

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Czeglédi András**

**Az autofágia és kamrafibrilláció kapcsolata**

**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**DEBRECEN, 2019.**

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Az autofágia és kamrafibrilláció kapcsolata**

**Czeglédi András**

**Témavezető: Dr. Lekli István**



**DEBRECENI EGYETEM**  
**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**  
**Debrecen, 2019**

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	1
1. Bevezetés.....	3
1.1. Kardiovaszkuláris szívbetegségek epidemiológiája.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A coronariabetegség.....	5
2.2. Arrhythmia és kialakulásuk.....	7
2.2.1. Abnormális ingerképzés.....	9
2.2.2. Abnormális ingerületvezetés.....	10
2.3. Antiarrhythmiaszerek.....	10
2.4. Az apoptózis.....	12
2.5. Az autofágia.....	13
2.6. Az autofágia szabályozó mechanizmusai.....	16
2.6.1. Nitrogén függő reguláció.....	16
2.6.2. Energia vagy glükóz függő reguláció.....	16
2.7. Az autofágia és az apoptózis kapcsolata.....	16
2.8. Az autofágia befolyásolásának lehetőségei.....	17
2.8.1. Autofágiát indukáló szerek.....	17
2.8.2. Autofágiát gátló szerek.....	19
2.9. Autofágia a kardiovaszkuláris rendszerben.....	21
2.9.1. Autofágia iszkémia-reperfúzió alatt.....	22
3. Az autofágia és a reperfúzió indukálta fibrilláció kapcsolata.....	23
4. Célkitűzések.....	24
5. Anyagok és módszerek.....	25
5.1. Kísérleti állatok-egerek és patkányok.....	25
5.2. Globális miokardiális iszkémia és reperfúzió izolált egérszíveken.....	25
5.3. Izolált dolgozó patkány szív preparátum.....	25
5.4. Arrhythmia kiváltása elektromos ingerléssel.....	26
5.5. Elhalt területek meghatározása TTC festés segítségével patkányszíveken.....	26
5.6. Fehérje izolálás és Western blot.....	27
5.6.1. Western blot vizsgálat egérszíveken.....	27
5.6.2. Western blot analízis patkány szíveken.....	28
5.7. Apoptózis detektálása patkányszíven fluoreszcens jelöléssel.....	28
5.8. Statisztikai elemzés.....	29
6. Eredmények.....	30

6.1. Kamrafibrilláció kialakulása iszkémia-reperfúzió átesett egérszívekben.....	30
6.2. Autofágiás és apoptotikus fehérjék Western blot analízise egérszíveken.....	30
6.3. A kamrafibrilláció hatása a balkamra funkciókra patkánymodellben.....	33
6.4. A kamrafibrilláció hatása az infarktusz terület nagyságára izolált dolgozó patkányszíven. .	34
6.5. Apoptózis mértéke a kamrafibrilláció hatására.....	34
6.6. A kamrafibrilláció hatása az autofágiás folyamatokra.....	35
7. Megbeszélés.....	37
9. Összefoglalás.....	42
10. Summary.....	42
11. Irodalomjegyzék.....	43
12. Tárgyszavak.....	52
13. Köszönetnyilvánítás.....	53
14. Függelék: a megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye.....	54

## Rövidítések jegyzéke

CVD-cardiovascular disease (szív- és érrendszeri megbetegedések)

CHD - coronary heart disease (coronariabetegség)

TTC – trifenil tetrazólium klorid

ISZB - iszkémiás szívbetegség

ATP – adenzin trifoszfát

ROS – reactive oxygen species (reaktív oxigén gyökök)

NADPH - Nikotinamid adenin dinukleotid foszfát

DNS – deoxiribonukleinsav

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule

EAD – early afterpolarization (korai utódepolarizáció)

DAD – delayed afterpolarization (késői utódepolarizáció)

AVNRT – atrioventricular nodal reentry tachycardia

EKG – elektro kardiogram

Hsc70 – heat shock cognate 70

LAMP2A - lysosome-associated membrane protein-2

AMP – adenzin monofoszfát

AMPK – AMP aktivált protein kináz

mTOR – mammalian target of rapamycin

mTORC – mTOR complex

SMER - small molecule enhancers of rapamycin

LC3B – microtubule-associated protein light chain 3B

LRS – LC3B recognition region

LIR – LC3B interacting region

ATPáz – adenzin trifoszfátáz

ER – endoplazmatikus retikulum

PI3 - kináz – foszfatidil inozitol 3 kináz

I.P. – intraperitoneális

I.V. - intravénás

HR – heart rate (szívfrekvencia)

AoP – aortic pressure (aortanyomás)

CF – coronary flow (koroária átáramlás)

AF – aortic flow (aorta átáramlás)

CO – cardiac output (perctérfogat)

SV – stroke volume (verőtérfogat)

HRP – horse radish peroxidase (tormaperoxidáz)

GAPDH – gliceraldehyd-3 foszfát dehidrogenáz

PVDF membrán – polivinilidén fluorid membrán

TPN – total protein normalization

TdT enzim – terminális deoxinukleotidil transzferáz enzim

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

PE - phosphatidylethanolamines

# 1. Bevezetés

Az autofágia egy intracelluláris folyamat, amely során fehérjék, sérült makromolekulák és sejtorganellumok degradálódnak. Az elmúlt évtizedek során a tudományos kutatások egyre közelebb jutottunk annak megértéséhez, hogy az autofágia milyen szerepet tölt be a szívizom homeosztázisában. Szerepet játszhat a megváltozott fiziológiás körülmények során számos kardiovaszkuláris betegségben, beleértve a szívelégtelenséget és az szívinfarktust is. Ugyanakkor jelenleg is vannak az autofágiával kapcsolatban vitatott kérdések. Az iszkémiás szívizomban jelentkező autofágiás folyamatok ugyanis jótékony hatással lehetnek és a túlélést segíthetik elő, míg reperfúzió során -amely viszont elengedhetetlen a miokardium túléléséhez- ezek a folyamatok súlyosbíthatják sejthalál folyamatát. A reperfúzió egyik legkomolyabb káros következménye a szívelégtelenség kialakulása mellett a kamrafibrilláció előfordulása.

## 1.1. Kardiovaszkuláris szívbetegségek epidemiológiája

A kardiovaszkuláris betegségek (cardiovascular disease-CVD) alatt olyan nem fertőző, szív- és érrendszert érintő elváltozásokat értünk, mint például a coronariabetegség, cerebrovaszkuláris betegség, perifériás keringés- és reumás szívbetegség, veleszületett szívrendellenesség, a mélyvénás trombózis, valamint a tüdőembólia. A WHO jelentése szerint a kardiovaszkuláris betegségek világszerte a vezető halálokok közé tartoznak: több ember halálát okozzák, mint bármely egyéb betegség. Becslések szerint évente 17,9 millió 70 év alatti halálos áldozata van a szív- és érrendszeri megbetegedéseknek, amely a globális halálozási okok 31%-a. A két leggyakoribb következmény közé a szívroham és a stroke tartozik, melyek a halálesetek mintegy 85%-áért felelősek. A CVD kialakulásáért felelős rizikófaktorok között tartják számon a stresszt, az egészségtelen táplálkozást, a mozgásszegény életmódot, továbbá a dohányzást és a túlzásba vitt alkoholfogyasztást. Mindezek együttes hatása magas vérnyomást, vércukor és lipid szint emelkedést eredményez, amely túlsúllyal és elhízással párosulva kiváltó oka a szív- és érrendszeri patológiás elváltozásának. Európában évente mintegy 4 millió haláleset a kardiovaszkuláris megbetegedésekre vezethető vissza. Ez a szám a halálozási okok 45%-át jelenti és a krónikus szívbetegség (CHD-chronic heart disease) valamint a cerebrovaszkuláris betegségek a leggyakoribbak. Előbbi 1,8 millió míg az utóbbi pedig 1 millió halálos áldozatot követel évente a kontinensen. A nemek arányát tekintve 2,2 millió nő hal meg főleg cerebrovaszkuláris okokra visszavezethetően, ami a halálesetek 49%-át jelenti és 1,8 millió férfi amely 40%-át teszi ki a halálozásoknak. Az átlag életkor megoszlását tekintve a CVD-hez köthető halálesetek 1/5-öd része következik be 75 éves kor felett, 1,4 millió 75 év alatt és éves szinten mintegy 700 ezer eset következik be a 65 éves kor betöltése előtt. Férfiakból 900 ezer míg

nőkből 500 ezer fő veszti életét 75 éves kora előtt CVD következtében és 65 éves kor alatt kétszer annyi férfi hal meg CHD következtében, mint ahány nő<sup>1</sup>.

Európában a halálozási arányok megoszlása országoként nagyon változó, de az elérhető adatok alapján minden EU-s országban javuló tendencia jellemzi a CVD általi halálozások számát; vagyis a prevenciónak és a korszerű kezeléseknek köszönhetően egyaránt csökken a morbiditás és a mortalitás.

Hazánkban a rákos megbetegedéseket megelőzve a kardiovaszkuláris megbetegedések a vezető halálok<sup>2</sup>. Férfiak esetében 100 ezer lakosból évente 921 fő veszíti életét CVD következtében és ebből 488 a coronariabetegség; nőknél pedig 646 megbetegedésből 319 a coronariabetegség<sup>1</sup>. Ugyanakkor Magyarországon is megfigyelhető az a tendencia, mint az EU többi országában, azaz a CVD-s esetek száma egyre csökkenőben van: férfiaknál 21.9%-kal míg nőknél 22.6%-kal csökkent a 2000-es évek elejéhez képest a CVD-s halálozások száma<sup>1</sup>. A kardiovaszkuláris megbetegedések prevenciójának legalább 5 fő eleme van. Ezek az életmód változtatás a testedzés bevezetésével és a dohányzás elhagyásával; a helyes táplálkozással; profilaktikus gyógyszerek alkalmazása és a fiatalabb koszorúér betegek hozzátartozóinak szűrése.

Nem meglepő tehát, hogy a kardiovaszkuláris megbetegedéseket érintő kutatások napjainkban igen nagy jelentőségűek, hiszen minél többet tudunk meg ezekről a betegségekről, annál hatékonyabb kezeléseket alkalmazhatunk, nagy hangsúlyt fektetve a megelőzésre.

Mivel a kamrafibrilláció és autofágia kapcsolatáról jelenleg nem áll rendelkezésünkre elegendő információ, továbbá az autofágia is igen intenzíven kutatott terület manapság, így szükségesnek láttuk foglalkozni ezzel a témával az alap kutatás szemszögéből.



## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A coronariabetegség

Fejlett országokban tapasztalható mozgásszegény és stresszes életmód, a nem megfelelő táplálkozás, elhízás és cukorbetegség egyaránt károsan hatnak az emberi szervezetre. Mindezen felsorolt hatásoknak egyik súlyos következménye lehet az iszkémiás szívbetegség (ISZB) vagy más néven coronariabetegség okozta szívelégtelenség, amely napjaink vezető halálozási oka és évente csaknem 3,8 millió ember halálát okozza Európában<sup>1</sup>.

Mivel a szívizomsejtek szinte kizárólag a mitokondriális oxidatív foszforiláció révén nyernek energiát, így a szív fiziológiás működéséhez elengedhetetlen a koronáriák által szállított oxigéndús vér biztosítása. A szívizomsejtek rendelkezésére álló rezervoár csupán néhány másodpercre elegendő energiát képes felhalmozni, ezért folyamatos a metabolikus aktivitás, amely biztosítja a fiziológiás szívfunkciót<sup>3</sup>. A reperfúzió elősegíti az iszkémiás szívizomszövet fiziológiás állapotának visszanyerését, ugyanakkor a hirtelen létrejött oxidatív stressz arrhythmiákat is előidézhethet. Az egyik ilyen nemkívánatos és potenciálisan letális reperfúzió okozta esemény, amit számos állatmodellen megfigyeltek a reperfúzió-indukálta kamrai fibrilláció<sup>4-7</sup>.

Az oxidatív stressz során a sejtben káros metabolitok keletkeznek, fehérje aggregátumok jönnek létre, sérülhetnek a mitokondriumok; egy katabolikus káosz alakul ki, amely a szívben hatványozottan veszélyes a magas metabolikus aktivitása miatt. Mindezen citotoxikus metabolitokat a sejt önmaga is képes bizonyos mértékig eliminálni. Az egyik ilyen „önműködő” folyamat az autofágia, amely során a sejt molekuláris szinten próbálja hatástalanítani és újrahasznosítani az említett citotoxikus metabolitokat<sup>8</sup>. Az autofágia szerepe a szívszövetben, mint egy nem osztódó szövettípus kettős megítélésű a túlélés és mortalitás tekintetében. Napjainkban az autofágia kutatása igen intenzív, mivel többek között ezen folyamattól függ a kardiomiociták és így a szívszövet túlélése<sup>9</sup>.

A krónikus szívbetegség során a szívizom vérellátása és a miokardium oxigén- és tápanyagigényének egyensúlya felborul, amelyet általában érelzáródás vagy érszűkület idéz elő. Csökken a tápanyag és oxigénfelvétele a szívizomzatnak, amely elengedhetetlen a miokardium sejtjeinek megfelelő működéséhez. Ez hosszútávon hipertóniát később pedig hipertrófiát okozhat, amely végső esetben szívinfarktushoz vezethet, amely a szívizomsejtek iszkémiás eredetű nekrozisa.

A szívinfarktus során a szív vérkeringését biztosító koronária erek bizonyos szakasza egy időre átjárhatatlanná válik a vér számára (iszkémia), majd az akadály gyógyszeres vagy nem gyógyszeres megszűnését követően újraindul a keringés (reperfúzió). A miokardiumban ekkor

lejátszódó biológiai folyamatokkal kapcsolatban számos kutatást folytattak már az elmúlt évtizedekben és ez idő alatt jelentős mennyiségű szakirodalom halmozódott fel az experimentális és klinikai vizsgálatok során.

Iszkémia alatt anaerob glikolízis indul el, amelynek következtében a sejten belüli glikogén raktárak nagyon hamar kiürülnek, valamint jelentős mértékű tejsav halmozódik fel, csökken az ATP mennyisége és a pH a szívizomsejtekben. A nagymértékben felhalmozódott  $H^+$  ionok károsítják a mitokondriumok membránpotenciálját és aktiválják a  $Na^+-H^+$  transzport fehérjét, előidézve ezzel egy emelkedett  $Na^+$  szintet. A  $Na^+$  szint csökkentésének érdekében megnyílnak a  $Na^+-Ca^{2+}$  transzportok így pedig  $Ca^{2+}$  kezd beáramolni és felhalmozódni a sejtbe. Ezt a jelenséget csak tovább súlyosbítja az ATP-függő  $Ca^{2+}$ -pumpák működési zavara, amelyek szintén  $Ca^{2+}$  beáramlást eredményeznek. Az ATP-függő  $K^+$  csatornák az intracelluláris ATP szint csökkenésének következtében megnyílnak és a kiáramló  $K^+$  repolarizáció rövidülést okoz, a szívizomsejt intracelluláris  $K^+$  koncentrációja pedig nagymértékben csökken<sup>7</sup>.

Ezt az állapotot tovább súlyosbítja a szabad gyökök megjelenése. A szabadgyökök olyan kémiai termékek, amelyek egyik külső elektronpályáján egyetlen, párosítatlan elektron helyezkedik el. Ez a kémiai állapot rendkívül instabil, így a szabad gyökök könnyen reakcióba lépnek szerves és szerves vegyületekkel egyaránt<sup>7</sup>. A miokardiális reperfúzió során reaktív oxigénszármazékok (ROS) vagyis oxigén tartalmú szabad gyökök<sup>10</sup> pl. szuperoxid anion, hipoklórsv, nitrit-oxidból peroxinitrit és végül hidroxilgyökök keletkeznek főleg az endotél sejtekből származó xantin oxidáz, illetve az újra működésbe lépő mitokondriális elektrontranszportok, később pedig a NADPH oxidáz hatására. A felhalmozódott ROS-oknak jelentős szerepe van a miokardiális sérülések kialakításában. A ROS hatására gyakran nagy vezetőképességű, membránt átívelő, átmenetileg permeabilitást biztosító pórusok nyílnak meg a mitokondriumok membránjában. Sérül a szarkoplazmatikus retikulum, hozzájárulva ezzel az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint növekedéséhez. A reaktív oxigén gyökök lipidperoxidáció révén károsítják a sejtmembránt, enzim denaturációt idéznek elő és közvetlenül károsítják a sejt DNS-ét.

A továbbiakban a már amúgy is kalciummal telített szívizomsejtbe további  $Ca^{2+}$  beáramlás történik a  $Na^+-Ca^{2+}$  transzport reverz működése folyamán. A reperfúzió hatására gyorsan beáll a fiziológiás pH szint és az újra működésbe lépő elektrontranszport miatt helyreáll az ATP szintézis. Ekkor azonban már a sejtben nagy koncentrációban van jelen a  $Ca^{2+}$  és a szívizomrostok fokozott és kontrollálatlan összehúzódása a citoszkeleton sérüléséhez és így a miocita apoptotikus pusztulásához vezet. A helyreállt mitokondriális membránpotenciál  $Ca^{2+}$  beáramlást idéz elő a mitokondriumba, megnövekszik a pH és ez a ROS-ok további termelődésével karöltve további átmenetileg permeabilitást biztosító pórusok megnyílásához vezet. Ez a folyamat szintén a

kardiomiociták további pusztulását idézi elő az oxidatív foszforiláció és a mitokondriumok szétesése miatt.

Órákkal a reperfúziót követően az infarktusos területen neutrofil granulociták jelennek meg és az adhézions molekulák (P-selectin, CD18 és CD11, ICAM-1) segítségével behatolnak a szívszövetbe ahol aztán kifejtik hatásukat<sup>11,12</sup>.

## 2.2. Arrhythmiai és kialakulásuk

A szív ingerületvezető rendszerének zavarai lehetnek állandóak vagy sporadikusak. A rendellenes ritmus a szív ingerületvezető rendszerének bármely pontjából kiindulhat a *sinus* csomótól a miocitáig. Kiindulási helyük alapján megkülönböztetünk pitvari és kamrai ritmuszavarokat. Az arrhythmiai megjelenhetnek *tachycardia* (szapora pulzus) vagy *bradycardia* (lassult pulzus) képében, irreguláris ritmushoz kapcsolódó szabályos kamrai kontrakciók formájában, érdemi kamraösszehúzódnás nélküli kaotikus depolarizációval (kamrafibrilláció) vagy az elektromos aktivitás teljes hiányával (*asystole*)<sup>13</sup>.

