nagyszámú mitokondrium biztosítja, melyekben az elektron transzportláncból felszabaduló elektronok következtében reaktív oxigén származékok (ROS) keletkeznek. A felszabadult elektronokat az  $\text{O}_2$  molekulák megkötik ezzel szuperoxidokat képezve. Fiziológiai körülmények között ez a folyamat egyensúlyban áll a szervezet antioxidáns rendszerével. A DOX, molekula szerkezetéből adódóan, metabolizációja során nagy mennyiségű reaktív oxigén származékokat generál, ezen hatásért pedig az endotheliális nitrit oxid (eNOS) reduktáz doménje felelős, amely a doxorubicint instabil szemikinonná konvertálja, ezáltal kedvezve a ROS képződésnek<sup>21</sup>. A DOX kezelés során tehát nagy mennyiségű reaktív oxigén származékok, valamint nitrogén származékok is, mint például szuperoxid, hidrogén-peroxid, hidroxil gyök és peroxinitrit keletkeznek, melynek hátterében a szívizomsejtek mitokondriumában lezajló kinon-szemikinon ciklus felborulása áll. A redukcióval képződő szemikinon egy nagyon instabil vegyület, amely az elektronját könnyen továbbadja, ezzel (a már fentebb említett) reaktív intermediereket hozva létre. Irodalmi adatok alapján azt tudjuk, hogy a szív kevesebb antioxidáns tulajdonságú enzimet tartalmaz (a szívizomban például nem található kataláz és glutathion-peroxidáz), ebből adódóan kevésbé képes védekezni az aktív gyökökkel szemben, valamint érzékenyebb az oxidatív stresszre és a vele járó károsodásokra. Mivel a DOX akkumulálódik a szervezetben és megnövekszik az általa generált reaktív oxigén gyökök mennyisége, egy idő után felborul az antioxidáns rendszer egyensúlya, oxidatív stressznek téve ki a szöveteket. Az oxidatív stressz lipidperoxidációs folyamatot indít el. A lipidperoxidáció során a reaktív oxigén származékok és a kettősfalú membrán kölcsönhatásba lépnek egymással, melynek során lipoperoxil ( $\text{LOO}^\cdot$ ) keletkezik, ami egy zsírsav molekulával reagálva lipidgyökké és lipid hiperoxiddá (LOOH) alakul. Ezek instabil vegyületek, azonban szekunder produktumaik, mint például a malondialdehid (MDA) már stabil vegyületek<sup>22</sup>. A lipidperoxidációs folyamat a szívizomsejtek membránját, enzimeit

és fehérjeláncait károsítja, melyek kulcsfontosságú proteinek funkcióvesztéséhez vezet, ennek következményeként sérülnek a mitokondriumok és nem lesznek képesek elegendő ATP képzésére, amely elengedhetetlen a szív fiziológiás működéséhez<sup>23,24</sup>. Továbbá, az oxidatív stressz mind a genomiális, mind a mitokondriális DNS töréséhez vezethet<sup>25</sup>.

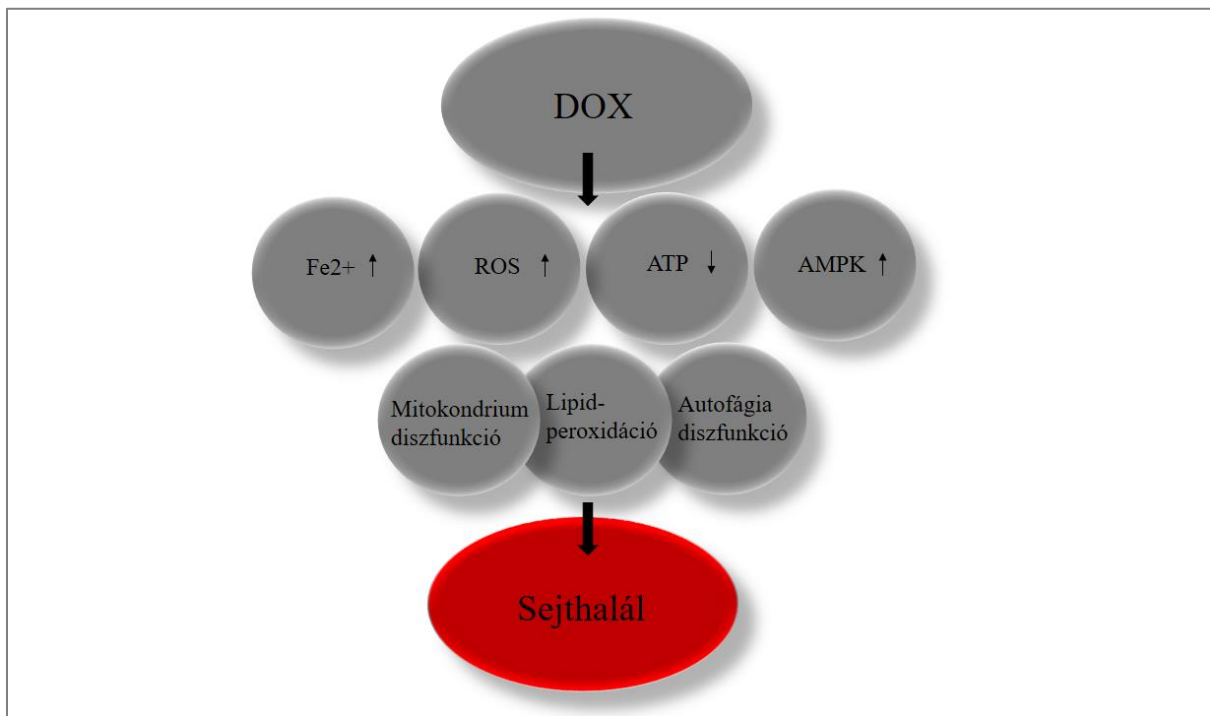
A sejtek energia háztartását szabályozó AMPK (AMP-aktivált protein-kináz) a sejtek energiaszükségletét az AMP/ATP és ADP/ATP arány monitorozásán keresztül érzékeli, és szabályozza a mitokondriumok ATP termelését<sup>26</sup>. Mivel a DOX kezelés során sérül a mitokondrium, és mint a már korábban említett ATP termelődés, így az AMPK útvonal modulálódása várható. Az alacsony ATP szint, és a nagyszámú ROS képződés az AMPK foszforilálódásához és aktiválódásához vezet<sup>27</sup>. A témában eddig elérhető irodalmi adatokat tanulmányozva azonban ellentétes eredményekre bukkantunk az AMPK útvonalat tekintve DOX kezelést követően. Chen és munkatársai 2011-ben H9c2 sejtvonalon vizsgálta az AMPK aktiválódását DOX kezelést követően, és azt találta, hogy a DOX indukálja az AMPK útvonalat<sup>28</sup>. Ezzel ellenkezően Gratia és munkatársai 2012-ben Wistar patkány állatmodellen azt mutatták ki, hogy a DOX inhibítorként hat az AMPK útvonalra<sup>29</sup>. Az ellentétes irodalmi adatok szintén indokolják a téma további, alaposabb vizsgálatát.

Az eddig említett mechanizmusokon felül (melyek diszregulációját okozza a DOX), kiemelendő az autofágia folyamatában károsodást előidéző hatása is. Számos kutatás foglalkozott már a DOX és az autofágia kapcsolatával, azonban a 2010-es évek elején megjelent publikációk nagyon ellentétesek voltak az autofágiára gyakorolt hatást illetően. Akkoriban összesen négy *in vivo* tanulmány volt elérhető, ahol a DOX autofágiára kifejtett hatását vizsgálták, melyből kettő azt állította, hogy a DOX indukálja az autofágiát<sup>30,31</sup>, míg kettő ezzel ellentétben azt találta, hogy a DOX gátolja az autofágiát<sup>19,32</sup>. Azonban ma már tudjuk, hogy a DOX valóban indukálja az autofágiát, viszont a folyamat diszregulálódik és egy inkomplett autofágia játszódik le a sejtekben<sup>33</sup>. Az autofágia folyamatát és annak fontosságát a szív- és érrendszerben egy külön fejezetben tárgyaljuk részletesen (**Az autofágia szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben** c. fejezet).

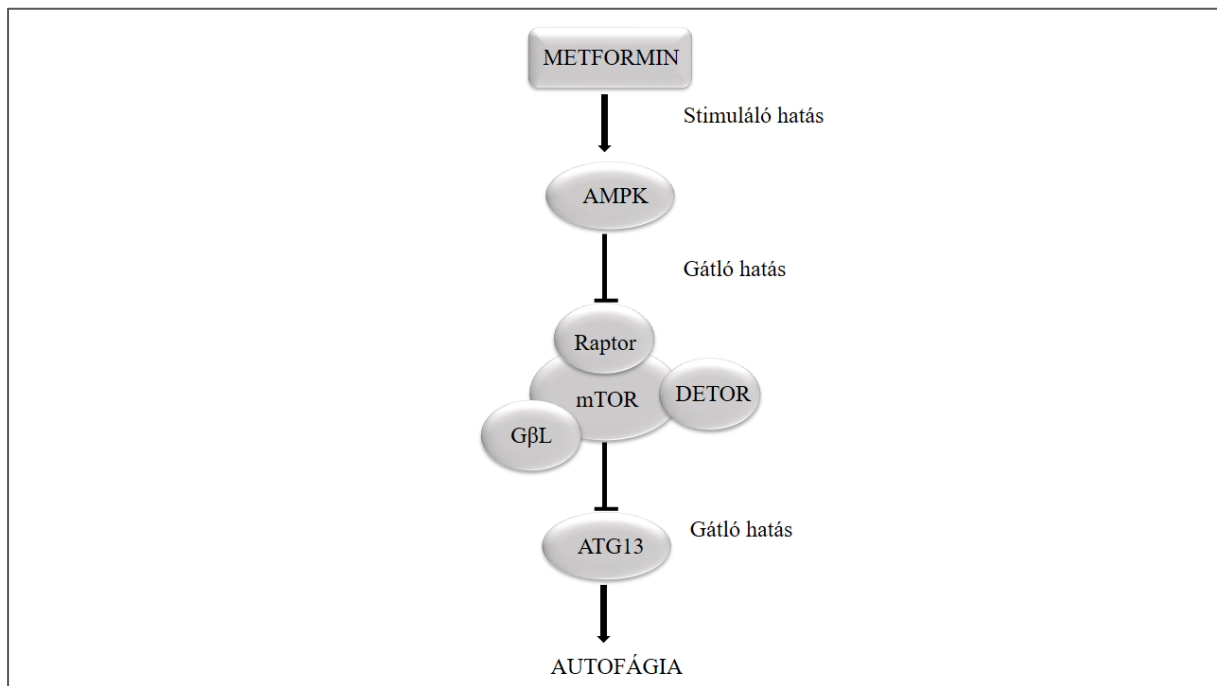
A daganatos megbetegedések következtében bekövetkező halálozások egyre növekvő tendenciát mutatnak világszerte, ezért nagy erőfeszítések folynak annak érdekében, hogy ez az arány csökkenjen, és ehhez hozzá tartozik az adott kemoterápiás szer okozta mellékhatások csökkentése is, hatékonyabbá téve ezzel a kezelést. A DOX esetében is számos kutatás folyik, különösen annak érdekében, hogy az általa okozott súlyos mellékhatás, a kardiotoxicitás kivédhető legyen. Ehhez hozzá tartozik az új analógok fejlesztése, valamint olyan kiegészítő

terápiák alkalmazása, már a kezelés megkezdése előtt illetve kezelés alatt, melyek kivédhetik a DOX okozta szívkárosító hatásait. Ilyen hatóanyag például a dexrazoxán, melyet kardioprotektív tulajdonságai miatt alkalmaztak doxorubicinnel egyidejűleg, azonban kiderült, hogy súlyos hematológiai elváltozásokat okoz, mint például anémia, neutropénia és trombocitopénia <sup>34</sup>. Legfrissebb kutatási eredmények alátámasztották, hogy a kettes típusú diabétesz mellitusz kezelésében alkalmazott metformin (MET) kardioprotektív tulajdonságokkal rendelkezik: csökkenti a diabétesz következtében kialakuló kardiovaszkuláris eredetű elhalálozást, valamint javítja a szívfunkciós paramétereket. A MET egy olyan biguanidinszármazék, mely a nem inzulinotrop vegyületek csoportjába tartozik, és működő  $\beta$ -sejtek hiányában is hatásos. Nem fokozza az inzulinelválasztást, euglykaemizáló szer, valamint nem okoz hypoglykaemiát. A MET mind éhomi, mind a prandiális glükóz szintet egyaránt csökkenti, továbbá kis mértékben a vesében is gátolja a glukoneogenezist. Az izmokban növeli a glükózfelvételt-és felhasználást. Lassítja a glükóz felszívódását a bélből, csökkenti az étvágyat, mely segítheti azon betegek fogyását, akik elhíztak a diabetesz következtében. Csökkenti a plazma glükagon szintjét. Másrészt, a lipidprofilt kedvezően befolyásolja, csökkenti a triglicerid-és koleszterinszintet, azonban ezt a hatást csak a napi kétszeri adagolásnál figyelték meg, a retard készítményeknél nem <sup>35</sup>. Néhány tanulmány is alátámasztja ezt: Zhang és munkatársai ventrikuláris hipertrófiás patkányokat kezeltek metforminnal, amely emelkedett eNOS és NO szinttel párosult, és nagyban javultak a szívfunkciós paraméterek <sup>36</sup>. Továbbá egy másik publikációban, ahol Xie és munkatársai LDL-indukált endothél diszfunkcióval rendelkező állatokat kezeltek metforminnal, azt találták, hogy kedvezően befolyásolta az endothélium-dependens relaxációs fakort, és csökkentette az oxidatív stressz mértékét <sup>37</sup>. A kardioprotektív hatás hátterében egyrészt anti-inflammatorikus és antioxidáns tulajdonsága áll. Soraya és munkatársai 2015-ben publikáltak egy tanulmányt, melyben azt találták, hogy az isoproterenol-indukálta miokardiális infarktust követően a MET mérsékelte a gyulladásos választ: csökkentette a perifériás neutrofil számot az AMPK aktiválódásán keresztül, és csökkentette az isoproterenol-indukálta kardiális remodelling mértékét <sup>38</sup>. Korábban már Zhao és munkatársai is leírták, hogy az AMPK-aktiváció képes csökkenteni a neutrofil pro-inflammatorikus aktivitást <sup>39</sup>. A MET antioxidáns tulajdonságáról is több publikációban olvashatunk: Kelleni és munkatársai kimutatták, hogy doxorubicin-indukált kardiotoxicitásban a MET kezelés csökkentette a szívben a nitrooxidatív stressz paraméterek (MDA és NO<sub>x</sub>) szintjét, és helyreállította a kardiális SOD aktivitást <sup>40</sup>. Érdekeség képpen megjegyezendő, hogy már 1995-ben és 1996-ban már jelent meg olyan tanulmány, amelyben írtak a MET antioxidáns hatásairól: csökkentette a szabad gyökök akkumulálódását és

csökkentette a lipidperoxidáció mértékét, azonban ezekben a tanulmányokban diabéteszes állatmodellekkel dolgoztak<sup>41,42</sup>. A MET nem csak az előzőekben felsorolt mechanizmusokban játszik szerepet, hanem kardioprotektív hatásáért az AMPK aktiválását is fontosnak tartják<sup>43,44</sup>: egyrészt stimulálja az eNOS-t, másrészt pedig indukálja az autofágiát<sup>45,46</sup>. Az autofágiát úgy képes a MET indukálni, hogy az AMPK indukciója gátolni fogja az mTORC1 komplexet, ami fiziológias körülmények között gátolja az autofágiát (4. ábra)<sup>47,48</sup>. Mint azt korábban már említettem, a DOX kezelés hatására az autofágiás folyamat is sérül, viszont több tanulmány is leírta már, hogy az autofágia helyreállítása védelmet nyújthat a kardiomiociták számára DOX kezelés alatt, azonban *in vivo* állatkísérletben a DOX és MET együttes hatását az autofágiára nézve még nem vizsgálták, ezért célul tűztük ki a MET kardioprotektív hatásának vizsgálatát DOX-indukálta kardiotoxicitásban, különösen fókuszálva az autofágiás folyamatra.



**3. ábra** Összefoglaló sematikus ábra a DOX-indukálta kardiotoxicitás kialakulásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusokról (szerkesztette Zilinyi Rita).



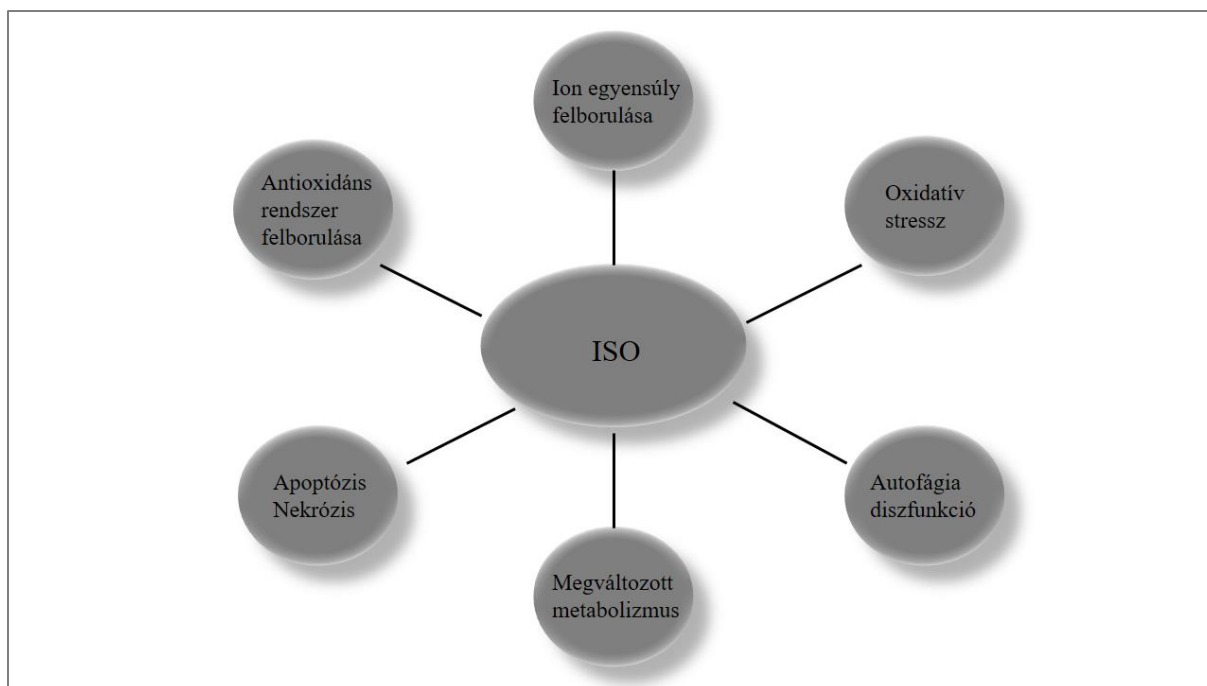
**4. ábra** A MET autofágiát indukáló hatásmechanizmus lépései (szerkesztette Zilinyi Rita).

### Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás

Az isoproterenol (ISO), vagy más néven isoprenalin, egy szintetikus katecholamin vegyület, amely a  $\beta_1$ -és  $\beta_2$ -receptorok szelektív agonistája. Hatást fejt ki a szívizomban található  $\beta_1$  adrenerg receptorokra, ezáltal növelve a pulzusszámot és a szív teljesítményét. Erősen hat a szívre, pozitív krono-, dromo- és inotrop hatással bír. Ezenkívül az ISO a  $\beta_2$  adrenerg receptorokon is hat a bronchioláris és a vascularis simaizomban, ezáltal simaizom relaxációt okoz, perifériás értágító és hörgőtágító hatással is rendelkezik. Asthma bronchiáléban is hatásos, 1%-os oldat aeroszolban inhalálva, vagy tableta formában a nyelv alá helyezve a súlyos rohamot is azonnal megszünteti. A szervezetben az isoprenalin egy része átalakul 3-metoxi-isoproterenollá. Az ISO hosszútávú, vagy nagy dózisu kezelés hatására kardiotoxicitás alakulhat ki, ezen kívül pedig szívritmuszavar, tachykardia és anginás fájdalom jelentkezhet <sup>35</sup>. A kardiotoxicitás kialakulásában számos molekuláris mechanizmus felborulása áll. Már egyszeri szubkután ISO adminisztrációt követően szignifikáns biokémiai és szövettani változások figyelhetők meg, főként a bal kamra szubendokardiális rétegében, mely extenzív miofibrilláris degenerációhoz vezet <sup>49</sup>. Hátterében egyrészt a megnövekedett mennyiségű ROS termelődése áll, amely oxidatív stresszhez és lipidperoxidációhoz vezet. Rathore és munkatársai 1998-ban megjelent publikációjukban arról írnak, hogy az ISO kezelés során

keletkező kinon metabolitok reakcióba lépnek az oxigénnel, így ROS-ok képződnek, s ez vezet az oxidatív stressz kialakulásához<sup>50</sup>. Majd a következő évben, 1999-ben Remiao és munkatársai írták le, hogy a nagy mennyiségben képződött ROS interferál a glutathion-reduktáz, és szuperoxid-diszmutáz enzimekkel<sup>51</sup>. Így megkezdődik az eddig egyensúlyban lévő antioxidáns rendszer felborulása: szignifikáns mértékű csökkenés figyelhető meg a rendszerben, úgymint a kataláz, szuperoxid-diszmutáz (SOD), glutathion (GSH), valamint glutathion-peroxidáz (GP<sub>x</sub>) esetében. A kataláz és szuperoxid-diszmutáz felelős az oxidatív stresszel szembeni védelemért, a ROS termelődését regulálja: a szuperoxid gyököket hidrogén-peroxid gyökké konvertálja. A glutathion védi a miokardiumot a szabad gyökökkel szemben: neutralizálja a szuperoxid gyököket, s csökkent szintje a szív lassúbb regenerálódását eredményezi iszkémiás sérülést követően. A glutathion-peroxidáz felelős a peroxidatív károsodásokkal szembeni védelemért: a hidrogén-peroxid katalitikus eltávolítását végzi a glutathion oxidációján keresztül<sup>52</sup>. A megnövekedett oxidatív stressz további folyamatokat indít el a sejtekben: megnövekedett neutrofil szám, mely nagy mennyiségű leukotrién, valamint hidrolitikus enzimek felszabadulásához vezet, melyek tovább súlyosbítják a miokardiális sérülést<sup>53</sup>. Az ISO adminisztráció ezen felül ionikus egyensúly felborulásához vezet: Ca<sup>2+</sup> akkumuláció alakul ki az adenilát-cikláz aktivációja és a lecsökkent ATP szint hatására. Singal és munkatársai 1983-ban úgy gondolták, hogy az ISO kezelés következtében kialakuló miokardiális iszkémiát a citoszolban nagy mennyiségben felhalmozódó Ca<sup>2+</sup> idézi elő<sup>54</sup>. A nagymennyiségű intracelluláris Ca<sup>2+</sup> negatívan hat a mitokondrium membrán potenciáljára, beleértve a reaktív szabad gyökök képzését, melyek aktiválják a kalcium- és magnéziumfüggő endonukleázt, ami végül DNS töredekezést és apoptózist indukál a sejtekben<sup>52</sup>. Az ISO-indukálta kardiotoxicitás kialakulásában kaszkádszerű patofiziológiás folyamatok indulnak el, például gyulladás, Ca<sup>2+</sup> akkumulálódás, az energia metabolizmus felborulása, melyek sejthalál útvonalamat indukálnak, s végül nagymennyiségű kardiomiocita pusztuláshoz vezetnek<sup>55</sup>. Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk ezeket a túlélési és halálozási útvonalamat, mégpedig az ISO emelkedő dózisének függvényében.

