

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Az autofágia és kamra fibrilláció kapcsolata

Czeglédi András

Témavezető: Dr. Lekli István



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Az autofágia és kamrafibrilláció kapcsolata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Gyógyszerészeti Tudományok tudományágban

Írta: Czeglédi András okleveles molekulárisbiológus

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

Témavezető: Dr. Lekli István, PharmD., PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Dr. Tóth E. Béla, PhD

Dr. Pósa Anikó, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani
Tanszék könyvtár a2019. október 9. 9 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Csonka Csaba, PhD
Dr. Somodi Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Dr. Pósa Anikó, PhD

Dr. Tóth E. Béla, PhD

Dr. Somodi Sándor, PhD

Dr. Csonka Csaba, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet A épület tanterme, 2019. október 9., 13 óra

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés és célkitűzés	1
II. Anyagok és módszerek	5
III. Eredmények	10
V. Megbeszélés.....	12
VI. Összefoglalás	15
VI. Köszönetnyilvánítás.....	16

I. Bevezetés és célkitűzés

A kardiovaszkuláris betegségek (cardiovascular disease-CVD) olyan nem fertőző, szív és érrendszert érintő elváltozások, mint a koronáriás szívbetegség, 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. Becslések szerint évente 17,9 millió 70 év alatti halálos áldozata van a szív- és érrendszeri megbetegedéseknek, amely globálisan a halálozási okok mintegy 31%-át teszi ki. 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 szintemelkedést eredményez, amely túlsúllyal és elhízással párosulva kiváltó oka a szív- és érrendszer 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 utóbbi pedig 1 millió halálos áldozatot követel évente a kontinensen. A nemek arányát tekintve 2,2 millió nő hal meg főleg cerebrovascularis 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. Európában a halálozási arányok megoszlása országonként nagyon változó, de az elérhető adatok alapján minden EU-s országban javuló tendencia jellemzi a CVD általi halálesetek 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 halálokok. Férfiak esetében 100 ezer lakosból évente 921 fő veszíti életét CVD következtében és ebből 488 a koronáriás szívbetegség; nőknél pedig 646 megbetegedésből 319 a koronáriás szívbetegség. 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 halálesetek száma. 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.

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. Az iszkémia-reperfúzió okozta érdemi kamraösszehúzódás nélküli kaotikus depolarizáció, azaz kamrafibrilláció az egyik legsúlyosabb következménye szívbetegségeknek.

A makroautofágia olyan evolúciósan konzervált, finoman szabályozott folyamat, melynek során a citoplazmában szabadon hozzáférhető anyagok (sérült sejtorganellumok, fehérjék, mitokondriumok) lizoszóma által degradálódnak. Az autofágia mechanizmusa már az embriogenezistől fontos szerepet játszik az élő szervezetekben. Szerepe van a sejt fiziológiás állapotának fenntartásában, az immunrendszer megfelelő működésében és összefüggésbe hozható 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.

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 fiziológiás 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. Ezek a folyamatok párhuzamosan, egymást kiegészítve vesznek részt a degradációban és újrahazsnosításban. 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 kromoszómához kötött, öröklődő Danon betegség.

Az autofágiás aktivitás megváltozása sokkal inkább jellemző olyan patológiás elváltozások során, mint az I/R sérülés, hipertenzió, hipertrofia, kardiomiopátia vagy szívelégtelenség. A megnövekedett autofágiás folyamatok hatása a szívszövetre, azonban meglehetősen vitatott. Az autofágia hatásából származó előny vagy hátrány attól is függ, hogy milyen típusú és mennyi ideig tartó stressznek van kitéve a szívszövet. Míg iszkémia során az autofágia protektív szerepet tölthet be, addig a reperfúzió alatt már koránt sem sorolható a szív túlélésében szerepet játszó 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_2O_2 eliminálását végző kataláz enzim is szubsztrátja lehet a lizoszómák általi degradációnak, amely a H_2O_2 felhalmozódását és így az oxidatív stressz fokozódását eredményezheti

A szakirodalomban azonban többnyire protektív szerepet tulajdonítanak az autofágiának a szívizomban I/R során.

Látható tehát, hogy az iszkémia-reperfúzió okozta kamrafibrilláció és az 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.

Disszertációm fő tárgya a kamrafibrilláció során megfigyelhető autofágiás folyamatok megfigyelése és a közöttük lévő kapcsolat feltárása állatkísérletes 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 szívekben 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 megközelítése 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 infarktusos terület nagyságának meghatározása és hogy ezek milyen korrelációt mutatnak az autofágiás és apoptotikus fehérjék expressziójának alakulásával, a kamrafibrilláció időtartamának fényében izolált dolgozó patkányszív modellen.

II. Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok-egerek és patkányok

Kíséreltink 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 állatkísérlet engedélyszáma 3/2012/DEMÁB Az állatok *ad libitum* férhettek hozzá standard rágcsáló táphoz és vízhez. A kísérletek előtt az állatok nem részesültek semmiféle kezelésben.

Globális miokardiális iszkémia és reperfúzió izolált egérsziveken

Az egereket intraperitoneálisan (i.p.) adott nátrium-pentobarbitál (60 mg/ttkg) injekcióval altattuk el. Véralvadógátlóként 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 millimolos koncentrációban: NaCl 118; KCl 5,8; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄ 0,36; MgSO₄ 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% O₂ és 5% CO₂) 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.

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% O₂ és 5% CO₂) buborékolattuk 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 a verőtérfogatot (SV, ml).