A szív- és érrendszeri betegségek következményeként bekövetkező hirtelen szívhalált kiváltó ok, az esetek 80-90%-ban a szívinfarktus vagy szívelégtelenség végett bekövetkező kamrai fibrilláció, amely a legsúlyosabb kamrai ritmuszavar, viszont a leggyakoribb szívritmuszavar a pitvarfibrilláció<sup>14</sup>.

A pitvarfibrilláció intraatrialis funkcionális reentry eredetű tachycardia, melynek létrejöttéhez és fenntartásához triggerként szolgáló ektópiás aktivitás, makroreentry körök és a pitvari izomzat elektrofiziológiai és strukturális károsodása, röviden szubsztrátum szükséges. A szubsztrátum hátterében a hypertonia, bal kamra hypertrophia, koszorúér betegség, fibrózis állhat. A ritmuszavart az ingerületvezetés és a repolarizáció inhomogenitása hozza létre, melynek a lassú pitvari vezetés és a rövid pitvari refrakteritás kedvez. Leggyakrabban a *vena pulmonalis*okba benövő pitvari izomnyúlványokból kiinduló kapcsolt *extrasystolek* vagy rövidebb-hosszabb ideig tartó *extrasystole* sorozatok indítják<sup>15</sup>.

A kamrafibrilláció teljesen dezorganizált kamrai elektromos tevékenység, mely effektív kontrakciót már nem eredményez. Sem pitvari, sem szabályos kamrai tevékenység nem figyelhető meg, mivel ez egy extrém fokú arrhythmia. Azonnali reszuszitáció megkezdése és aszinkron DC *cardioversio* (defibrilláció) szükséges. Leggyakoribb kiváltó okai a következők: iszkémiás szívbetegség, cardiomyopathiák, elektrolitzavar, *carditis*<sup>15</sup>.

Az arrhythmiai kialakulásának és mechanizmusának tárgyalásához elengedhetetlen először részletezni a kardiomiocitákra jellemző ingerképzés és vezetés hátterét. A szívnek autonóm ingerképzési és vezetési tulajdonságai vannak, amelyet az idegrendszer közvetett módon

befolyásolni képes: a paraszimpatikus idegrendszer acetilkolin hatására lassíthatja, míg a szimpatikus beidegződés katekolaminok révén gyorsíthatja a szívfrekvenciát.

A pitvar és kamra izomzata funkcionális szempontból egységes rendszert alkot (*syncytium*), amelyben az ingerület gyors terjedése időben összehangolt, egyetlen izomsejtre emlékeztető kontrakciót hoz létre. A munkaizomrostok egyetlen különálló sejt-ként foghatók fel, amelyek elágazódnak és sokszoros összeköttetésben állnak egymással. A szíviomrostot gazdag kapillaris hálózat és szarkolemma veszi körül<sup>16</sup>. A szívkontrakciót kiváltó módosult rostok az ún. „pacemaker” sejtekből állnak, amelyek spontán depolarizáció révén ingerképzésre képesek. Ezek a *nodus sinuatrialis* és *nodus atrioventricularis* vagy közismertebb nevükön sinus- és AV-csomó. A sinus csomó a jobb pitvarban található, innen indul az ingerület és terjed tova a pitvarokon. Az ingerület pitvarokból kamrákba való átterjedése az *annulus fibrosus* miatt csakis az AV-csomón keresztül lehetséges. Innen az elektromos impulzus a His-kötegen keresztül a Tawara-szárukba majd pedig a Purkinje-rostokba továbbítódik. A szív munkaizomzatát felépítő sejteket gyors, míg a pacemaker funkcióval rendelkező kardiomicitákat lassú lefolyású akcióspotenciál jellemzi.

Lassú lefolyású akciós potenciál során a diasztolés repolarizáció közben a  $K^+$  ionok folyamatosan áramolnak ki a sejtéből, a  $Na^+/K^+$  pumpán keresztül, miközben azok lassan záródnak. A repolarizáció végén a membránpotenciál egy adott negatív értékén (kb. -60 mV) hiperpolarizációra nem specifikus kation csatornák (FUNNY csatorna) nyílnak meg és megkezdődik a  $Na^+$ -ok lassú beáramlása a sejtbe (f-áram). A FUNNY csatorna záródása közben -40 mV-nál a tranziens és L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák nyílnak meg, amelyeken keresztül a  $Ca^{2+}$  beáramlás történik, a sejt eléri a csúcspotenciált. Ekkor a késői  $K^+$  csatornák megindítják a repolarizációt. A sejtéből a  $Na^+/K^+$  pumpa és más transzport fehérjék segítségével a  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$  ionok visszaáramolnak az extracelluláris térbe.

A pacemaker sejtekben keletkezett elektromos áram a sejteket összekötő GAP-junction-ön keresztül terjed át a gyors akcióspotenciállal jellemezhető munkaizomzatba. Ahhoz hogy az akcióspotenciál kialakuljon a sejtnek el kell érni az ún. küszöbpotenciált (-90 mV-ról -70 mV-ra). Ez a membrán depolarizáció nyitja a gyors, feszültségfüggő  $Na^+$  csatornákat és rövid idő alatt nagy mennyiségű  $Na^+$  beáramlás következtében a sejt depolarizálódik kb. +30 mV-nál. A gyors  $Na^+$  csatornák záródnak és a  $K^+$  csatornák megnyílásával megkezdődik a korai repolarizációs fázis. Nagyjából -40 mV-nál az L-típusú feszültség függő  $Ca^{2+}$  csatornákon keresztül kalcium beáramlás indul meg. Ezt nevezzük plató fázisnak, amely során a  $K^+$  ki- és a  $Na^+$  beáramlása közel megegyező sebességgel történik, vagyis a sejtben belüli feszültség közel konstans. Az idő előrehaladtával további  $K^+$  csatornák nyílnak meg, emelkedik a  $K^+$  kiáramlás, a  $Ca^{2+}$  csatornák záródnak és a

kardiomiociták repolarizálódnak. Az intracelluláris térben lévő  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok eltávolítását szintén transzport fehérjék és az ATP függő  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa végzi.

A szívben kialakuló arrythmiák minden esetben az ingerképzés vagy ingerületvezetés zavaraira, esetleg ezek kombinációjára vezethetők vissza. Az ingerképzés frekvenciáját, a szimpatikus és paraszimpatikus hatás mellett, 3 tényező befolyásolja: a maximális diasztolés potenciál, a küszöbpotenciál és a depolarizáció sebessége, melyek közül bármelyik megváltozása módosíthatja az ingerképzés sebességét<sup>17</sup>. Ebből következik, hogy ha valamilyen metabolikus rendellenesség lép fel, úgy mint hypoxia vagy hypokalémia, akkor a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpák gátlása miatt a diasztolés repolarizáció elnyúlik<sup>18</sup>. Degeneratív körülmények között, amelyek hatással vannak a szív elektromos vezetési tulajdonságára vagy a *sinus* csomó sejtjeit gátolják, *bradycardiát* vagy akár a *sinus* csomó gátlását is okozhatják, amely tovább manifesztálódva a SA-csomó blokkolását eredményezheti. A szív ingerképző helyeinek túlzott aktivitása vagy szupressziója eredményeképpen létrejövő aritmiákat a normál automácia zavarainak tekintjük.

### **2.2.1. Abnormális ingerképzés**

Háttérben a szív munkaizomzatának megváltozott elektromos tulajdonsága áll. Ezek a miociták alapvetően nem képesek spontán depolarizációra. Megváltozott automácia esetében azonban a maximális diasztolés potenciáljuk eltolódik a küszöbpotenciál értéke felé, melynek következtében hasonlóan kezdenek viselkedni a pacemaker sejtekhez. Ennek molekuláris háttérben a megnövekedett extracelluláris kálium szint, alacsony intracelluláris pH és megnövekedett katekolamin szint állhat. A kóros ingerképzés ezen formáját triggerelt aktivitásnak is nevezzük, mivel ezeknek az automáciáknak a beindításához, előző akcióspotenciálok szükségesek, amelyek kiváltják (triggerelik) az azután már magától is fennálló ritmuszavart<sup>14,19</sup>. Ezek alapján két arrhythmogén mechanizmus ismert: korai utódepolarizáció (*early afterdepolarization*, EAD) és késői utódepolarizáció (*delayed afterpolarization*, DAD).

Korai utódepolarizáció esetén a teljes repolarizáció előtt, újabb depolarizációs hullám alakul ki és terjed át a környező kamrai munkaizomrostokra, amely extrasystolét vagy nagyfrekvenciájú kaotikus kamrai tachycardiát (*torsades de pointes*) vált ki. Az EAD kialakulása korai repolarizációkor vagy plató fáziskor következik be, mivel ilyenkor viszonylag magas a sejtmembrán ellenállása és akár a repolarizáció akár a depolarizációs áramlás irányába következik be változás, az hatással lesz az akcióspotenciál hosszára, amely alapfeltétele a korai utódepolarizáció kialakulásának<sup>19</sup>. Mindezek háttérben veleszületett hosszú QT-szindróma, nagyfokú *bradycardia*, *hypokalaemia* állhat.

Késői utódepolarizációról beszélünk, ha a miociták membránpotenciáljában ingadozás történik az akcióspotenciál repolarizációjának lezajlása után. Ezeket az oszcillációkat számos körülmény okozhatja, amelyek a diasztolés intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint növekedését eredményezik és a küszöbpotenciált elérve, újabb akcióspotenciált eredményezhetnek. A késői utódepolarizáció kialakulásának a gyorsabb szív működés kedvez. Emelkedett kalcium koncentrációt a *digitalis* toxicitás a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa blokkolásával és így a  $\text{Ca}^{2+}$  szarkoplazmás retikulumból való mobilizálásával érhet el. Az emelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint pedig a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  csere mechanizmuson keresztül depolarizálja a szívizmot<sup>14,19</sup>. További anyagok, mint például a katekolaminok és az I/A alcsoportba tartozó antiarrhythmias gyógyszerek fokozhatják a DAD kialakulásának esélyét.

### 2.2.2. *Abnormális ingerületvezetés*

Az elektromos impulzus továbbítása a szíven belül bizonyos esetekben, farmakonok hatására vagy anatómiai okok miatt akadályozva lehet. Ilyen szituációkban az inkomplett refrakter periódus miatt az impulzus nem, vagy csak rendellenesen képes továbbhaladni<sup>20</sup>.

Az ingerületvezetés zavarán alapuló másik jelenség az ún. körbefutó ingerület vagy *reentry* mechanizmusa. A szív normális elektromos aktivitása során a szívritmus a *sinus* csomóból indul ki és terjed szét az egész szerven, mígnem az összes kardiomiocita repolarizálódik és az effektív refrakter periódus befejeződik. Mivel a szívben a refrakter szakasz kellően hosszú, így normál esetben az ingerület körbeforgása nem jön létre. Azonban sérült szívszövetben előfordulhat az ingerület anterográd vagy retrográd irányú blokkolása. Anatómiai vagy klasszikus körbefutó ingerület okozta kórkép a Wolff-Parkinson-White szindróma (atrioventrikuláris reentry tachycardia, AVRT) vagy a AV csomó reentry tachycardia (AVNRT)<sup>21</sup>.

### 2.3. *Antiarrhythmias szerek*

Az antiarrhythmias szerek olyan farmakonok csoportja, amelyek az abnormális szívritmusokat képesek befolyásolni. Hatásukat a különböző ioncsatornákon keresztül fejtik ki. Ebből a szempontból az egyik legfontosabb ioncsatorna a  $\text{Na}^+$ -csatorna amelyet a legtöbb antiarrhythmias gyógyszer gátol<sup>14</sup>.

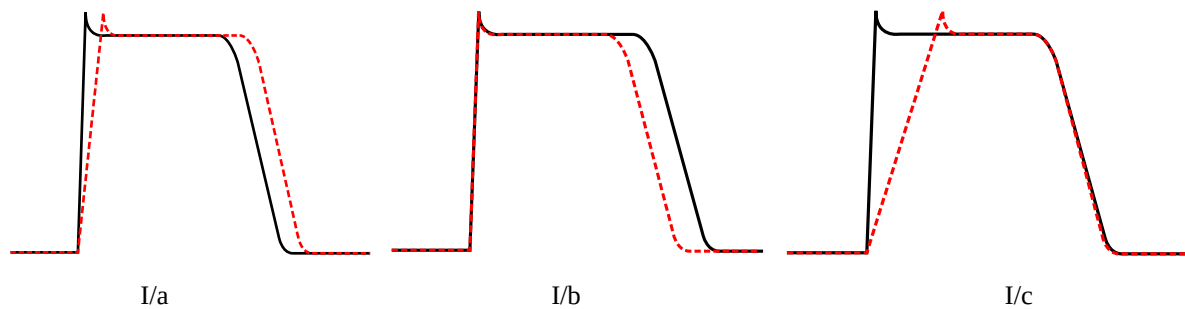
Jelenlegi ismereteink szerint a szívfrekvencia jelentősen befolyásolja az antiarrhythmias szerek hatását. Ennek nagy jelentősége van, hiszen a betegeket pont akkor kezeljük ilyen szerekkel, amikor a normális szívritmus megváltozik, *tachycardia* vagy korai *extrasystole* következik be. Továbbá ismeretes az a tény is, hogy az egyes hatóanyagok az egyes ioncsatornához különböző módon kapcsolódnak attól függően, hogy azok épp milyen állapotban vannak. Ez a jelenség a

funkcionális függés, vagy modulált receptor teória. A  $\text{Na}^+$  csatornának, amely működése döntően meghatározza az ingerületvezetést 3 konformációs állapota ismeretes: nyugalmi, aktív és inaktív állapot. A  $\text{Na}^+$  csatorna blokkolók aktív és inaktív állapotban jobban kötődnek, nyugalmi állapotban pedig inkább disszociálnak róla. Ennek az az eredménye, hogy magas szívfrekvenciánál vagy korai extrasystolénál a  $\text{Na}^+$  csatorna blokkolók hatása fokozódik.

Az antiarrhythmias szerek osztályozása hatásmechanizmusuk alapján történik és Vaughan-Williams oxfordi farmakológus nevéhez kötődik. Williams az antiarrhythmias szereket elektrofiziológiai hatásai alapján osztályozta. A Vaughan-Williams-féle felosztás IV. osztályba sorolja be az antiarrhythmias szereket, bár azok csoportosítása igen nehéz feladat.

Az I. osztályba sorolt szerek a  $\text{Na}^+$  csatornákon keresztül hatnak és membránstabilizáló hatásúak, azaz csökkentik a plazmamembrán ingerelhetőségét. Az akcióspotenciálra kifejtett hatásuk a 1. ábra mutatja. Az I. osztályba sorolt szerek további három alcsoportra oszthatók:

- I/a alcsoport: közepesen gyorsan (5-30 sec) kötődnek és disszociálnak a  $\text{Na}^+$  csatornákhöz, terápiás szinteken gátolják valamelyik  $\text{K}^+$ -csatornát is és meghosszabbítják az akciós potenciál időtartamát. EKG görbén élettani szívfrekvencia esetén szélesítik a QRS-komplexust és megnyújtják a QT-intervallumot. Terápiás alkalmazása főleg kamrai arrhythmiaéknál és Wolff-Parkinson-White szindróma esetén. Jelentősebb képviselői: *quinidin*, *procainamid* és *disopyramid*.
- I/b alcsoport: gyors leválási kinetika jellemzi (100-400 ms), nincs  $\text{K}^+$ -csatorna gátló hatásuk, rövidítik az akciós potenciál hosszát. Normál szívfrekvenciánál nem érvényesül  $\text{Na}^+$ -csatorna gátló hatásuk, ugyanakkor *tachycardia* esetén kifejeződik. Főleg miokardiális infarktus alatt vagy közvetlenül utána alkalmazzák, habár ez a gyakorlat egyre inkább ellenjavallott, mivel jelentősen megnövekedhet az asystole esélye. Leggyakrabban használt képviselői: *lidocain*, *mexiletin*, *phenytoin*.
- I/c alcsoport: a blokkolás kinetikája meglehetősen lassú (5-180 sec) és már fiziológiás szívfrekvenciánál is gátolják a szívizom  $\text{Na}^+$ -csatornáit. Nincs jelentősebb hatása az akciós potenciál hosszára. A QRS-komplexust kiszélesítik és mérsékelten megnyújtják a QT-intervallumot. Miokardiális infarktus után nem, míg ismétlődő *tachycardia* és vezetési rendellenességek esetén, továbbá rohamokban jelentkező pitvari fibrillációk megelőzéseként alkalmazzák. Leggyakrabban használt szerek: *flecianid* és *propafenon*.



1. ábra: A Vaughan Williams-féle I.osztály alcsoportjainak hatása az akciós potenciál hosszára

- II. osztály: ezek a szerek a  $\beta$ -adrenerg receptorok kompetitív gátlói, hatásukat a katekolaminok blokkolásával fejtik ki, így csökkentve a szimpatikus tónus hatását a szívre. Csökkentik a cAMP-függő ioncsatornák működését. Terápiás szerként a szupraventrikuláris tachycardia esetén alkalmazzák, csökkenti a miokardiális infarktus mortalitását és az AV csomó vezetőképességét. Leggyakrabban használt szerek: *propranolol*, *metoprolol*, *esmolol* és *pindolol*.
- III. osztály: gyors késői egyenirányító  $K^+$ -csatorna blokkolók, a szívizomsejtek repolarizációját hosszabbítja. Az effektív refrakter periódus és az akciós potenciál idejének hosszabbításával, továbbá azzal, hogy az ingerületvezetést nem lassítja -lévén hogy nincs  $Na^+$ -csatorna blokkoló hatása- ideális a reentry arrhythmia megelőzésére. Fordított use-dependencia jellemzi ezeket a szereket, ezért az alap *sinus* ritmus fenntartását támogatják. EKG-n a QT-intervallum megnyúlását eredményezik. Jelentősebb képviselői: *sotalol*, *amiodaron* és *bretylum*.
- IV. osztály:  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkolók és jelentős szerepük van a szív lassú akcióspotenciállal jellemezhető ingerképző szöveteire, csökkentik az AV csomó vezetését. A plató fázist lerövidítik a gyors akciós potenciálú sejtekben, csökkentve a szív kontraktilitását<sup>14</sup>.