Az ISO-indukálta kardiotoxicitás patkányon való modellezése egyszerű, gyors, nem-invazív eljárás, amely a humán esetekhez szinte teljesen hasonló miokardiális sérülést produkál<sup>56</sup>.



**5. ábra** Összefoglaló sematikus ábra az ISO-indukálta kardiotoxicitás kialakulásában szerepet játszó mechanizmusokról (szerkesztette Zilinyi Rita).

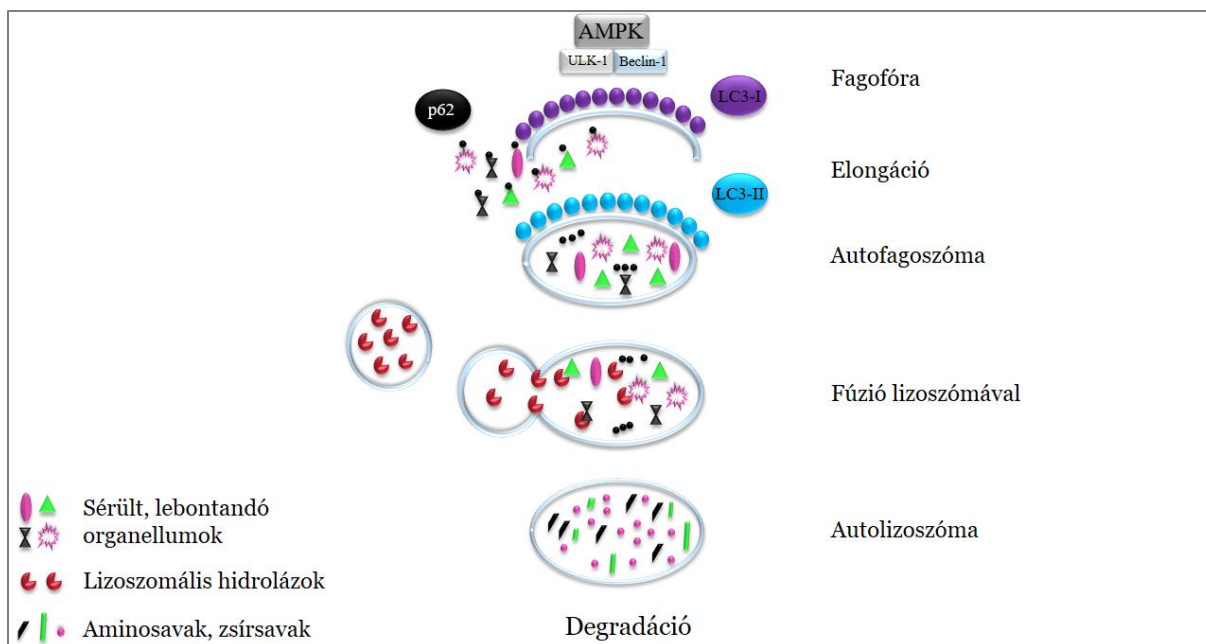
### **Az autofágia szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben**

Az autofágia egy evolúciósan konzervált katabolikus folyamat, ami Wattiaux és De Devu eredeti meghatározása szerint nem más, mint egy autofagoszóma és lizoszóma fúziójából létrejövő autolizozómában megemésztődő elhatárolódott citoplazma rész <sup>57</sup>. A görög eredetű 'auto'=ön/saját és 'phagein'=enni szóból ered, és gyakorlatilag a sejtek önmérsztést jelenti. Az autofágia kettős funkcióval rendelkezik: 1) fiziológias körülmények között a sejt számára már felesleges, előregedett vagy káros sejtalkotók, makromolekulák (összefoglaló néven kargo) eltávolítása lizozomális degradáció útján, 2) patológias körülmények esetén, mint például az energia homeosztázis felborulása, éhezés, vagy a metabolizációs folyamatokban történő változások, védelmi útvonalat biztosít a sejtek számára. A jelenséget legelőször 1976-ban írta le Sybers és munkatársai, akik szívizomsejtektől megvonva a glükózt és oxigént megfigyelték, hogy indukálódott az autofágia <sup>58</sup>. Decker és munkatársai pedig izolált Langendorff nyúl szíven kimutatták, hogy az autofágia fokozódásának mértéke kapcsolatban áll a szívizom funkcionális felépülésével iszkémia-reperfúziót követően <sup>59</sup>.

Az autofágiának jelen ismereteink szerint három típusát különböztetjük meg. 1) mikroautofágia, 2) makroautofágia, 3) Chaperon-mediált autofágia. A három típusa közül a

szívben a makroautofágiának tulajdonítanak legnagyobb szerepet, s ez a kardiovaszkuláris betegségekben a leggyakrabban vizsgált típus. A továbbiakban használt autofágia szó a munkánkban a makroautofágiára vonatkozik. A folyamat öt fő lépésből áll, ahol először az autofágia aktiválódása történik az ULK-1-en keresztül, majd egy kettősfalú fagofór képződik, melyben a Beclin-1 fehérjének van alapvető szerepe. Ezt követi a fagofór elongációja a hozzá kapcsolódó protein komplexek segítségével, majd létrejön a kettősfalú autofagoszóma. Kialakulásában számos fehérje részt vesz, azonban kulcsfontosságú szerepet játszik ezekben a lépésekben az LC3-I és LC3-II, amelyek az autofagoszóma kialakulásáért felelősek, valamint a p62/SQSTM1 fehérje, mely megjelöli a lebontásra szánt kargót, és azokat célirányosan az autofagoszóma belsejébe irányítja<sup>60,61</sup>. Utolsó lépésként az autofagoszóma egy lizoszómával egyesül, létrehozva ezzel az autolizozómát, ahol degradálódik a kargó a benne levő hidrolázok (katepszinek, lipázok) segítségével<sup>62,63</sup>. A fúzió kialakulását az UVRAG-Vps34-beclin1 PI3-kináz komplex és Rubicon-UVRAG-Vps34-beclin1 PI3-kináz komplex regulálja<sup>64,65</sup>. A résztvevő kulcsfontosságú fehérjék, például Beclin-1, LC3-I-II és p62/SQSTM1 monitorozása információt adhat a folyamat előrehaladásáról.

Energiaszegény állapotban az autofágiás folyamat indukciója fontos szerepet játszik a szívben. Csökkent ATP szint esetén megnő az AMPK expressziója, amely indukálja az autofágiát. Ez a folyamat számos esetben, például károsodott mitokondrium és felborult energia balance, éhezés vagy megnövekedett oxidatív stressz, jelentheti a túlélést a kardiomiociták számára<sup>66</sup>. Természetesen csak abban az esetben, ha a folyamat teljes mértékben lejátszódik, azonban vannak olyan patofiziológiás folyamatok, amelyek károsítják az autofágiát, s annak diszregulációjához vezet. Ebben az esetben nem tud védelmi útvonalat biztosítani a sejtek számára. Az autofágia további fontosságát mutatja az a tény, hogy az elvesztett kardiomiociták természetes pótlása egy nagyon lassú és ineffektív folyamat, sőt a miociták többnyire nem képesek regenerálódásra<sup>67,68</sup>.



**6. ábra** A makroautofágia útvonal 5 lépése (szerkesztette Zilinyi Rita).

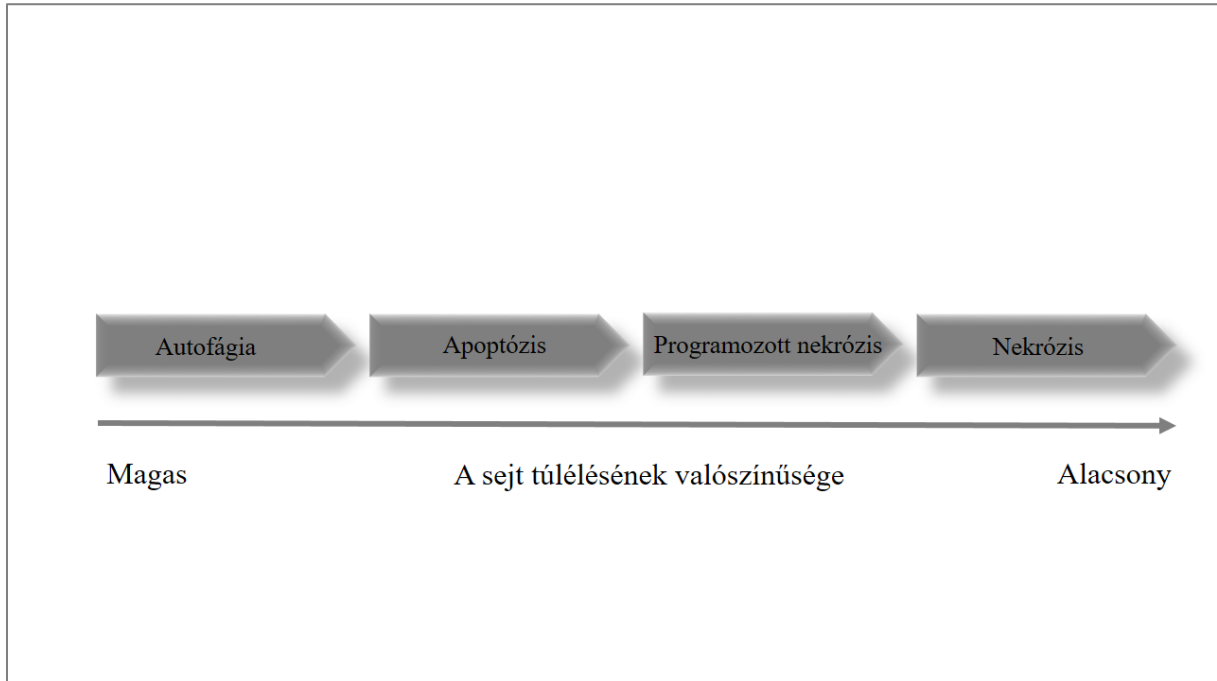
### Az autofágia, az apoptózis és nekrozis

A tradicionális Clarke-féle, morfológiai kritériumok alapján három fő sejtlebontó mechanizmust különböztethetünk meg: I. apoptózis, II. nekrozis, III. autofágia, s ez az utóbbi folyamat egyben a legjelentősebb sejten belüli stressz-válasz <sup>69</sup>. Az apoptózis görög eredetű szó, melynek jelentése 'lehull', a nekrozis a görög necros szóból ered, melynek jelentése 'halott'. A három folyamat közül az apoptózis az úgynevezett aktív sejthalál forma, míg a nekrozis a passzív formája a sejthalálnak, tehát energiát nem igényel. Az előbbi olyan sejtleletani reakció, amely a citoprotektív folyamatok legutolsó, 'öngyilkos' stációjára, az utóbbi pedig akkor figyelhető meg, amikor hirtelen az élettel összeegyeztethetetlen körülménynek van kitéve a sejt, és a sejtet érő hatásokra szinte már ideje sincs reagálni. A két sejthalál forma közötti eltéréseket 1965-ben Trump és munkatársai kezdték el vizsgálni, és írták le az ultrastrukturális jellemzőket elektronmikroszkópos vizsgálataik után <sup>70-73</sup>. A két mechanizmus közötti legfőbb különbség morfológiai: a nekrotizáló sejt intenzíven duzzad, a sejtmembrán elveszti intaktágát és barrier szerepét is, így a beltartalom a környezetbe áramlik, miközben sérülnek a sejtorganellek is, végül a lízis során antigének kerülnek a környezetbe, amelyek gyulladásos folyamatot indítanak el. Az apoptózis során pedig a sejtek zsugorodása figyelhető meg, ugyanis elkezd gyengülni a sejt-sejt közötti kapcsolat. Az apoptózis, a nekrozissal szemben, szöveti protektív jellegű, ugyanis a sejt végig intakt membránnal rendelkező részekre

esik, melyeket az erre specializálódott sejtek bekebeleznek és lebontják, de a beltartalom védve van, így az apoptózis során gyulladás nem indukálódik <sup>74</sup>.

Az autofágia felelős a sejten belül a különböző organelumok és fehérjék lebontásának és újra hasznosításának kontrollálásáért. Az autofágiát részletesebben **Az autofágia szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben** c. fejezetben kerül kifejezésre. Az apoptózis fiziológias körülmények között a celluláris turnover egyensúly fenntartásához szükséges, biztosítja a folyamatos megújulást, az osztódás/sejthalál ciklus szabályozásához nélkülözhetetlen folyamat. Szerepe van az abnormális, nem megfelelően differenciálódott, valamint feleslegben lévő nem-funkcionáló sejtek eltávolításában is. Az apoptózis indukálásában a szigorúan kontrollált kaspáz-család kaszkádszerű aktiválódása játszik alapvető szerepet. A szó eredete funkciójára is utal egyben: cysteinyl aspartate specific protease: **caspase**. A kaspázok minden élő sejtben, úgynevezett előlakként, prokaspázként termelődnek, melyek proteolitikus hasítással kerülnek aktív formába. Emlősökben eddig 14 kaspázt azonosítottak, ebből emberben 11 található meg. Funkciójuk alapján két típust különböztetünk meg: citokin aktivátor gyulladásozó kaspázok, illetve sejthalál-apoptotikus kaspázok <sup>75,76</sup>. Az utóbbi csoportba tartozik a kutatócsoportunk által is vizsgált kaspáz-3 fehérje. Az apoptózis útvonal aktiválásának legismertebb útvonala a károsodott és stressznek kitett sejtek esetében a mitokondriumból kiinduló forma. A sérült sejtek mitokondriumának külső membránrepedését követően a citokróm-c a citoplazmába kerül, ahol kötődni fog az Apaf-1 adaptorfehérjéhez, s aktiválni fogja azt, majd ehhez a komplexhez kapcsolódik a prokaspáz-9, s aktiválódása után beindul a kaspáz-család kaszkádszerű aktiválódása. Ez az útvonal az apoptózis intrinzik útvonala, azonban létezik egy extrinzik útvonal is, ahol a kaspáz család aktiválódása a prokaspáz-8 aktiválásán keresztül történik, amely általában a killer limfociták által prezentált Fas-ligand kötődése a célsejtek felszínén található halálreceptorhoz, a Fas-hoz fog kötődni. Mindkét útvonal végül a prokaspáz-3 aktiválásán keresztül fejezi be a sejthalál folyamatát <sup>77</sup>. Normál körülmények között az autofágia blokkolja az apoptózist, azonban ha megváltozik a sejt fiziológias állapota az autofágia apoptózist vagy nekrozist indukálhat <sup>78</sup>. Ez a jelenség akkor figyelhető meg, ha a sejt olyan megváltozott körülménynek van kitéve, mint például az oxidatív stressz, és az autofágia már nem képes ehhez adaptálódni és ezzel megbirkózni <sup>79,80</sup>. Az autofágia első sorban úgy blokkolja az apoptózis folyamatát, és próbálja védeni a sejtet a sejthalállal szemben, hogy szelektíven csökkenti a pro-apoptotikus fehérjék termelődését. Az egyik ilyen kulcsfontosságú fehérje ebben a folyamatban a kaspáz-8, amelynek indukcióját késlelteti az autofágia <sup>81,82</sup>. Azonban, amikor az autofágia diszregulálódik és nem tud a folyamat végbemenni, például ha

stressz-mediálta citoprotektív autofágia folyamata sérül, az apoptózis és/vagy nekrozis aktiválódásához fog vezetni <sup>83,84</sup>.



**7. ábra** A sejt túlélésének valószínűsége a különböző túlélési- és halálozási útvonalak aktiválódását követően (szerkesztette Zilinyi Rita).

## Célkitűzések

Kutatócsoportunk célul tűzte ki egyrészt az autofágia szerepének vizsgálatát DOX-indukálta kardiotoxicitásban, ahol, mint kiegészítő terápiaként metformint adagoltunk. A legújabb tanulmányokban arról olvashatunk, hogy a MET számos esetben kardioprotektív hatással bír. Az irodalomban korábban már leírták, hogy a MET az AMPK útvonalon keresztül indukálni képes az autofágiát, azonban azt még nem írták le mindeddig, hogy a DOX együttesen adagolva hogyan befolyásolja az autofágia folyamatát. További kísérleteinkben pedig a különböző dózisban alkalmazott ISO dóziszfüggő szívkárosító hatásait, és a folyamatban résztvevő, különböző túlélési és halálozási útvonalak (apoptózis, nekrozis és autofágia), és azok kapcsolatát vizsgáltuk. A tanszéken korábban végzett *ex vivo* kísérletekből azt már tudjuk, hogy az ISO dóziszfüggő toxicitást mutat, azonban a molekuláris útvonalak, s azok pontos szerepe nem teljesen tisztázott a  $\beta$ -receptorokra gyakorolt hatása folyamán.

Összefoglalva célunk volt:

1. Kísérleti protokoll beállítása a DOX-indukálta kardiotoxicitás és a MET protektív szerepének vizsgálatára.
2. Az autofágia szerepének felderítése DOX és MET együttes adagolásánál.
3. Az ISO dóziszfüggő toxicitásának alátámasztása.
4. A különböző sejthalálozási útvonalak (apoptózis, nekrozis) vizsgálata ISO-indukálta szívizomkárosodásban.
5. Az autofágia, apoptózis és nekrozis kapcsolatának vizsgálata különböző dózisú ISO kezelést követően.

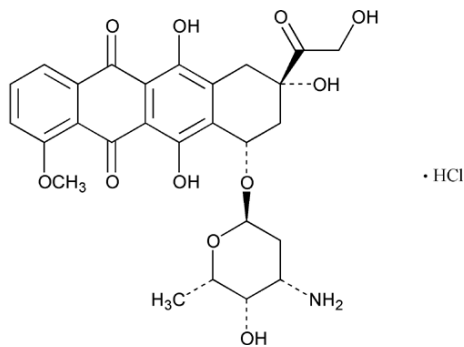
# Anyagok és módszerek I: Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás

## I/1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során nőstény (250-300 g) Sprague-Dawley patkányokat használtunk (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Németország). Minden állat esetében a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt a vonatkozó Európai Unió- és a „Principles of Laboratory Animal Care” valamint a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (NIH 85-23, revised 1996) összhangban. Az állatoknak *ad libidum* (szabad hozzáférés) volt standard rágcsálótáphoz és vízhez.

## I/2. A kísérleteinkben felhasznált anyagok

Doxorubicin (Doxorubicin-Teva 2 mg/ml)

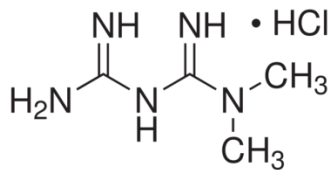


Adriamycin, Doxil

$C_{27}H_{29}NO_{11}$

M= 579,986 g/mol

Metformin (Meforal 1000 mg)



1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride

$C_4H_{11}N_5$

M= 165,628 g/mol

### I/3. Kísérleti elrendezés

Kísérleteink során Sprague-Dawley nőstény patkányok 4 csoportját hoztuk létre:

#### 1. KONTROLL

- fiziológias sóoldat i.p.
- víz per os

#### 2. DOXORUBICIN

- 3 mg/kg doxorubicin-hidroklorid i.p. kétnaponta
- víz per os

#### 3. METFORMIN

- 250 mg/kg metformin-hidroklorid szuszpenzió per os naponta
- fiziológias sóoldat i.p.

