

**A kardioprotekció különböző lehet ségei  
a szívizom iszkémia/reperfúziós  
károsodásának csökkentése érdekében**

(PhD tézis rövid magyar nyelv összefoglalója)

Pálóczi János

Témavezetők:

Dr. Görbe Anikó

Dr. Bencsik Péter

Szegedi Tudományegyetem,  
Multidiszciplináris Orvostudományok  
Doktori Iskola  
Általános Orvostudományi kar,  
Biokémiai Intézet

Szeged,

2015



## Publikációs lista

### 1. A doktori disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó cikkek listája:

- I. Bencsik P\*, Pálóczi J\*, Kocsis GF, Pipis J, Beleczi I, Varga ZV, Csonka C, Görbe A, Csont T, Ferdinandy P. Moderate inhibition of myocardial matrix metalloproteinase-2 by ilomastat is cardioprotective. *Pharmacol Res.* 2014; 80:36–42. **IF.: 3.976**  
\*a szerzők egyenlő arányban járultak hozzá a közlemény létrejöttéhez.
- II. Görbe A, Varga ZV, Pálóczi J, Rungarunlert S, Klincumhom N, Purity MK, Madonna R, Eschenhagen T, Dinnyés A, Csont T, Ferdinand P. Cytoprotection by NO-donor SNAP against ischemia/reoxygenation injury in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Mol Biotechnol.* 2014; 56:258–64. **IF.: 2.275**

**A témához közvetlenül kapcsolódó cikkek kumulatív impakt faktora: 6.251**

### 2. A doktori disszertáció témájához közvetetten kapcsolódó cikkek listája:

- III. Csonka C, Kupai K, Bencsik P, Görbe A, Pálóczi J, Zvara A, Puskás LG, Csont T, Ferdinandy P. Cholesterol-enriched diet inhibits cardioprotection by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activators cromakalim and diazoxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014; 306:H405–13. **IF.: 4.012**
- IV. Monostori P, Kocsis GF, Ökrös Z, Bencsik P, Czétényi O, Kiss Z, Gellén B, Bereczki C, Ocsovszki I, Pipis J, Pálóczi J, Sárközy M, Török S, Varga IS, Kiss I, Fodor E, Csont T, Ferdinandy P, Túri S. Different administration schedules of darbepoetin alfa affect oxidized and reduced glutathione levels to a similar extent in 5/6 nephrectomized rats. *Clin Exp Nephrol.* 2013; 17:569–74. **IF.: 1.708**
- V. Szűcs G, Murlasits Z, Török S, Kocsis GF, Pálóczi J, Görbe A, Csont T, Csonka C, Ferdinandy P. Cardioprotection by Farnesol: Role of the Mevalonate Pathway. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013; 27:269–77. **IF.: 2.952**
- VI. Varga ZV, Kupai K, Szűcs G, Gáspár R, Pálóczi J, Faragó N, Zvara A, Puskás LG, Rázga Z, Tizlavicz L, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Ferdinandy P, Csont T. MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 62:111–21. **IF.: 5.218**
- VII. Kocsis GF, Sárközy M, Bencsik P, Pipicz M, Varga ZV, Pálóczi J, Csonka C, Ferdinandy P, Csont T. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 303:H1229–36. **IF.: 3.629**

**A témához közvetetten kapcsolódó cikkek kumulatív impakt faktora: 17.519**

## Bevezetés

Az akut miokardiális infarktus Magyarországon évente közel húszezer embert érint. A betegség hátterében leggyakrabban egy a koszorúerek falában, érlemezésesedés következtében kialakult plakk ruptúrája áll, amit többnyire az ér elzáródása és iszkémiás körülmények kialakulása követ az érintett szívterületen. Az iszkémia következményeként a hipoxiás sejtek apoptózis, illetve nekrozis következtében elpusztulnak. A hipoxiás szívizomsejtekben intracellulárisan megemelkedik a  $\text{Na}^+$ , a  $\text{H}^+$  és a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja, ami pH csökkenéshez, szöveti acidózishoz vezet. Az ionháztartás zavara nemcsak a kontraktilis elemek túlműködését, hanem proapoptotikus jelátviteli folyamatokat is beindíthat. Mindezen folyamatok mellett reaktív oxigén/nitrogén intermedierek is képződnek a hipoxiás szívizomsejtekben, ami tovább súlyosbítja az iszkémiás károsodást. A reaktív szabadgyökök felszaporodása miatt számos enzim, pl. mátrix-metalloproteinázok (MMP-k) kóros aktivációja is bekövetkezik.

A legtöbbet alkalmazott terápiás beavatkozás miokardiális infarktus esetén, az elzáródott ér újbóli megnyitása és az érintett szívizomterület reperfüziója. Annak ellenére, hogy a reperfüziót követően visszaáll a megfelelő oxigén és tápanyag kínálat, további, úgynevezett reperfüziós károsodással is számolni kell. A reperfüzió első szakaszában ugyanis a hirtelen megnövekedő oxigén kínálat miatt további reaktív szabadgyökök (ROS) képződnek a szívizomban, átmenetileg fokozva a sejtpusztulás mértékét. Ezen felül az endothel sejtek felszínén fokozódik egyes adhéziós fehérjék megjelenése (pl. VCAM-1, E-, és P-szelektinek), ezáltal fokozódik a leukociták kitapadása, és szöveti penetrációja. Az aktivált leukocitákból citokinek, gyulladáshoz vezető mediátorok, proteolitikus enzimek szabadulnak fel, amik egy komplex gyulladáshoz vezető folyamatot indukálnak az érintett szívizomban.