## 2.4. Az apoptózis

Szívinfarktus során az egyik előforduló patológiás elváltozás az apoptózis. A programozott sejthalál egy energiafüggő folyamat, melynek során a sejtben olyan enzimek aktiválódnak, amelyek segítségével képesek lebontani saját DNS-üket, valamint a sejtmag és a sejtplazma fehérjéit. Az apoptózison átesett sejt ezután sejtalkotóira esik szét, de plazmamembránja továbbra is intakt marad. Ezek az apoptotikus sejt részecskék aztán a fagociták célpontjává válnak. Ennek köszönhetően az apoptotikus sejthalál -ellentétben a nekrozissal- nem vált ki gyulladási reakciót a szövetekben. Nekrozis során a sejtek membránintegritásukat elveszítik, enzimatikusan emésztődnek, ezáltal a sejt komponensek kiszivárognak, így előidézve a szervezet gyulladási



reakcióját<sup>13</sup>. Az apoptózis létfontosságú komponense a sejtek természetes megújulásának, az immunrendszer fejlődésének és megfelelő működésének, a hormonfüggő atrofianak, az embrionális fejlődésnek és a kémiai indukált sejthalálnak. A túl alacsony vagy épp túl magas apoptotikus aktivitás fontos tényezője számos neurodegeneratív betegségnek, iszkémiás károsodásnak<sup>22</sup>, autoimmun rendellenességeknek és rákos megbetegedésnek.

Az apoptózis mechanizmusa igen szabályozott és komplex molekuláris folyamatok kaszkádja, amelyben az kaszpáz fehérjék vesznek részt. A kaszpázok cisztein proteázok, amelyek a fehérjéket az aszpartát aminosavnál képesek hasítani és inaktív proenzimként állandóan jelen vannak a sejtekben. Aktivációjuk a pro- és antiapoptotikus fehérjék expressziójának finoman szabályozott egyensúlyától függ. Mai ismereteink szerint tíz ilyen kaszpáz fehérje játszik szerepet az apoptózisban, melyek az alábbi szempontok szerint rendszereznek:

- iniciátorok: kaszpáz-2, -8, -9, -10
- effektorok: kaszpáz-3, -6, -7
- inflammatórikus kaszpázok: kaszpáz-1,-4,-5

Jelenleg három főbb apoptotikus útvonalat különböztetnek meg: az *extrinsic* vagy halál receptor által-, az *intrinsic* vagy mitokondriális úton indukált és a citotoxikus T-sejt mediált útvonalat. Bármilyen úton aktiválódik az apoptózis, az eredmény a kaszpáz kaszkád aktivációja lesz, amely DNS fragmentációt, a citoszkeleton és magfehérjék degradációját, apoptotikus zárványok formációját eredményezi, ezáltal a sejt pusztulását okozza. A folyamat legvégén olyan fehérjék expresszálódnak, amelyek az apoptotikus sejt fagociták általi eliminálását vonja maga után<sup>23</sup>.

## 2.5. Az autofágia

Az eukariótákban a legjelentősebb fehérje degradációs rendszer az élesztőktől kezdve a növényeken át az emlősökig az autofágia folyamata. A görög eredetű szó (αυτοφαγος) 1963-as bevezetése *Christian De Duve* nevéhez fűződik és lefordítva „önemésztést” jelent. Legelső megfigyelése *Keith R. Porter* és tanítványa *Thomas Ashford* nevéhez köthető. A Rockefeller Intézet munkatársai izolált patkány májon végzett kísérleteik során glükagonnal perfundálták azt, így idézték elő a májsejtek glikogén lebontását és figyelték meg a lizoszómák emelkedett számát, amikben mitokondriumokat is felfedeztek<sup>24</sup>. Napjainkban az autofágia folyamatát és a szervezetre gyakorolt hatásának vizsgálatát is igen élénk érdeklődés övezi. 2016-ban Yoshinori Ohsumi autofágia kutatásban végzett munkásságát orvosi Nobel-díjjal ismerték el.

Az autofágia mechanizmusa már az embriogenezistől fontos szerepet játszik. Szerepe van a sejt fiziológiás állapotának fenntartásában, az immunrendszer megfelelő működésében és

összefüggésben áll számos neurodegeneratív betegséggel is, mint például Parkinson kór, Alzheimer kór, Huntington kór, Creutzfeldt-Jakab kór; továbbá Danon kór, Crohn betegség és 2-es típusú diabetes<sup>14,25-27</sup>.

Mindenek előtt fontos tisztázni, mit is tekintünk autofágiának egy sejtben. Minden folyamatot ide sorolunk, (i) amely során a citoplazmában szabadon hozzáférhető anyagok, (ii) lizoszóma által degradálódnak. Mindenképp fontos tehát különbséget tenni az autofágia és a sejtben lejátszódó egyéb vezikuláris transzportok, illetve proteoszómális folyamatok között<sup>28</sup>. Mint minden molekuláris biológiai folyamatot, így az autofágiát sem lehet csupán egyféleképpen jellemezni. Jelenlegi ismereteink szerint az autofágiának 3 típusát különböztetjük meg: mikroautofágia, chaperon mediált autofágia és makroautofágia.

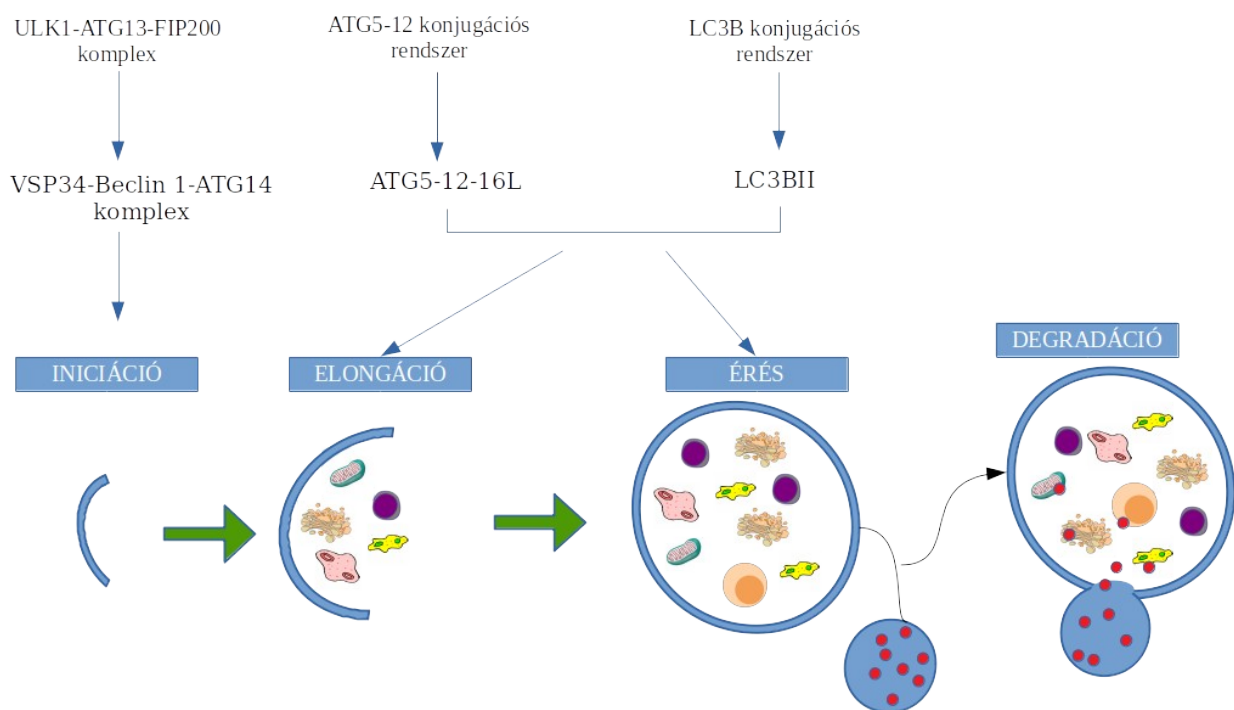
A mikroautofágia folyamata a legegyszerűbb mind közül, melynek során a növények és gombák világában vakuólumok, míg a *Drosophila melanogaster*től kezdődően az emlősökig a lizoszóma közvetlenül kebelezi be és degradálja a molekulákat (endoszómális mikroautofágia)<sup>29</sup>. Habár ez a legkevésbé vizsgált típusa az autofágiának, annyi bizonyos, hogy jó pár komponense szerepet játszik a makroautofágiás folyamatokban is<sup>29</sup>.

A chaperon-mediált autofágia egy szelektív folyamat, amely során a fehérjékhez előbb egy speciális aminosav szekvencia (KFERQ), majd pedig ehhez a pentapeptid motívumhoz a Hsc70 fehérje kapcsolódik. Az így kialakult szubsztrát komplex közvetlenül a lizoszóma felszínéhez kötődik, ezt követően fehérje transzlokáció során (LAMP2A) a lizoszóma belsejében megtörténik a molekulák lebontása. Ebben a folyamatban nem alakul ki vezikula a degradálandó fehérje körül, továbbá csak proteinek szolgálhatnak szubsztrátumként, más makromolekulák, mint például lipidek, nukleinsavak vagy membránfehérjék nem<sup>29</sup>.

A leginkább tanulmányozott makroautofágia genetikailag igen jól szabályozott és evolúciósan konzervált folyamat. Ez tette lehetővé tanulmányozását a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben és így sikerült pontos képet kialakítani a folyamat molekuláris hátteréről és mechanizmusáról. Disszertációmban az autofágia szó használata a továbbiakban a makroautofágia folyamatát jelenti.

A folyamatot elindító jelenség a sejtben belüli adenzin-monofoszfát (AMP) szint emelkedése, amely működésbe hozza az AMP aktivált protein kinázt (AMPK). Az AMPK inhibítorként hat az mTOR komplexre, amely gátolja az autofágia folyamatát. Legelső lépéseként izolációs membrán fűződik le a Golgi-apparátusról vagy az endoplazmatikus retikulumból, amelyet az ULK1-Atg13-FIP200-Atg1 kináz komplex szabályoz és az mTOR jelátviteli útvonalon keresztül aktiválódik. Az ún. omegaszóma további növekedését az Atg12-Atg5/Atg16 komplex irányítja. Miután az izolációs membrán lefűződése megindult, tovább folytatódik az elongáció, miközben a

membrán körülveszi a sérült sejtalkotókat. A membrán növekedés későbbi szakaszában az Atg5-12 komplex disszociál az izolációs membránról míg az LC3BII fokozatosan lokalizálódik a membrán mindkét oldalán. A folyamat során a citoszólban található natív LC3BI fehérje lipidizációs folyamaton megy keresztül és folyamatosan beépül az izolációs membrán mindkét oldalára, így annak mennyisége az az autofagoszóma kialakulása során egyre növekszik. Az autofagoszóma kialakulását követően a külső membrán és a lizoszóma egyesül így létrejön a autolizoszóma. Az autofagoszóma és lizoszóma fúzióját a Rubicon-UVRAG-Vps34-beclin1-ClassIII-PI3 kináz komplex szabályozza. Az autolizoszóma létrejöttét követően megkezdődik a fagoszóma által körülzárt sejtkomponensek degradációja a lizozómában található hidrolázok, proteázok és lipázok hatására. A fagoszóma belsejében lévő LC3II fehérjék a lizozómában található katepszin hatására delipidálódnak és újból LC3I fehérjévé alakulnak át, így újra felhasználhatóvá válnak a fagoszóma membránjának kialakításához (2. ábra)<sup>30</sup>.



2. ábra: Az autofágia sematikus ábrája

Mint ahogyan azt az előzőekben részleteztem, az autofágia folyamata alapvetően nem tekinthető szelektívnek. Létezik azonban a makroautofágiának egy olyan speciális esete, amely lehetővé teszi a sérült molekulák degradációját molekuláris jelöléssel. Kimutatták, hogy a nukleosporin p62 fehérje tartalmaz egy úgynevezett LRS (LC3 Recognition Sequence) vagy más néven LIR (LC3-interacting region) szekvenciát, amely közvetlenül képes kötődni a fagoszóma felépítésében résztvevő LC3II fehérjékhez<sup>31</sup>. Ez lehetővé teszi a p62 fehérje által jelölt részecskék degradációját a fagolizozómában.

## **2.6. Az autofágia szabályozó mechanizmusai**

Tekintve, hogy az autofágia kritikus szerepet játszik a sejtek homeosztázisának fenntartásában és a stressz során történő túlélésben nem meglepő, hogy igen finom szabályozási mechanizmus határozza meg az aktivitását. Számos tanulmány foglalkozik azzal, hogy a normál körülmények között megfigyelhető alap autofágia aktivitása miként tud meglehetősen gyorsan fokozódni bizonyos stimulációk hatására. Evolúciósan konzervált mivoltából adódóan a szabályozási mechanizmusok nagyon hasonlóak a gombáktól kezdve az emlősökig bezáróan<sup>32</sup>.

### **2.6.1. Nitrogén függő reguláció**

Az aminosav és nitrogén szintben bekövetkező változás elsődleges érzékelője egyben a makroautofágia egyik legfőbb szabályozója az mTOR komplex 1 (mTORC1), amely egy szerin/treonin kináz. Tápanyag bőség esetén ez a molekula komplex az ATG1, ATG13, ULK1 fehérjék és az autofágia-specifikus foszfatidil-inozitol-3-kináz gátlása révén megakadályozza a fagoszóma membrán kialakulását<sup>32</sup>. Továbbá olyan transzkripció faktort (TFEB) blokkol, amely elengedhetetlen a lizoszóma biogenezisének szabályozásához<sup>33</sup>. Aminosav és nitrogén megvonás esetén az mTORC1 inaktiválása révén elindulhat a makroautofágia folyamata.

### **2.6.2. Energia vagy glükóz függő reguláció**

Az autofágia szabályozása glükóz metabolizmuson és energia szinten keresztül szintén létfontosságú a homeosztázis fenntartásához. Glükóz jelenlétében a cAMP aktivált protein kináz A (PKA) megakadályozza az autofagoszóma formációját az ATG1 és ATG13 fehérjék gátlása révén, illetve az AMP aktivált protein kináz (AMPK) inhibitoraként közvetve aktiválja az mTORC1-et, amely gátolja a makroautofágiát. Az autofágiás flux növekedését az mTORC1 AMPK általi inaktiválása teszi lehetővé, amelyet a csökkent ATP és a felhalmozódó AMP szint aktivál. Az AMPK továbbá foszforiláció révén aktiválja az ULK1 és Bcl1 fehérjéket így indítva el az autofágia folyamatát<sup>34</sup>.

Az autofágia tehát egy aktív, evolúciósan konzervált és jól szabályozott folyamat, amely a sejt megfelelő homeosztázisához elengedhetetlen. Ugyanakkor a túlzott autofágiás folyamatok a sejt pusztulásához is vezethetnek, melyet autoapoptózisnak vagy II-es típusú programozott sejthalálnak nevezünk<sup>29,35</sup>.

## **2.7. Az autofágia és az apoptózis kapcsolata**

Habár a két molekuláris mechanizmus különbözik egymástól, mégis meg kell említeni a közöttük lévő kapcsolatot, hiszen mindkét folyamat szabályozásában szerepet játszanak a TP53/p53

és BH3 fehérjecsald tagjai<sup>36</sup>. Továbbá az autofágia az apoptózis *intrinsic* aktiválását gátolja azáltal, hogy végrehajtja a sérült, apoptózist előidéző molekulák és mitokondriumok eliminálását a sejtben. Amennyiben az autofágiás aktivitás elégtelen vagy épp ellenkezőleg, túl fokozottá válik, úgy az apoptózist indukálhat a sejtben. Ugyanakkor az apoptózis képes gátolni az autofágiát, mert a kaszpázok az alapvető autofágiás proteinek eliminálását is elvégezhetik<sup>37</sup>. Jelenleg két folyamat ismeretes, amely autofágia által kiváltott sejthalált von maga után. Az egyik a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPáz pumpával összefüggő *autozis*, illetve a *ferroptózis*, amely során az autofágia a ferritint degradálja, ami reaktív oxigén gyökök felhalmozódását eredményezi<sup>38</sup>.

## **2.8. Az autofágia befolyásolásának lehetőségei**

Mivel az autofágia egy dinamikus, genetikailag és molekuláris mechanizmusokat tekintve is meglehetősen szabályozott folyamat, így lehetőség van a fiziológias szinthez képest fokozni, vagy gátolni az autofágiás aktivitást. Az ATG gének mintegy fele szükséges az autofágiához, továbbá a PI3K komplex az Atg9 és az Atg2-Atg18 komplexek elengedhetetlenek az iniciációhoz<sup>39</sup>.

Az autofágia szabályozásában, mint azt korábban említettem központi szerepet játszik az mTOR (mammalian target of rapamycin) fehérje és komplexei (mTORC1 és mTORC2), amely az autofágiára gátló hatással bír és többek közt olyan alapvető életfolyamatokban tölt be szabályozó funkciót, mint a sejtnövekedés és metabolizmus, fejlődés, öregedés, hypoxiára adott sztrezz válasz<sup>40</sup>. A klasszikus mTOR mediált autofágián kívül természetesen más molekuláris folyamatok is játszhatnak fontos szerepet az autofágia szabályozásában, mint például a Ca<sup>2+</sup>-calpain-G<sub>sα</sub> és a cAMP-Epac-PLC-ε-IP3 útvonalak<sup>41</sup>. Ebből következik, hogy igen sok alkalmazott vagy még fel nem fedezett mediátor és gén létezik, amelyek aktiválhatják vagy gátolhatják az autofágiát. A továbbiakban a potenciális, valamint a már klinikumban alkalmazott, az autofágiás folyamatokra befolyással bíró lehetőségeket részletezem.

### **2.8.1. Autofágiát indukáló szerek**

Jelenleg egyre több kutatás mutat összefüggést bizonyos betegségek patogenezise és az elégtelen autofágiás folyamat között<sup>26</sup>. Ezért intenzív vizsgálatok folynak annak érdekében, hogy minél több stratégiát és terápiás lehetőséget dolgozzanak ki az autofágia fokozásának érdekében. Az 1. táblázatban tüntettem fel a ma ismert és már terápiásan vagy kutatásban alkalmazott szereket.

Autofágia indukálás	mTOR függő útvonál	mTOR független útvonál	Támadáspont
EBSS			Éhezést indukál
Brefeldin A Thapsigargin Tunicamycin			ER stresszt indukál
	Rapamycin Temsirolimus Everolimus Ridaforolimus		mTOR gátló
		SMER Trehalóz	mTOR független aktivátor
		LiCl L690,330 Carbamezapin Valproinsav	IMPáz inhibitor
		N-acetil-D-szfinгоzin	Class I PI3K inhibitor
		Penitrem A	Ca <sup>2+</sup> blokkoló
		Kalpasztatin	Calpain gátló

1. táblázat: az autofágiát fokozni képes lehetőségek

Az autofágia indukálásának legegyszerűbb módja a tápanyag megvonás. Fiziológias körülmények között sejtekben az aminosav hiány indítja meg az autofágiát, amelyet könnyedén elő lehet idézni szérum mentes tápközeggel, amelyből hiányoznak az esszenciális aminosavak<sup>42</sup>. Fehérjeszintézis során az endoplazmatikus retikulumban (ER) felhalmozódott fehérjeaggregátumok úgynevezett endoplazmatikus stresszt váltanak ki. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy az ER stressz szintén indukálhat autofágiás folyamatokat a sejtben<sup>43-45</sup>. Celluláris szinten ez a fehérje újrahasonosítás természetes folyamata. Így az ER stressz kiváltására képes brefeldin A, thapsigargin és tunicamycin képes fokozni az autofágiás aktivitást és mindemellett még az LC3BII és Beclin-1, e két jelentős autofágia marker expresszióját is<sup>46</sup>. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy *Gordon és mtsai* kimutatták: a thapsigargin képes mobilizálni az ER Ca<sup>2+</sup> depóját, amely a citoszólikus kalcium szint megemelkedését és így az autofágia gátlását is eredményezheti<sup>47</sup>.