#### 4. DOXORUBICIN + METFORMIN

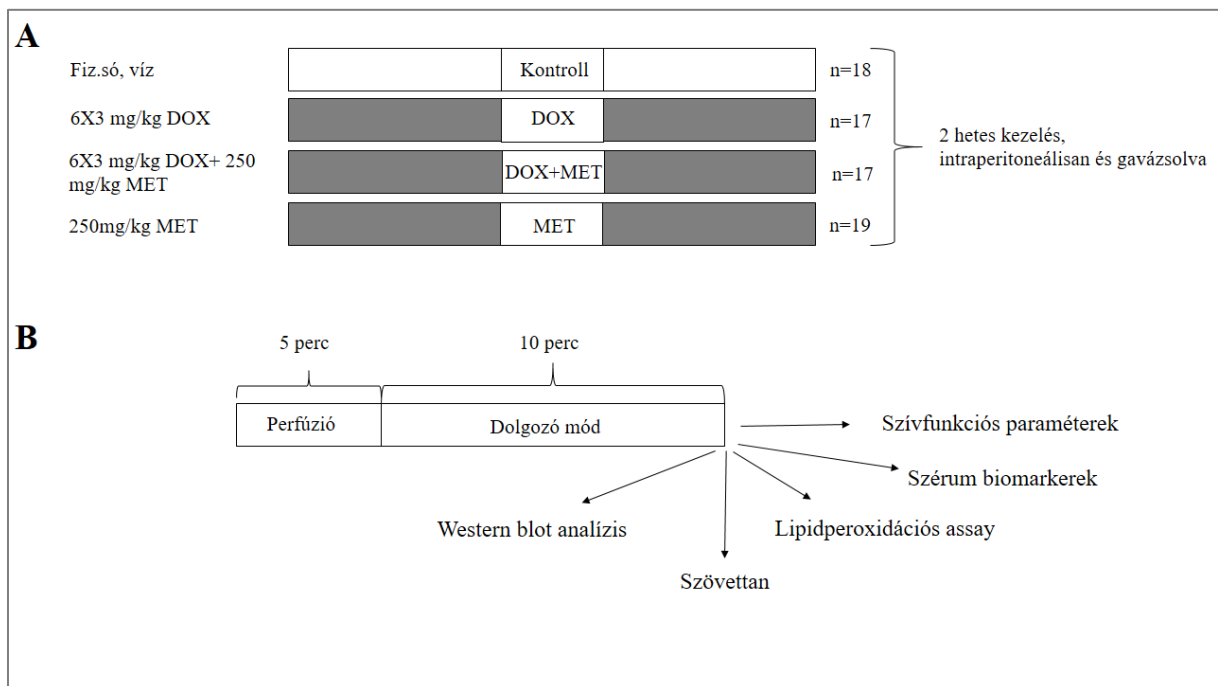
- 3 mg/kg doxorubicin-hidroklorid i.p. kétnaponta
- 250 mg/kg metformin-hidroklorid szuszpenzió per os naponta

Az állatok kezelése 2 hétig tartott. A DOX kumulatív dózisa 18 mg/kg volt. Előzetes irodalmi adatok alapján ennél a dózisonál már megfigyelhetőek a kardiotoxicitás jelei. Kísérleteink kezdeti szakaszán az első megválasztott dózis a MET esetében 500 mg/kg volt. A két hetes kezelés végén a MET csoportban az állatok nagy része elhalálozott, ezért boncolást végeztünk. A hasüreg felnyitását követően észrevettük, hogy az állatok gyomorfalán nagymértékű bevezés látható, ezen kívül pedig nagy mennyiségű, felszívódatlan MET volt felhalmozódva. Ebből arra következtettünk, hogy a megválasztott MET napi dózis és térfogat olyan nagymértékű volt, hogy képtelen volt a kísérleti állatban a MET felszívódni. Valószínűsíthető, hogy a MET

dózisfüggő protektív hatással rendelkeznek: egy 2015-ben megjelent publikációban Kobashigawa és munkatársai arról számoltak be, hogy egy alacsonyabb dózisban alkalmazott MET kezelés kardioprotektív hatással volt H9c2 sejtvonalon DOX-indukált kardiotoxicitással szemben, azonban ez a hatás már nem érvényesült egy magasabb dózisú MET kezelésnél. Eredményeik azt mutatták, hogy ez a hatás annak köszönhető, hogy a MET dózisfüggő módon szupresszálja a PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) expresszióját<sup>85</sup>. Ezt követően egy alacsonyabb, 100 mg/kg dózissal kezdtük meg a két hetes kezelést. Ekkor a kezelést követően már nem volt a MET csoportban elhalálozás. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a kiválasztott dózis elegendő volt-e ahhoz, hogy indukálja az AMPK útvonalat, Western blot analízissel néztük az AMPK fehérje expresszió szintjét, azonban a kontroll csoport értékeihez képest nem tapasztaltunk változást. Ekkor döntöttünk úgy, hogy emeljük a MET dózisát 250 mg/kg-ra, ahol a két hetes kezelést követően ismét Western blot analízissel megvizsgáltuk az AMPK fehérje expresszióját, ahol már a MET csoportban szignifikánsan magasabb értéket kaptunk a kontroll csoporthoz hasonlítva.



**8. ábra** Sprague-Dawley nőstény patkány hasürege a két hetes MET kezelést követően, ahol az alkalmazott dózis 500 mg/kg volt (a képeket készítette Zilinyi Rita).



**9. ábra** A DOX és MET kezelési protokoll sematikus ábrája (A), és a kezelést követően végzett mérések összefoglaló ábrája (B) (készítette Zilinyi Rita).

#### I/4. Szérum biomarkerek meghatározása

A két hetes kezelést követően az állatokat mély anesztézia alá helyeztük 60 mg/kg-os dózisé Euthanival-oldattal, amely 400 mg/ml pentobarbital-nátriumot tartalmaz (Alfasan Nederland BV, Kuipersweg 9, Woerden), majd a vena jugularisból vért vettünk a szérum biomarkerek

meghatározása céljából. A méréseket a Labor Medicina Intézetben végezték mind a két kísérletsorozat esetében.

A meghatározott paraméterek a következők voltak:

- Troponin T (TrT)
- Laktát-dehidrogenáz (LDH)
- Kreatin-kináz MB izotípus (CK-MB)

A Troponin T 3 izoformáját tudjuk megkülönböztetni, melyből két izoforma a vázizmokban expresszálódik, míg a 3. izoforma (kardiális TrT) specifikusan és kizárólag a szívizomban található meg<sup>86</sup>. A kardiális TrT 6%-a a citoszolban szabadon, a többi pedig a vékony filamentumokba épülve található. A sejtvázhoz kötött molekulák tartósan fennálló, súlyos filamentum szétesés során jön létre. Az 1980-as évek végén kezdték a cTrT-t és cTrI-t alkalmazni, mint a kardiális károsodásokat specifikusan jelző markereket<sup>87</sup>. Mivel kizárólag a szívizomban fordulnak elő, ezért teszi alkalmassá a sérumból mérve a szívben történő károsodások, mint az akut miokardiális infarktus, vagy kemoterápia következtében kialakuló kardiotoxicitás diagnosztizálását<sup>88,89</sup>. 2010 márciusától a Debreceni Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet (KBMPI) Immunkémia Részlege a miokardiális iszkémia diagnosztikájában eddig használt kardiális troponin I mérése helyett a kardiális troponin T mérésére tért át.

A laktát-dehidrogenáz (LDH), vagy más néven tejsav-dehidrogenáz a tejsav-piroszőlősav átalakulást katalizálja és öt izotípusát különböztetjük meg. A tetramer LDH molekula kétféle monomerből épülhet fel. A két alegységet M (muscle = izom típusú) és H (heart = szív típusú) betűvel jelöljük, melyekből öt féle izotípus épülhet fel: LDH-1 = LDH (H4) LDH-2 = LDH (H3M) LDH-3 = LDH (H2M2) LDH-4 = LDH (HM3) LDH-5 = LDH (M4). Ezen izoenzimek közül az LDH-1 és LDH-2 fordul elő a szívben. Az enzimaktivitás meghatározása egyéb más enzimekkel (például kreatin-kináz) együtt a klinikai orvosi diagnosztikában széles körben alkalmazott módszer, a szövetszéteséssel vagy membrán permeabilitás változással együtt járó kórképek jellemzésére. Akut miokardiális infarktus esetén az LDH aktivitás emelkedés mértéke arányos a szívizom-károsodás mértékével. Azonban fontos megemlíteni, hogy az emelkedett LDH szintet számos más betegségben is tapasztalni lehet, mint például májbetegségek, anémiák és tumorok esetében<sup>90</sup>.

A kreatin-kináz (CK) enzim az ATP-ADP átalakulást katalizálja, miközben a kreatinból kreatin-foszfát keletkezik. A kreatin-kináz M (muscle = izom típus), és B (brain = agyi típusú) alegységekből felépülő dimer. Három izoenzim típusát különböztetjük meg, s az egyes CK

izoenzimek specifikusak az egyes szövetekre: a CK-MM az izomra, a CK-BB az agyra, míg az ún. hibrid forma CK-MB a szívre jellemző. Szívizom károsodás esetén nagy mértékben megnő ennek szintje. Az infarktus valószínűsége magas, amennyiben a sérumból mért kreatin-kináz aktivitás 6-25%-át a CK-MB aktivitás adja, infarktust követően gyors és határozott emelkedése várható <sup>49,91,92</sup>.

### **I/5. Izolált dolgozó szív preparátum**

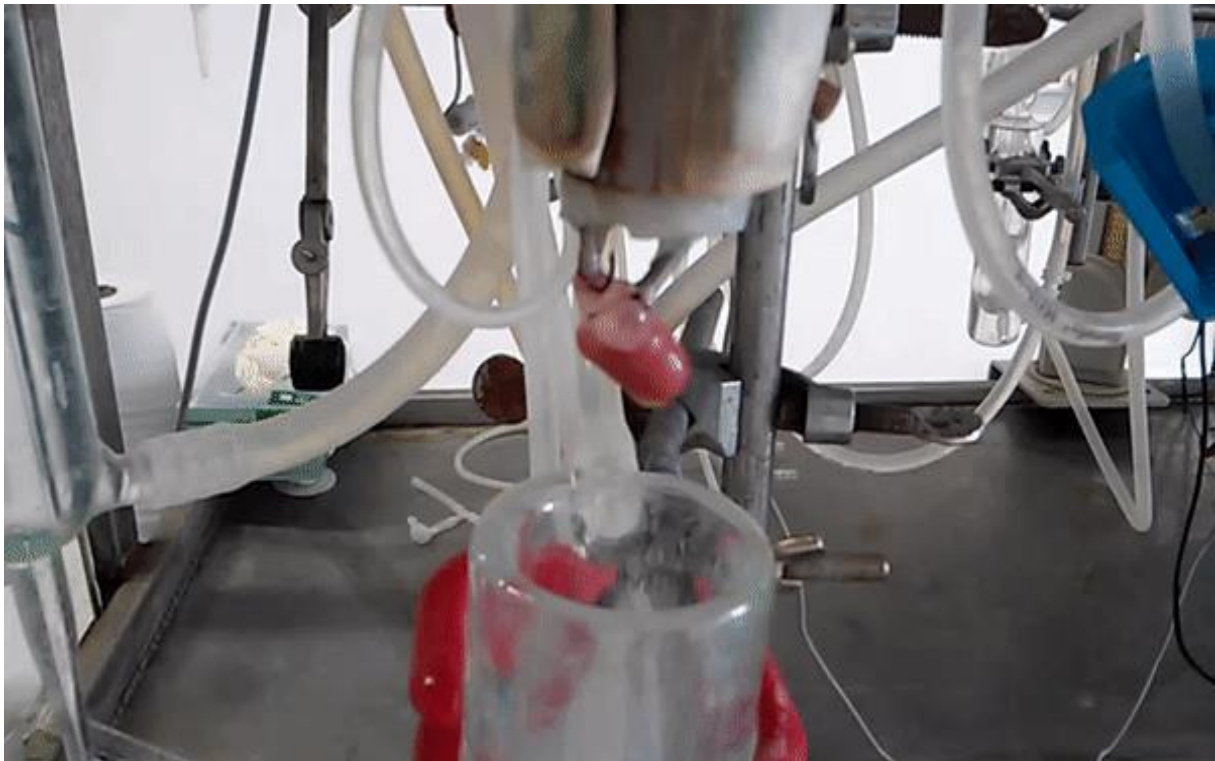
A vérvételt követően az állatok heparin injekciót (Heparibene-Na 25000 NE oldatos injekció, Teva Gyógyszergyár Zrt.) kaptak véralvadás gátlás céljából, majd torakotómiát végeztünk és izoláltuk a szíveket, melyeket kanülök segítségével a „dolgozó” szívizolációs készülékhez rögzítettünk az aortán és a vena pulmonalison keresztül.

A szíveket módosított Krebs-Henseleit (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,36 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glükóz ) oldattal perfundáltattuk 5 percen keresztül 100 vízcentiméteres nyomás mellett, hogy a vaszkulaturából kimossuk a vért.

Ezt követően dolgozó módba kapcsoltuk a készüléket és 10 percig perfundáltattuk a szíveket. Ilyenkor az oldat a bal pitvarból a bal kamrába áramlik, innen pedig a szív saját munkájával pumpálja ki 17 vízcentiméteres nyomással szemben <sup>93-95</sup>. Ezután határoztuk meg a szívfunkciós paramétereket, melyek a következők voltak:

- aorta-átáramlás (AF): a kipumpált folyadék gyűjtése 1 percen át
- koronária-átáramlás (CF): a koronáriákon átáramló folyadék gyűjtése 1 percen át
- szívfrekvencia (HR): beépített nyomásérzékelővel
- aortanyomás (AoP): beépített nyomásérzékelővel
- perctérfogat (CO): aorta átáramlás + koronária átáramlás
- verőtérfogat (SV): perctérfogat / szívfrekvencia hányadosa

A szíveket -80 °C-on tároltuk a molekuláris biológiai mérések elkezdéséig.



**10. ábra** „Dolgozó” szívizolációs készülék, melyre a szívet kanuláltuk az aorta és vena pulmonalison keresztül.

#### **I/6. Miofibrillumok vastagságának meghatározása**

A szívfunkciós paraméterek regisztrálását követően a szív egy részét (bal kamra) további molekuláris biológiai vizsgálatokra tároltuk, míg a szív apikális részét 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk szövettani vizsgálathoz. A paraffinba ágyazott 4  $\mu\text{m}$  vastagságú keresztmetszeteket Masson's trikróm (Trichrome Stain Kit, Abcam) festékkel festettük meg, ahol az anilin kék oldat a kollagént, a fukszin-sav az izomrostokat, a hematoxilin a sejtmagokat festette meg. Első lépésként a metszeteket deparaffináltuk 2x5 percig xyloolban, majd 5-5 percig leszálló ágú alkohol sorozatban inkubáltuk, végül desztillált vízzel átöblítettük. Ezt követően a metszetek készen álltak a festésre: 5 percig Weigert's Iron Hematoxylinnal, 15 percig Biebrich Scarlet Acid Fuchsinnal, Analine Blue-val 10 percig inkubáltuk. Végül dehidratáltuk felszálló ágú alkohol sorozatban, majd moviol alkalmazva fedtük azokat. A metszeteket Olympus CX-31 típusú mikroszkóp alatt vizsgáltuk, és Olympus DP74 típusú kamerával készítettünk képeket 4x (scale bar 1000  $\mu\text{m}$ ) és 40x (scale bar 40  $\mu\text{m}$ ) nagyításban. Az eredmények kiértékelését, melynek során a rózsaszínes pirosra festődött miofibrillumok vastagságát határozták meg a különböző csoportokban, a Debreceni Egyetem Anatómiai Intézete végezte.

## I/7. Lipidperoxidációs assay

A DOX-okozta lipidperoxidáció mértékének meghatározásához végeztük el a malondialdehid (MDA) szint mérését a szívsvövetből. A lipidperoxidáció során képződő MDA szintje arányos a lipidperoxidáció mértékével. A mérést a következőképpen kivitelezte: a szívsvöeteket homogenizáltuk, majd centrifugáltuk 13000 rpm fordulatszámom 10 percig, majd a felülúszót egy új Eppendorff csőbe pipettáztuk. Párhuzamosan pedig elkészítettük az MDA standardsort (4, 8, 12, 16, 20 nmol MDA), majd minden mintához és standardhoz tiobarbiturátsav (TBA) oldatot adtunk és 60 percig inkubáltuk 95 °C-on. Ezt követően 200 µl-t pipettáztunk minden mintából egy 96-lyukú mikrolemezre. Az MDA és a rendszerhez hozzáadott TBA egy színes komplexet képez, mely 532 nm-en abszorpciós maximummal rendelkezik. A szín intenzitása egyenesen arányos a minta malondialdehid koncentrációjával. A koncentráció számítása a kalibrációs görbe alapján a következő képlettel történt:

$$S_a/S_v \times D = C$$

S<sub>a</sub>: MDA mennyisége (nmol) az ismeretlen mintában kalibrációs görbe alapján

S<sub>v</sub>: minta mennyisége (µl)

D: dilúciós faktor

C: MDA koncentráció a mintában

## I/8. Fehérje izolálás és Western blot

A szívsvöet bal kamráját (300 mg) először homogenizáló oldat (Tris 25 mM, NaCl 25 mM, Na-ortovanadát 1 mM, NaF 10 mM, Na-pirofoszfát 10 mM, okadánsav 10 nM, EDTA 0.5 mM, PMSF 1 mM, 1x proteáz inhibitor koktél, komponensek: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) és egy elektromos diszpergáló eszköz (T 10 basic Ultra-Turrax, IKA, Németország) segítségével homogenizáltuk. Ezt követően 2000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk a mintákat 10 percen keresztül 4 °C-on, melynek során a nukleáris frakció ülepedett le. A felülúszót új Eppendorff csőbe pipettáztuk, melyet 10000 rpm fordulatszámom centrifugáltunk 20 percig, szintén 4 °C-on. A kinyert citoszolikus frakciókat ismét új Eppendorff csövekbe pipettáztuk, majd meghatároztuk a minták fehérje koncentrációját. Ennek elvégzéséhez BCA kitet használtunk (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). 96 lyukú mikrolemezre pipettáztuk a mintákat 20x hígításban, majd 180 µl BCA reagenst adtunk hozzá, amely az A és B komponenseket 50:1

arányban tartalmazta, valamint külön sorba egy 2 mg/ml koncentrációjú BSA törzsoldatból kiinduló, felező hígítású standard sort. Ezt követően 30 perc inkubálás következett 37 °C-on, amikor a fehérjék által redukált rézionokkal reakcióba lépett a BCA reagens, lila színű komplexet képezve. Az abszorbanciát 562 nm-en mértük a FluoSTAR OPTIMA program segítségével. Majd meghatároztuk a minták fehérjetartalmát a standardsor kalibrációs görbéje alapján és Excel program segítségével az egyes mintákból bemérendő térfogatokat, hogy minden mintából azonos, 75 µg fehérje kerüljön bemérésre a Western blot analízishez. A mintákhoz 25 µl Laemmli-puffert adtunk és 10 percig inkubáltuk 98 °C-on.

A fehérjék elektroforézisét 12%-os Stain Free, 0,75 mm vastagságú poliakrilamid gélen végeztük. (Acrylamide kit, Bio-Rad, California, USA). A megszilárdult gélre 75 µg fehérjét és előfestett protein standardet pipettáztunk, majd 115 V feszültség mellett végeztük a fehérjék méret szerinti elválasztását. Ezt követően elektroforetikus transzferáltuk a fehérjéket PVDF membránra (Bio-Rad, California, USA) transzfer készülék (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories Ltd.) segítségével 100 V feszültség mellett. Ezután a membrán aspecifikus kötőhelyeit blokkoltuk 7%-os (m/V%) zsírszegény tejjel 1 órán keresztül, majd mostuk a membránt TBST oldattal (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris, desztillált víz, Tween 20, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A primer antitesteket (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) TBST oldatban hígítottuk 1:1000 arányban, s a membránt egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. Másnap eltávolítottuk a primer antitestet és a membránt mostuk 3x10 percig TBST oldattal, majd a szekunder antitestet, amely HRP-jelzett antitest (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) TBST-vel hígítottuk 1:3000 arányban, és 1,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránt. Ezt követően ismét TBST oldattal 3x10 percig mostuk a membránt. Kemilumineszcens előhívást alkalmaztunk (ECL substrate: Bio-Rad, California, USA), melynek alapja, hogy a szekunder antitest egy torma-peroxidáz nevű enzimmel van jelölve. Az előhívó folyadékban lévő szubsztrát, a luminol hidrogén-peroxid jelenlétében gerjesztődik, fotont bocsát ki. Ezt a folyamatot a ChemiDoc Touch Imaging System készülék segítségével detektáltuk. Ezt követően a készülék segítségével befotózott membránokat az Image Lab Software 5.2.1 használatával az általunk meghatározni kívánt fehérje relatív expresszió szintjét az egyes minták összfehérje tartalmára standardizálva határoztuk meg.

Western blot analízissel meghatározott fehérjék a következők voltak: pAMPK, AMPK, Beclin-1, LC3B-II, p62.

## **I/9. Statisztika**

A kapott nyers adatokat az átlag  $\pm$  SEM értékkel jellemeztük. Az egyes csoportok közötti eltérést az egy-pontos ANOVA-teszttel értékeltük, ezt követően a Tukey-féle poszttesztet is elvégeztük a Graph Pad Prism 5 szoftver (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) segítségével. A  $p \leq 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

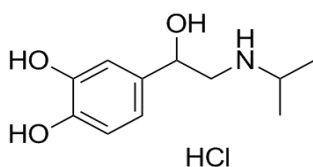
## Anyagok és módszerek II: Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás

### II/1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során hím (350-400 g) Sprague-Dawley patkányokat használtunk (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Németország). Minden állat esetében a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt a vonatkozó Európai Unió-s és a „Principles of Laboratory Animal Care” valamint a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (NIH 85-23, revised 1996) összhangban. Az állatoknak *ad libidum* (szabad hozzáférés) volt standard rágcsálótáphoz és vízhez.

