

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Farmakológiai beavatkozások és kardiotoxicitás vizsgálata a szívizomban: az autofágia jelentősége

Zilinyi Rita

Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2019

Farmakológiai beavatkozások és kardiotoxicitás vizsgálata a szívizomban: az autofágia jelentősége

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

Írta: Zilinyi Rita okleveles klinikai laboratóriumi kutató

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

Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Kertész Attila, Ph.D.
Dr. Csonka Csaba, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék Könyvtára
2019. október 10. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Pósa Anikó, Ph.D.
Prof. Dr. Kovács Péter, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kovács Péter, az MTA doktora
Dr. Kertész Attila, Ph.D.
Dr. Pósa Anikó, Ph.D.
Dr. Csonka Csaba, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület
2019. október 10. 13:00 óra

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	4
Célkitűzések	6
Anyagok és módszerek.....	7
Kísérleti állatok	7
Kísérleti elrendezés: DOX-indukálta kardiotoxicitás	7
Kísérleti elrendezés: ISO-indukálta kardiotoxicitás.....	8
Szérum biomarkerek meghatározása.....	8
Izolált dolgozó szív preparátum	9
Lipidperoxidációs assay	9
Miofibrillumok vastagságának meghatározása	10
Infarktusos terület meghatározása	10
Apoptózis mértékének meghatározása	11
Fehérje izolálás és Western blot.....	11
Statisztika	13
Eredmények: DOX-indukálta kardiotoxicitás.....	14
A doxorubicin és metformin hatása a szívfunkcióra	14
A doxorubicin és metformin hatása a szérum biomarkerekre.....	14
A doxorubicin és metformin hatása a miofibrillumra	14
A doxorubicin és metformin hatása a lipidperoxidációra	15
A doxorubicin és metformin hatása az autofágiás markerek expressziójára.....	15
Eredmények: ISO-indukálta kardiotoxicitás	16
Isoproterenol hatása a túlélésre	16
Isoproterenol hatása a szérum biomarkerekre	16
Isoproterenol és az infarktusos terület.....	16
Isoproterenol és az apoptózis	16
Isoproterenol és az autofágia.....	17
Diszkusszió.....	18
Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás.....	18
Isoproterenol-indukálta kardiotoxicitás.....	22
Megállapításaink	25
A tanulmányok limitáló tényezői	26
Összefoglalás.....	27
Köszönetnyilvánítás	28

Bevezetés

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 kardiovaszkuláris betegségek hátterében a leggyakrabban álló kockázati tényezők a magasvérnyomás, zsíryanycsere 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. A rizikófaktorok csökkentése és a prevenció fontossága vitathatatlan a szív- és érrendszeri betegségekben.

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. A DOX egy nagyon hatékony antineoplasztikus szer, azonban klinikai felhasználásának limitáló tényezője a kumulatív és irreverzibilis kardiotoxicitás. A DOX-indukálta kardiotoxicitás multifaktoriális, hátterében számos bonyolult molekuláris mechanizmusok állnak, melyek a mai napig nem teljesen tisztázottak, azonban tudjuk, hogy mitokondriális diszfunkció, oxidatív stressz, lipidperoxidáció, apoptózis és az autofágia abnormalis működése áll. A témában eddig elérhető irodalmi adatokat tanulmányozva azonban ellentétes eredményekre bukkantunk az AMPK útvonalat tekintve DOX kezelést követően. Az ellentétes irodalmi adatok szintén tovább indokolják a téma alaposabb vizsgálatát. Mivel a DOX kezelés során sérül a mitokondrium, és modulálódik az ATP termelődés, így az AMPK útvonal modulálódása várható: ez egyrészt hatással van az energia homeosztázisra, másrészt az autofágia folyamatára, hiszen az AMPK hatására indukálódhat az autofágia.

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, úgy mint károsodott mitokondrium és felborult energia balance, éhezés vagy megnövekedett oxidatív stressz, jelentheti a túlélést a kardiomiociták számára. 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

inzulintrop vegyületek csoportjába tartozik, és működő β -sejtek hiányában is hatásos. Nem fokozza az inzulinválasztást, euglykaemizáló szer, valamint nem okoz hypoglykaemiát. 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.