A rapamycin vagy más néven sirolimus a *Streptomyces hygroscopicus* baktérium által termelt antifungális molekula. Jelenleg is alkalmazzák klinikumban: a szívkatéterezés során behelyezett stentet vonják be vele, mivel immunszuppresszáns hatása révén megelőzhető a kilökődés<sup>48</sup>, továbbá szervtranszplantáción átesett betegeknél is alkalmazzák ezen tulajdonsága okán, megelőzendő az újonnan beültetett szerv kilökődését<sup>49</sup>. Az autofágia szabályozásában központi szerepet játszó mTOR blokkolására és így az autofágia aktiválására *in vivo* és *in vitro* is egyaránt kiválóan alkalmas<sup>50</sup>. A rapamycin alacsony dózisú (25-100 nM) adagolása csökkentette

izolált egérszív modellen az I/R okozta nekrozist és apoptózist<sup>51</sup>. Továbbá I/R-t követően a szívben expresszálódó urokortin, Beclin-1 gátló hatása révén csökken az autofágia<sup>52</sup>. Terápiás készítmények is képesek befolyásolni az autofágiás fluxot, mint például a  $\beta$ -blokkoló propranolol, a Ca-blokkolóként alkalmazott verapamil-ezek stimulálják, míg a  $\beta$ -adrenoreceptor agonista isoproterenol gátolja azt<sup>53</sup>. Terápiás alkalmazását immunkompetens betegekben azonban korlátozza az immunrendszert blokkoló hatása. Éppen ezért intenzív kutatás folyik a rapamycinnel azonos hatású, de kevésbé toxikus anyagok fejlesztése és alkalmazása végett. A vízdékony észteresített rapamycin, azaz a temsirolimust (CCI-779) egérmódellem már sikerrel alkalmazták Huntington-kór kezelésében a huntingtin aggregátumok csökkentése révén<sup>54</sup>. Két másik rapamycin alternatíva (everolimus, deforolimus) is ígéretesek a jövőbeni alkalmazásra, kisebb toxicitásuk és enyhe, dóziszfüggő mellékhatásuk miatt<sup>55</sup>. Más rapamycin alternatívák is léteznek az úgynevezett kis molekulájú rapamycin erősítők (SMER-small molecule enhancers of rapamycin), amelyek mTOR függő módon fokozzák az autofágiát, ugyanakkor nem befolyásolják az Atg5-12, Atg7 és Beclin-1 expressziót<sup>39</sup>. Pontos hatásmechanizmusuk még egyelőre nem ismert. Sarkar et al. pedig a trehalósról mutatták ki, hogy egy mTOR független autofágia aktivátor<sup>56</sup>.

Potenciális autofágia aktivátorok lehetnek még olyan molekulák, mint pl. a LiCl, amely inozitol monofoszfátáz blokkoló hatással bír vagy I. osztályba tartozó foszfatidil inozitol-3-kináz inhibitorok. Bizonyos  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna blokkolók is elősegíthetik az autofágiás folyamatokat, mivel csökkentik az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintet és a csökkent intracelluláris kalcium szint hatására fokozódik a kalpain proteáz aktivitása, károsítva ezzel a heterotrimer G-fehérjéket<sup>41</sup>.

### **2.8.2. Autofágiát gátló szerek**

Az autofágia molekuláris hátterének tanulmányozása során számos potenciális, az autofágia valamely molekuláris mechanizmusát negatívan befolyásoló kémiai mediátort azonosítottak és alkalmaztak különböző sejt- és állatmodelleken<sup>39</sup>. Az autofágia inhibitorokat a 2. táblázatban csoportosítottam mechanizmusuk és támadáspontjuk alapján.

Fagolizoszóma kialakulás	Autofagoszóma formáció	Lizoszóma	Támadáspont
		klorokin	<b>Lizoszóma degradáció gátlása</b>
	3-metiladenin Wortmannin LY294002		<b>PI 3-kináz inhibitor</b>
	Cycloheximid		<b>Fehérje szintézis gátló</b>
Bafilomycin A1			<b>ATP-áz inhibitor</b>
		Hydroxychloroquine Lys05	<b>Lizoszóma ellúgosítás</b>
		Leupeptin E64d Pepstatin A	<b>Proteáz inhibitor</b>

2. táblázat: autofágiát gátolni képes lehetőségek

A PI3-kináz enzimet gátló 3-metiladenin volt az első azonosított és legszélesebb körben alkalmazott autofágia gátló szer<sup>57</sup>. Az emlős sejtekben található PI 3-kináz enzimeket 3 osztályba sorolják: az I. osztályba tartozó kinázok gátolják az autofágiát, míg a II. nincs ráhatással. Ezzel szemben a III. osztályú PI 3-kináz elengedhetetlen az autofágia korai szakaszában a fagoszóma formáció során<sup>58</sup>. Későbbi tanulmányok megerősítették, hogy a 3-metiladenin a wortmanninnal és LY294002 molekulával egyetemben blokkolják az autofágiát a III. osztályú PI3 kináz gátlása révén. Azonban a legújabb kutatások során azt tapasztalták, hogy a 3-metiladenin képes fokozni az autofágiás fluxot, amennyiben hosszan van adagolva megfelelő tápanyag ellátottság mellett. Az éhezés indukálta autofágiát azonban gátolja. A Wortmannin ugyanakkor bármilyen körülmény is áll fenn, permanens III. osztályú PI 3-kináz gátló<sup>59</sup>.

Az eukarióta sejtekben található ősi, evolúciósan konzervált enzim a vakuoláris H<sup>+</sup> ATP-áz<sup>60</sup>. Az enzim intracelluláris vakuólumokba, endoszómákba, lizoszómákba juttat protonokat a membránon keresztül, így a belső milió savassá válik. A bafilomycin A1 molekula ezt az ATP-áz enzimet képes gátolni, így a lizoszóma acidifikációját is. *Klionsky* és munkatársai ugyanakkor kimutatták, hogy a bafilomycin A1 nem akadályozza meg az érett autofagoszóma és lizoszóma fúzióját<sup>61</sup>.

Léteznek más anyagok is, amelyek a lizoszóma lumenében uralkodó alacsony pH-t képesek lúgosítani, mint pl. a klinikumban is alkalmazott antimaláriás és reuma ellenes szerek a *chloroquin* és *hydroxichloroquin*<sup>14,39</sup>. *In vitro* autofágiát blokkoló hatásához azonban igen magas, millimólos koncentráció szükséges, amely elérése élő szervezetben nem tartható fent és súlyos mellékhatásokat is okozhat. A *chloroquin* egy dimer formája a Lys01, illetve ennek vízdékony sója a Lys05 molekula tízszer hatékonyabb autofágia inhibitornak bizonyult a chloroquinénél<sup>62</sup>. A lizoszómán belüli akkumulálódása és lúgosító hatása miatt sokkal jobb terápiás szernek ígérkezik.



A lizozómában található proteázok gátlása is egy lehetséges stratégia az autofágia blokkolására. A leupeptin a természetben előforduló proteáz inhibitor amely cisztein, szerin és threonin peptidázokat gátol. Autofágia blokkoló hatását a lizozóma által közrezárt citoszólikus részek lebontásának gátlásával fejt ki, ezáltal fagolizozóma és inklúzis testek akkumulációját idézi elő a sejtben<sup>63</sup>. *Cycloheximid*del alkalmazva pedig meggátolja az autofágiás vakuólumok képződését és a lizozómális enzimek szintézisét<sup>64</sup>. Az E64d és a pepsztatin A szintén képesek gátolni az autofágiát a lizozómális proteázok gátlásával. Az E64d molekula membránon jól permeál és a lizozómában jelenlevő *cathepsin* B, H és L míg a pepsztatin A a *cathepsin* D és E molekulákat gátolja<sup>39</sup>.

Egyre több, a klinikumban terápiás szerként alkalmazott hatóanyagról derül ki, hogy autofágiát aktiváló vagy gátló hatása van és egyre több újabb anyagot fedeznek fel. Azonban ezek alkalmazása meglehetősen korlátozott, mivel hatásuk eléréséhez magas dózist kell alkalmazni és ebből kifolyólag súlyos mellékhatásaik lehetnek, nem beszélve a lokális alkalmazás nehézségeiről.

## 2.9. Autofágia a kardiovaszkuláris rendszerben

Ahhoz, hogy a szívizomsejtek feladataikat teljes mértékben el tudják látni, elengedhetetlen a megfelelő oxigén és energiaellátottság, illetve a rendesen funkcionáló és helyes konformációt felvett, érett fehérjék jelenléte. Megelőzendő az aggregátumok képződését, a fehérjeszintézist többszörös ellenőrzési folyamat kíséri a sejtekben, azonban ennek ellenére fiziológias körülmények között is kialakulhatnak hibás vagy sérült fehérje aggregátumok. Ezek hatástalanításában a chaperon- és ubiquitin-mediálta protein degradáció mellett a szívszövetben is megfigyelhető alap autofágiás folyamatok játszanak szerepet. Ezen molekuláris folyamatok elengedhetetlenek a kardiomiociták homeosztázisának, struktúrájának és funkciójának fenntartásához<sup>65</sup>. Ezek a folyamatok párhuzamosan, egymást kiegészítve vesznek részt a degradációban és újrahaznosításban. Akad azonban olyan példa is, amelyben az autofágia folyamata káros hatással van a szívre. A szívben abnormálisan funkcionáló autofágia eredménye például a nagyon ritka, X kromozómához kötött, öröklődő Danon-betegség. A Danon-kórban szenvedő pácienseket *cardiomyopathia*, vázizom *myopathia* és mentális retardáció triászja jellemzi, amely a lizozóma-kapcsolt membrán protein 2 (lysosome-associated membrane protein-2, LAMP-2) fehérjét kódoló gén mutációjának köszönhető. A génmutáció a LAMP-2 csökkent expresszióját eredményezi, így fokozott autofágiás folyamat figyelhető meg a váz- és szívizomzatban<sup>66</sup>.

Az autofágiás aktivitás megváltozása sokkal inkább jellemző patológiás elváltozások során, úgymint az I/R sérülés, hipertenzió, hipertrófia, kardiomiopátia vagy szívelégtelenség. A megnövekedett autofágiás folyamatok hatása a szívszövetre azonban meglehetősen vitatott. Az

autofágia hatásából származó előny vagy hátrány is attól függ, hogy milyen típusú és mennyi ideig tartó stressznek van kitéve a szívszövet. Egyes kutatások kimutatták az autofágia előnyökkel járó szerepét atheroszklerózis során. Az oxidatív behatás során keletkező károsodott lipideket és fehérjéket is eltávolítja, továbbá a gyulladás révén sérült komponenseket a plakkból eltávolítja<sup>66</sup>. Yan és munkatársai krónikus iszkémiát túlélő miokardiumban emelkedett autofágiás folyamatokat figyeltek meg, ami az autofágia túlélést segítő tulajdonságát támasztja alá<sup>67</sup>. Gurusamy és munkatársai pedig iszkémiához adaptálódott miokardiumban figyeltek meg fokozott autofágiát, amelynek előnyös hatását wortmaninnal, az autofágiát gátolni képes vegyülettel meg tudták előzni<sup>68,69</sup>. A sérült mitokondriumok eltávolítását végző mitofágia is protektív az I/R sérülések során<sup>70</sup>. Ezzel ellentétben az autofágia gátlása segítette a sejtek túlélését I/R-nak kitett kardiomiocitákban<sup>52</sup>. Matsui és mtsai pedig megfigyelték az autofágia jótékony szerepét iszkémia alatt, ami ugyanakkor a reperfúzió során már károsnak bizonyult<sup>71</sup>. Pattison és munkatársai kimutatták azt, hogy az egyes neurodegeneratív betegségekben is szerepet játszó poliglutaminból felépülő pre-amiloid oligomer szívelégtelenséget okoz. Transzgén egerekben vizsgálták a folyamatot és vizsgálódásaik során többek között kimutatták, hogy ezekben az egerekben a megnövekedett poliglutamin expresszió mellett az autofágia is emelkedett a szívizomsejtekben<sup>72</sup>. Egy másik tanulmány pedig rávilágított arra a tényre, hogy az I/R indukálta autofágia károsítja a kardiomyociták gap-junction kapcsolataiban található connexin43 fehérjét, amely elengedhetetlen az egyes szívizomsejtek közötti jelátvitel zavartalan folyamatáért<sup>73</sup>. A szakirodalomban azonban többnyire protektív szerepet tulajdonítanak az autofágiának a szívizomban I/R során<sup>74</sup>.

### **2.9.1. Autofágia iszkémia-reperfúzió alatt**

Decker és munkatársai kísérleteikben izolált nyúl szíven vizsgálták Langendorff módban a különböző hosszúságú iszkémia hatását a szívizomzatra. Kutatásuk során azt tapasztalták, hogy 20 perc iszkémia kromatin kondenzációt, mitokondriumok tágulását és az endoplazmatikus retikulum duzzadását okozza, de jelentős lizoszóma szám növekedést vagy glikogén degradációt nem észleltek. Azonban 15 perc reperfúziót követően autofágiás aktivitást figyeltek meg, amely a reperfúzió során tovább fokozódott. 40 perc iszkémia már önmagában elegendő az autofágia fokozott aktivitásának előidézéséhez, amelyet a reperfúzió csak tovább fokozott, míg az 1 órán át tartó iszkémia már súlyosan károsítja, mi több gátolja az autofágia folyamatát<sup>75,76</sup>, holott ilyenkor az iszkémia során fellépő oxigén és tápanyag hiányt ellensúlyozandó, az autofágia már egyfajta protektív szerepet töltene be. A túlságosan hosszú iszkémia időtartama így már irreverzibilis károsodásokhoz vezet.

Reperfúzió során a lehetőségekhez és a beavatkozásokhoz mérten helyreáll a szívszövet tápanyag és energia ellátása, így az AMPK aktiváció megszűnik, helyette a Beclin-1 fehérje hatására marad továbbra is aktív az autofágia<sup>71</sup>. Míg iszkémia során az autofágia protektív szerepet tölthet be, addig a reperfúzió alatt már korántsem sorolható a szív túléléséhez hozzájáruló folyamatok közé a következő okok miatt:

1. A rendkívül magas autofágiás aktivitás sejthalálhoz vezethet.
2. Reperfúzió során fokozott Beclin-1 és csökkent Bcl-2 termelés figyelhető meg a miocitákban. Ennek következményeként az emelkedett Beclin-1 expresszió fokozott autofágiát és sejthalált eredményez.
3. Az autofágia és az apoptózis különböző mediátorok révén egymással szorosan összekapcsolt folyamat. Éppen ezért az emelkedett autofágiás aktivitás apoptózist eredményezhet.
4. A reperfúzió hatására termelődő H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminálását végző kataláz enzim is szubsztrátja lehet a lizoszómák általi degradációnak, amely a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felhalmozódását és így az oxidatív stressz fokozódását eredményezheti<sup>77</sup>.

### **3. Az autofágia és a reperfúzió indukálta fibrilláció kapcsolata**

Mint azt már korábban említettük a reperfúzió során fellépő kamrai fibrilláció jelenségét már számos állatmodellen és humán szervezetben egyaránt megfigyelték<sup>9</sup>. A reperfúzió indukálta arrythmiák-így a kamrafibrilláció is-közvetlenül a keringés helyreállásakor következik be, továbbá az iszkémia-reperfúzió miatt kialakult oxidatív stressz a sejt homeosztázisának zavarát okozza, amely az autofágia indukálását vonja következképp maga után. Az autofágia szívszövetben betöltött szerepe kettős. Egyrészt a túlélést segíti vagy épp ellenkezőleg, a sejtpusztulást fokozza attól függően, hogy milyen intenzitással van jelen a sejtekben. Minél intenzívebb az autofágia, annál nagyobb eséllyel indít el patológiás reakciókat a szívizomsejtekben és működési zavarokat a szívizomzatban<sup>12</sup>. Manapság csak kevés tanulmány foglalkozik az arrythmiák és az autofágia lehetséges kapcsolatával és módosításával. Ezek közül néhány azt feltételezi, hogy a pitvarfibrilláció összefüggésben van a „hibás” autofágiával<sup>78</sup>. Egy másik tanulmányban pedig kimutatták azt, hogy mitrális és trikuszipidális regurgitáció eredményeképpen kialakult hipertrófia során, emelkedett autofágiás aktivitás figyelhető meg. Ez az emelkedett aktivitás azonban nem minden esetben okozott a páciensekben pitvarfibrillációt<sup>79</sup>.

## 4. Célkitűzések

Disszertációm fő tárgya a kamrafibrilláció során megfigyelhető autofágiás folyamatok megfigyelése és a közöttük lévő kapcsolat feltárása egér és patkány modelleken. Kísérleteink során célul tűztük ki a kamrafibrilláció és autofágia közötti lehetséges ok-okozati összefüggés közelebbi megértését és pontosítását: azaz hogy az autofágia szerepet játszik-e a kamrafibrilláció kialakulásában, vagy éppenséggel a kamrafibrilláció váltja ki az autofágiát? Lehetséges-e, hogy a fibrillációra hajlamos szivekben kialakul az arrhythmia tekintet nélkül az autofágiára és emiatt később nem képes megfelelő szinten tartani azt?

Célkitűzésünk volt továbbá az autofágia és a kamrafibrilláció kapcsolatának és molekuláris hátterének jobb megértése állatmodellek segítségével.