### II/2. A kísérleteinkben felhasznált anyag

Isoproterenol



Izoprenalin-hidroklorid

$C_{11}H_{18}ClNO_3$

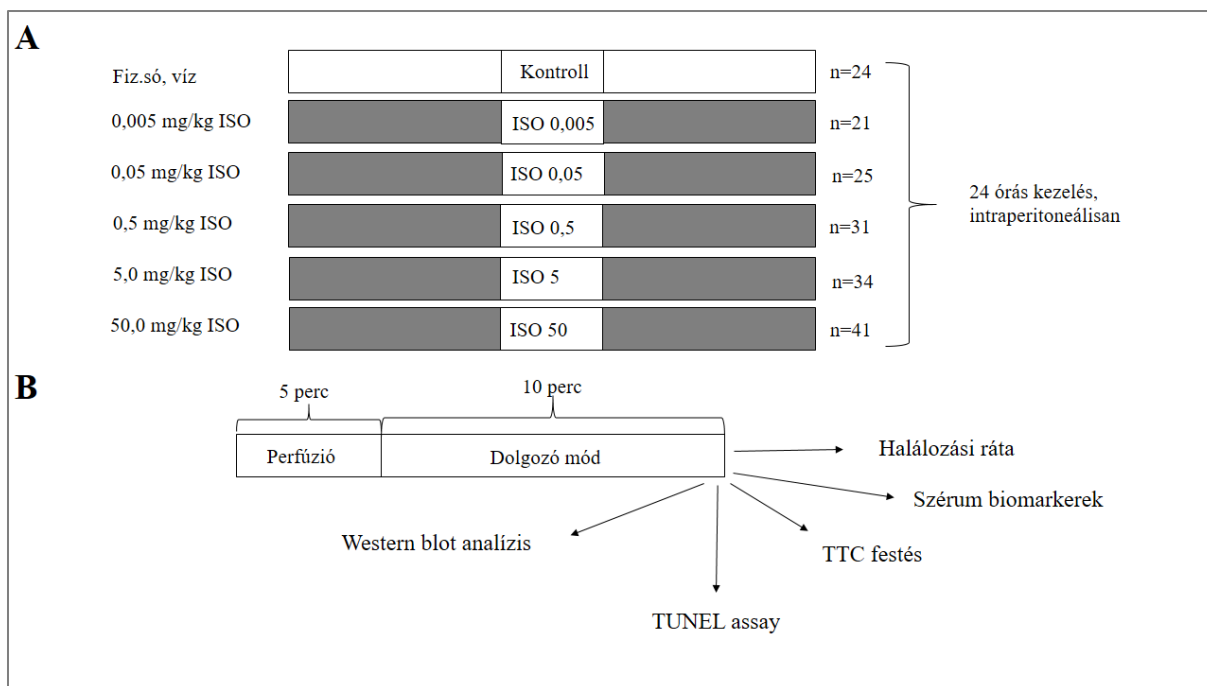
$M=247,719 \text{ g / mol}$

### **II/3. Kísérleti elrendezés**

Kísérletink során Sprague-Dawley hím patkányok 6 csoportját hoztuk létre:

1. KONTROLL
  - fiziológiás sóoldat i.p.
2. ISO 0,005
  - 0,005 mg/kg isoproterenol i.p.
3. ISO 0,05
  - 0,05 mg/kg isoproterenol i.p.
4. ISO 0,5
  - 0,5 mg/kg isoproterenol i.p.
5. ISO 5
  - 5,0 mg/kg isoproterenol i.p.
6. ISO 50
  - 50,0 mg/kg isoproterenol i.p.

Az állatok egyszeri ISO kezelésben részesültek, ezt követően 24 óra elteltével az állatokat mély anesztézia alá helyeztük. Az általunk kiválasztott ISO dózisokat a tanszékünkön végzett előzetes állatkísérletek alapján választottuk. Tósaki és munkatársai izolált szíven vizsgálták a különböző dózisban alkalmazott ISO proarritmikus hatását <sup>96</sup>.



**11. ábra** A különböző dózisú ISO kezelési protokoll sematikus ábrája (A), és a kezelést követően végzett mérések összefoglaló ábrája (B) (készítette Zilinyi Rita).

#### II/4. Szérum biomarkerek meghatározása

A 24 órás kezelést követően az állatokat mély anesztézia alá helyeztük 60 mg/kg-os dózisú Euthanival-oldattal, amely 400 mg/ml pentobarbital-nátriumot tartalmaz (Alfasan Nederland BV, Kuipersweg 9, Woerden), majd a vena jugularisból vért vettünk a szérumparaméterek meghatározása céljából. A méréseket a Labor Medicina Intézet végezte mind a két kísérlet esetében.

A meghatározott paraméterek a következők voltak:

- Troponin T (TrT)
- Laktát-dehidrogenáz (LDH)
- Kreatin-kináz MB izotípus (CK-MB)

## **II/5. Izolált dolgozó szív preparátum és infarktusos terület meghatározása**

Az izolált dolgozó szív preparátum protokoll pontos leírása az előző fejezetben található:  
**Anyagok és módszerek I: Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás, III/5. alfejezet.**

A 10 perces dolgozómódot követően 30 ml 1%-os trifenil-tetrazólium-klorid ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , TTC, komponensek: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oldatot injektáltunk a szívbe az aortakanül mellékágán keresztül, majd  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk az analízis elvégzéséig. Az apiko-bazális tengelyre merőlegesen körülbelül 1 mm vastagságúra szeleteltük a mintákat, beszenneltük, majd egyenként lemértük a szívszeletek tömegét. Ezt követően ImageJ szoftverrel kielemeztük a digitális képeket, melynek során pixelszámot társítottunk a szeletek tömegéhez, majd kijelölve az infarktusos területeket arányosan kiszámoltuk az infarktusos szívszövet tömegét. Ezután összesítettük a szeletekből kapott eredményeket: a szívet érintő infarktus méretét a teljes szívtömeg és az infarktusos szívtömeg hányadosaként kaptuk meg<sup>97,98</sup>.

## **II/6. Apoptózis mértékének meghatározása**

Az apoptózis detektálásához TUNEL assayt használtunk (terminális dezoxinukleotidil transzferáz (TdT) jelölő teszt), melynek során jelölni tudjuk a szabad 3'-OH terminált módosított nukleotidokkal enzimatis reakcióban (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR, fluorescein-labeled cell markers, Roche, Mannheim, Germany). A terminális dezoxinukleotidil transzferáz (TdT) katalizálja a dezoxiribonukleotidok templát-független polimerizációját az egy- vagy duplaszálú DNS 3' végéhez. A szív apikális részét 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk 24 órán keresztül szövettani vizsgálathoz. A paraffinba ágyazott 4,5  $\mu\text{m}$  vastagságú keresztmetszeteket xyolban és acetonban deparaffináltuk, majd 70%-os alkoholban és vízben rehidratáltuk azokat. Ezt követően 6 percig inkubáltuk forrásban levő citrát (pH 6.0) pufferben, majd szobahőmérsékletre hűtöttük 10 percen keresztül, és 2 alkalommal mostuk 5 percen keresztül PBS (phosphate-buffer saline, pH 7.4) pufferben. Végül a metszeteket  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 1 órán keresztül inkubáltuk TdT-vel, mostuk azokat még 2 alkalommal, majd annak érdekében, hogy detektálni tudjuk a nukleotidokat, DAPI festéket alkalmaztunk (4',6'-diamidino-2-phenylindole), amely kék fluoreszcenciát emittál miután bekötődik a DNS AT régiójába. Ismét mostuk a metszeteket PBS pufferben, majd szárítás után moviol segítségével lefedtük azokat. Ezt követően fluoreszcens mikroszkóp (Zeiss Axioscope A1 microscope with HBO100 illuminator (Zeiss, Jena, Germany) alá helyeztük a metszeteket. A piros és kék fluoreszcenciát

detektáló csatornákat összefűztük (ZEN 2012 software, Zeiss, Jena, Germany), és ahol megjelent mindkettő szín az TUNEL pozitív, ahol csak kék színt detektáltunk az TUNEL negatív sejtmag. A DNS töredezés mértéke az egyes mintákban a TdT-pozitív sejtmag / összes sejtmag arányaként lett meghatározva.

## **II/7. Fehérje izolálás és Western blot**

A szívsvövet bal kamrájából történő fehérje izolálás és a Western blot analízis az előző kísérlet **Anyagok és módszerek I/8.** alfejezetében pontosan leírt protokoll alapján történt. Western blot analízissel meghatározott fehérjék a következők voltak: pro-kaspáz-3, Beclin-1, LC3B-II, p62.

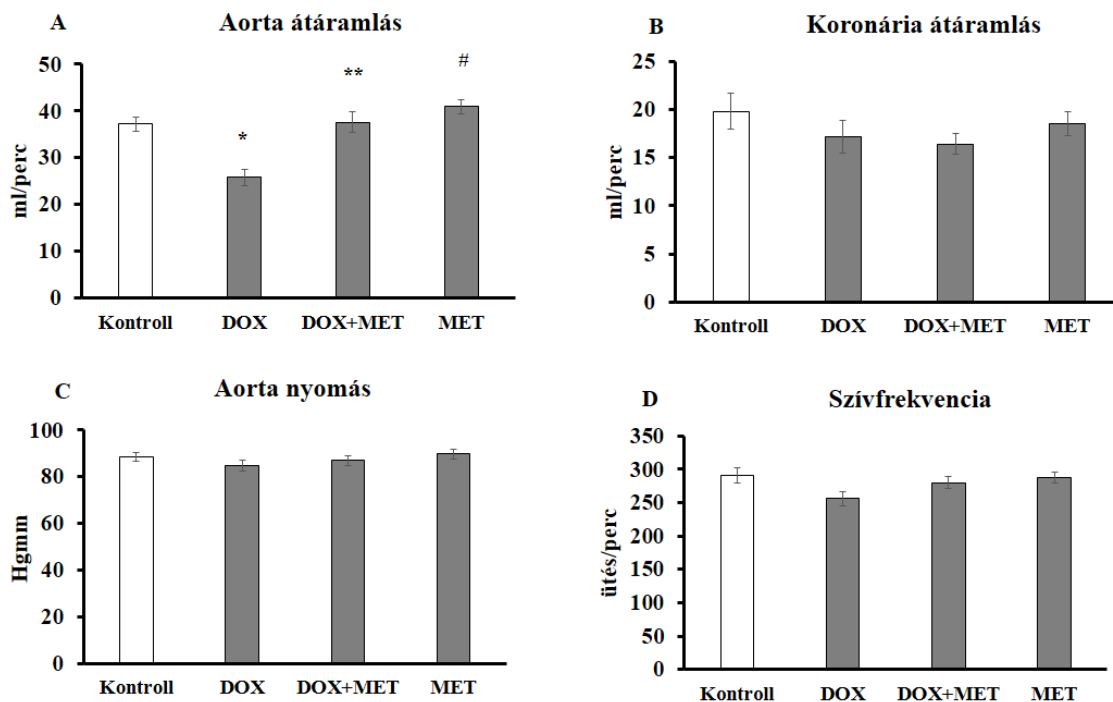
## **II/8. Statisztika**

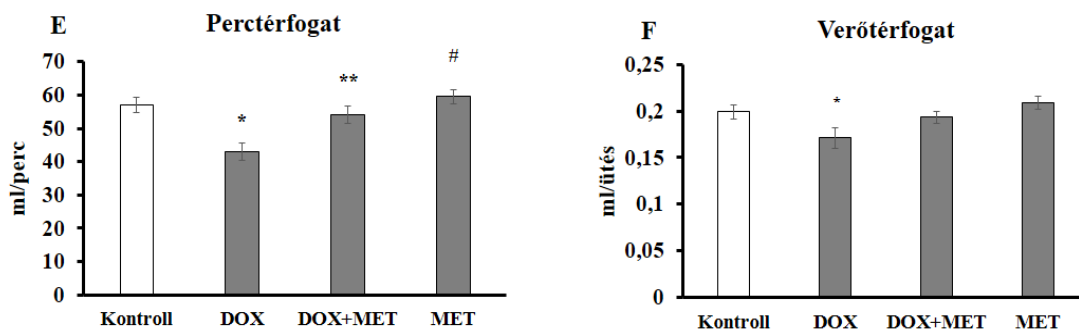
A kapott individuális adatokat az átlag  $\pm$  SEM értékkel jellemeztük. Az egyes csoportok közötti eltérést az egy-pontos ANOVA-tesztel értékeltük, ezt követően a Dunett poszttesztet is elvégeztük, túlélési aránynál a csoportok közötti eltéréseket Chi<sup>2</sup> és Fisher's tesztel végeztük a Graph Pad Prism 5 szoftver (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) segítségével. A  $p \leq 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

# Eredmények I: Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás

## I/1. A doxorubicin és metformin hatása a szívfunkcióra

A két hetes kezelés hatására az aorta átáramlás esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a DOX csoportban a kontroll értékeihez képest, míg a DOX+MET csoportban szignifikánsan magasabb értéket kaptunk a DOX csoporthoz viszonyítva (12. ábra A). A szívfunkciós paraméterek közül, a koronária átáramlás, szívfrekvencia és aorta nyomás értékeit tekintve szignifikáns változást nem tapasztaltunk, azonban ezen paraméterek esetében elmondható, hogy a DOX csoportban enyhe csökkenés látható a kontroll csoporthoz képest (12. ábra B,C,D). A verőtér fogat és perctér fogat esetében is elmondható, hogy a DOX csoportban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk, míg a verőtér fogat esetében enyhe mértékű, a perctér fogat esetében szignifikáns javulást tapasztaltunk (12. ábra E,F)

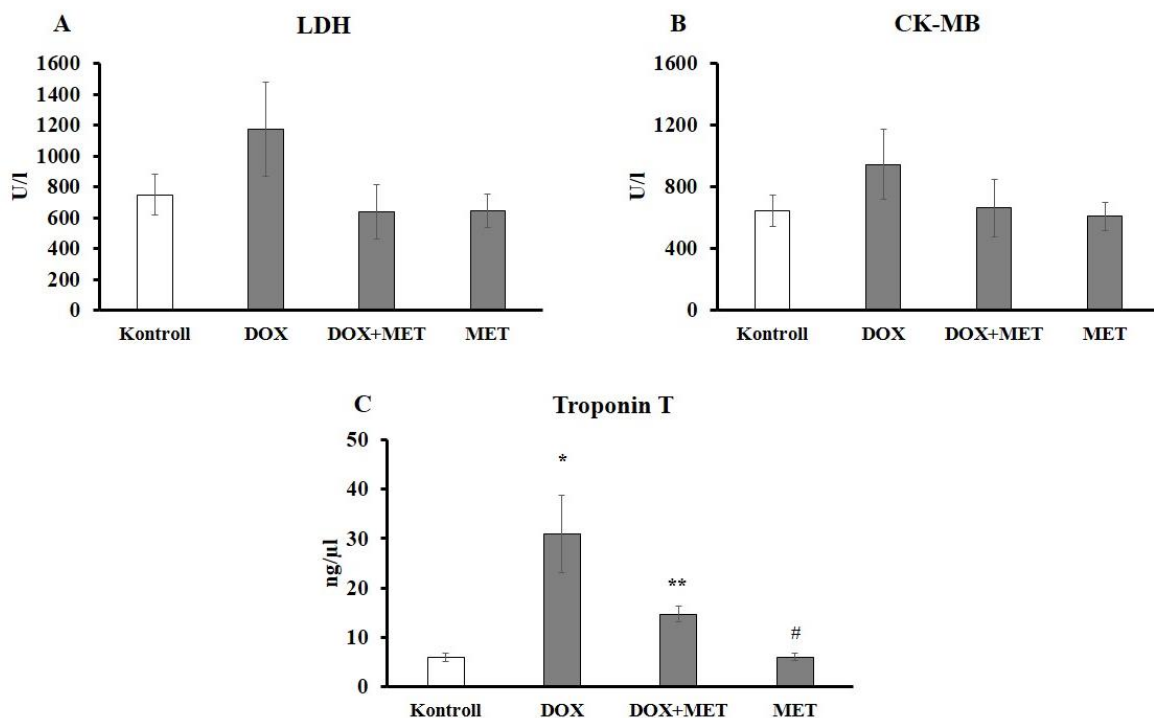




**12. ábra** A DOX és MET hatása a szívfunkciós paraméterekre a két hetes kezelést követően, ahol „dolgozószív” készülékre helyeztük az izolált szíveket, majd rögzítettük az aorta átáramlás (A), koronária átáramlás (B), aorta nyomás (C), szívfrekvencia (D), perctérfogat (E), verótérfogat (F) értékeit. Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egyponos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Tukey teszt követett. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. \* szignifikáns különbség DOX és kontroll csoport között, \*\* szignifikáns eltérés DOX és DOX+MET csoport között, # szignifikáns különbség DOX és MET csoport között.

## I/2. A doxorubicin és metformin hatása a szérumbiomarkerekre

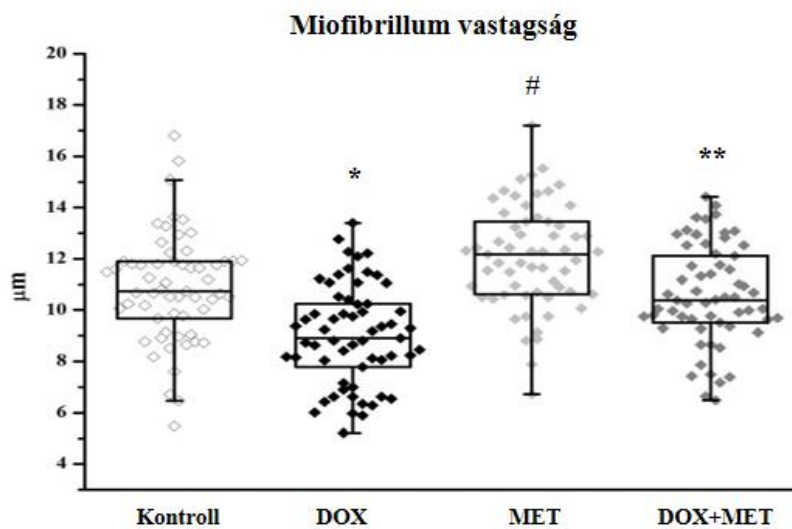
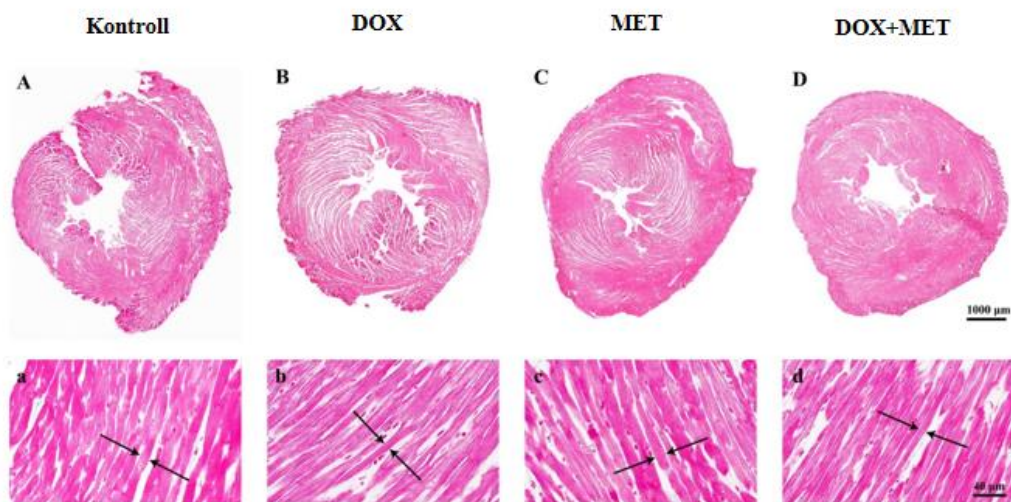
A két hetes kezelést követően a szérumbiomarkerek meghatározásához a vena jugularisból vért vettünk. A szívizom károsodást jól jelző markerek, a LDH és CK-MB izotípus a DOX csoportban jelentősen emelkedett volt, míg ezek az értékek a MET kiegészítő kezelés hatására alacsonyabb szinten maradtak (13. ábra A,B). A Troponin T kizárólag kardiális izoformák részét képezi, így a vérkeringésből mérhető Troponin T szívizom károsodásra utal. A DOX csoportban már a két hetes kezelést követően szignifikánsan emelkedett mennyiségben volt jelen a vérben a kontrollhoz viszonyítva, ezzel ellentétben a DOX+MET csoportban szignifikánsan alacsonyabb értéket mértünk a DOX csoporthoz képest (13. ábra C).



**13. ábra** A DOX és MET hatása a szérumban a két hetes kezelést követően. A vena jugularisból vett vérből a laktát-dehidrogenáz (A), a kreatin-kináz MB izotípus (B) és a Troponin T (C) került meghatározásra. Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egy pontos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Tukey teszt követett. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. \* szignifikáns különbség DOX és kontroll csoport között, \*\* szignifikáns eltérés DOX és DOX+MET csoport között, # szignifikáns különbség DOX és MET csoport között.

### I/3. A doxorubicin és metformin hatása a miofibrillumra

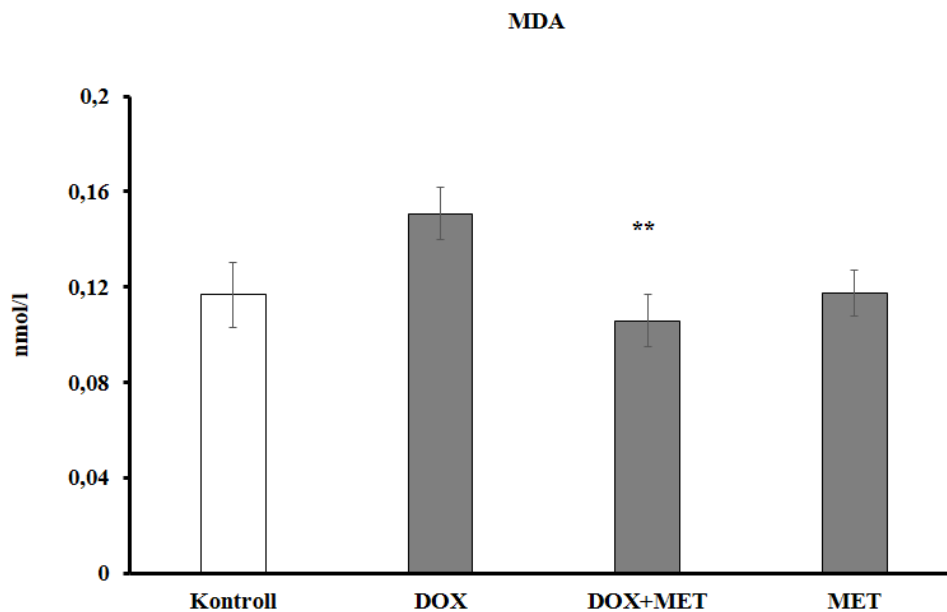
A Masson's trikróm festés során vizsgálni kívántuk a kollagén mennyiségét a szív szövetben. A kollagén akkumulálódás a szívizomban a fibrózis jele, azonban a két hetes kezelést követően még nem tapasztaltunk fibrózisra utaló jeleket. Azonban a DOX csoportban szignifikáns mértékben csökkent a kardiomiociták száma a kontrollhoz képest, melyet a miofibrillumok vastagsága jól reprezentál (14. ábra B,b). A DOX+MET csoportban láthatjuk (14. ábra D,d), hogy a miofibrillumok vastagsága szignifikánsan vastagabb a DOX csoporthoz képest, sőt az értékek megközelítik a kontroll csoport értékeit (14. ábra A,a).