Kísérletünk második részében, az isoproterenol (ISO) indukálta kardiotoxicitás és autofágia kapcsolatát vizsgáltuk. Az ISO hosszútávú, vagy nagy dózisu kezelés hatására kardiotoxicitás alakulhat ki, ezen kívül pedig szívritmuszavar, tachykardia és anginás fájdalom jelentkezhethet. 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. Hátterében egyrészt a megnövekedett mennyiségű ROS termelődése áll, amely oxidatív stresszhez és lipidperoxidációhoz vezet. 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_x) esetében. A kataláz és szuperoxid-diszmutáz felelős az oxidatív stresszel szembeni védelemért, a ROS termelődését regulálja: a szuperoxid gyököket hidrogén-peroxid gyökökké konvertálja. Az ISO adminisztráció ezen felül ionikus egyensúly felborulásához vezet: Ca²⁺ 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 Ca²⁺ idézi elő. A nagymennyiségű intracelluláris Ca²⁺ negatívan hat a mitokondrium membrán potenciáljára, beleértve a reaktív szabad gyökök képzését, melyek aktiválják a kalcium-és magnézium-függő endonukleázt, ami végül DNS töredekezést és apoptózist indukál a sejtekben. Az ISO-indukálta kardiotoxicitás kialakulásában kaskád-szerű patofiziológias folyamatok indulnak el, úgymint gyulladás, Ca²⁺ akkumulálódás, az energia metabolismus felborulása, melyek sejthalál útvonalamat indukálnak, s végül nagymennyiségű kardiomiocita pusztuláshoz vezetnek. Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk ezeket a túlélési, és halálozási útvonalamat, méghozzá az ISO emelkedő dózisának függvényében.

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 doxorubicinnal együttesen adagolva hogyan befolyásolja az autofágia folyamatát. További kísérleteinkben pedig a különböző dózisban alkalmazott ISO dózisfüggő 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 dózisfüggő toxicitást mutat, azonban a molekuláris útvonalak, s azok pontos szerepe nem teljesen tisztázott a β -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. A különböző sejthalálozási útvonalak (apoptózis, nekrozis) vizsgálata ISO-indukálta szívizomkárosodásban.
4. Az autofágia, apoptózis és nekrozis kapcsolatának vizsgálata különböző dózisú ISO kezelést követően.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteink első felében nőstény (250-300 g) Sprague-Dawley patkányokat, az ISO kísérletsorozathoz hím (300-350 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 ” és 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.

Kísérleti elrendezés: DOX-indukálta kardiotoxicitás

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

1. KONTROLL

- fiziológiás sóoldat i.p.
- víz per os

2. DOXORUBICIN0

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

3. METFORMIN

- 250 mg/kg metformin-hidroklorid szuszpenzió per os naponta
- fiziológiás 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.

Kísérleti elrendezés: ISO-indukálta kardiotoxicitás

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.

Szérum biomarkerek meghatározása

Az állatokat mély anesztézia alá helyeztük 60 mg/kg-os dózisú Euthanimal-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)

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, amiket 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 CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 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 szemben⁹³⁻⁹⁵. 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

Lipidperoxidációs assay

A DOX-okozta lipidperoxidáció mértékének meghatározásához végeztük el a malondialdehid (MDA) szint mérését a szívszövetből. A lipidperoxidáció során képződő MDA szintje arányos a lipidperoxidáció mértékével. A mérést a következőképpen kiviteleztük: a szívszöveteket 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.

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 vizsgálatához. A paraffinba ágyazott 4 µm 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 a metszeteket, végül desztillált vízzel átöblítettük azokat. 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 moviolt alkalmazva fedtük azokat. A metszeteket Olympus CX-31 típusú mikroszkóp alatt vizsgáltuk, és Olympus DP74 típusú kamerával készítettünk képeket 4x (scale bar 1000 µm) és 40x (scale bar 40 µm) nagyításban. Az eredmények kiértékelését, melynek során a rózsaszínes pirosra festődött miofibrillumok vastagságát határozták meg a különböző csoportokban, a Debreceni Egyetem Anatómiai Intézete végezte.