A fenti kérdések megválaszolásának érdekében, a következő kísérleteket végeztük el:

- Az iszkémia-reperfúzió okozta kamrai fibrilláció során bekövetkező autofágiás folyamat aktivitásának mérése.
- A mesterségesen előidézett és különböző időtartamú kamrai fibrillációk hatásai az izolált dolgozó szív funkcióira és az autofágiás folyamatokra.
- Molekulárisbiológiai vizsgálatokkal megállapítottuk a kamrafibrilláció hatására expresszáldó autofágiás markerek szintjét, amelyekből következtethettünk az autofágia jelentőségére és mértékére.
- A posztfibrilláció okozta infarktusz terület nagyságának meghatározása és hogy ezek milyen korrelációt mutatnak az autofágiás és apoptotikus fehérjék expressziójának alakulásával, a kamrafibrilláció időtartamának fényében izolált dolgozó patkányszív modellen.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. Kísérleti állatok-egerek és patkányok

Kísérleteink során hím Sprague-Dawley patkányokat (370-400g) és hím C57BL/6 egereket (25-35g) használtunk fel (Charles River Laboratories, Németország). Az állatok tartása és felhasználása során minden esetben a DEMÁB irányelvei szerint jártunk el, összhangban az ide vonatkozó Európai Unió és *Guide for the care and use of laboratory animals* előírásaival. Az állatkísérelt engedélyszáma 3/2012/DEMÁB Az állatok *ad libitum* férhettek hozzá standard rágcsáló táphoz és vízhez. A kísérletek előtt az állatok nem részesültek semmiféle kezelésben.

### 5.2. Globális miokardiális iszkémia és reperfúzió izolált egérsziveken

Az egereket intraperitoneálisan (i.p.) adott nátrium-pentobarbitál (60 mg/ttkg) injekcióval altattuk el. Véralkotóként intravénás (i.v.) heparint alkalmaztunk 1000 IU/ttkg dózisban. Az anesztéziát követően torakotómiát végeztünk és a sziveket jéghideg módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferbe helyeztük, melynek összetétele millimol koncentrációban: NaCl 118; KCl 5,8; CaCl<sub>2</sub> 1,8; NaHCO<sub>3</sub> 25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; MgSO<sub>4</sub> 1,2 és glükóz 11,1. Ezt követően az aortán át kanüláltuk a sziveket és 30 percen keresztül perfundáltuk Krebs-Henseleit oldattal 80 Hgmm nyomás alkalmazásával. A puffert a kísérlet időtartama alatt karbogén gázzal (95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>) buborékoltattuk és 37 °C-on tartottuk. Ezt követően 25 perc globális iszkémiát idéztünk előt, amit 80 perc reperfúzió követett. A reperfúziós alatt folyamatos EKG regisztrációt végeztünk (ADInstruments, Powerlab, Castle Hill, Australia). Attól függően, hogy az I/R indukált-e kamrai fibrillációt a sziveket két csoportra osztottuk: fibrillált és nem fibrillált. Irreverzibilis kamrai fibrillációnak tekintettük a sziveket akkor, ha legalább 3 percig tartó arrhythmiát regisztráltunk.

### 5.3. Izolált dolgozó patkány szív preparátum

Az állatokat testsúlymérést követően elaltattuk i.p. ketaminnal (50 mg/kg) és xylazinnal (10 mg/kg). A teljes anesztézia ellenőrzését követően az állatoknak i.v. heparint (1000 IU/kg) adtunk. A mellkas felnyitását követően az állatok szívét kivettük és jéghideg módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferbe helyeztük. Ezt követően kanüláltuk a szív aortáját, amelyet 10 percen keresztül Krebs-Henseleit oldattal perfundáltuk nem dolgozó Langendorff módban, 100 vízcentiméter nyomás mellett azért, hogy a szívben maradt vért kimossuk. Továbbá, ez idő alatt kanüláltuk a pulmonáris vénát, s ezt követően pedig a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk át. Dolgozó mód során az aorta felőli koronária beáramlást lezártuk és a *vena pulmonalis* felől perfundáltuk a sziveket 17 vízcentiméteres nyomással. A perfúziós oldat a tüdővénán keresztül a bal pitvarba, majd

a bal kamra által kipumpálva az aorta kanülön át távozott 100 vízcentiméter nyomással szemben. A puffert a kísérlet időtartama alatt karbogén gázzal (95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>) buborékoltattuk és 37 °C-on tartottuk.

Dolgozó mód során a koronária- és aortaátáramlás (CF, AF) mérést végeztünk, amely a perfúziós oldat szíven keresztüli átáramlásának 1 percen keresztül történő összegyűjtésével történt. A kísérlet során a szívritmust (HR), aortanyomást (AoP) és ennek idő szerinti első deriváltját (dp/dt) folyamatosan regisztráltuk (ADInstruments, Powerlab, Castle Hill, Australia). A mért paraméterek segítségével meghatározhattuk a perctérfogatot (CO), amely az AF és CF összege (ml/perc), valamint a CO és HR hányadosával az ún. verőtérfogatot (SV, ml).

#### **5.4. Arrhythmia kiváltása elektromos ingerléssel**

A kísérletek folyamán 10 perc dolgozó módot és a fentebb részletezett szívparaméterek regisztrációját követően a szíveket visszakapcsoltuk „nem dolgozó” Langendorff módba. A szív apexébe ezután a regisztrációt végző készülék elektromos ingerlésre alkalmas elektródját helyeztük, míg egy másik vezetéket az aorta kanülre csíptetve földeltük a rendszert. A szoftver segítségével beállítottuk az áramerősséget (20 mA), a frekvenciát (20 Hz)<sup>80</sup>. Az ingerlések időtartama csoportonként változott: 1, 3 és 10 perc, valamint kontroll. A kontroll csoport szíveit nem tettük ki elektromos impulzusnak, csupán az elektródot helyeztük be az apexbe és hagytuk, hogy 10 percen keresztül Langendorff módban működjön. Az arrhythmia kiváltását követően a szíveket további 10 percig hagytuk regenerálódni Langendorff módban, majd pedig visszakapcsoltuk dolgozó módba és további 110 percen keresztül működtettük. A ritmusgenerálást követő 120 perces perfúzió 30-ik, 60-ik és 120-ik percében a szívfunkciók regisztrálását végeztük a kísérlet végén pedig a szíveket további felhasználásra elraktároztuk -80 °C-on.

#### **5.5. Elhalt területek meghatározása TTC festés segítségével patkányszíveken**

Az infarktusos terület meghatározására a szívek egy részén (csoportonként 4db) trifeniltetrazólium klorid (TTC) festést alkalmaztunk. 50 ml TTC oldatot (millimolos koncentráció: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 88,05; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,66; TTC 29,86) a 120 perces perfúzió végén 37 °C-ra felmelegítettük és az aortán keresztül injektáltuk a szívbe, ezt követően -20 °C-on tároltuk. A mintákat az apikobazális tengelyre merőlegesen a lehető legvékonyabb (1-2 mm) metszetekre szeleteltük, leitattuk a maradék folyadékot, majd a metszeteket beszkeneltük és tömegüket egyenként lemértük. A beszkenelt metszeteket ezután ImageJ szoftverrel elemeztük: először pixelszámot társítottunk a szív metszet egészéhez és az infarktusos területhez. Az infarktusos rész és az egész metszet területének hányadosát ezután megszoroztuk a metszet tömegével. Legvégül összesítettük az egyes

eredményeket és az infarktus mértékét az infarktusos rész/teljes szív tömege x100 képletből %-ban kaptuk meg.

## **5.6. Fehérje izolálás és Western blot**

Az izolált szív-kísérleteket követően a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Fehérjeizoláláshoz patkányszív esetén 300 mg-ot míg egérszívből 100 mg-ot használtunk fel. A szövethomogenizáláshoz használt puffer összetétele: 25 mM Tris-HCl, pH8, 25 mM NaCl, 1mM Na-ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 nM okadán sav, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1x proteáz gátló koktél, desztillált víz. A szívdarabokhoz hozzáadtuk a homogenizáló puffert és elektromos roncsoló segítségével, jegen tartva homogenizáltuk. Miután a szövetet sikerült teljes mértékben homogenizálni, a mintákat 2000 rpm sebességgel 4 °C-on 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd a felülúszót további 20 percen át, 4 °C-on és 10000 rpm sebességgel centrifugáltuk. Az így kapott citoszolikus frakciót használtuk tovább. A minták fehérje koncentrációját BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg, majd Laemmli puffert adtunk hozzájuk és 10 percen keresztül 100 °C-on inkubáltuk.

### **5.6.1. Western blot vizsgálat egérszíveken**

Az állatszívekből a következő fehérjék expressziós szintjét határoztuk meg: LC3B, ATG5, ATG12, ATG7, Bcl-2 és Beclin-1. A fehérjéket poliakrilamid gél elektroforézis segítségével méret szerint elválasztottuk, méretüktől függően 12% vagy 15%-os akrilamid koncentrációt használtunk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása 5%-os sovány tejport tartalmazó TBS pufferrel történt, amely 0,5% Tween-t tartalmazott. A blokkolás folyamatos rázatás mellett szobahőmérsékleten történt 60 perces inkubációs idővel. A membránok ezután 4 °C-on és egy éjszakán keresztül voltak inkubálva a primer antitestekkel TBS pufferbe hígítva a következő arányokban: LC3B(1:333), ATG7(1:33), ATG5(1:1000), ATG12(1:1000), Beclin-1 (1:1000), Bcl-2(1:1000), GAPDH (1:20000). Az inkubációt követően a membránokat háromszor átmostuk TBS pufferrel, hogy a felesleges, nem kötődött antitesteket eltávolítsuk. A mosást követően a membránokat 1 órán keresztül inkubáltuk tormaperoxidázzal kapcsolt szekunder antitesttel szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően újabb mosás következett, majd pedig Western HRP (Millipore, Billerica, MA, USA) szubsztrát hozzáadásával a kemilumineszcenciát Röntgenfilmekre exponáltuk. A filmeket szkennel segítségével digitalizáltuk és az optikai denzitást ImageJ szoftverrel elemeztük. A fehérjeexpressziót a GAPDH fehérjéhez viszonyítva határoztuk meg.

### 5.6.2. Western blot analízis patkány szíveken

A fehérjék méret szerinti elválasztását a BIO-RAD TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit segítségével végeztük. A gélek akrilamid koncentrációját a detektálandó fehérjék méretének ismeretében határoztuk meg 5% és 20% között. Elektroforézist követően a géleket UV fényben aktiváltuk a gyártó leírása alapján, majd transzferáltuk PVDF membránra. Transzferálást követően a membránokat 5%-os BSA oldattal blokkoltuk, majd pedig 4 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk primer antitestekkel: LC3B (1:1000), Atg5 (1:500), Atg12(1:500), p62 (1:1000), hasított kaszpáz-3 (1:1000), mTOR (1:2000) és p-mTOR (1:2000) (CellSignaling, Danvers MA, USA).

Az atmoszféra követően a membránokat 1,5 órán keresztül, HRP-vel konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk (CellSignaling, Danvers MA, USA), szobahőmérsékleten. Újabb mosást követően a membránokra Bio-Rad Clarity Western ECL szubsztrátot helyeztünk. Az így létrejövő fotoemissziós reakció detektálásához ChemiDoc OneTouch (Bio-Rad, Hercules CA, USA) készüléket használtunk. A kapott eredményeket a Bio-Rad ImageLab (Hercules CA, USA) szoftverével értékeltük ki. A stain free technológia az úgynevezett teljes protein normalizáció (TPN) elvén alapszik. Ennek lényege, hogy a gélben található trihalometán és a fehérjéket felépítő aminosavak közül a triptofán és származékai UV fény hatására kovalens kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Ez a módosítás lehetővé teszi a fehérjék későbbi fluoreszcens detektálását erre alkalmas eszközzel a transzferálást követően. Így, meghatározhatjuk az egyes membránok teljes fehérje mennyiségét és ehhez tudjuk hasonlítani az antitesttel jelölt fehérjéket. A módszernek számos előnye van a hagyományos *housekeeping* normalizációval szemben, mint például a jobb reprodukálhatóság, precízebb expressziós szint meghatározás és nem utolsósorban a transzferálás nyomonkövethetősége<sup>81</sup>.

### 5.7. Apoptózis detektálása patkányszíven fluoreszcens jelöléssel

A kamrafibrilláció szívizom sejtekre gyakorolt hatását In Situ Cell Death Detection Kit segítségével végeztük el (Roche, Mannheim, Németország). Ez a módszer az apoptózis során bekövetkező DNS fragmentáción alapszik. Az így szabaddá váló 3'-OH végekhez a detektálás során használt TdT enzim templát független, fluoreszcens festékekkel jelölt nukleotidokat kapcsol. Mivel az épen maradt DNS molekulák 3' végéhez a TdT enzim nem képes nukleotidokat kapcsolni, így csak azok a sejtmagok fognak jelet adni, amelyekben a programozott sejthalál aktív folyamatként volt jelen. Reperfúziót követően a szívek apexét 4% formalinos oldatban fixáltuk 48 órán keresztül 4 °C-on. Később a formalint 70%-os etanolra cserélve dehidratáltuk a mintákat és paraffinba ágyazást követően 3,5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Hisztokémia előtt a metszeteket paraffin



mentesítettük xilénben és acetonban, majd pedig rehidratáltuk 70%-os etanolban és vízben. Ezt követően a mintákat 12 perc Na-citrát pufferben (10 mM, pH 6) forralva feltártuk.

Miután lehűlt a puffer a metszeteket 2x5 percen át PBS-ben mostuk, majd pedig 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk a TdT enzim keverékkel. Újabb mosást követően DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) festékkel jelöltük a sejtmagokat. A feleslegben maradt festéket PBS-sel lemostuk és Moviollal rögzített fedőlemezzel lefedtük a metszeteket. A fluoreszcens jeleket Axioscope.A1 mikroszkóp (Zeiss, Jéna, Németország) és HBO100 illuminátor segítségével detektáltuk. A detektálás során az apoptotikus sejtek a kék (DAPI) szín mellett piros színt is emittáltak. A két hullámhosszon detektált képeket ZEN 2012 szoftver segítségével (Zeiss, Jéna, Németország) egyesítettük és az így megfigyelhető bíbor színt vettük apoptotikusan pozitívnak, míg a csak kék színű jellel detektálható sejtmagokat nem apoptotikusnak. Az apoptózis mértékét ezután a TdT pozitív sejtek számának, illetve az összes sejtszám százalékos arányával határoztuk meg.

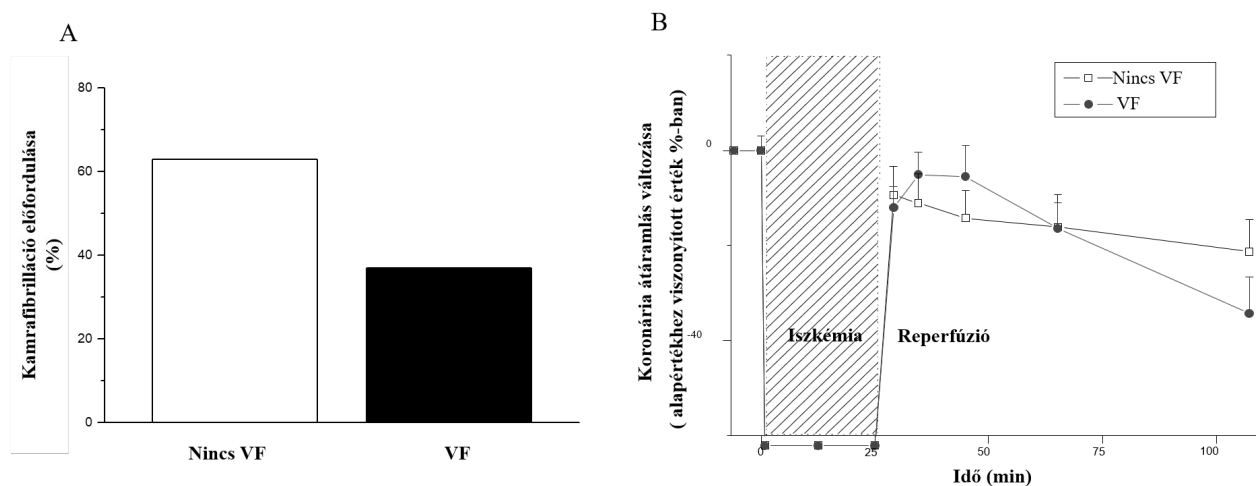
## **5.8. Statisztikai elemzés**

A kapott adatokat a számtani átlag  $\pm$  a középérték standard hibájával adtuk meg. Az egyes csoportokban történt eltérést az egy pontos ANOVA-teszttel értékeltük, ezt követően Bonferroni -féle poszttezzttel elemeztük tovább GraphPad Prism 5.0 szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha  $p < 0,05$  volt.

## 6. Eredmények

### 6.1. Kamrafibrilláció kialakulása iszkémia-reperfúzió átesett egérszívekben

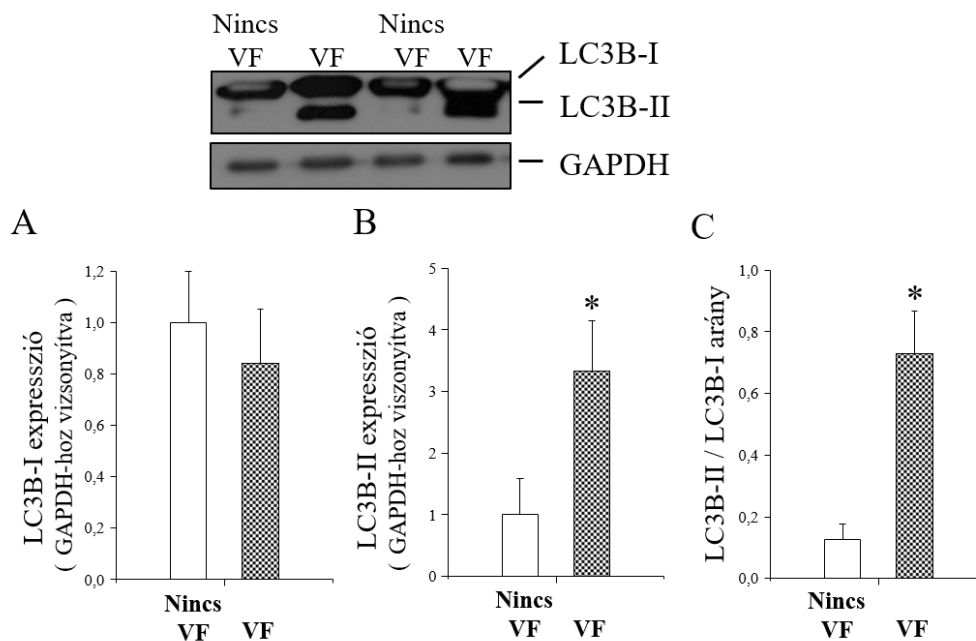
Összesen 21 izolált egérszívet vizsgáltunk a kísérlet során. A 25 percet követő globális iszkémián átesett egérszívek közül nyolc szíven volt megfigyelhető kamrafibrilláció, míg 13 szív esetében nem volt arhythmia a reperfúziót követően (3. ábra A). A két csoportban mért koronária átáramlás változásában sem volt tapasztalható szignifikáns különbség (3. Ábra B).