**14. ábra** A DOX és MET hatása a miofibrillum vastagságra a két hetes kezelést követően. A csoportok közötti eltéréseket egyponos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Tukey teszt követett. Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. \* szignifikáns különbség DOX és kontroll csoport között, \*\* szignifikáns eltérés DOX és DOX+MET csoport között, # szignifikáns különbség DOX és MET csoport között.

#### I/4. A doxorubicin és metformin hatása a lipidperoxidációra

A MET kardioprotektív hatásának további igazolásához meghatároztuk a malondialdehid (MDA) szintjét a szívszövetben. A két hetes kezelést követően a DOX csoportban a malondialdehid szintje, bár nem szignifikáns módon, emelkedett volt a kontroll csoport értékeihez képest, ezzel szemben a DOX+MET csoportban szignifikánsabb alacsonyabb értéket kaptunk a DOX csoport értékeihez hasonlítva (15. ábra).

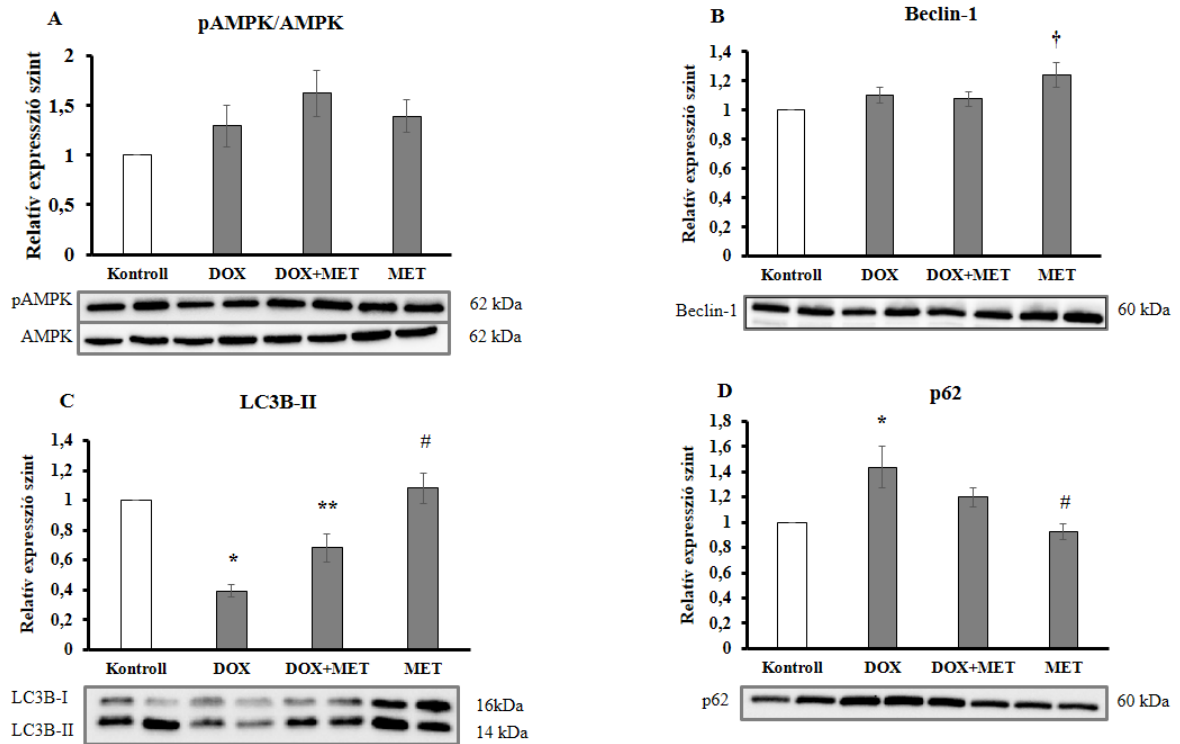


**15. ábra** A DOX és MET hatása a lipidperoxidációra a két hetes kezelést követően. Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egyponos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Tukey teszt követett. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. \*\* szignifikáns eltérés DOX és DOX+MET csoport között.

#### I/5. A doxorubicin és metformin hatása az autofágiás markerek expressziójára

A szívszövetben zajló makroautofágiás útvonal vizsgálatához a sejtek energia homeosztázisáért felelős és egyben autofágiát indukáló AMPK foszforilált és nem foszforilált fehérjét, az autofágiát iniciáló Beclin-1 fehérjét, az autofagoszóma kialakulásáért felelős LC3B-II fehérjét, valamint a lebontásra szánt komponenseket megjelölő és azokat az autofagoszóma belsejébe irányító p62 fehérjét vizsgáltuk. A pAMPK/AMPK esetében láthatjuk (16. ábra A), hogy ennek a szintje mind a MET, mind a DOX csoportban emelkedést mutatott, azonban meglepő módon

a legmagasabb expressziós szintet a DOX+MET csoportban mértük. A Beclin-1 fehérje (16. ábra B) szignifikáns emelkedést mutatott a MET csoportban a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, míg a DOX+MET csoportban csak enyhe emelkedést tapasztaltunk. Az LC3-II (16. ábra C) szignifikáns csökkenést mutatott a DOX csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva, míg a DOX+MET csoportban ez az érték szignifikánsan emelkedett volt a sima DOX csoporthoz képest. A p62 fehérje expresszió szintje (16. ábra D) szignifikánsan emelkedett volt a DOX csoportban a kontroll értékeihez képest, míg a DOX+MET csoportban ez az érték, bár nem szignifikáns módon, alacsonyabb volt a DOX csoportban mért értékekhez képest.

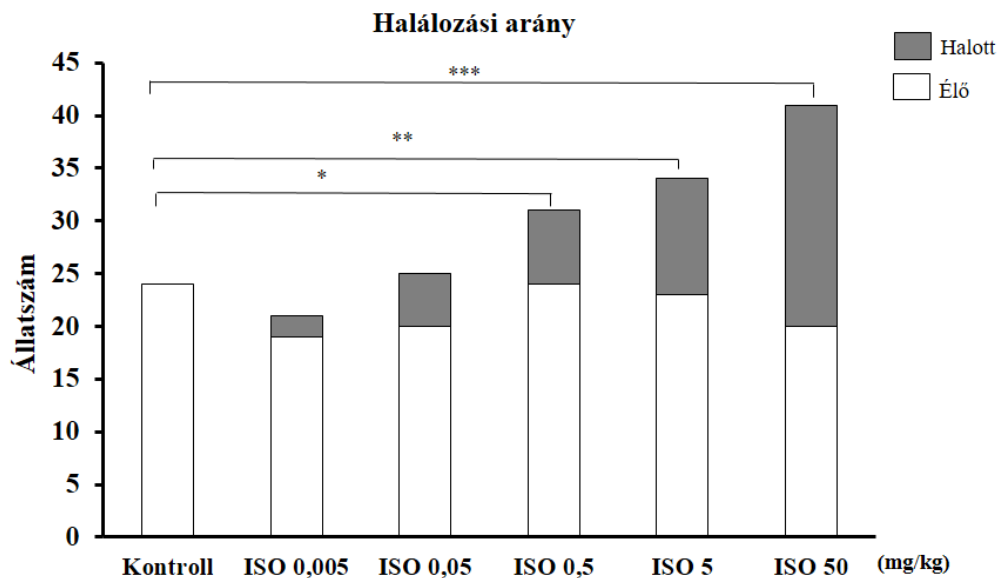


**16. ábra** A DOX és MET hatása az autofágiás markerek expresszió szintjére a két hetes kezelést követően. A szívszövetből western blot analízissel határoztuk meg a pAMPK/AMPK (A), Beclin-1 (B), LC3B-II (C), és p62 (D) szintjét. Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egyponos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Tukey teszt követett. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. \* szignifikáns különbség DOX és kontroll csoport között, \*\* szignifikáns eltérés DOX és DOX+MET csoport között, # szignifikáns különbség DOX és MET csoport között, † szignifikáns különbség MET és kontroll csoport között.

## Eredmények II: Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás

### II/1. Isoproterenol hatása a túlélésre

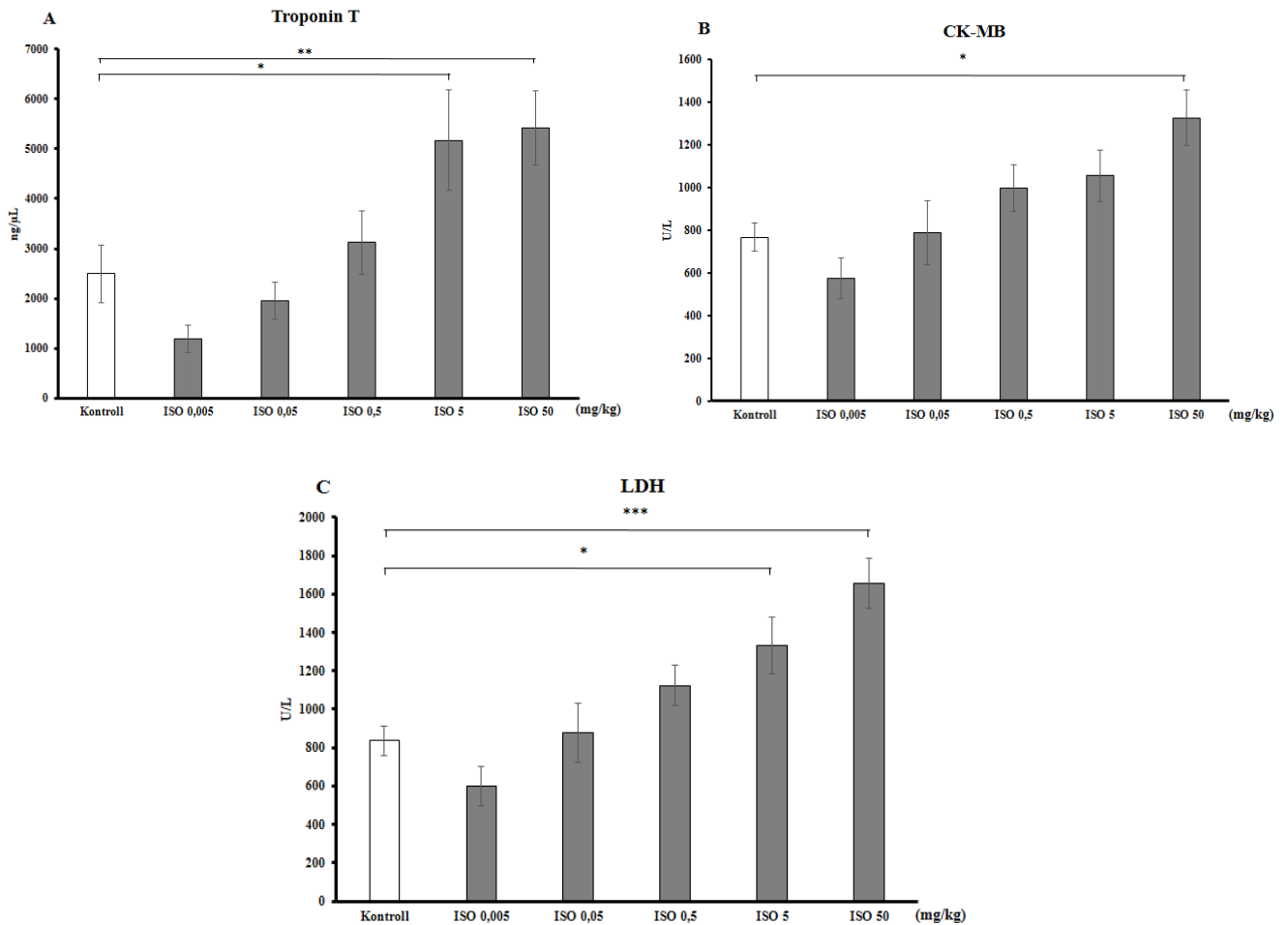
Annak érdekében, hogy jobban szemléltessük az ISO dózisfüggő toxicitását, a kísérletekben részt vevő életben maradt, és a kezelés közben elhalálozott állatok számát oszlopdiagram formájában prezentáltuk (17. ábra). Látható, hogy dózisfüggő módon emelkedett az elhalálozott állatok száma. A 0,5 mg/kg ISO, 5,0 mg/kg ISO és 50,0 mg/kg ISO csoportban szignifikáns mértékű volt azoknak az állatoknak a száma, amelyek nem éltek túl a kezelést a kontroll csoporthoz viszonyítva.



**17. ábra** A különböző dózisú ISO hatása a túlélési arányra (n=24-41). A csoportok közötti eltéréseket  $\chi^2$  és Fisher's tesztel végeztük. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. A \*, \*\*, és \*\*\*,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , és  $p < 0,001$  értéket jelöl a kontroll csoport értékeihez hasonlítva.

## II/2. Isoproterenol hatása a szérumbiomarkerekre

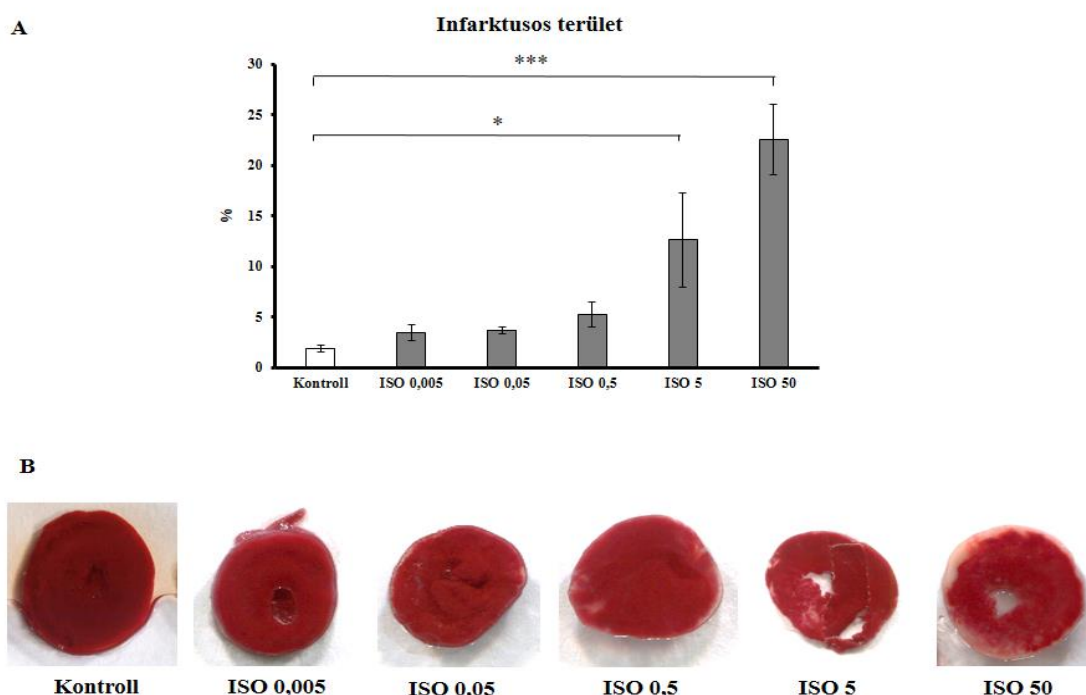
Az ISO kezelést követően a szérumbiomarkerek meghatározásához a vena jugularisból vért vettünk. A szívizom károsodást specifikusan jelző marker a kardiális Troponin T, valamint a LDH szignifikáns emelkedést mutatott az 5 mg/kg ISO és 50 mg/kg ISO csoportban a kontroll értékeihez viszonyítva (18. ábra A,B), míg a CK-MB izotípus esetében az 50 mg/kg ISO csoportban kaptunk szignifikáns emelkedést a kontrollhoz képest (18. ábra C).



**18. ábra** A különböző dózisu ISO hatása a szérumbiomarkerekre. A vena jugularisból vett vérből a Troponin T (A), a kreatin-kináz MB izotípus (B) és az LDH (C) került meghatározásra (n=24-41). Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egyponos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Dunnett posztteszt követett. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. A \*, és \*\*\*,  $p < 0,05$ , és  $p < 0,001$  értéket jelöl a kontroll csoport értékeihez hasonlítva.

### II/3. Isoproterenol és az infarktusos terület

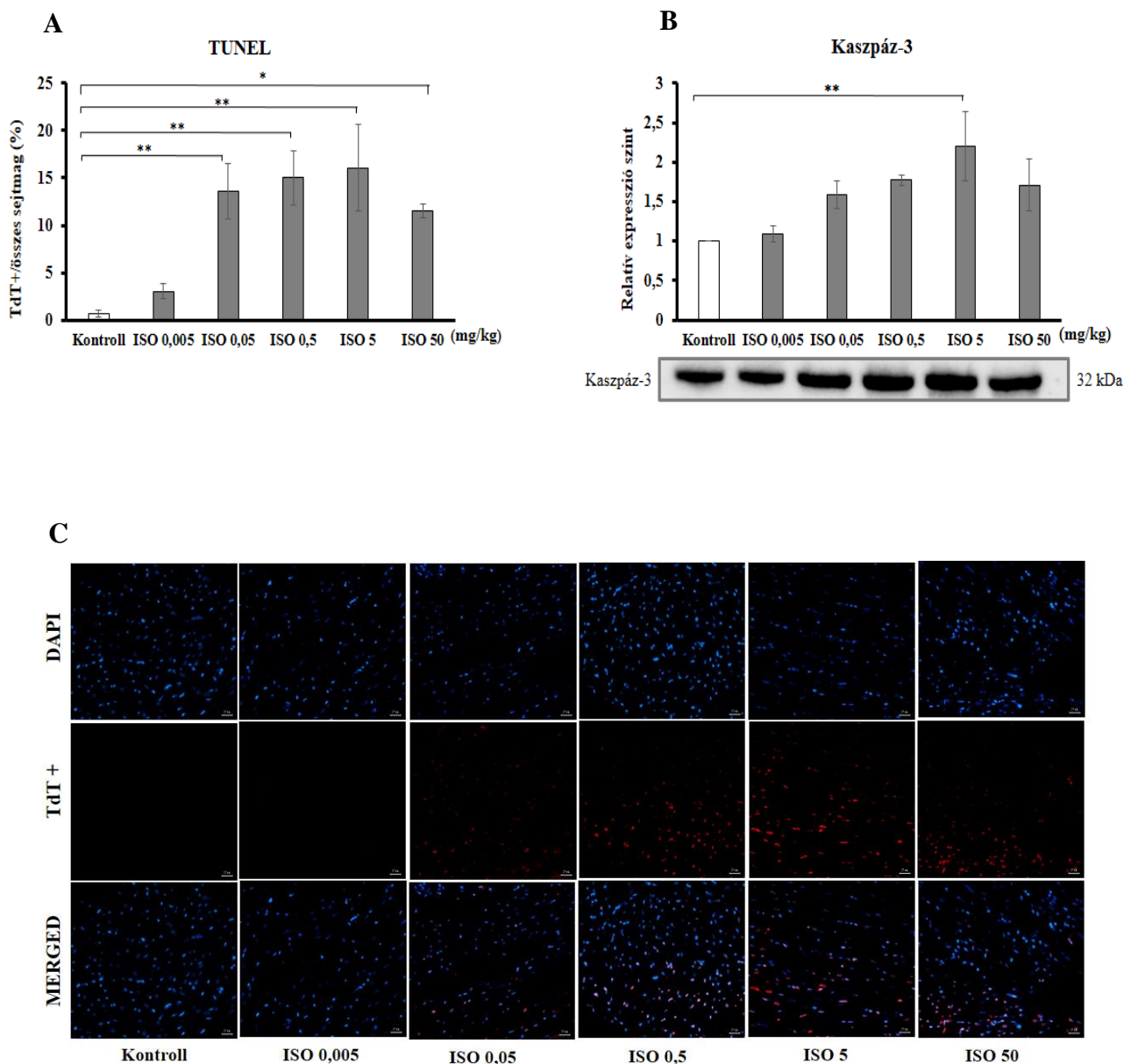
A TTC festés során meghatároztuk a szív élő és elhalt szövet arányát a teljes szívszövetre nézve, majd ábrázoltuk százalékosan a nekrozis mértékét. Eredményeink jól mutatják, hogy dózisfüggő módon emelkedett az infarktusos terület, az 5,0 mg/kg ISO és 50,0 mg/kg ISO csoportban pedig szignifikáns mértékű volt az elhalt szívszövet mennyisége a kontroll csoport értékéhez viszonyítva (19. ábra).



**19. ábra** A különböző dózisu ISO hatása a nekrozis mértékére (A), és a TTC festett szívszövet reprezentatív ábrája (B) (n=4-6/csoport). Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egyponos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Dunnett posztteszt követett. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. A \*, és \*\*\*,  $p < 0,05$ , és  $p < 0,001$  értéket jelöl a kontroll csoport értékeihez hasonlítva.

#### **II/4. Isoproterenol és az apoptózis**

A kardiomiocita apoptózis mértékének meghatározásához először a DNS törést mértük TUNEL assay segítségével, amely jól jelzi az apoptózis korai fázisát. Méréseink során szignifikánsan emelkedett TdT pozitív sejtmag (ami a DNS törés jele, és az apoptózis korai fázisában már megjelenik) számot kaptunk a 0,05 mg/kg ISO, 0,5 mg/kg ISO, 5,0 mg/kg ISO és az 50,0 mg/kg ISO csoportban a kontroll csoport értékeihez viszonyítva (20. ábra A). Az apoptózis mértékének további vizsgálatához Western blot analízissel vizsgáltuk a kaszpáz-3 fehérje expresszió szintjét a szívszövetben. A mérés során szignifikáns mértékben emelkedett a kaszpáz-3 expressziója az ISO 5,0 csoportban a kontroll értékeihez képest, azonban a legnagyobb dózisu, 50,0 mg/kg ISO csoport értékei alacsonyabbak voltak az 5,0 mg/kg ISO csoport értékeihez képest (20. ábra B).