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 áramáerősséget (20 mA), a frekvenciát (60 Hz). 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.

Elhalt területek meghatározása TTC festés segítségével patkányszíveken

Az infarktusos terület meghatározására a szívek egy részén (csoportonként 4db) trifenil-tetrazólium klorid (TTC) festést alkalmaztunk. 50 ml TTC oldatot (millimolos koncentráció: Na₂HPO₄ 88,05; NaH₂PO₄ 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, leitatunk 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.

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 citoszólikus 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.

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.

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 átmosást 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 total protein normalization (TPN) elvén alapszik. Ennek lényege, hogy a gélben található trihalometán és a fehérjéket felépítő aminosavak közül a triptofán és származékai UV fény hatására kovalens kötással 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 nyomomonkövethetősége.

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 festékkel 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.

III. Eredmények

Kamrafibrilláció kialakulása iszkémia-reperfúzió átesett egérszívekben

Kísérleteink során összesen 21 izolált egérszívet vizsgáltunk. A 25 percet követő globális iszkémián átesett egérszívek közül nyolc szíven volt megfigyelhető kamrafibrilláció, míg 13 szív esetében nem volt arrhythmia a reperfúziót követően. A két csoportban mért koronária átáramlás változásában sem volt tapasztalható szignifikáns különbség.

Autofágiás és apoptotikus fehérjék Western blot analízise

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

Az autofagoszóma képződésben szintén fontos szerepet játszó, ubiquitin szerű konjugációs rendszer expressziójának általunk vizsgált fehérjéi a Atg5, Atg12 és Atg7. 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.

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.

A kamrafibrilláció hatása a balkamra funkciókra

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

A kamrafibrilláció hatása az infarktusos terület nagyságára

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. 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.

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. 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.

A kamrafibrilláció hatása az autofágiás folyamatokra

A 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.

V. Megbeszélés

Különböző típusú arrhythmia kialakulhatnak iszkémia-reperfúzió és genetikai mutációk következményeként is. Manapság igen nagy figyelmet fordítanak a miokardiális ischaemia szövődményei iránt, főleg a szupraventrikuláris és kamrai arrhythmia jellemzésére és remodelingre. A miokardiális iszkémia után bekövetkező reperfúzió befolyásolja számos gén expresszióját, hatással van az ioncsatornák állapotára, a miokardiális funkciókra és a szív arrhythmogenezisére is. A szívizomzat elektrofiziológiája és arrhythmogenezise-beleértve a kamrai arrhythmia-át viszonylag jól ismert, azonban jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre az arrhythmia és autofágia közötti kapcsolatról. Az autofágia arrhythmia kialakulásában betöltött szerepe nehezen megítélhető, hiszen figyelembe kell venni a szív ritmuszavaraival 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. Ezen aggregátumok felhalmozódása az intracelluláris térben az érintett sejt elöregedéséhez vezethet, gyulladást idézhet elő és növeli a sejt fogékonyságát további megbetegedésekre. A kardiovaszkuláris rendszer sejtjei különösen érzékenyek ezen intracelluláris fehérje törmelékek jelenlétére, melynek következményeként különböző szívbetegségek és arrhythmia alakulhatnak ki.

Tanulmányunkban vizsgáltuk az izolált egérszíveken vizsgált 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. 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 indukciójában és mintegy platform fehérjeként funkcionál az Atg fehérjéknek és a III-as osztályba tartozó PI3K-nak, amelyek együttesen iniciálják a makroautofágiát. 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. Mindazonáltal fontos megjegyezni, hogy ha a szövet elég hosszan intenzív stressznek van kitéve, az autofágia okozta sejthalál fokozódhat. 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

elválatozásokat 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 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. A kardiovaszkuláris és egyéb szövetekben az életkor előrehaladtával az apoptózis és az autofágia szintje csökken, amely a gyulladásos jelenségekkel és az NF- κ B aktivációval együtt szövetkárosodást, fizikai degradációt és tumorgenezist eredményezhet. 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 ismételten LC3BI-é alakul, ezáltal újból felhasználhatóvá válik további fagoszóma felépítésében. Éppen ezért az LC3BII jó indikátora azt az autofágiás folyamatoknak a legkülönbözőbb 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. Ezt korábbi kutatások is alátámasztják, hiszen *Chen* és munkatársai a pitvarfibrilláció jelenlétében vagy hiányában, mitrális és tricuspídalis billentyűk regurgitációban LC3B pozitív pitvari myociták számának emelkedését tapasztalták. Ezzel szemben *Garcia* és munkatársai csökkent autofágiás aktivitást tapasztaltak posztoperatív páciensek esetén pitvari fibrilláció során, csökkent LC3B expressziós szint mellett. 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. 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.

Mindezen eredményeket együttvéve 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 - úgy mint 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 verőtérfogat 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. Az ismert mechanizmusok, amelyek az infarktusos terület nagyságának ilyen mértékű növekedését előidézik és fokozzák, megfigyelhetők az arrhythmogenezis és a szívfunkciók működési zavara során is. 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. Ezen folyamatok patofiziológiáját a szívritmuszavarok elősegítik és a szövetek az autofágia indukálásával ellensúlyozzák azt. 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. 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. 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 – energiahány 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.

VI. 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 depléciónak 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.

VI. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek Dr. Lekli Istvánnak és a Gyógyszerhatástani Tanszék vezetőjének Prof. Dr. Tótsági 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, 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.



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., Tószaki, 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., Tószaki, 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.0000000000000132>
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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.07.05.