3.ábra: A 25 perc globális iszkémiát követően kialakuló kamrafibrillációk előfordulásának gyakorisága (A) és ennek hatására a koronária átáramlásban bekövetkező változások (B). Nincs VF szívek n=13, VF szívek n=8, \*p<0,05 Nincs VF vs. VF

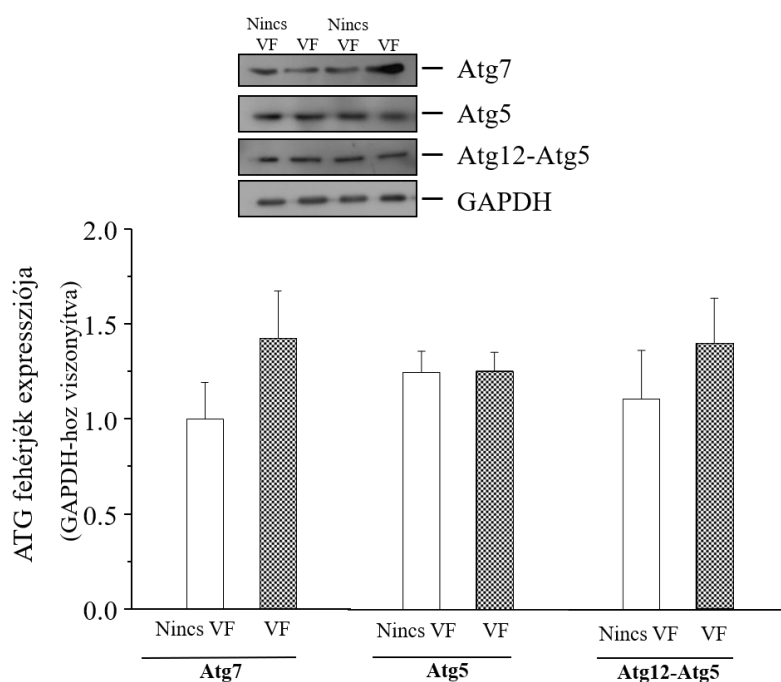
### 6.2. Autofágiás és apoptotikus fehérjék Western blot analízise egérszíveken

Az LC3B-I expressziót tekintve (4. ábra A) nem volt jelentős különbség a fibrilláción átesett és a nem fibrillált egérszívek között. Ugyanakkor az LC3B-II fehérje (3. ábra B) szignifikáns emelkedést mutatott a fibrillált csoportban, amely az autofagoszóma képződésének egyik legmegfelelőbb indikátora. Továbbá a két fehérje (4. ábra C) egymáshoz viszonyított arányában is jelentős eltérés mutatkozott a fibrillált csoport esetében.



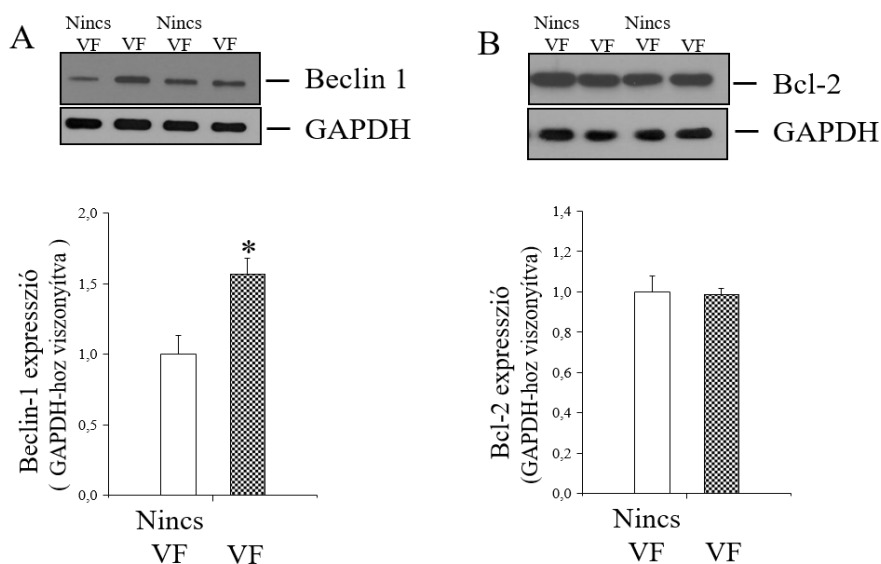
**4. ábra:** Az iszkémia-reperfúzió-indukálta kamraifibrilláción átesett szívekben megfigyelhető LC3B expresszió változása a nem fibrillált szívekhez viszonyítva. (n=4 csoportonként, \*p<0,05 Nincs VF vs. VF)

Az autofagoszóma képződésben szintén fontos szerepet játszó, ubiquitin szerű konjugációs rendszer expressziójának általunk vizsgált fehérjéi a Atg5, Atg12 és Atg7 (5. ábra). Az Atg5 és Atg12 fehérje kovalens kötődését az Atg7 révén jön létre, majd ezután Atg5-12 komplexként vesz részt a fagoszóma formációjában. A Western blot vizsgálatokat követően nem tapasztaltunk jelentős emelkedést a vizsgált Atg fehérjék expressziójában a fibrilláción átesett szívek esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva.



5. ábra: Az iszkémia-reperfúzió által előidézett kamrafibrilláció hatása az autofágiában szerepet játszó Atg fehérjék expressziójára. (n=4 csoportonként, \*p<0,05 Nincs VF vs. VF)

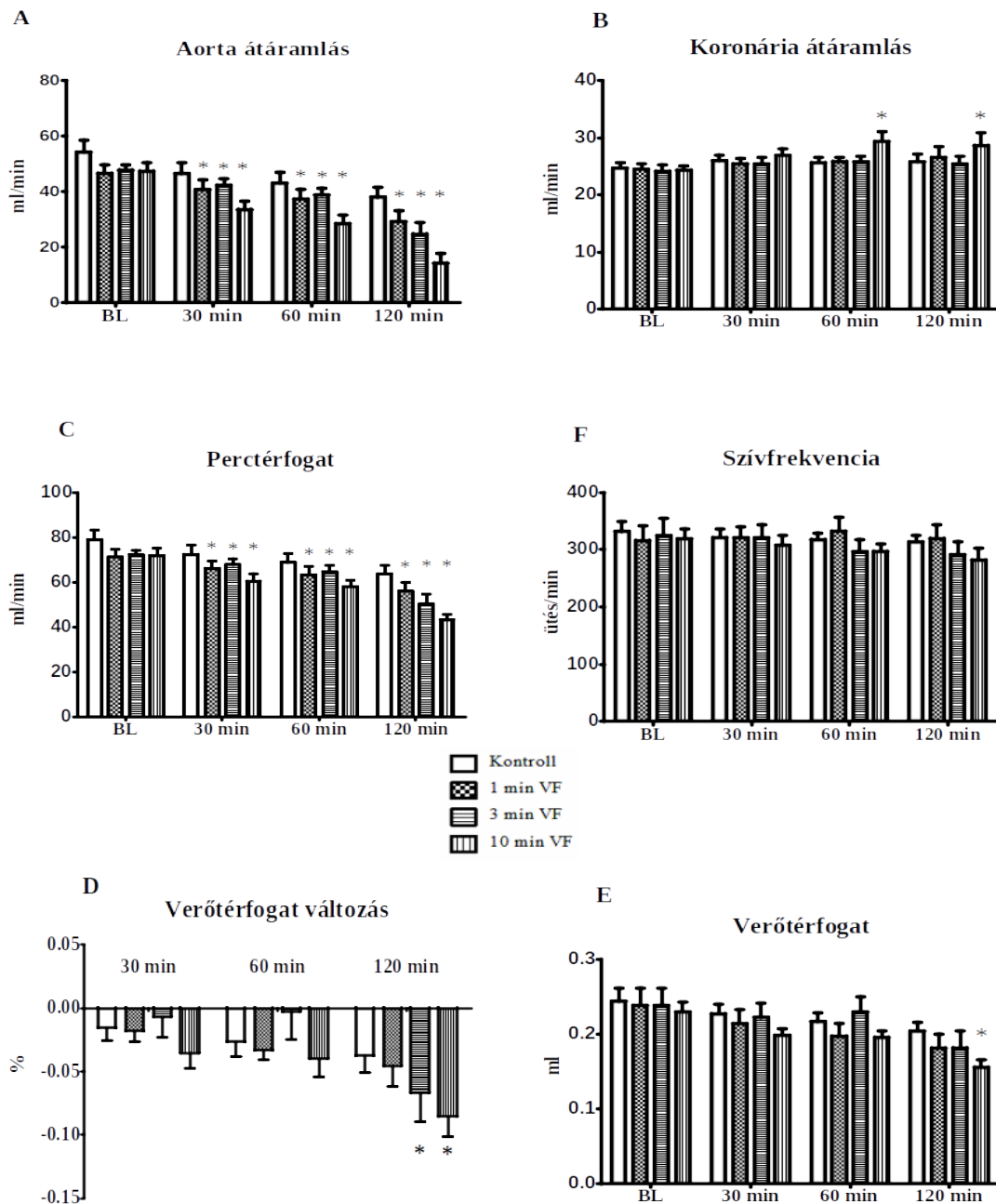
Az autofágia szabályozásában szerepet játszó fehérje a Beclin-1 és a Bcl-2 expresszióját is vizsgáltuk. A Bcl-2 expressziójában-amely a Beclin-1 szabályozását végzi-nem tapasztaltunk eltérést a fibrillált és nem fibrillált csoport között. Ugyanakkor a Beclin-1 kifejeződése szignifikánsan nőtt a kamrafibrilláción átesett szívekben (6. ábra).



6. ábra: a Beclin-1 és Bcl-2 fehérje szintjeinek változása egérszívekben I/R okozta kamrafibrillációt követően. (n=4 csoportonként, \*p<0,05 Nincs VF vs. VF)

### 6.3. A kamrafibrilláció hatása a balkamra funkciókra patkánymodellben

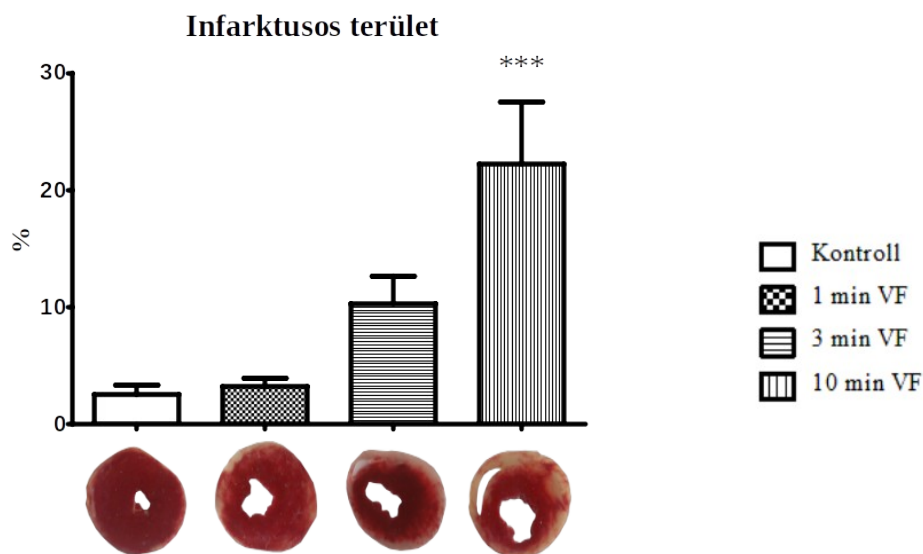
Elektromos stimulálás által kiváltott és különböző hosszúságú fibrilláció előtt és után folyamatosan regisztráltuk a szívfunkciókat a 30, 60, és 120 percben (7.ábra). Az aortaátáramlásban (7. ábra A) és a perctérfogatban (7. ábra, C) bekövetkező változás mindegyik csoportban jelentős mértékű volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. A szívfrekvencia (7. ábra, F) és a verőtérfogatban (7. ábra, E) nem tapasztaltunk szignifikáns változást, mint ahogy a koronária átáramlás (7. ábra, B) számos esetében sem. Jelentős csökkenés volt viszont megfigyelhető a verőtérfogat változásában (7. ábra, D).



7. ábra: A szívfunkciók alakulása kamrafibrilláció előtt (BL) és a fibrillációt követően a 30, 60, és 120 percben. (n=6 csoportonként, \*p<0.05)

#### 6.4. A kamrafibrilláció hatása az infarktusos terület nagyságára izolált dolgozó patkányszíven

A szívek egy csoportján a kamrafibrillációt és a 120 perc post-fibrillációs perfúziót követően TTC festést alkalmaztunk, meghatározandó a kamrai fibrilláció által kiváltotta iszkémiás károsodás mértékét (8. ábra). Mint ahogyan az a 7. ábrán látható nem volt tapasztalható szignifikáns változás az elhalt területek nagyságában az 1 és 3 perc időtartamú kamrafibrilláció esetén a kontrollhoz viszonyítva. Mindazonáltal a 10 perces fibrilláción átesett szívek elhalt területeinek nagyságát, mintegy tízszeresen megnövelték a kontroll csoporthoz viszonyítva.

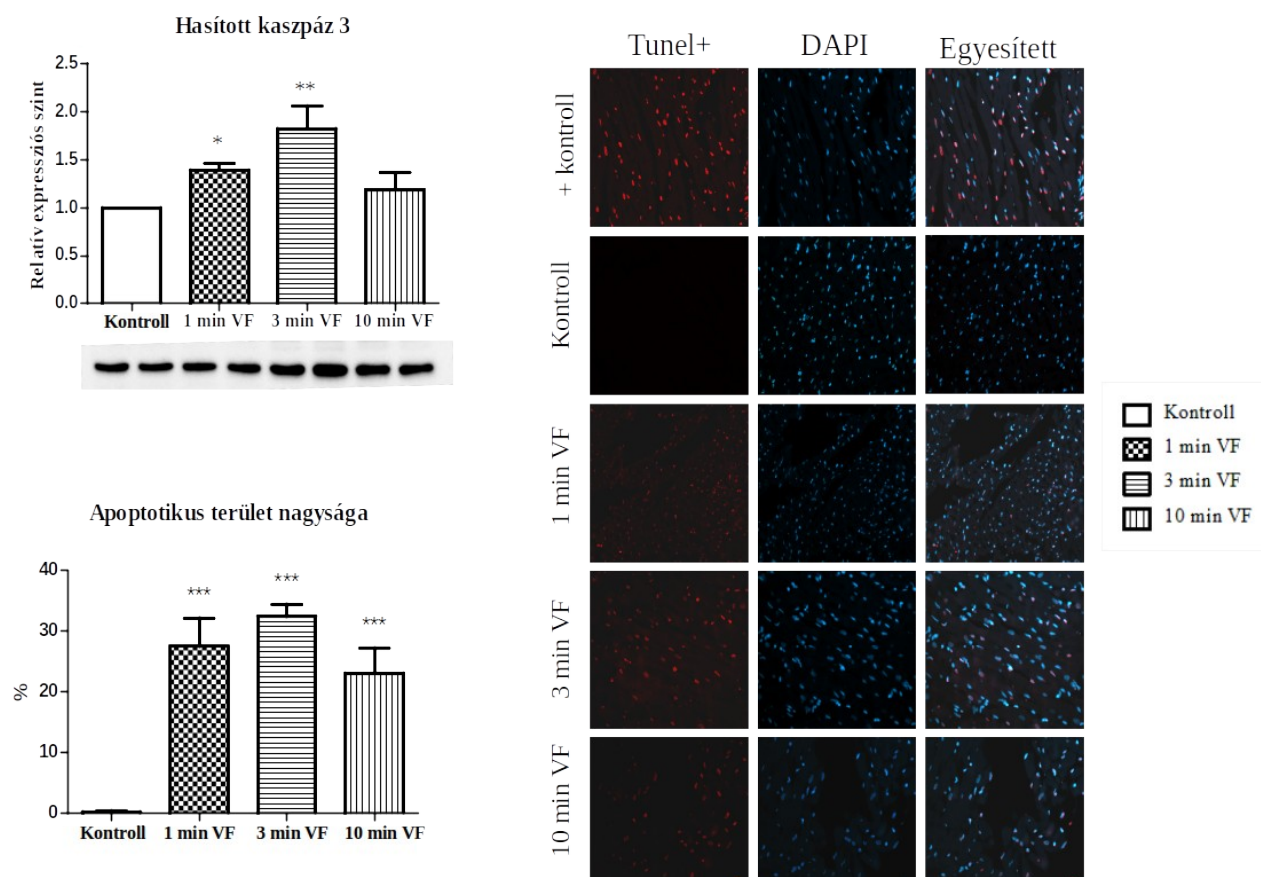


8. ábra: a fibrilláció időtartamának növekedésével az infarktusos terület nagysága is növekszik.  
n=4, \*\*\*p<0.001

#### 6.5. Apoptózis mértéke a kamrafibrilláció hatására

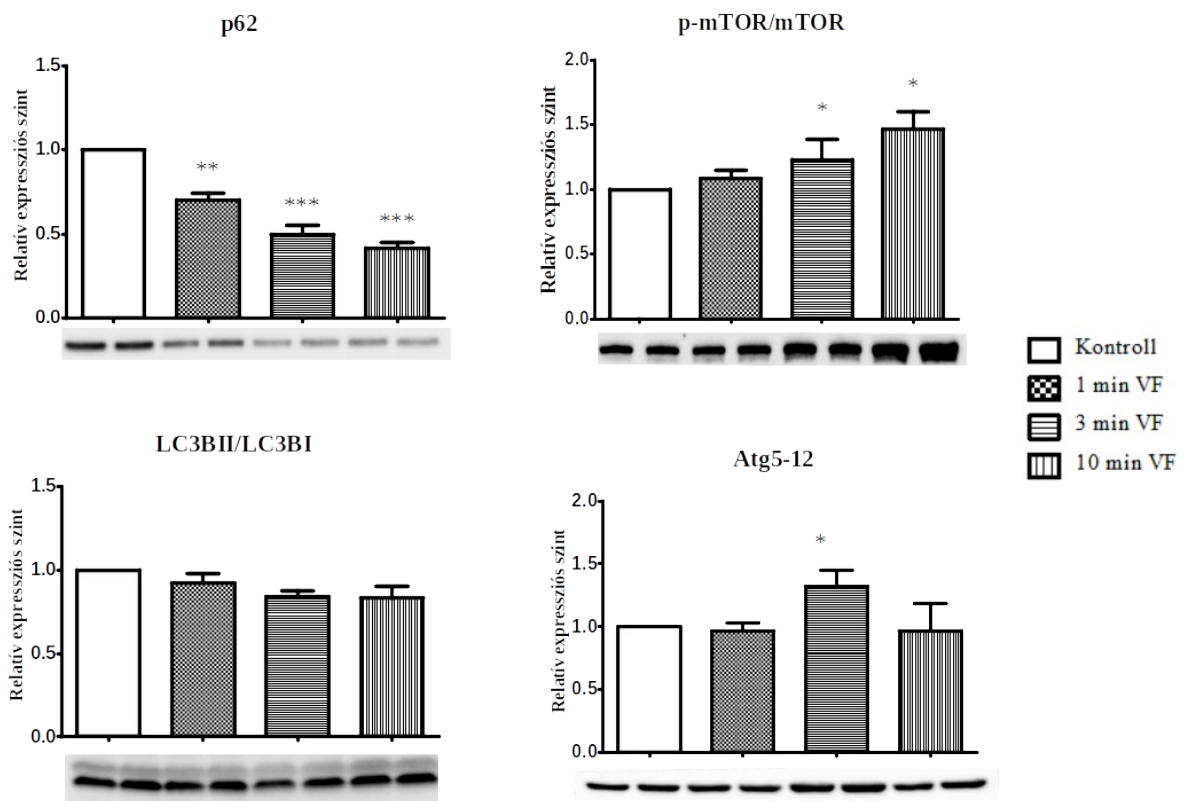
A kontroll szívekhez viszonyítva az 1 perc VF csoportban a hasított kaszpáz 3 expresszió körülbelül 1,5x volt és csaknem duplája a 3 perces csoportban (9. ábra). 10 perces kamrafibrillációt követően ugyanakkor már nem volt jelentős különbség a kaszpáz-3 expresszióban a kontrollhoz 1 és 3 perc VF-nek kitett szívekben. Ugyanebben a két csoportban a fokozott kaszpáz aktivitás mellett a TUNEL pozitív sejtmagok száma is jelentősen emelkedett volt. A legintenzívebb TUNEL pozitivitás a 3 perc VF csoportban volt megfigyelhető.