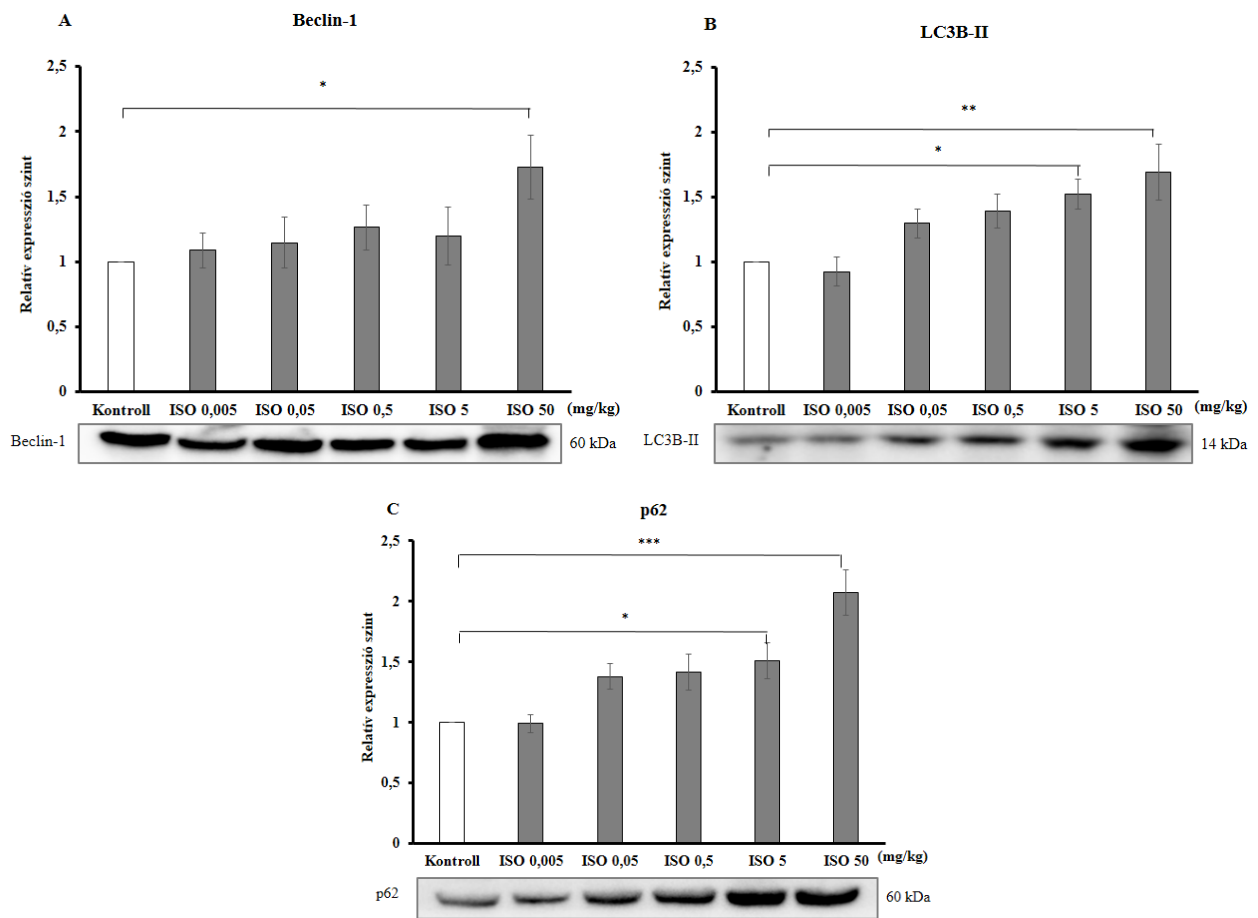


**20. ábra** A különböző dózisú ISO hatása az apoptózisra. A DNS törés mértékének meghatározásához TUNEL assayt végeztünk el (A). Az apoptózis mértékét a TdT pozitív magok és összes sejtmagok aránya adja meg ( $n = 4$ / csoport). Western blot analízissel a kaspáz-3 expresszió szintje is meghatározásra került (B). A TUNEL festésből származó reprezentatív immunfluoreszcens képek a szívsvöetvből (C), ahol a kék szín a sejtmagokat mutatja (DAPI festés), a piros pedig a TdT+ sejtmagot jelzi. Scale bar: 20  $\mu$ m. Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egyponstos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Dunnett posztteszt követett. Szignifikáns

eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. A \* és \*\*,  $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ , értéket jelöl a kontroll csoport értékeihez viszonyítva.

## **II/5. Isoproterenol és az autofágia**

A szívszövetben zajló makroautofágiás útvonal vizsgálatához az autofágiát iniciáló Beclin-1 fehérjét, az autofagoszóma kialakulásáért felelős LC3B-II fehérjét, valamint a lebontásra szánt komponenseket megjelölő és azokat az autofagoszóma belsejébe irányító p62 fehérjét vizsgáltuk. A Beclin-1 esetében láthatjuk (21. ábra A), hogy szinte minden ISO csoportban szintje nem haladta meg a kontroll csoport értékeit, csak egy nagyon enyhe emelkedés látható, azonban az ISO 50,0 mg/kg csoportban szintje szignifikánsan emelkedettebb volt a kontroll csoport értékeihez képest. Az LC3B-II (21. ábra B) dóziszfüggő módon emelkedett az egyes csoportokban, azonban az ISO 5,0 mg/kg, és ISO 50,0 mg/kg csoportban szintje szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoport értékeihez képest. A p62 fehérje expresszió szintje (21. ábra C) ugyancsak dóziszfüggő módon emelkedett, az ISO 5,0 mg/kg, és ISO 50,0 mg/kg csoportban szintje szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoport értékeihez képest.



**21. ábra** A különböző dózisú ISO hatása az autofágiás markerek expresszió szintjére (n=7-12). A szívszövetből Western blot analízissel határoztuk meg a Beclin-1 (A), LC3B-II (B), és p62 (C) szintjét. Az eredményeket a középérték  $\pm$  a mintaközép hibájaként (SEM) adtuk meg. A csoportok közötti eltéréseket egyponos variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet a Dunnett posztteszt követett. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. A \*, \*\*, és \*\*\*,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , és  $p < 0,001$  értéket jelöl a kontroll csoport értékeihez viszonyítva

# Diszkusszió

## I. Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás

A legfrissebb statisztikai adatok alapján elmondható, hogy a szív- és érrendszeri megbetegedések következtében kialakuló halálozások globális szinten vezetik a mortalitási statisztikát, annak ellenére, hogy a fejlődött országokban ez az utóbbi évtizedekben csökkenést mutatott: köszönhetően egyrészt a modern gyógyszeres kezelésnek, másrészt a hatékony prevenció intézkedéseknek köszönhetően. 2015-ben mintegy 17,9 millió ember vesztette életét valamilyen kardiovaszkuláris eredetű betegségben, s felmérések alapján ez a szám 2030-ra 23-24 millióra emelkedhet éves szinten világszerte. Az amerikai *Heart Disease and Stroke Statistics* 2018-as kiadványában összegezte azokat a rizikó faktorokat (összesen 7 tényezőt), amelyek nagyban hozzá járulnak a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában, s ezt *'Life's Simple 7'*-nek nevezte el: dohányzás, fizikai aktivitás hiánya, egészséges tápanyag bevitel hiánya, túlsúly/obezitás, magas koleszterinszint, diabétesz, valamint magas vérnyomás. A kardiovaszkuláris betegségek kezelésében egyre nagyobb szerepet játszanak, és nagy erőfeszítések folynak a megfelelő prevenció stratégiák kialakítása és a rizikó faktorok csökkentése irányába<sup>99,100</sup>. Legyen szó szív- és érrendszeri, vagy bármilyen más betegségről, napjainkban egyre nagyobb erőfeszítések folynak a prevenció irányába. Az alap kutatás célja a különböző betegségek patomechanizmusának pontos föltárása, hiszen ez is hozzájárulhat a védekező stratégiák kialakításához, valamint a hatékonyabb terápiák kidolgozásához. Kísérleteink során is olyan alapmechanizmusokat vizsgáltunk, amelyek még nem teljesen tisztázottak, azonban ezen folyamatok pontosabb feltérképezése és megismerése a prevenció részét képezhetik a későbbiekben, vagy új támadáspontú gyógyszeres terápia kifejlesztéséhez nyújthatnak segítséget. A doxorubicint, amelyet 1971-ben hoztak forgalomba, az egyik leghatékonyabb antraciklin típusú kemoterápiás szerként tartották számon, azonban néhány éven belül kiderült, hogy kardiotoxikus<sup>101,102</sup>. Jelenleg is intenzíven folynak a kutatások a mellékhatások kivédésére, azonban napjainkig nem sikerült olyan módszert kidolgozni, mellyel a kardiotoxicitás kivédhető lenne. Jelen kísérletünkben a DOX kezelést metforminnal kombináltuk, és vizsgálni kívántuk annak kardioprotektív tulajdonságát, valamint az autofágiára gyakorolt hatását. A DOX-indukálta kardiotoxicitás kialakulásának hátterében multifaktoriális mechanizmusok állnak, azonban kulcsfontosságú folyamat a kardiomiocitákat érintő oxidatív stressz<sup>103</sup>. A DOX kezelés következtében ugyanis felborul az antioxidáns egyensúly: a megnövekedett mennyiségű reaktív oxigén- és nitrogén gyökök, valamint az

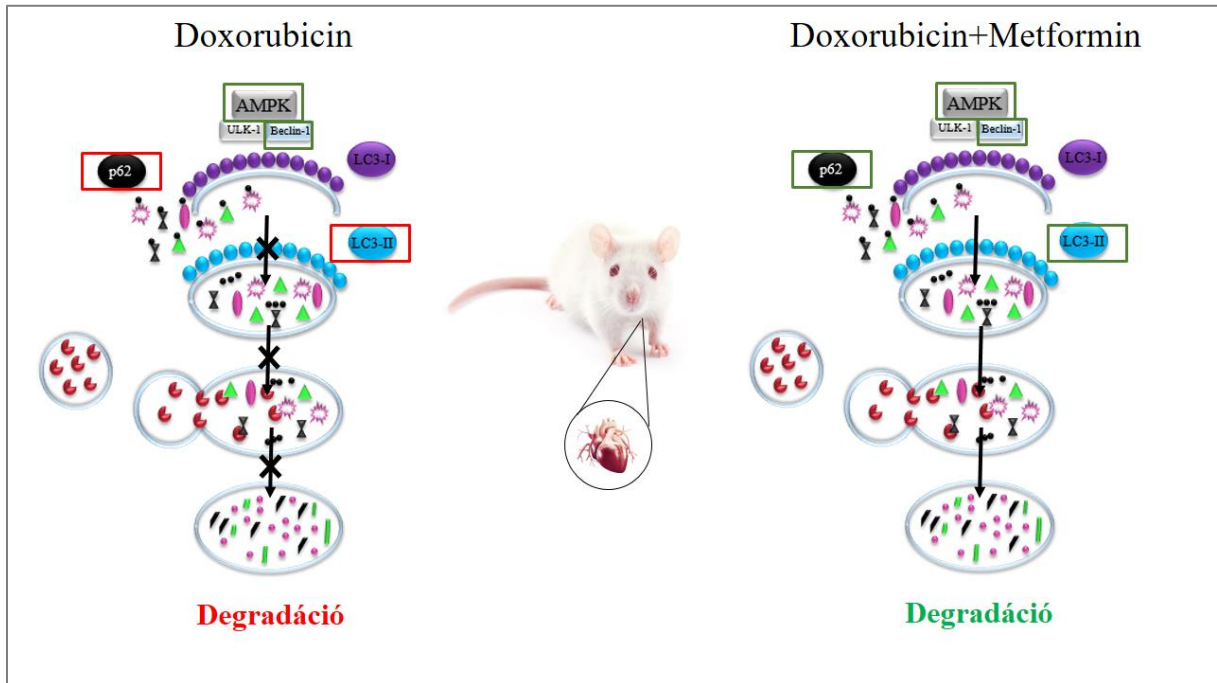
oxidatív stressz DNS és fehérje károsodáshoz, illetve a mitokondrium abnormális működéséhez vezet, amellyel a sejt már nem képes megbirkózni <sup>104</sup>. Eredményeink ezt szintén alátámasztották, hiszen a két hetes kezelést követően a DOX csoportban nagymértékben emelkedett MDA szintet mértünk, mely a lipidperoxidáció egyik jól mérhető produktuma, ezzel szemben a DOX+MET csoportban ez a szint szignifikánsan csökkent értéket mutatott a sima DOX csoport értékeihez képest. A megnövekedett oxidatív stressz károsodott bal kamrai funkcióval társult: a szívfunkciós paraméterek közül az aorta átáramlás, a perctérfogat és verőtérfogat szignifikáns csökkenést mutatott a DOX kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest, míg a MET kiegészítő kezelés hatására az aorta átáramlás és perctérfogat szignifikánsan javult a doxorubicinhoz képest. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a MET kezelés hatására a pumpa funkcióban nem volt tapasztalható akkora mértékű romlás, mint a sima DOX kezelt csoportban. 2017-ben Wu T. és munkatársai vizsgálták a MET hatását diabétesz mellitusban szenvedő betegekben, és azt találták, hogy a MET enyhén emeli a szívfrekvenciát, azonban a vérnyomás szignifikáns növekedése nélkül <sup>105</sup>. Jelen esetben is a méréseink ezt alátámasztották, hiszen enyhén emelkedett volt a szívfrekvencia a DOX+MET, valamint a sima MET csoportban, azonban a vérnyomás esetében egyik csoportban sem tapasztaltunk nagymértékű változást. A DOX-indukálta kardiális sérülés alátámasztásához továbbá mértük a sérumból a CK-MB izotípusát, a LDH-t, valamint a Troponin T-t. A CK-MB és LDH a véráramba kerül a kardiomiociták membrán sérülése következtében, ebből adódóan a vérből mérhető szintjük a kardiotoxicitás kifejezetten jó indikátorai. A 6X3 mg/kg DOX kezelés hatására ezek a paraméterek emelkedett szintet mutattak a kontroll csoportok értékeihez képest, míg a metformin kezelés hatására a LDH és CK-MB jóval alacsonyabb szintű volt a sima DOX csoporthoz képest, sőt, a Troponin T, mely specifikusan a szívizomban fordul elő, szignifikánsan magasabb volt a DOX csoportban. Viszont a MET+DOX csoportban ez az érték szignifikánsan alacsonyabb volt a sima DOX csoporthoz hasonlóan. Ezek az eredmények alátámasztják az a tényt, hogy a MET napi adagolása, mérsékelte a DOX által okozott kardiális sérülést. A szövettani vizsgálatok eredményei szintén igazolják a MET kardioprotektív hatását: önmagában a DOX kezelés szignifikánsan csökkentette a miofibrillumok vastagságát a kontroll csoporthoz képest, míg a DOX+MET csoportban a miofibrillumok szignifikánsan vastagabbak voltak a DOX csoporthoz viszonyítva. Korábban Ashour és munkatársai is leírták, hogy DOX kezelés mellett nagymértékű kardiomiocita elhalást és abnormális mitokondriumokat találtak szövettani vizsgálataik során, melyek normalizálódását figyelték meg amikor metformint is adagoltak a DOX mellé <sup>106</sup>. Továbbá a MET csökkentette az apoptotikus kaszpáz-3, és emelte az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szintjét, melyből arra következtettek, hogy antiapoptotikus

tulajdonsággal is rendelkezik a MET<sup>107</sup>. Az általunk kapott szövettani eredmények is alátámasztják ezt, hiszen a két hetes MET kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb volt a kardiomiocita elhalás mértéke a sima DOX csoporthoz képest. Jelen kísérletünk egyik fókuszpontja a szívben zajló makroautofágia vizsgálása, valamint a MET hatása erre az útvonalra, hiszen az irodalomban erről pontos adatok még nem állnak rendelkezésünkre. Az autofágia monitorozására az LC3B-II és a p62 fehérjék expresszió szintjét határoztuk meg. Az LC3B-II fehérje az LC3-ből keletkezik, hasítást követően először LC3-I jön létre, majd lipid konjugációval jön létre az LC3-II, mely a kettős falú autofagoszóma kialakulásához szükséges, szignifikáns csökkenést mutatott a DOX kezelés hatására, míg a MET kezeléssel kiegészítve az LC3B-II szintje szignifikáns emelkedést mutatott a sima DOX kezeltcsoporthoz képest. A p62, mely a lebontásra szánt ubiquitinilált komponenseket megköti, méghozzá az UBA (ubiquitin-associated) doménje segítségével, és irányítja az autofagoszóma belsejébe, hogy azok lizoszomális degradáción menjenek keresztül, szignifikánsan emelkedett szintet mutatott a DOX csoportban a kontrollhoz képest, míg MET adagolásakor a fehérje expressziós szintje a DOX csoporthoz képest (bár nem szignifikáns) jóval alacsonyabb volt. Az alacsony LC3B-II szint arra enged következtetni, hogy már az autofagoszóma kialakulásakor zavart okoz a DOX, s elképzelhető, hogy nem megfelelő mennyiségű autofagoszóma alakul ki ahhoz, hogy teljesen végig menjen a folyamat. Ezt alátámasztja a nagymennyiségű p62 szint, hiszen normál körülmények között a p62 szintén lebontásra kerül az autofagolizoszómában, továbbá azt már leírták, hogy az akkumulálódott p62 az autofágia abnormális, végbe nem menő állapotára utal<sup>108</sup>. MET kezelést követve, láthatjuk az LC3B-II és p62 fehérjék esetében, hogy szintjük valamelyest normalizálódott a sima DOX csoporthoz képest, és elképzelhető, hogy a MET képes kivédeni a DOX okozta károsodást az autofágiás folyamatban. Az autofágia mind fiziológiás, mind patofiziológiás körülmények között fontos túlélési útvonal a sejtek számára. Indukálódása történhet például éhezés, oxidatív stressz, megváltozott metabolizmus hatására. A DOX kezelés során nagymennyiségű ROS képződik, illetve a mitokondriumban csökken az ATP szint, valamint emelkedik az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint, ezért az AMPK foszforilálódik, majd aktiválódik, hiszen a sejtek energia háztartás szenzitív monitorozója, az emelkedett AMPK pedig autofágiát iniciál az mTOR fehérje gátlásával, vagy az ULK-1 direkt foszforilálásán keresztül<sup>26,109</sup>. Ezt a fehérjét, a foszforilálódott AMPK és AMPK arányát szintén vizsgáltuk a két hetes kezelés végét követően. Korábbi tanulmányokban ellentmondásos adatokat olvashatunk, miszerint a DOX képes indukálni, illetve blokkolni is az autofágiát. Egy 2017-es reviewban Koleini és Kardami összegyűjtötte az összes *in vitro* és *in vivo* tanulmányt, amelyben a DOX-indukálta kardiotoxicitás és autofágia kapcsolatát vizsgálták, kiemelve, hogy

az egyes tanulmányokban hogyan alakult a DOX kezelés hatására az AMPK aktivitás<sup>20</sup>. Meglepő módon ebben az összefoglaló táblázatban is ellentétes adatokkal találkoztam: Lv X. és munkatársai 2012-ben azt írták le, hogy 20 mg/kg-os egyszeri dózisban i.p. alkalmazva hím patkány modellen a DOX indukálta az AMPK-t, míg Gu J. és munkatársai azt találták 2016-ban, hogy 15 mg/kg dózisú DOX nem befolyásolta az AMPK-t<sup>110,111</sup>. A legfrissebb publikációk egyikében azonban már arról olvashatunk, hogy a DOX igenis indukálja az autofágiát az AMPK útvonalon keresztül, azonban a folyamatban zavar lép fel és az autofágia inkomplett, illetve nem megy végbe. Ezt támasztja alá a mi kísérletünkben a DOX csoportban mért emelkedett AMPK expresszió szint is. Továbbá a MET csoportban szintén emelkedett szintet mértünk, azonban tudjuk, hogy a MET egyik hatása, hogy indukálja az AMPK-t. Meglepő módon, a legmagasabb expressziós szintet a DOX+MET csoportban tapasztaltuk, s arra következtettünk, hogy a két szer AMPK indukáló hatása összeadódott és egy kifejezettebb AMPK indukáló hatás érvényesült. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy valóban elindul az autofágiás folyamat a DOX kezelés hatására, azonban a folyamat inkompletsége miatt nem tud egy protektív mechanizmusként működni a kardiomiociták számára, hiszen egyik fő feladata, hogy eltakarítsa a sejt számára többé már nem hasznos komponenseket, bele értve a DOX hatására károsodott mitokondriumok degradációját is. Ezen túlmenően pedig azt is figyelembe kell vennünk, hogy az autofágia energiaigényes folyamat: és valószínűleg ez is szerepet játszik abban, hogy a DOX kezelés hatására az energia háztartás felborul, s a kezdetekben a szívizomsejtek az autofágia indukálódásán keresztül próbálják túlélni és adaptálódni a megváltozott körülményekhez, azonban az ATP szint folyamatos csökkenése, valamint az autofágiás folyamat megrekedése a sejtek halálához vezet. Egy korábbi fejezetben már szó volt arról, hogy normál körülmények között az autofágia blokkolni képes az apoptózist, méghozzá a proapoptotikus kaspázok blokkolása révén, azonban a megváltozott fiziológiás körülmények következtében, valamint ha már az autofágia önmagában nem képes megbirkózni a patológiás állapottal, akkor indukálni képes az apoptózist vagy a nekrozist.