Infarktusz terület meghatározása

A 10 perces dolgozó-módot követően 30 ml 1%-os trifetil-tetrazólium-klorid (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_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 apikobazális tengelyre merőlegesen körülbelül 1 mm vastagságúra szeleteltük a mintákat, beszkeneltük, majd egyenként lemértük a szívszeletek tömegét. Ezt követően ImageJ szoftverrel kielemeztük a digitális képeket, melynek során pixelszámot társítottunk a szeletek tömegéhez, majd kijelölve az infarktusz területeket arányosan kiszámoltuk az infarktusz szívszövet tömegét. Ezután összesítettük a szeletekből kapott eredményeket: a szívet érintő infarktusz méretét a teljes szívtömeg és az infarktusz szívtömeg hányadosaként kaptuk meg.

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 µm vastagságú keresztmetszetek 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 salin, pH 7.4) pufferben. Végül a metszeteket 37 °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, a TUNEL pozitív, ahol csak kék színt detektáltunk, a TUNEL negatív sejtmag. A DNS töredezés mértéke az egyes mintákban a TdT-pozitív sejtmag / összes sejtmag arányaként lett meghatározva.

Fehérje izolálás és Western blot

A szívsvövet 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 fordulatszámon 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 lép a BCA reagens, lila színű komplexet képezve. Az abszorbanciát 562 nm-en mértük a FluoSTAR OPTIMA program segítségével. Majd a minták fehérjetartalmát a standardsor kalibrációs görbéje alapján meghatároztuk és Excel program segítségével meghatároztuk 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 géltre 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 apsecifikus 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 inkubáltuk a membránt szobahőmérsékleten. 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 enzimmel jelölt, ami a torma-peroxidáz. 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 és Kaszpáz-3.

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 Tukey-féle és Dunett poszttesztet is elvégeztük. Túlélési aránynál a csoportok közötti eltéréseket Chi² 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. A $p \leq 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények: DOX-indukálta kardiotoxicitás

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. 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. A verőtérfogat és perctérfogat esetében is elmondható, hogy a DOX csoportban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk, míg a verőtérfogat esetében enyhe mértékű, a perctérfogat esetében szignifikáns javulást tapasztaltunk.

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. 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.

A doxorubicin és metformin hatása a miofibrillumra

A Masson's trikróm festés során vizsgálni kívántuk a kollagén mennyiségét a szívszövetben. A kollagén akkumulálódás a szívizomban a fibrózis jele viszont a két hetes kezelést követően még nem tapasztaltunk fibrózisra utaló jelet. Azonban a DOX csoportban szignifikáns mértékben csökkent a kardiomiociták száma a kontrollhoz képest, melyet a miofibrillumok vastagsága jól reprezentál. A DOX+MET csoportban láthatjuk, hogy a miofibrillumok vastagsága

szignifikánsan vastagabb a DOX csoporthoz képest, sőt az értékek megközelítik a kontroll csoport értékeit.

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.

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, hogy 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 szignifikáns emelkedést mutatott a MET csoportban a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, míg a DOX+MET csoportban csak enyhe emelkedést tapasztaltunk. Az LC3-II 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 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.

Eredmények: ISO-indukálta kardiotoxicitás

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 diagram formájában prezentáltuk. 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.

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, míg a CK-MB izotípus esetében az 50 mg/kg ISO csoportban kaptunk szignifikáns emelkedést a kontrollhoz képest.

Isoproterenol és az infarktusz 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 infarktusz 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.

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. 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.

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 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 dózisfüggő 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 ugyancsak dózisfüggő módon emelkedett, az ISO 5,0 mg/kg, és ISO 50,0 mg/kg csoportban szintje szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoport értékeihez képest.

Diszkusszió

Doxorubicin-indukálta kardiotoxicitás

A legfrissebb statisztikai adatok alapján elmondható, hogy a szív- és érrendszeri megbetegedések következtében kialakuló halálozások globális szinten vezetnek a mortalitási statisztikát, annak ellenére, hogy a fejlődött országokban ez az utóbbi évtizedekben csökkenést mutatott: köszönhetően egyrészt a modern gyógyszeres kezelésnek, másrészt a hatékony preventív 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 hozzájárulnak 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 preventív stratégiák kialakítása és a rizikó faktorok csökkentése irányába. 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 feltárása, 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. 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. 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 abnormalis működéséhez vezet, amellyel a sejt már nem képes megbirkózni. 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 mellituszban szenvedő betegekben, és azt találták, hogy a MET enyhén emeli a szívfrekvenciát, azonban a vérnyomás szignifikáns emelése nélkül. 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 szérumból 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 hasonlítva. 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 abnormalis mitokondriumokat találtak szövettani vizsgálataik során, melyek normalizálódását figyelték meg amikor metformint is adagoltak a DOX mellé. 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. 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. 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^{2+} 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. 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. 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. 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, 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, még hozzá a proapoptotikus kaszpázok blokkolása révén, azonban a megváltozott fiziológiás körülmények következtében, valamint ha már az autofágia önmagában nem képes megbírkózni a patológiás állapottal, akkor indukálni képes apoptózist vagy 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.