## 6.6. A kamrafibrilláció hatása az autofágiás folyamatokra



9. ábra: Elektromos stimulussal kiváltott kamrafibrilláció hatására bekövetkező változás a szívizomsejtekben megfigyelhető apoptotikus aktivitásra. (n=8 csoportonként, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)

A 10. ábrán látható p62 fehérje expressziójának folyamatos csökkenése figyelhető meg a fibrilláltatott csoportokban. A 10 perc VF csoportban az expresszió már csupán 2/3-a a kontrollnak. Ezzel szemben a p-mTOR/mTOR arány változásánál növekedés figyelhető meg a fibrilláció időtartamának növekedésével arányosan. Az LC3BII/LC3BI arány változásában csökkenő tendencia figyelhető meg, de jelentős különbség a kontrollhoz viszonyítva nem volt tapasztalható. Az ATG5-12 komplex expresszióját vizsgálva pedig a 3 perc VF csoportban volt tapasztalható a legmagasabb expressziós szint a kontrollhoz viszonyítva.



10. ábra: Elektromosan indukált fibrilláció hatása az autofágiában szerepet játszó fehérjék expressziójában. (n=6 csoportonként, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)



## 7. Megbeszélés

A makroautofágia molekuláris mechanizmusa finoman szabályozott és rendkívül bonyolult molekuláris folyamatok összességéből tevődik össze. Ezeket a folyamatokat legjobban és legegyszerűbben egysejtű gombában (*Saccharomyces cerevisiae*) illetve egyszerűbb felépítésű szövetes állatokban (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) tanulmányozták. Mivel az autofágia egy ősi, evolúciósan igen konzervált folyamat, így az alacsonyabb rendűeknél megfigyelt mechanizmusok hasonlóképpen jelen vannak magasabb rendű élőlényekben is, például gerinces emlősökben. A kutatásaink során vizsgált fehérjék többségét is gombákból izolálták először, éppen ezért lehetséges ezek expressziós szintjéből következtetéseket levonni.

Különböző típusú arrhythmia kialakulhatnak iszkémia-reperfúzió és genetikai mutációk következményeként is<sup>82,83</sup>. Manapság igen nagy figyelmet fordítanak a miokardiális ischaemia szövődményei iránt, főleg a szupraventrikuláris és kamrai arrhythmia jellemzésére és remodellingre. A miokardiális iszkémia után bekövetkező reperfúzió befolyásolja számos gén expresszióját, hatással van az ioncsatornák állapotára, a miokardiális funkciókra és a szív arrhythmogenezisére is<sup>84-87</sup>. A szívizomzat elektrofiziológiája és arrhythmogenezise (beleértve a kamrai arrhythmia kialakulását) viszonylag jól ismert, azonban jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre az arrhythmia és autofágia közötti kapcsolatról<sup>78,79</sup>. Az autofágia arrhythmia kialakulásában betöltött szerepe nehezen megítélhető, hiszen figyelembe kell venni a szív ritmuszavaraihoz összefüggésbe hozható tényezőket, úgy mint a miokardiális iszkémia-reperfúzió és genetikai mutációk, valamint a felhalmozódó káros fehérje aggregátumok. A homeosztázis felborulásának és így az arrhythmia kialakulásának is egyik fő előidézője a sejtben oxidatív stressz hatására kialakuló sérült fehérje aggregátumok<sup>88</sup>. Ezen aggregátumok felhalmozódása az intracelluláris térben az érintett sejt előregedéséhez vezethet, gyulladást idézhet elő és növeli a sejt fogékonyságát további megbetegedésekre<sup>89</sup>. A kardiovaszkuláris rendszer sejtjei különösen érzékenyek ezen intracelluláris fehérje törmelékek jelenlétére, melynek következményeként különböző szívbetegségek és arrhythmia alakulhatnak ki<sup>88</sup>.

Tanulmányunkban vizsgáltuk az izolált egérszíveken vizsgálta az iszkémia-reperfúzió indukálta kamrai arrhythmia során az autofágiában bekövetkező változásokat. Kísérleteink során az autofágiában szerepet játszó biomarkerek expresszióját (LC3B, Atg-5, Atg-7, Atg-12, Bcl-2, és Beclin-1) vizsgáltuk egérszívekben, amelyekben spontán alakult ki I/R-t követően kamrai arrhythmia<sup>9</sup>. Modellünkben emelkedett Beclin-1 expresszió volt megfigyelhető a reperfúzió után a fibrillált szívekben, összehasonlítva a fibrilláción át nem esett szívekkel. A Beclin-1 alapvető fehérje az autofágia indukációjában<sup>90</sup> és mintegy platform fehérjeként funkcionál az Atg fehérjéknek

és a III-as osztályba tartozó PI3K-nak, amelyek együttesen iniciálják a makroautofágiát<sup>90,91</sup>. Ez a folyamat fiziológias körülmények között az mTOR által represszálva van, így a tápanyag megvonás és rapamycin kezelés általi mTOR represszió elősegíti az autofágiás válasz kialakulását és bizonyos körülmények között közrejátszhat, adott szövet homeosztázisának helyreállításában<sup>34</sup>. Mindazonáltal fontos megjegyezni, hogy ha a szövet elég hosszan intenzív stressznek van kitéve, az autofágia okozta sejthalál fokozódhat<sup>92,93</sup>. Az általunk tapasztalt megnövekedett Beclin-1 expresszió valóban egy fokozott autofágiát jelent a fibrillált csoportban, ugyanakkor nem zárható ki az autofágia előfordulása a nem fibrillált csoportban sem, hiszen a miokardiális iszkémia patológiás elváltozásokat idéz elő a szívszövetben, amely önmagában kiváltó oka az autofágiának.

Eredményeink arra engedtek következtetni, hogy fibrilláció során az erősebb Beclin-1 expresszió intenzívebb autofágiát jelez. Továbbá a Beclin-1 a kaspáz-3 -7 és 8 fehérjékkel együtt az apoptózis és autofágia közötti kölcsönhatásokért is felelős<sup>94</sup> és a Bcl-2 fehérje is befolyással bír az apoptózis és autofágia szövetbeni alakulására. A Beclin-1 a Bcl-2 fehérjével kölcsönhatva gátolja az autofágiát és negatív regulátora az apoptózisnak is, ennek eredményeképp pedig a gyulladásos jelenségeket promótálja<sup>95</sup>. A kardiovaszkuláris és egyéb szövetekben az életkor előrehaladtával az apoptózis és az autofágia szintje csökken, amely a gyulladásos jelenségekkel és az NF- $\kappa$ B aktivációval együtt szövetkárosodást, fizikai degradációt és tumorgenezist eredményezhet<sup>95</sup>. A fent említett folyamatok az öregedés következtében, hosszú időn keresztül fokozatosan megnövekedett Bcl-2 expresszióval járhatnak együtt; azonban a Bcl-2 szintje nem változhat lényegesen az akut szövetkárosodás, például az I/R sérülés hatására. Eredményeink ezzel összhangban vannak, ugyanis kísérleteink során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Bcl-2 expresszióban a fibrillált szövetekben, szemben a nem fibrillált szívből származó szívizommal.

Az LC3B fehérje az autofagoszóma membrán növekedésben tölt be kulcsfontosságú szerepet. A membrán képződésének kezdetétől, annak mindkét oldalára beépül és az érést követően egészen a fagolizoszóma komplex kialakulásig jelen van. Az LC3BI izoforma az Atg7 és Atg3 fehérje révén egy foszfatidil-etanolamin (PE) csoport hozzákapcsolásával alakul LC3BII-vé, mely aztán a membránba beépül. A lizoszómában található enzimek hatására az LC3BII-ről a PE csoport eltávolításra kerül és ismételen LC3BI-é alakul, ezáltal újból felhasználhatóvá válik további fagoszóma felépítésében. Éppen ezért az LC3BII jó indikátora azt az autofágiás folyamatoknak a legkülönfélébb szövetek sejtjeiben. Elképzeléseinket, miszerint az autofágia emelkedett aktivitása figyelhető meg a fibrillált szívszövetben, az LC3BII/LC3BI arányt és az LC3BII szintet vizsgálva is alá tudtuk támasztani, mivel mindkét esetben szignifikáns növekedést tapasztaltunk és ez a makroautofágia növekedését jelenti<sup>96</sup>. Ezt korábbi kutatások is alátámasztják, hiszen *Chen* és munkatársai a pitvarfibrilláció jelenlétében vagy hiányában, mitrális és trikuszipidális billentyűk

regurgitációban LC3B pozitív pitvari myociták számának emelkedését tapasztalták<sup>79</sup>. Ezzel szemben *Garcia* és munkatársai csökkent autofágiás aktivitást tapasztaltak posztoperatív páciensek esetén pitvari fibrilláció során, csökkent LC3B expressziós szint mellett<sup>78</sup>. Azonban megjegyzendő, hogy kísérleteink során I/R indukálta kamrai fibrillációt vizsgáltunk állatmodellen, amely jelentős mértékben különbözik a pitvari fibrillációtól.

Érdekes módon nem volt megfigyelhető szignifikáns eltérés a fibrillált szívek esetén az Atg7, Atg5 és Atg5-12 fehérjekomplex expressziójában. Az Atg5 és Atg12 fehérjék kovalens kapcsolódását az Atg7 enzim katalizálja, így vesznek részt a autofagoszóma membrán képződésében<sup>97-100</sup>. Az Atg7 expressziója ugyan emelkedett, de nem szignifikáns mértékben, összehasonlítva a kamrafibrillációt elszenvedett szívekkel. Az Atg5-12 komplex szintje hasonlóképpen alakult és megjegyzendő, hogy az Atg5-12 komplex önmagában is felgyorsíthatja az LC3B fehérje expresszióját<sup>101</sup>.

Mindezen eredményeket együttevve arra a következtetésre jutottunk, hogy a szívszövet I/R indukálta kamrai arrhythmiára válaszul, emelkedett autofágiával reagál azon szívekhez képest, melyekben nem alakult ki I/R-t követően arrhythmia. Azonban néhány ok-okozati összefüggés, úgymint az autofágia közreműködik-e a kamrafibrilláció kialakulásában vagy éppen a kamrafibrilláció indukálja-e az autofágiát; illetve hogy az arra hajlamos szívekben kamrafibrilláció alakul ki, tekintet nélkül az autofágiás aktivitásra és ezen szívek emiatt képtelenek fentartani az autofágia megfelelő szintjét továbbra is megválaszolatlanul maradt.

Éppen ezért kutatócsoportunk további vizsgálatokkal tett erőfeszítéseket ezen kérdések megválaszolására. Kísérleteink során elektromos stimulussal generáltunk különböző időtartamú kamrafibrillációt, izolált dolgozó patkányszíveken és vizsgáltuk a kamrai arrhythmia szívfunkciókra, autofágiás markerekre, illetve az apoptózisra gyakorolt hatását.

Az elektromos ingerek által kiváltott kamrai fibrilláció időtartama hozzájárult a szívfunkciók depressziójához, beleértve az aorta kiáramlást, a koszorúér átáramlást, a verőtér fogat változását és növelte az elhalt szívterületek nagyságát is. 10 perc időtartamú kamrafibrilláció már tízszeresére növelte az elhalt területek nagyságát az arrhythmián át nem esett csoporthoz képest, amely az oxidatív stressznek is köszönhető<sup>102</sup>. Az ismert mechanizmusok, amelyek az infarktusos terület nagyságának ilyen mértékű növekedését előidézik és fokozzák, megfigyelhetők az arrhythmogenezis és a szívfunkciók működési zavara során is<sup>103,104</sup>. Azonban érdekes módon a szívszövetben megfigyelhető legnagyobb apoptotikus aktivitás (TUNEL pozitív sejtek és hasított kaszpáz-3 expresszió) a 3 perc időtartamú csoportban volt megfigyelhető, nem pedig a 10 perces csoportban.

Az autofágia szabályozásában, a sejtciklus és növekedésben központi szerepet játszó mTOR fehérje komplex (mammalian target of rapamycin) negatív hatással van az autofágiára. Amennyiben elegendő tápanyag és növekedési faktor van jelen, akkor blokkolja az Atg1 fehérjét, így az autofagoszóma inicializációja nem lehetséges. Az I. osztályba tartozó foszfatidil-inozitol-3 kináz és az AMP-aktivált kináz érzékelik a sejt energiaellátottságát. Amennyiben tápanyagszegény állapot lép fel, foszforiláció által blokkolják az mTOR komplexet, ezzel lehetővé téve az autofágia és más citoprotektív folyamatok elindítását. Az mTOR expresszióját vizsgálva növekvő p-mTOR/mTOR arány figyelhető meg a kamrafibrilláció időtartamának növekedésével együtt, amely emelkedett autofágiát jelent. Ismeretes, hogy az oxidatív stressz sérülést okozhat a genomba, így magasabb mTOR aktivitást eredményezve a sejtciklus leáll és az előregedett fenotípus jegyeit mutató sejt gyulladásos reakciókat válthat ki, ami fizikai degradációt eredményez<sup>89</sup>. Ezen folyamatok patofiziológiáját a szívritmuszavarok elősegítik és a szövetek az autofágia indukálásával ellensúlyozzák azt<sup>9,37</sup>. Ezen megfigyeléseinket a p62 fehérje szintjének csökkenése is alátámasztja, mivel ez a fehérje teszi lehetővé a sérült sejtkomponensek jelölését és mihamarabbi degradációját az autofágia révén<sup>105</sup>. A p62 fehérje felhalmozódása a sejtben az autofágiás folyamatok csökkenését jelentené, tehát a kamrafibrilláció során fokozódhat az autofágiás aktivitás.

Az autofágiás markereket tekintve azonban érdekes jelenség figyelhető meg, ugyanis az LC3BII/LC3BI arányt vizsgálva fokozatos csökkenést tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest a fibrilláltatott szívek esetében, azonban ez a tendencia nem volt szignifikáns mértékű. Ebből arra következtethetünk, hogy a kamrafibrilláció indukálása szupresszálja a fagoszóma formációját. Ez válaszul szolgálhat a korábban feltett kérdésünkre, miszerint az autofágia közreműködik-e a kamrafibrilláció kialakulásában vagy éppen a kamrafibrilláció indukálja-e az autofágiát. A modellünkben megfigyelhető Atg5-12 komplex expressziójának változása is arra enged következtetni, hogy a szívben a fibrilláció során végbemenő folyamatok hatására az autofágia aktivitása ingadozik. Ezen eredményeket összegezve valószínűsíthető, hogy a miokardiumban arrhythmia hatására emelkedő autofágia – lévén, hogy aktív folyamat – energiahiány miatt lelassul és protektív szerepe nélkül a sejt nekrotikus pusztulása történik, gyulladást idézve elő a szívszövetben.

Kísérleteinkkel számos olyan tényezőt tártunk fel a szívszövet fibrillációra adott válaszreakcióját nézve, amely rendkívül hasznos lehet az arrhythmogenezis megértésében és betekintést nyújtottak az autofágiával kapcsolatos patofiziológiába.

Összességében tehát eredményeink alapján megállapíthatjuk:

- I. Az iszkémia-reperfúzió és az utána esetlegesen kialakuló kamrafibrilláció a szívizomszövetben az autofágiás folyamatok fokozódását eredményezi.
- II. Arrhythmia során ez a fokozott autofágiás folyamat protektív szerepet tölt be a szívszövetben, enyhíti az oxidatív stressz okozta károsodásokat és eliminálja a keletkezett toxikus anyagokat a szívizomsejtekből.
- III. Az autofágia kardioprotektív szerepét azonban jelentősen korlátozza a kamrafibrilláció miatt kialakuló energiahiány, amelyet a helyreálló oxigén- és tápanyagellátás sem képes ellensúlyozni.
- IV. Mindezen folyamatok együttesen a szívszövet apoptózisát majd nekrozisát idézik elő, amely az arrhythmia időtartamának növekedésével együtt eszkalálódik.

## 9. Összefoglalás

A kardiovaszkuláris megbetegedések miatti halálozási arány a statisztikák szerint a világon mindenütt a vezető halál okok közé sorolhatóak, bár a prevenciónak és az egyre hatásosabb terápiáknak hála, javuló tendencia figyelhető meg. Továbbra is szükséges azonban a jövőbeni terápiás lehetőségek optimalizálása és hatásosságának fokozásának érdekében az alapkutatás során foglalkozni a szív- és érrendszeri betegségek molekuláris hátterével, melyek közül az iszkémia-reperfúzió indukálta kamrai fibrilláció az egyik legsúlyosabb következmény.