Összességében elmondható, hogy a napi rendszerességgel adagolt kiegészítő MET terápia kardioprotektívnek bizonyult a DOX terápia mellett. Jelen kísérletben az autofágia működésére fókuszáltunk: eredményeinkkel igazoltuk, hogy a DOX diszregulációt okoz az autofágiás folyamatban, amit a MET valamelyest normalizálni volt képes. Feltételezzük, hogy ez a folyamat felelős azért, hogy a DOX+MET csoportban jóval kisebb mértékű volt a szívizom károsodás: alacsonyabb volt a szívizomkárosodást jelző szérumban enzimek szintje, javultak a szívfunkciós paraméterek, kisebb volt a lipidperoxidáció mértéke, valamint jelentősen

vastagabb miofibrillumok figyelhetők meg a szövettani metszetekben a sima doxorubicinnel kezelt csoporthoz képest. Azonban további kísérletek, és az autofágiás flux alaposabb tanulmányozása szükséges, hogy egyértelműen alátámaszthassuk az ok-okozati összefüggéseket.



**22. ábra** A két hetes DOX és MET hatása az autofágiás folyamatra: az általunk meghatározott autofágiás markerek expressziós szintje alapján (készítette Zilinyi Rita).

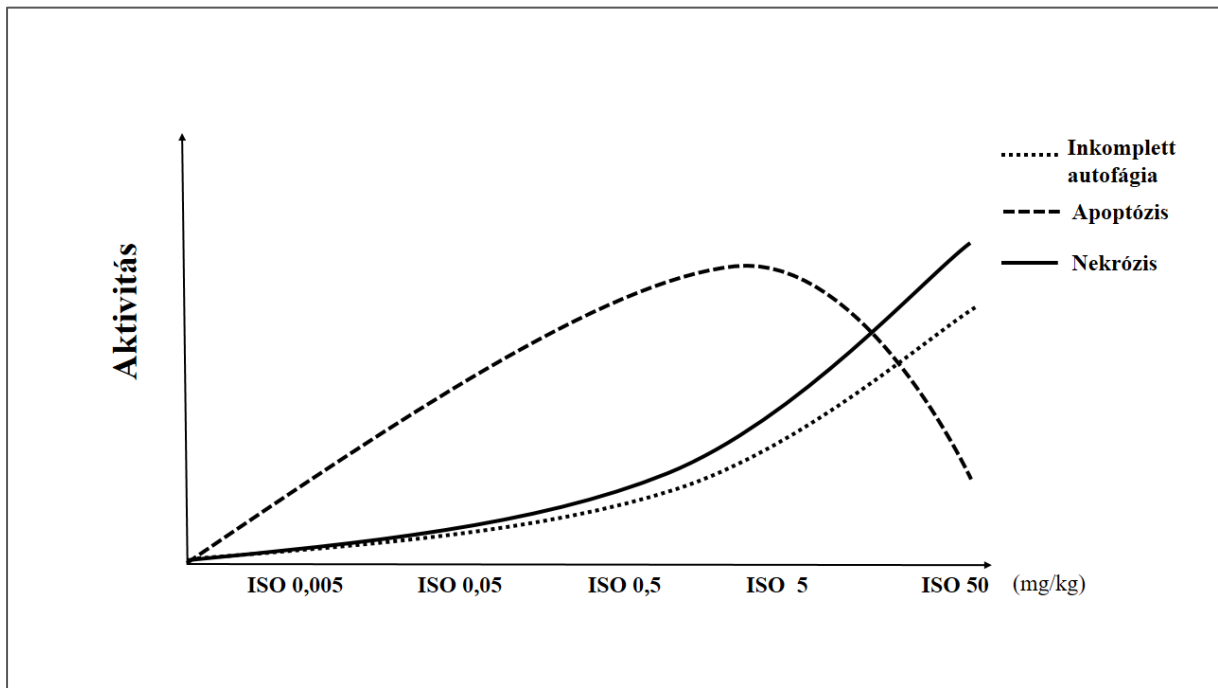
## II. Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás

Kísérleteink további részében az ISO indukálta kardiotoxicitás kialakulásában szerepet játszó túlélési, és halálozási útvonalak vizsgálatát tűztük ki célul. Az ISO intraperitonealis adminisztrációja patkány modellben gyors, egyszerű, és nem invazív módszer, hogy az emberben kialakuló miokardiális infarktushoz hasonló sérülést indukáljunk<sup>53,56</sup>. Számos tanulmány született már ebben a témában, és tudjuk, hogy a toxicitás mértéke dózis függő módon alakul ki<sup>96</sup>. A kísérleteink során felhasznált állatok túlélési arányából láthatjuk, hogy a 24 órás kezelés következtében az elhalálozott állatok száma is dóziszfüggő mértékben emelkedett, az 5,0 mg/kg, és 50,0 mg/kg dózissal kezelt állatok közel fele nem élte túl a másnapot. A kardiotoxicitás kialakulásának alátámasztásához, a vena jugularisból vett vérből meghatároztuk olyan biomarkerek szintjét, melyek a miokardium sérülését jelzik. A Troponin T kizárólag a szívizomban fordul elő, ezért teszi alkalmassá a szérumból mérve a szívben történő károsodások, mint az akut miokardiális infarktus, vagy kemoterápia következtében kialakuló kardiotoxicitás diagnosztizálására<sup>88,89</sup>. Jól látszott az eredményeinkből, hogy a két legmagasabb dózisnál, a Troponin T és LDH szignifikánsan emelkedettebb volt, a CK-MB izotípus esetében az 50,0 mg/kg dózissal kezelt állatoknál kaptunk szignifikáns emelkedést. Ennek hátterében pedig a nagy mennyiségű ROS-mediálta lipid membrán diszrupciója áll, melynek következményeként citoszolikus enzimek (LDH és CK-MB) szabadulnak fel és kerülnek a véráramba, s ezek emelkedett szintje már jelzi a sejtmembrán integritásának változását és a szívizom sérülését<sup>112</sup>. Ebből az eredményekből már azt is láthatjuk, hogy a miokardiumban okozott károsodás mértéke dóziszfüggő módon alakul ki. Megemlítendő, hogy a kardiomiociták regenerálódási képessége minimális. Az utóbbi évtizedek egyik jelentős kutatási vonala az apoptózis szerepének vizsgálata különböző kóros állapotokban. Az apoptózis fontos szerepet tölt be a szív és az erek fejlődése során is. Kísérleti állatokban és humán szívizomzaton végzett vizsgálatok is igazolták a miociták korral összefüggő lassú elvesztése is apoptotikus folyamat révén történik. Több kísérlet szerint a fejlődő szívben azokon a helyeken észlelhető apoptózis, ahol alacsonyabb a sejtproliferáció, illetve ahol fúzió vagy remodeling fordul elő. Kísérletekben továbbá azt is megfigyelték, hogy az embrionális szívben az apoptózis serkentésével vagy gátlásával szívfejlődési rendellenességek hozhatók létre, például kaszpáz-8 knock-out egerekben kamratágulat és hemodinamikai elégtelenség alakul ki<sup>113</sup>. A miociták apoptózisát több tényező is kiválthatja: a legerőteljesebb apoptózist indukálók közé tartoznak a szívizomban az oxigéntartalmú szabad gyökök, stresszállapotok, citokinek (FAS, TNF $\alpha$ ), szfingolipid metabolitok. Ebben a tanulmányban az autofágia, apoptózis és nekrozis

vizsgálatára fókuszáltunk. Több tanulmány leírta már, hogy ezek a túlélési, és halálozási útvonalak szigorúan kontrollált és egymással szoros kapcsolatban álló mechanizmusok <sup>78,114-116</sup>, és ha diszrupció történik ezen folyamatok kapcsolatában, az súlyos patofiziológiás folyamatok kialakulásához vezet <sup>116</sup>. Az ISO kezelés egyik következménye is a nagyszámú reaktív oxigén gyökök képződése, amely oxidatív stresszhez és lipidperoxidációhoz vezet, s a megnövekedett oxidatív stressz további folyamatokat indít el a sejtekben: indukálódik az autofágia <sup>53</sup>. Western blot eredményeinkből az látszik, hogy az LC3B-II fehérje, amely az autofagoszóma kialakulásában résztvevő fehérje, valamint a p62/SQSTM1 fehérje, mely megjelöli a lebontásra szánt kargót, és azokat célirányosan az autofagoszóma belsejébe irányítja, szignifikánsan emelkedett expresszió szintet mutatott a két legnagyobb dózisu ISO csoportban a kontroll csoporthoz képest, de az megállapítható, hogy a fehérjék expresszió szintje dózisu függően emelkedik. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az autofágia diszregulálódik, és a folyamat nem tud teljes mértékben végbemenni. Ezt támasztja alá a nagymennyiségű p62 szint, hiszen normál körülmények között a p62 szintén lebontásra kerül az autofagolizozómában, továbbá azt már leírták, hogy az akkumulálódott p62 az autofágia abnormális, inkomplett állapotára utal <sup>108</sup>. Normál körülmények között az autofágia blokkolja az apoptózist, azonban ha megváltozik a sejt fiziológiás állapota az autofágia apoptózist vagy nekrozist indukálhat. Ez a jelenség akkor alakul ki, ha a sejt olyan megváltozott körülménynek van kitéve, mint például az oxidatív stressz, és az autofágia már nem képes ehhez adaptálódni és ezzel megbirkózni <sup>79,80</sup>. Feltételezésünk szerint, mivel az autofágia jelen esetben diszregulálódik, apoptózis fog indukálódni. A TUNEL assay, (mely jól jelzi a DNS törést már az apoptózis korai fázisában), során kapott eredményeinkből látható, hogy a DNS károsodás jelei már egészen a 0,05 mg/kg dózisu ISO-val kezelt csoportban észlelhetők, a DNS törés mértéke már az ISO 0,05 csoportnál szignifikáns mértékű volt a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, és dózisu függő módon emelkedett a DNS károsodás mértéke. Az apoptózis további vizsgálatához mértük a kaszpáz-3 fehérje expresszió szintjét. Itt azonban az látható, hogy az apoptózis mértéke a legnagyobb az 5,0 mg/kg dózisu ISO csoportban volt mérhető, a legmagasabb dózisu nál azonban már egy alacsonyabb apoptózist detektáltunk. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az 50,0 mg/kg dózisu ISO már olyan nagymennyiségű toxin a kardiomiociták számára, hogy ez olyan mértékű károsodás, melyet már sem az autofágia sem az apoptózis nem képes kivédeni, s aktiválódik a nekrozis útvonala. Ezt támasztja alá a TTC festés eredménye is, ahol az ISO 5,0 és ISO 50,0 csoportban már szignifikáns mértékű volt az elhalt szívsvözet mértéke, valamint az 50,0 mg/kg dózisu ISO-val kezelt állatok fele elhalálozott a kezelést követően. Megjegyzendő, hogy a sejthalál aktív formája az apoptózis

energiaigényes folyamat, és az ISO kezelés következtében az energiaegyensúly felborul, lecsökken az ATP szint (a nagy mennyiségben keletkezett reaktív oxigén gyökök következtében kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$  akkumulálódása során megnő a mitokondrium membránjának permeabilitása, ebből adódóan változik a proton grádiens és csökken az ATP termelés <sup>117</sup>) így nem meglepő, hogy a nagy dózisú kezelésnél már nem detektáltunk szignifikáns mértékű apoptózist, azonban szignifikáns mértékű szívszövet elhalást figyeltünk meg. Számos tanulmány született már, amely vizsgálta az ISO indukálta kardiotoxicitás és apoptózis kapcsolatát, azonban még nem vizsgálták, hogy a túlélési, és halálozási útvonalak hogyan alakulnak növekvő dózisú ISO kezelést követően. Az általunk kapott eredményeink és következtetéseink alapján demonstráltuk az autofágia, az apoptózis és a nekrosis folyamatok alakulását a különböző dózisú ISO kezelést követően (23. ábra). Feltételezésünk szerint a nagyszámú kardiomiociták elhalása egyrészt az autofágia, mint túlélési útvonal, diszruptiója miatt történik. Western blot eredményeink ezt igazolják, hiszen az ISO dózisának emelkedésével szignifikánsan emelkedik a p62, mely egy folyamatos akkumulálódásra, valamint az autofágia inkomplettiségre utal. Másrészt jól látható, dózisfüggő módon az apoptózis mértéke is emelkedik (normál körülmények között az autofágia blokkolja az apoptózist, azonban ha megváltozik a sejt fiziológiás állapota az autofágia apoptózist vagy nekrosist indukálhat <sup>78</sup>), azonban a legnagyobb dózisonál szintje visszaesik, ahol a nekrosis már szignifikáns mértékű volt. Eddig több tanulmány is leírta már, hogy az autofágia helyreállítása védelmet nyújthat a kardiomiociták számára <sup>118-120</sup>, valamint születtek olyan publikációk is, melyekben antioxidánsokat adagoltak ISO kezelést kiegészítve, és azok antiapoptotikus hatásáról számoltak be <sup>121</sup>.

Konklúzióként elmondható, hogy dózisfüggő módon sérül az autofágia amely túlélési útvonalat biztosít a kardiomiociták számára, azonban helyreállításával kiküszöbölhető lehet a halálozási útvonalak (apoptózis és nekrosis) aktiválása és a nagy mértékű szívizomsejt elhalás, valamint terápiás célpontként is szolgálhat. Azonban a pontos ok-okozati viszonyok feltárásához további molekuláris biológiai vizsgálatok szükségesek.



**23. ábra** A különböző dózisú ISO hatása a különböző túlélési, és halálozási útvonalakra: az általunk meghatározott apoptózis mértéke, az autofágiás markerek expressziós szintje, valamint a nekrotizált szívszövet alapján (készítette Zilinyi Rita).

## Megállapításaink

- Kísérletünk első felében megállapítottuk, hogy a DOX az AMPK útvonalon keresztül indukálja az autofágiát, azonban a folyamat diszregulálódik, és a sérült, lebontásra szánt makromolekulák nem tudnak lebomlani az autolizozómában.
- A DOX kezelés okozta kardiotoxicitás mértéke sokkal kisebb volt MET kiegészítő kezelés hatására: normalizálódott az autofágia folyamata. Feltételezésünk szerint az autofágia, mint védelmi útvonal, helyreállításával sikerült mérsékelni a DOX okozta miokardium károsodást.
- Metformin kezelés hatására javultak a szívfunkciós paraméterek, kisebb mértékű volt a lipidperoxidáció, alacsonyabb szinten maradtak a szívizom károsodást jelző szérum markerek, valamint a szövettani eredmények alapján a MET hatására kisebb mértékű volt a miociták elhalása doxorubicin kezelés mellett.
- További kísérleteinkben alátámasztottuk, hogy az ISO dóziszfüggő módon diszregulálja az autofágiát a szívizomsejtekben.
- Megállapítottuk, hogy az autofágia folyamatában bekövetkező sérülést követően aktiválódik az apoptózis is, valamint a legnagyobb dózisnál a sejthalál passzív formája, a nekrozis volt szignifikáns mértékben jelen.

## **A tanulmányok limitáló tényezői**

A DOX és ISO kísérlesorozat során a kísérleti állatok intraperitonealisan kapták a hatóanyagokat, azonban a klinikumban protokoll szerint a betegek intravénás adminisztrációban részesülnek. Az intraperitonealis injektálást az indokolta, hogy az állatokat ebben az esetben nem kell elaltatni, hiszen a különböző altatószerek befolyásolhatják a szívfunkciós paramétereket, befolyásolva ezzel az általunk vizsgálni kívánt végpontokat. Továbbá megjegyzendő, hogy a doxorubicines tanulmányban a szívfunkciós paraméterek, szérumbiomarkerek és a molekuláris biológiai vizsgálatok az utolsó dózist követően 24 óra elteltével történtek. Eddigi tanulmányok azonban leírták, hogy a betegek esetében a kezelés befejezését követően hónapok, akár évek alatt fejlődhet ki a DOX okozta szívelégtelenség. Kiemelendő, hogy a klinikumban a betegeknél az ISO dózisa infúzióban 0,5 mikrogram/perc és 5,0 mikrogram/perc között van, ami szignifikánsan kisebb, mint az általunk alkalmazott dózisok, azonban az alap kutatásban, állatkísérletekben általában 50x vagy 100x magasabb dózisokat szükséges alkalmazni. Az általunk használt dózisok megfelelnek az irodalomban fellelhető dózistartománynak.

## Összefoglalás

Munkám első részében vizsgáltuk a MET kardioprotektív szerepét DOX indukálta kardiotoxicitásban, ahol elsősorban a kardiomiociták túlélésében szerepet játszó autofágiás folyamatot tanulmányoztuk. Kísérleteink során a két hétig napi 250 mg/kg dózisban adagolt MET kardioprotektív hatással rendelkezett a DOX kezelés mellett: javította a szívfunkciós paramétereket, a szívizom károsodásra utaló markerek alacsonyabb szintjét detektáltuk, a lipidperoxidáció mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a sima DOX kezeléshez képest, a miofibrillumok vastagsága is szignifikáns volt MET kiegészítő kezelés hatására, valamint az autofágiás folyamat normalizálódott. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a diszregulálódott autofágia, melyet a DOX kezelés okozott, nem képes megbirkózni a sejtet ért nagymértékű károsodással, így végül a kardiomiociták nagymértékű elhalásához vezet. Azonban a MET kezeléssel feltételezhetően, a normalizálódott autofágiának köszönhetően, kivédhető lehet a nagymértékű szívizomsejt elhalás a DOX kezelés alatt.

További kísérleteinkben vizsgálni kívántuk az autofágia, apoptózis és nekrozis útvonalát különböző dózisú ISO kezelést követően. Az ISO dózisfüggő toxicitást mutat, és irreverzibilis kardiotoxicitás kialakulásához vezet. Eredményeinkből az látható, hogy először az autofágia indukálódik és a kis dózisú kezelésnél még képes megbirkózni az ISO okozta fiziológiás állapot megváltozásával, azonban dózisfüggő módon az autofágiás folyamat diszregulálódik, mely programozott sejthalált (apoptózist), valamint nekrozist indukál. A TUNEL assay eredményeiből látható, hogy dózisfüggő módon emelkedik az apoptózis mértéke, azonban a legnagyobb dózisonál már csökkent apoptózist detektáltunk, viszont a nekrozis mértéke itt már szignifikáns volt, amit egyrészt a szignifikáns mértékű szívszövet elhalás, másrészt a szignifikáns mértékben elhalálozott állatok száma támasztja alá.

## Summary

DOX is a widely-used antineoplastic agent, however one of the most prominent side effects of DOX is its cumulative and irreversible cardiotoxicity. The molecular mechanisms are still poorly understood, but oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and the dysregulation of the autophagy are involved. The objective of the current study was to investigate the protective role of MET and its effect on autophagy in DOX-induced cardiotoxicity. Sprague-Dawley rats were segregated into four groups at random. The DOX-group received DOX (3 mg/kg every second day) intraperitoneally. The MET-group received 250 mg/kg/day MET via gavage. The DOX+MET-group received both at the aforementioned doses. Based on our findings MET conferred increased cardioprotection against the development of cardiotoxicity manifested by a significant decrease in serum Troponin T and cardiac MDA levels, and improvement in heart function in connection with histopathological features. Moreover, by focusing on the contribution of autophagic proteins, we have found that MET restored autophagy, which could be survival pathway for cardiomyocytes in DOX-induced toxicity. These results indicate that the administration MET, might be a preferable drug for patients receiving DOX.

To further study the importance of autophagy, during cardiotoxicity we administered isoproterenol (ISO) at different doses (0.005 mg/kg ISO, 0.05 mg/kg ISO, 0.5 mg/kg ISO, 5.0 mg/kg ISO, 50.0 mg/kg ISO), ISO is a catecholamine and bearing a non-selective  $\beta$ -adrenergic agonist property. However, the major clinical limitation of ISO administration is its cardiotoxicity, which is complex and multifactorial, including the generation of cytotoxic free radicals in myocytes followed by oxidative stress and lipid peroxidation. We investigated autophagic processes and the two death pathways, including apoptosis and necrosis. Based on our results, we may assume that under this experimental condition the autophagy is malfunctioning in dose-dependent manner, thus at high doses including ISO 5, and ISO 50,0, apoptosis and necrosis take place in the heart tissue.

## Irodalomjegyzék

- 1 Központi Statisztikai Hivatal adatbázisa.
- 2 Levy, D. *et al.* Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* **347**, 1397-1402, doi:10.1056/NEJMoa020265 (2002).
- 3 Cowie, M. R. *et al.* Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J* **20**, 421-428 (1999).
- 4 Francis, G. S. & Pierpont, G. L. Pathophysiology of congestive heart failure secondary to congestive and ischemic cardiomyopathy. *Cardiovasc Clin* **19**, 57-74 (1988).
- 5 Yusuf, S. *et al.* Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet* **362**, 777-781, doi:10.1016/S0140-6736(03)14285-7 (2003).
- 6 Bonow, R. O. *et al.* ACC/AHA Clinical Performance Measures for Adults with Chronic Heart Failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures (Writing Committee to Develop Heart Failure Clinical Performance Measures): endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* **112**, 1853-1887, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.170072 (2005).
- 7 Hunt, S. A. *et al.* 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* **119**, e391-479, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192065 (2009).
- 8 Massie, B. M. *et al.* Toleration of high doses of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with chronic heart failure: results from the ATLAS trial. The Assessment of Treatment with Lisinopril and Survival. *Arch Intern Med* **161**, 165-171 (2001).
- 9 Hood, W. B., Jr., Dans, A. L., Guyatt, G. H., Jaeschke, R. & McMurray, J. J. Digitalis for treatment of congestive heart failure in patients in sinus rhythm: a systematic review and meta-analysis. *J Card Fail* **10**, 155-164 (2004).
- 10 Fuster, V. *et al.* ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart

- Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* **114**, e257-354, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.177292 (2006).
- 11 Lipshultz, S. E. *et al.* Continuous Versus Bolus Infusion of Doxorubicin in Children With ALL: Long-term Cardiac Outcomes. *Pediatrics* **130**, 1003-1011, doi:10.1542/peds.2012-0727 (2012).
- 12 Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**, 185-229, doi:10.1124/pr.56.2.6 (2004).
- 13 Press, M. F. *et al.* Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol* **29**, 859-867, doi:10.1200/JCO.2009.27.5644 (2011).
- 14 O'Malley, F. P. *et al.* Topoisomerase II alpha protein and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy with CEF compared to CMF in the NCIC CTG randomized MA.5 adjuvant trial. *Breast Cancer Res Treat* **128**, 401-409, doi:10.1007/s10549-011-1511-5 (2011).
- 15 Lipshultz, S. E. *et al.* Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol* **11**, 950-961, doi:10.1016/S1470-2045(10)70204-7 (2010).
- 16 Lipshultz, S. E. *et al.* Changes in cardiac biomarkers during doxorubicin treatment of pediatric patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: associations with long-term echocardiographic outcomes. *J Clin Oncol* **30**, 1042-1049, doi:10.1200/JCO.2010.30.3404 (2012).
- 17 Colombo, A., Cipolla, C., Beggiato, M. & Cardinale, D. Cardiac toxicity of anticancer agents. *Curr Cardiol Rep* **15**, 362, doi:10.1007/s11886-013-0362-6 (2013).
- 18 Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T. & Leeuwenburgh, C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* **62**, 4592-4598 (2002).