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. Számos tanulmány született már ebben a témában, és tudjuk, hogy a toxicitás mértéke dózis függő módon alakul ki. 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. 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. Ebből az eredményekből már azt is láthatjuk, hogy a miokardiumban okozott károsodás mértéke dózisfüggő 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. A miociták apoptózisát több tényező is kiválthatja: a legerőteljesebb apoptózist indukálók közé tartoznak a szívizomban az oxigéntartalmú szabad gyökök, stresszállapotok, citokinek (FAS, TNF α), 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, és ha diszrupció történik ezen folyamatok kapcsolatában, az súlyos patofiziológias folyamatok kialakulásához vezet. 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. Western blot eredményeinkből az látszik, hogy az LC3B-II fehérje, amely az autofagoszóma kialakulásában részvevő 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 dózisú ISO csoportban a kontroll csoporthoz képest, de az megállapítható, hogy a fehérjék expresszió szintje dózisfüggően 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 ¹⁰⁸. Normál körülmények között az autofágia blokkolja az apoptózist, azonban ha megváltozik a sejt fiziológias 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. Feltételezésünk szerint, mivel az autofágia jelen esetben diszregulálódik, apoptózis fog indukálódni. A TUNEL assay, (mely jól jelzi a DNS törést már az apoptóz korai fázisában), során kapott eredményeinkből látható, hogy a DNS károsodás jelei már egészen a 0,05 mg/kg dózisú ISO-val kezelt csoportban észlelhetők, a DNS törés mértéke már az ISO 0,05 csoportnál szignifikáns mértékű volt a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, és dózisfüggő módon emelkedett a DNS károsodás mértéke. Az apoptózis további vizsgálatához mértük a kaspáz-3 fehérje expresszió szintjét. Itt azonban az látható, hogy az apoptózis mértéke a legnagyobb az 5,0 mg/kg dózisú ISO csoportban volt mérhető, a legmagasabb dózisonál azonban már egy alacsonyabb apoptózist detektáltunk. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az 50,0 mg/kg dózisú 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 szívszövet mértéke, valamint az 50,0 mg/kg dózisú 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 Ca^{2+} akkumulálódása során megnő a mitokondrium membránjának permeabilitása, ebből adódóan változik a proton grádiens és csökken az ATP termelődés) így nem meglepő, hogy a nagydózisú 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, apoptózis és nekrosis folyamatok alakulását a különböző dózisú ISO kezelést követően. Feltételezésink szerint a nagyszámú kardiomiociták elhalása egyrészt az autofágia, mint túlélési útvonal diszrupciója miatt történik. Western blot eredményeink ezt igazolják, hiszen az ISO dózisének emelkedésével szignifikánsan emelkedik a p62, mely egy folyamatos akkumulálódásra, valamint az autofágia inkomplettségére 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 nekrozist indukálhat), azonban a legnagyobb dózisonál már szintje visszaesik, ahol a nekrosis már szignifikáns mértékű volt. Több tanulmány is leírta már, hogy az autofágia helyreállítása védelmet nyújthat a kardiomiociták számára, valamint születtek már olyan publikációk, melyekben antioxidánsokat adagoltak ISO kezelést kiegészítve, és azok antiapoptotikus hatásáról számoltak be. 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.

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 szérumbiomarkerek, 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 dózisonál 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 intraperitoneális 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, 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 a MET kiegészítő kezelés hatására, valamint az autofágiás folyamatot normalizálta. 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 útvonalat különböző dózisú isoproterenol 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.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Tósaki Árpádnak témavezetőmnek, 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 részt vevő, 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 testvéreimtől, 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.