Iszkémia alatt a megváltozott metabolikus aktivitás hatására a fokozott autofágia segít a miociták energiaszükségletének kielégítésében, azonban reperfúzió alatt a továbbra is magas aktivitása már inkább károsan hat a szívre. Az I/R hatására kialakuló fibrilláció ezt még csak tovább fokozza, hiszen a tápanyag depléció miatt a sejtek továbbra is autofágia révén próbálnak többlet energiához jutni. Ez a folyamat aztán autofágia-indukálta apoptózist eredményez, legvégül pedig nekrozishoz vezethet, ha a normál szívritmus nem áll helyre időben.

Jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan lehetőség, amely az autofágia szívszövetbeni szabályozását biztosítaná I/R során. A prevenció és a prekondíció azonban nagyban hozzájárulhat az esetlegesen bekövetkező szívinfarktus során az arrhythmia elkerüléséhez nagyban növelve ezzel a túlélést.

## 10. Summary

The cardiovascular diseases are still among the highest risk factors of mortality rates all over the world, although because of the prevention and the more effective therapies the tendency is improving. However to optimize and enhance therapies we need to do more investigations for the better understanding of the molecular background and mechanisms of the cardiovascular diseases.

One of the most harmful phenomenon is the ischaemia-reperfusion induced ventricular fibrillation. During ischaemia the metabolic pathways are altered and to maintain the energy level in the heart tissues an elevated autophagy activity can be observed. Under reperfusion this elevated activity could be deleterious and the ventricular fibrillation could enhance this activity because of the energy depletion. These circumstances driven to autophagy-induced apoptosis and necrosis if the normal heart rhythm isn't recovered.

Currently we don't have opportunity to alter the autophagy activity in the heart during ischaemia-reperfusion. The only way is the prevention and the preconditioning to prevent this deteriorative phenomenon.

## 11. Irodalomjegyzék

1. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016;37(42):3232-3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334
2. Internet. IHME. <http://www.healthdata.org/hungary>.
3. Lavandero S, Troncoso R, Rothermel BA, Martinet W, Sadoshima J, Hill JA. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy*. 2013;9(10):1455-1466. doi:10.4161/auto.25969
4. Hagar JM, Hale SL, Kloner RA. Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res*. 1991;68(1):61-68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984872>.
5. Koda K, Salazar-Rodriguez M, Corti F, et al. Aldehyde dehydrogenase activation prevents reperfusion arrhythmias by inhibiting local renin release from cardiac mast cells. *Circulation*. 2010;122(8):771-781. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.952481
6. Tosaki A, Szekeres L, Hearse DJ. Diltiazem and the reduction of reperfusion-induced arrhythmias in the rat: protection is secondary to modification of ischemic injury and heart rate. *J Mol Cell Cardiol*. 1987;19(5):441-451. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3625781>.
7. Tosaki A, Balint S, Szekeres L. Pacing and reperfusion induced arrhythmias: protection by slow heart rate in the rat heart. *Cardiovasc Res*. 1988;22(11):818-825. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3256423>.
8. Dong Y, Undyala V V, Gottlieb RA, Mentzer RM, Przyklenk K. Autophagy: definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010;15(3):220-230. doi:10.1177/1074248410370327
9. Meyer G, Czompa A, Reboul C, et al. The Cellular Autophagy Markers Beclin-1 and LC3B-II are Increased During Reperfusion in Fibrillated Mouse Hearts. *Curr Pharm Des*. 2013;19(39):6912-6918. doi:10.2174/138161281939131127122510
10. Tosaki A, Braquet P. DMPO and reperfusion injury: arrhythmia, heart function, electron spin resonance, and nuclear magnetic resonance studies in isolated working guinea pig hearts. *Am Heart J*. 1990;120(4):819-830. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2171311>.
11. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-1135. doi:10.1056/NEJMra071667
12. Ong S-B, Gustafsson AB. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):190-196. doi:10.1093/cvr/cvr312

13. Kumar V, Abul K A, Aster JC. *A Patológia Alapjai*. Medicina K. Budapest; 2014.
14. Fürst Z, Gyires K. A farmakológia alapjai. In: Varró A, Baczkó I, eds. Budapest: Medicina; 2017:237-254.
15. Balogh L. *EKG Alapismeretek*. Debrecen: Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai és Szívsebészeti Klinika; 2017.
16. Péter B. *Orvosi Élettan 1. Kötet*. Budapest; 1981.
17. Ziad F. Issa, John Michael Miller DPZ. *Electrophysiological Mechanisms of Cardiac Arrhythmias: Clinical Arrhythmology and Electrophysiology, a Companion to Braunwald's Heart Disease.*; 2009.
18. Jose Jalife, Mario Delmar, Justus Anumonwo, Omer Berenfeld JK. *Basic Cardiac Electrophysiology for the Clinician.*; 2009.
19. Gaztañaga L, Marchlinski FE, Betensky BP. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(2):174-185. doi:10.1016/j.recesp.2011.09.018
20. Clusin WT. Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003;40(3):337-375. doi:10.1080/713609356
21. Zipes DP. Mechanisms of clinical arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14(8):902-912. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890064>.
22. Kovacs P, Bak I, Szendrei L, et al. Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001;364(6):501-507. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770004>.
23. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
24. ASHFORD TP, PORTER KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*. 1962;12:198-202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13862833>.
25. Eskelinen E-L, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(4):664-673. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.014
26. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
27. Münz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:423-449. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132537
28. Bhattacharyya S, Yu H, Mim C, Matouschek A. Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):122-133. doi:10.1038/nrm3741



29. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017;36(13):1811-1836. doi:10.15252/embj.201796697
30. Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2201-2214. doi:10.1089/ars.2010.3482
31. Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1374-1378. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.017
32. Yin Z, Pascual C, Klionsky D. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell.* 2016;3(12):588-596. doi:10.15698/mic2016.12.546
33. Settembre C, Zoncu R, Medina DL, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 2012;31(5):1095-1108. doi:10.1038/emboj.2012.32
34. Chang Y-Y, Juhász G, Goraksha-Hicks P, et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 1):232-236. doi:10.1042/BST0370232
35. Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci.* 2000;113 ( Pt 7:1189-1198. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704370>.
36. Denton D, Xu T, Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(1):35-42. doi:10.1038/icb.2014.85
37. Lekli I, Haines DD, Balla G, Tosaki A. Autophagy: an adaptive physiological countermeasure to cellular senescence and ischaemia/reperfusion-associated cardiac arrhythmias. *J Cell Mol Med.* 2017;21(6):1058-1072. doi:10.1111/jcmm.13053
38. Gao M, Monian P, Pan Q, Zhang W, Xiang J, Jiang X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res.* 2016;26(9):1021-1032. doi:10.1038/cr.2016.95
39. Yang Y, Hu L, Zheng H, et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(5):625-635. doi:10.1038/aps.2013.5
40. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016
41. Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, Rubinsztein DC. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):46-56. doi:10.1038/cdd.2008.110

42. Mitchener JS, Shelburne JD, Bradford WD, Hawkins HK. Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am J Pathol.* 1976;83(3):485-492. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/937509>.
43. Yin J-J, Li Y-B, Wang Y, et al. The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic  $\beta$  cell death. *Autophagy.* 2012;8(2):158-164. doi:10.4161/auto.8.2.18807
44. Kim D-S, Li B, Rhew KY, et al. The regulatory mechanism of 4-phenylbutyric acid against ER stress-induced autophagy in human gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res.* 2012;35(7):1269-1278. doi:10.1007/s12272-012-0718-2
45. Ciechomska IA, Gabrusiewicz K, Szczepankiewicz AA, Kaminska B. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy in malignant glioma cells undergoing cyclosporine a-induced cell death. *Oncogene.* 2013;32(12):1518-1529. doi:10.1038/onc.2012.174
46. Petrovski G, Das S, Juhasz B, Kertesz A, Tosaki A, Das DK. Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2191-2200. doi:10.1089/ars.2010.3486
47. Gordon PB, Holen I, Fosse M, Røtnes JS, Seglen PO. Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J Biol Chem.* 1993;268(35):26107-26112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253727>.
48. Bae I-H, Lim KS, Park DS, et al. Sirolimus coating on heparinized stents prevents restenosis and thrombosis. *J Biomater Appl.* 2017;31(10):1337-1345. doi:10.1177/0885328217706222
49. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 1975;28(10):721-726. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1102508>.
50. Tanemura M, Ohmura Y, Deguchi T, et al. Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am J Transplant.* 2012;12(1):102-114. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03771.x
51. Khan S, Salloum F, Das A, Xi L, Vetrovec GW, Kukreja RC. Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41(2):256-264. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.04.014
52. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, et al. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40(6):846-852. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.03.428
53. Bahro M, Pfeifer U. Short-term stimulation by propranolol and verapamil of cardiac cellular autophagy. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(12):1169-1178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3443984>.

54. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 2004;36(6):585-595. doi:10.1038/ng1362
55. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2005;16(4):525-537. doi:10.1093/annonc/mdi113
56. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5641-5652. doi:10.1074/jbc.M609532200
57. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(6):1889-1892. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6952238>.
58. Miller S, Tavshanjian B, Oleksy A, et al. Shaping development of autophagy inhibitors with the structure of the lipid kinase Vps34. *Science.* 2010;327(5973):1638-1642. doi:10.1126/science.1184429
59. Wu Y-T, Tan H-L, Shui G, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2010;285(14):10850-10861. doi:10.1074/jbc.M109.080796
60. Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V, Nelson H. The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol.* 2000;203(Pt 1):89-95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600677>.
61. Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy.* 2008;4(7):849-850. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758232>.
62. Amaravadi RK, Winkler JD. Lys05: a new lysosomal autophagy inhibitor. *Autophagy.* 2012;8(9):1383-1384. doi:10.4161/auto.20958
63. Moriyasu Y, Inoue Y. Use of protease inhibitors for detecting autophagy in plants. *Methods Enzymol.* 2008;451:557-580. doi:10.1016/S0076-6879(08)03232-1
64. Kominami E, Hashida S, Khairallah EA, Katunuma N. Sequestration of cytoplasmic enzymes in an autophagic vacuole-lysosomal system induced by injection of leupeptin. *J Biol Chem.* 1983;258(10):6093-6100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6133857>.
65. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(4):654-661. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.01.010
66. De Meyer GRY, Martinet W. Autophagy in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(9):1485-1495. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.011

67. Yan L, Vatner DE, Kim S-J, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13807-13812. doi:10.1073/pnas.0506843102
68. Gurusamy N, Lekli I, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. BAG-1 induces autophagy for cardiac cell survival. *Autophagy*. 2009;5(1):120-121. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001866>.
69. Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov N V, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med*. 2009;13(2):373-387. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00495.x
70. Hoshino A, Matoba S, Iwai-Kanai E, et al. p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(1):175-184. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.10.008
71. Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*. 2007;100(6):914-922. doi:10.1161/01.RES.0000261924.76669.36
72. Pattison JS, Sanbe A, Maloyan A, Osinska H, Klevitsky R, Robbins J. Cardiomyocyte expression of a polyglutamine preamyloid oligomer causes heart failure. *Circulation*. 2008;117(21):2743-2751. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.750232
73. Martins-Marques T, Catarino S, Zuzarte M, et al. Ischaemia-induced autophagy leads to degradation of gap junction protein connexin43 in cardiomyocytes. *Biochem J*. 2015;467(2):231-245. doi:10.1042/BJ20141370
74. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Eat your heart out: Role of autophagy in myocardial ischemia/reperfusion. *Autophagy*. 2008;4(4):416-421. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18253087>.
75. Decker RS, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol*. 1980;98(2):425-444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7355988>.
76. Decker RS, Poole AR, Crie JS, Dingle JT, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. II. Immunohistochemical and biochemical changes in cathepsin D. *Am J Pathol*. 1980;98(2):445-456. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6986784>.
77. Matsui Y, Kyoj S, Takagi H, et al. Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion. *Autophagy*. 2008;4(4):409-415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227645>.

78. Garcia L, Verdejo HE, Kuzmicic J, et al. Impaired cardiac autophagy in patients developing postoperative atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143(2):451-459. doi:10.1016/j.jtcvs.2011.07.056
79. Chen M-C, Chang J-P, Wang Y-H, Liu W-H, Ho W-C, Chang H-W. Autophagy as a mechanism for myolysis of cardiomyocytes in mitral regurgitation. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(3):299-307. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02410.x
80. Dave KR, Della-Morte D, Saul I, Prado R, Perez-Pinzon MA. Ventricular fibrillation-induced cardiac arrest in the rat as a model of global cerebral ischemia. *Transl Stroke Res.* 2013;4(5):571-578. doi:10.1007/s12975-013-0267-0
81. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem.* 2013;433(2):105-111. doi:10.1016/j.ab.2012.10.010
82. Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, et al. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management parts I and II. *Circulation.* 1999;99(4):518-528. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927398>.
83. Said M, Becerra R, Valverde CA, et al. Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(6):936-944. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.010
84. Luther S, Fenton FH, Kornreich BG, et al. Low-energy control of electrical turbulence in the heart. *Nature.* 2011;475(7355):235-239. doi:10.1038/nature10216
85. Szendrei L, Turoczi T, Kovacs P, Vecsernyes M, Das DK, Tosaki A. Mitochondrial gene expression and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused nondiabetic and diabetic myocardium. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(3):543-552. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11853705>.
86. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias--diagnosis and therapy. *Nat Rev Cardiol.* 2012;9(6):319-332. doi:10.1038/nrcardio.2012.3
87. Belevych AE, Terentyev D, Terentyeva R, et al. Shortened Ca<sup>2+</sup> signaling refractoriness underlies cellular arrhythmogenesis in a postinfarction model of sudden cardiac death. *Circ Res.* 2012;110(4):569-577. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.260455
88. McClintock D, Gordon LB, Djabali K. Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2154-2159. doi:10.1073/pnas.0511133103
89. Haines DD, Juhasz B, Tosaki A. Management of multicellular senescence and oxidative stress. *J Cell Mol Med.* 2013;17(8):936-957. doi:10.1111/jcmm.12074
90. Hsieh Y-C, Athar M, Chaudry IH. When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med.* 2009;15(3):129-138. doi:10.1016/j.molmed.2009.01.002

91. Itakura E, Mizushima N. Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *Autophagy*. 2009;5(4):534-536. doi:10.4161/auto.5.4.8062
92. Przyklenk K, Dong Y, Undyala V V, Whittaker P. Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):197-205. doi:10.1093/cvr/cvr358
93. Sciarretta S, Hariharan N, Monden Y, Zablocki D, Sadoshima J. Is autophagy in response to ischemia and reperfusion protective or detrimental for the heart? *Pediatr Cardiol*. 2011;32(3):275-281. doi:10.1007/s00246-010-9855-x
94. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):571-580. doi:10.1038/cdd.2010.191
95. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):520-534. doi:10.1016/j.arr.2012.11.004
96. Noda T, Fujita N, Yoshimori T. The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death Differ*. 2009;16(7):984-990. doi:10.1038/cdd.2009.54
97. Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem*. 1998;273(51):33889-33892. doi:10.1074/jbc.273.51.33889
98. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998;395(6700):395-398. doi:10.1038/26506
99. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*. 2001;20(21):5971-5981. doi:10.1093/emboj/20.21.5971
100. Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, et al. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell*. 1999;10(5):1367-1379. doi:10.1091/mbc.10.5.1367
101. Nakatogawa H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem*. 2013;55:39-50. doi:10.1042/bse0550039
102. Ferdinandy P, Das DK, Tosaki A. Pacing-induced ventricular fibrillation leading to oxygen free radical formation in aerobically perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25(6):683-692. doi:10.1006/jmcc.1993.1081
103. Mukherjee S, Ray D, Lekli I, Bak I, Tosaki A, Das DK. Effects of Longevinex (modified resveratrol) on cardioprotection and its mechanisms of action. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(11):1017-1025. doi:10.1139/y10-082

104. Lekli I, Ray D, Mukherjee S, et al. Co-ordinated autophagy with resveratrol and  $\gamma$ -tocotrienol confers synergetic cardioprotection. *J Cell Mol Med.* 2010;14(10):2506-2518. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00921.x
105. Rusten TE, Stenmark H. p62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol.* 2010;12(3):207-209. doi:10.1038/ncb0310-207

## 12. Tárgyszavak

Izolált dolgozó szív

Autofágia

Arrhythmia

Apoptózis

Infarktusz terület

Isolated working heart

Autophagy

Arrhythmia

Apoptosis

Infarct size



### **13. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek Dr. Lekli Istvánnak és a Gyógyszerhatástani Tanszék vezetőjének Prof. Dr. Tósaki Árpádnak, amiért szakmai iránymutatásukkal, segítségükkel biztosítottak minden feltételt amely lehetővé tette, hogy a családomban elsőként legyen egy doktor.

Továbbá köszönöm barátomnak Dr. Kovács Renátónak, az ebédeket és a kávézásokat és hogy nem hagyta feladnom az egészséget, pedig sokszor igen közel álltam hozzá az évek során.

Köszönöm a két legjobb kollégámnak Zilinyi Ritának és Dr. Szabados-Fürjesi Péternek a társaságukat az irodában és azon kívül is! Nélkülük sosem írtam volna meg a disszertációm ez szinte biztos. Ezen felül a Gyógyszerhatástani Tanszék jelenlegi és egykori munkatársainak is köszönök mindent.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Boglárkának és Családomnak a támogatást, a gondoskodást és a türelmet, ami felém irányult tőlük a doktori évek során.

A kutatás a NKFI(OTKA)K124719 projekt és a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 számú projekt társfinanszírozásával valósult meg.

## 14. Függelék: a megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/279/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Czeglédi András  
Neptun kód: Z08Z2A  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Czeglédi, A.**, Tósaki, Á., Gyöngyösi, A., Zilinyi, R., Tósaki, 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)
2. Meyer, G., Czompa, A., Reboul, C., Csépanyi, E., **Czeglédi, A.**, Bak, I., Balla, G., Balla, J., Tósaki, Á., Lekli, I.: The Cellular Autophagy Markers Beclin-1 and LC3B-II are Increased during Reperfusion in Fibrillated Mouse Hearts.  
*Curr. Pharm. Des.* 19 (39), 6912-6918, 2013.  
IF: 3.288





**További közlemények**

3. Nagy, F., Tóth, Z., Bozó, A., **Czeplédi, A.**, Rebenku, I., Majoros, L., Kovács, R. L.: Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.  
*Med. Mycol.* 57 (5), 573-581, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy108>  
IF: 2.851 (2018)
4. Gyöngyösi, A., Zilinyi, R., **Czeplédi, 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)





5. Zilinyi, R., Czompa, A., **Czeplédi, 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
6. Czompa, A., Gyöngyösi, A., **Czeplédi, A.**, Csépanyi, E., Bak, I., Haines, D. D., Tósaki, Á., Lekli, I.: Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 64 (5), 412-419, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.000000000000132>  
IF: 2.135

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,929**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,471**

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, 2019.07.05.