- 19 Kawaguchi, T. *et al.* Prior starvation mitigates acute doxorubicin cardiotoxicity through restoration of autophagy in affected cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **96**, 456-465, doi:10.1093/cvr/cvs282 (2012).
- 20 Koleini, N. & Kardami, E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* **8**, 46663-46680, doi:10.18632/oncotarget.16944 (2017).
- 21 Neilan, T. G. *et al.* Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. *Circulation* **116**, 506-514, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652339 (2007).
- 22 Barrera, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* **2012**, 137289, doi:10.5402/2012/137289 (2012).
- 23 Zhou, S., Starkov, A., Froberg, M. K., Leino, R. L. & Wallace, K. B. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res* **61**, 771-777 (2001).
- 24 Angsutararux, P., Luanpitpong, S. & Issaragrisil, S. Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 795602, doi:10.1155/2015/795602 (2015).
- 25 Penna, C. *et al.* Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 794-801, doi:10.1016/j.bbabi.2009.03.013 (2009).
- 26 Hardie, D. G. AMPK and autophagy get connected. *EMBO J* **30**, 634-635, doi:10.1038/emboj.2011.12 (2011).
- 27 Qi, D. & Young, L. H. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab* **26**, 422-429, doi:10.1016/j.tem.2015.05.010 (2015).
- 28 Chen, M. B. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase contributes to doxorubicin-induced cell death and apoptosis in cultured myocardial H9c2 cells. *Cell Biochem Biophys* **60**, 311-322, doi:10.1007/s12013-011-9153-0 (2011).
- 29 Gratia, S. *et al.* Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: at the crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative, and genotoxic stress. *Cardiovasc Res* **95**, 290-299, doi:10.1093/cvr/cvs134 (2012).
- 30 Lu, L. *et al.* Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure. *Int J Cardiol* **134**, 82-90, doi:10.1016/j.ijcard.2008.01.043 (2009).

- 31 Smuder, A. J., Kavazis, A. N., Min, K. & Powers, S. K. Doxorubicin-induced markers of myocardial autophagic signaling in sedentary and exercise trained animals. *J Appl Physiol (1985)* **115**, 176-185, doi:10.1152/jappphysiol.00924.2012 (2013).
- 32 Sishi, B. J., Loos, B., van Rooyen, J. & Engelbrecht, A. M. Autophagy upregulation promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Pharmacol* **85**, 124-134, doi:10.1016/j.bcp.2012.10.005 (2013).
- 33 Li, D. L. *et al.* Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification. *Circulation* **133**, 1668-1687, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017443 (2016).
- 34 Tahover, E. *et al.* Dexrazoxane added to doxorubicin-based adjuvant chemotherapy of breast cancer: a retrospective cohort study with a comparative analysis of toxicity and survival. *Anticancer Drugs* **28**, 787-794, doi:10.1097/CAD.0000000000000514 (2017).
- 35 Gyires Klára, F. Z., Ferdinándy Péter. *Farmakológia és Klinikai Farmakológia* (2017).
- 36 Zhang, C. X. *et al.* Metformin attenuates ventricular hypertrophy by activating the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric oxide synthase pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 55-62, doi:10.1111/j.1440-1681.2010.05461.x (2011).
- 37 Xie, W., Zhang, S. D., Ou, X. P. & Yang, T. L. [Protective effects of metformin on low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction in rats]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **29**, 890-893 (2009).
- 38 Soraya, H., Rameshrad, M., Mokarizadeh, A. & Garjani, A. Metformin attenuates myocardial remodeling and neutrophil recruitment after myocardial infarction in rat. *Bioimpacts* **5**, 3-8, doi:10.15171/bi.2015.02 (2015).
- 39 Zhao, X. *et al.* Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L497-504, doi:10.1152/ajplung.90210.2008 (2008).
- 40 Kelleni, M. T., Amin, E. F. & Abdelrahman, A. M. Effect of Metformin and Sitagliptin on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats: Impact of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *J Toxicol* **2015**, 424813, doi:10.1155/2015/424813 (2015).
- 41 Faure, P. *et al.* An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* **48**, 353-357 (1999).
- 42 Kanigur-Sultuybek, G. *et al.* The effect of metformin on insulin receptors and lipid peroxidation in alloxan and streptozotocin induced diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **6**, 271-280 (1995).

- 43 Abbasi, F. *et al.* Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **53**, 159-164 (2004).
- 44 El Messaoudi, S., Rongen, G. A., de Boer, R. A. & Riksen, N. P. The cardioprotective effects of metformin. *Curr Opin Lipidol* **22**, 445-453, doi:10.1097/MOL.0b013e32834ae1a7 (2011).
- 45 Dermaku-Sopjani, M. & Sopjani, M. Intracellular signaling of the AMP-activated protein kinase. *Adv Protein Chem Struct Biol* **116**, 171-207, doi:10.1016/bs.apcsb.2018.12.001 (2019).
- 46 Vazirian, M., Nabavi, S. M., Jafari, S. & Manayi, A. Natural activators of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) and their pharmacological activities. *Food Chem Toxicol* **122**, 69-79, doi:10.1016/j.fct.2018.09.079 (2018).
- 47 Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J. & Jin, S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8204-8209, doi:10.1073/pnas.0502857102 (2005).
- 48 Hoyer-Hansen, M. *et al.* Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* **25**, 193-205, doi:10.1016/j.molcel.2006.12.009 (2007).
- 49 Acikel, M. *et al.* Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: biochemical and histological findings. *Int J Cardiol* **98**, 389-394, doi:10.1016/j.ijcard.2003.10.054 (2005).
- 50 Rathore, N., John, S., Kale, M. & Bhatnagar, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol Res* **38**, 297-303, doi:10.1006/phrs.1998.0365 (1998).
- 51 Remiao, F., Carmo, H., Carvalho, F. D. & Bastos, M. L. Inhibition of Glutathione Reductase by Isoproterenol Oxidation Products. *J Enzyme Inhib* **15**, 47-61 (1999).
- 52 Shukla, S. K., Sharma, S. B. & Singh, U. R. beta-Adrenoreceptor Agonist Isoproterenol Alters Oxidative Status, Inflammatory Signaling, Injury Markers and Apoptotic Cell Death in Myocardium of Rats. *Indian J Clin Biochem* **30**, 27-34, doi:10.1007/s12291-013-0401-5 (2015).
- 53 Lobo Filho, H. G. *et al.* Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc* **26**, 469-476 (2011).
- 54 Singal, P. K., Beamish, R. E. & Dhalla, N. S. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv Exp Med Biol* **161**, 391-401 (1983).

- 55 Liu, Y. T. *et al.* The metabolic disturbances of isoproterenol induced myocardial infarction in rats based on a tissue targeted metabonomics. *Mol Biosyst* **9**, 2823-2834, doi:10.1039/c3mb70222g (2013).
- 56 Brooks, W. W. & Conrad, C. H. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med* **59**, 339-343 (2009).
- 57 De Duve, C. & Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**, 435-492, doi:10.1146/annurev.ph.28.030166.002251 (1966).
- 58 Sybers, H. D., Ingwall, J. & DeLuca, M. Autophagy in cardiac myocytes. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* **12**, 453-463 (1976).
- 59 Decker, R. S. & Wildenthal, K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol* **98**, 425-444 (1980).
- 60 Yorimitsu, T. & Klionsky, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1542-1552, doi:10.1038/sj.cdd.4401765 (2005).
- 61 Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2503-2518, doi:10.1016/j.biocel.2004.05.009 (2004).
- 62 Codogno, P. & Meijer, A. J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1509-1518, doi:10.1038/sj.cdd.4401751 (2005).
- 63 Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3-12, doi:10.1002/path.2697 (2010).
- 64 Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. & Mizushima, N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* **19**, 5360-5372, doi:10.1091/mbc.E08-01-0080 (2008).
- 65 Liang, C. *et al.* Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* **8**, 688-699, doi:10.1038/ncb1426 (2006).
- 66 Lee, Y., Lee, H. Y. & Gustafsson, A. B. Regulation of autophagy by metabolic and stress signaling pathways in the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **60**, 118-124, doi:10.1097/FJC.0b013e318256cdd0 (2012).
- 67 Srivastava, D. & Ivey, K. N. Potential of stem-cell-based therapies for heart disease. *Nature* **441**, 1097-1099, doi:10.1038/nature04961 (2006).
- 68 MacLellan, W. R. & Schneider, M. D. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **81**, 137-144 (1997).
- 69 Clarke, P. G. & Clarke, S. Historic apoptosis. *Nature* **378**, 230, doi:10.1038/378230c0 (1995).

- 70 Trump, B. F., Goldblatt, P. J. & Stowell, R. E. Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane, and lipid droplets. *Lab Invest* **14**, 2000-2028 (1965).
- 71 Trump, B. F., Goldblatt, P. J. & Stowell, R. E. Studies of mouse liver necrosis in vitro. Ultrastructural and cytochemical alterations in hepatic parenchymal cell nuclei. *Lab Invest* **14**, 1969-1999 (1965).
- 72 Goldblatt, P. J., Trump, B. F. & Stowell, R. E. Studies on Necrosis of Mouse Liver in Vitro: Alterations in Some Histochemically Demonstrable Hepatocellular Enzymes. *Am J Pathol* **47**, 183-208 (1965).
- 73 Trump, B. F., Goldblatt, P. J. & Stowell, R. E. Studies on Necrosis of Mouse Liver in Vitro. Ultrastructural Alterations in the Mitochondria of Hepatic Parenchymal Cells. *Lab Invest* **14**, 343-371 (1965).
- 74 Sass Miklós, L. G. Molekuláris sejtbológia. (2013).
- 75 Riedl, S. J. & Shi, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 897-907, doi:10.1038/nrm1496 (2004).
- 76 Salvesen, G. S. & Riedl, S. J. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **615**, 13-23, doi:10.1007/978-1-4020-6554-5\_2 (2008).
- 77 D'Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* **43**, 582-592, doi:10.1002/cbin.11137 (2019).
- 78 Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3448-3459, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001 (2013).
- 79 Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 741-752, doi:10.1038/nrm2239 (2007).
- 80 Kroemer, G., Marino, G. & Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**, 280-293, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023 (2010).
- 81 Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H. & Dikic, I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* **20**, 21-30, doi:10.1038/cdd.2012.72 (2013).
- 82 Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A. & Rabinowich, H. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6**, 891-900, doi:10.4161/auto.6.7.13038 (2010).

- 83 Katayama, M., Kawaguchi, T., Berger, M. S. & Pieper, R. O. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* **14**, 548-558, doi:10.1038/sj.cdd.4402030 (2007).
- 84 Carew, J. S. *et al.* Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* **110**, 313-322, doi:10.1182/blood-2006-10-050260 (2007).
- 85 Kobashigawa, L. C., Xu, Y. C., Padbury, J. F., Tseng, Y. T. & Yano, N. Metformin protects cardiomyocyte from doxorubicin induced cytotoxicity through an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway: an in vitro study. *PLoS One* **9**, e104888, doi:10.1371/journal.pone.0104888 (2014).
- 86 Filatov, V. L., Katrukha, A. G., Bulargina, T. V. & Gusev, N. B. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Mosc)* **64**, 969-985 (1999).
- 87 Katrukha, A. G. *et al.* Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin Chem* **44**, 2433-2440 (1998).
- 88 Katrukha, A., Bereznikova, A., Filatov, V. & Esakova, T. Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum. *Clin Chem Lab Med* **37**, 1091-1095, doi:10.1515/CCLM.1999.159 (1999).
- 89 Katrukha, A., Bereznikova, A. & Pettersson, K. New approach to standardisation of human cardiac troponin I (cTnI). *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **230**, 124-127 (1999).
- 90 Jurisic, V., Radenkovic, S. & Konjevic, G. The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol* **867**, 115-124, doi:10.1007/978-94-017-7215-0\_8 (2015).
- 91 Mathew, S., Menon, P. V. & Kurup, P. A. Effect of administration of vitamin A, ascorbic acid and nicotinamide adenine dinucleotide + flavin adenine dinucleotide on severity of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Indian J Exp Biol* **23**, 500-504 (1985).
- 92 Senthil, S., Sridevi, M. & Pugalendi, K. V. Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Toxicol Pathol* **35**, 418-423, doi:10.1080/01926230701230312 (2007).
- 93 Neely, J. R., Liebermeister, H. & Morgan, H. E. Effect of pressure development on membrane transport of glucose in isolated rat heart. *Am J Physiol* **212**, 815-822, doi:10.1152/ajplegacy.1967.212.4.815 (1967).
- 94 Yamamoto, F., Manning, A. S., Crome, R., Braimbridge, M. V. & Hearse, D. J. Calcium antagonists and myocardial protection: a comparative study of the functional, metabolic

- and electrical consequences of verapamil and nifedipine as additives to the St. Thomas' cardioplegic solution. *Thorac Cardiovasc Surg* **33**, 354-359, doi:10.1055/s-2007-1014167 (1985).
- 95 Tosaki, A. & Hellegouarch, A. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channel blocking agent ameliorates, but the opening agent aggravates, ischemia/reperfusion-induced injury. Heart function studies in nonfibrillating isolated hearts. *J Am Coll Cardiol* **23**, 487-496 (1994).
- 96 Tosaki, A., Woodward, B., Yamamoto, F. & Hearse, D. J. Isoproterenol and the genesis of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart: adrenoceptor or free radical-mediated mechanisms? *J Cardiovasc Pharmacol* **15**, 398-407 (1990).
- 97 Schultz, J. E., Yao, Z., Cavero, I. & Gross, G. J. Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *Am J Physiol* **272**, H2607-2615, doi:10.1152/ajpheart.1997.272.6.H2607 (1997).
- 98 Dickson, E. W. *et al.* Naloxone blocks transferred preconditioning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1751-1756, doi:10.1006/jmcc.2001.1436 (2001).
- 99 Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **137**, e67-e492, doi:10.1161/CIR.0000000000000558 (2018).
- 100 Vertes, A. & Szabados, E. [Cardiovascular prevention - 2016]. *Orv Hetil* **157**, 1526-1531, doi:10.1556/650.2016.30577 (2016).
- 101 Cassinelli, G. The roots of modern oncology: from discovery of new antitumor anthracyclines to their clinical use. *Tumori* **2016**, 226-235, doi:10.5301/tj.5000507 (2016).
- 102 Lefrak, E. A., Pitha, J., Rosenheim, S. & Gottlieb, J. A. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* **32**, 302-314 (1973).
- 103 Hadi, N. *et al.* Vitamin E and telmisartan attenuates doxorubicin induced cardiac injury in rat through down regulation of inflammatory response. *BMC Cardiovasc Disord* **12**, 63, doi:10.1186/1471-2261-12-63 (2012).
- 104 Cappetta, D. *et al.* Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 1521020, doi:10.1155/2017/1521020 (2017).
- 105 Wu, T. *et al.* Effects of Vildagliptin and Metformin on Blood Pressure and Heart Rate Responses to Small Intestinal Glucose in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **40**, 702-705, doi:10.2337/dc16-2391 (2017).

- 106 Ashour, A. E. *et al.* Metformin rescues the myocardium from doxorubicin-induced energy starvation and mitochondrial damage in rats. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 434195, doi:10.1155/2012/434195 (2012).
- 107 Sheta, A., Elsakkar, M., Hamza, M. & Solaiman, A. Effect of metformin and sitagliptin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in adult male albino rats. *Hum Exp Toxicol* **35**, 1227-1239, doi:10.1177/0960327115627685 (2016).
- 108 Liu, W. J. *et al.* p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett* **21**, 29, doi:10.1186/s11658-016-0031-z (2016).
- 109 Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* **25**, 1895-1908, doi:10.1101/gad.17420111 (2011).
- 110 Lv, X. *et al.* Berberine inhibits doxorubicin-triggered cardiomyocyte apoptosis via attenuating mitochondrial dysfunction and increasing Bcl-2 expression. *PLoS One* **7**, e47351, doi:10.1371/journal.pone.0047351 (2012).
- 111 Gu, J. *et al.* Resveratrol-induced autophagy promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int Immunopharmacol* **32**, 1-7, doi:10.1016/j.intimp.2016.01.002 (2016).
- 112 Derbali, A. *et al.* Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study. *J Physiol Biochem* **71**, 281-288, doi:10.1007/s13105-015-0411-2 (2015).
- 113 Kopper László, F. L. Apoptózis. (2002).
- 114 Chen, Q., Kang, J. & Fu, C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct Target Ther* **3**, 18, doi:10.1038/s41392-018-0018-5 (2018).
- 115 Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U. & Kimchi, A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* **16**, 966-975, doi:10.1038/cdd.2009.33 (2009).
- 116 Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 81-94, doi:10.1038/nrm3735 (2014).
- 117 Hori, M. & Nishida, K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **81**, 457-464, doi:10.1093/cvr/cvn335 (2009).

- 118 Zilinyi, R. *et al.* The Cardioprotective Effect of Metformin in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: The Role of Autophagy. *Molecules* **23**, doi:10.3390/molecules23051184 (2018).
- 119 Garrido, V. *et al.* Novel Therapies Targeting Cardioprotection and Regeneration. *Curr Pharm Des* **23**, 2592-2615, doi:10.2174/1381612823666170112122637 (2017).
- 120 Zhou, J. *et al.* Autophagy plays an important role in triptolide-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Toxicol Lett* **236**, 168-183, doi:10.1016/j.toxlet.2015.05.013 (2015).
- 121 Suchal, K. *et al.* Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats. *Phytomedicine* **23**, 1401-1408, doi:10.1016/j.phymed.2016.07.015 (2016).

## **Tárgyszavak**

Autofágia

Apoptózis

Doxorubicin

Isoproterenol

Izolált szív

Kardiotoxicitás

Metformin

Nekrózis

Autophagy

Apoptosis

Doxorubicin

Isoproterenol

Isolated heart

Cardiotoxicity

Metformin

Necrosis

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Tósaki Árpádnak, aki lehetővé tette számomra, hogy a Gyógyszerhatástani Tanszéken végezhessem kutatómunkámat, és biztosította a megfelelő anyagi háttérrel hozzá. Továbbá köszönöm a támogatást, és a sok tanácsot amit az évek során kaptam, valamint azt a sok lehetőséget, hogy számos magas színvonalú hazai, és nemzetközi konferenciára eljuthattam. Ezúton szeretném megköszönni Dr. Lekli Istvánnak, aki annak ellenére, hogy nem a témavezetőm volt, végig kísérte a több éves munkámat, biztatott és mindig segítséget nyújtott nekem.

Köszönöm továbbá Dr. Szabados-Fürjesi Péternek, Dr. Gyöngyösi Alexandrának és Czeglédi Andrásnak, hogy nem csak munkatársaim, de barátaim is voltak egyben, és feledhetetlen pillanatokat szereztek, mind a munkahelyen és azon kívül is. Ezen felül minden jelenlegi és korábbi munkatársamnak is köszönöm az évek alatt nyújtott segítséget. Minden egyes társszerzőnek, és a kollaborációban résztvevő, és segítséget nyújtó kollégáimnak is köszönet jár.

Közeli barátnőimnek, Szojka Zsófiának és Dr. Majoros Évának, akik szintén támogattak a Ph.D. éveim alatt, és mindig számíthattam rájuk.

A legnagyobb támogatást pedig Édesanyámtól, Édesapámtól és testvéremtől, Zilinyi Tamástól kaptam, akiknek a legnagyobb köszönet jár, amiért mindig biztattak, támogattak és mellettem álltak, valamint a Családom összes többi tagjától, nélkülük ez nem sikerült volna.

A disszertáció elkészítését a : GINOP-2.3.2-15-2016-00043. számú “Szív-és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART) című projekt támogatta, továbbá az EFOP- 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009. számú és EFOP-3.6.1-16-2016-00022. számú pályázat finanszírozásával valósult meg. További támogató volt a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001. számú pályázat, valamint az OTKA K 124719, és Campus Mundi (Tempus Közalapítvány).



Nyilvántartási szám: DEENK/280/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Zilinyi Rita  
Neptun kód: S5F2WZ  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Gyöngyösi, A., **Zilinyi, R.**, Czeglédi, A., Tósaki, Á., Tósaki, Á., Lekli, I.: The role of autophagy and death pathways in dose-dependent isoproterenol-induced cardiotoxicity.  
*Curr. Pharm. Design. [Epub ahead of print]*, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1381612825666190619145025>  
IF: 2.412 (2018)
2. **Zilinyi, R.**, Czompa, A., Czeglédi, A., Gajtkó, A., Pituk, D., Lekli, I., Tósaki, Á.: The Cardioprotective Effect of Metformin in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: the Role of Autophagy.  
*Molecules*. 23 (5), 1-12, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23051184>  
IF: 3.06





### További közlemények

3. Czeglédi, A., Tószaki, Á., Gyöngyösi, A., **Zilinyi, R.**, Tószaki, Á., Lekli, I.: Electrically-Induced Ventricular Fibrillation Alters Cardiovascular Function and Expression of Apoptotic and Autophagic Proteins in Rat Hearts.  
*Int. J. Mol. Sci.* 20 (7), 1628-, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20071628>  
IF: 4.183 (2018)

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,655**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
5,472**

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, 2019.07.04.