Az MMP-k  $\text{Zn}^{2+}$ -tartalmú endopeptidázok, melyek nevüket a kötőszövetben betöltött szerepük alapján kapták. Az MMP-k fiziológiai körülmények között zimogén, azaz inaktív formában szintetizálódnak és aktivitásukat proteolitikus hasítást követően nyerik el. Azonban egyes izoformák, mint például a szívizomsejtekben konstitutívan expresszálandó MMP-2 esetében, lehetőség van alternatív módon történő aktiválódásra. Ilyen alternatív utat jelent egy ROS intermedier, a peroxinitrit szint emelkedése, mely az enzim inaktív formájának aktivációját indukálja S-nitrozilációs és S-glutathionilációs folyamatokon keresztül. Újabban bebizonyosodott, hogy a patofiziológiai körülmények között aktiválódott pro-MMP-2 izoforma a szívizomsejtekben súlyos károsodást képes előidézni az iszkémiás inzultus követően, hiszen intracelluláris szubsztrátjait (titin, az  $\alpha$ -aktinin, a troponin-I, és a miozin

könny láncc) amelyek elengedhetetlenek a fiziológias izomm ködéshez funkcióképtelenné teszi. Ezen struktúrák degradációja sejt szinten a kontraktilitás csökkenéséhez, valamint a szív pumpafunkciójának romlásához vezet. Mindezek mellett a nekrotizált sejtekben kiszabaduló aktív MMP-2 az extracelluláris mátrixot is károsítja, fokozva az iszkémiás károsodás mértékét. Ezért az MMP-k gátlása egy potenciális terápiás célpont lehet az akut miokardiális infarktus kezelésében.

A miokardiális infarktus terápiájának egyik új megközelítése is körvonalazódik: az infarktus következtében elhalt szívizomba beültetett sejt-eredetű szívizomsejtek képesek lehetnek az érintett szívizomterület funkciójának javítására. Habár több preklinikai tanulmány számottevő szívfunkció javulásról számol be az implantációt követően, a humán célú felhasználáshoz számos problémát kell még megoldani, mint például magas tisztaságú, nagyszámú szívizomsejt előállítás *in vitro*. További problémát okoz az implantált sejtek alacsony túlélési rátája a kedvezőtlen, iszkémiás szöveti környezetben. A szívizomsejtek ilyen környezetben történő védelme kardioprotektív anyagokkal, komolyan javíthatja az implantált sejtek hosszú távú túlélését.

Kutatócsoportunk már korábban létrehozott egy primer neonatális patkány szívizomsejt modellben működő szimulált iszkémia/reoxigenizációs (SI/R) teszt rendszert, amit a nitrogén-monoxid (NO) donor s-nitroso-N-acetil-penicillamin (SNAP) és a partikuláris guanilat-cikláz enzimet aktiváló B-típusú nátriuretikus peptid (BNP) kardioprotektív hatásának vizsgálatával validáltuk. Ez az *in vitro* teszt rendszer alkalmas lehet az iszkémiás szívizomba implantált sejtek túlélését fokozó, endogén jelátviteli útvonalak vizsgálatára, potencírozására.

### **Célkitzés**

A jelen kutatási munka első részében a nem szelektív MMP inhibitor ilomastat direkt citoprotektív hatását vizsgáltuk egy előzetesen létrehozott, kardioprotektív anyagok tesztelésére alkalmas rendszerben, primer neonatális patkány szívizomsejteken, SI/R inzultust követően. Továbbá megvizsgáltuk, hogy ez a kardioprotektív hatás az MMP-2 intracelluláris gátlásán keresztül történik-e. Ezen túlmenően, *in vivo* patkányszívizom modellben vizsgáltuk az ilomastat infarktus méret csökkentő hatását iszkémia/reperfúziót követően.

A második tanulmány célja egy egér sejt vonalból származtatott szívizomsejt modellben működő SI/R teszt rendszer létrehozása volt, amely alkalmas kardioprotektív hatású szerek tesztelésére, és a sejtvédő hatás intracelluláris jelátviteli útvonalának vizsgálatára.

## Anyag és módszer

Az első tanulmányban először egy *in vitro* kísérletsorozatban az ilomastat  $IC_{50}$  koncentrációját határoztuk meg patkányszív homogenizátumon, zselatin zimográfia segítségével. Majd sejtkultúrán végzett kísérleteken teszteltük az ilomastat direkt citoprotektív hatását újszülött patkányból izolált négy napos szívizomsejt modellen, SI/R-t követően. Az iszkémiát ún. hipoxiás oldattal, illetve leg hipoxiás környezettel szimuláltuk. A SI csoportokban a sejteken levő tápoldatot hipoxiás oldatra cseréltük, majd 240 percre hipoxiás inkubátorba (95%  $N_2$ , 5%  $CO_2$ ) helyeztünk ilomastat (5 nM, 50 nM, 500 nM, és 5  $\mu$ M koncentrációban) illetve leg annak *in vivo* anyaga (dimetil-szulfoxid) jelenlétében. Kontrollként normoxiás csoportot alkalmaztunk, amelyben a sejteket normoxiás oldatban tartottuk, normoxiás inkubátorban (95% levegő, 5%  $CO_2$ ) a kezelés ideje alatt. Ezt a periódust mind az SI/R, mind a normoxiás kezelés esetében egy 120 perces reoxigenizáció követte: a sejteket visszahelyeztük a megfelelő tápközegbe és normoxiás körülmények között tartottuk. A kísérletek végén calceines fluoreszcencia méréssel határoztuk meg a sejtek viabilitását. Az intracellulárisan aktiválódott MMP-2-t *in situ* zimográfiával illetve leg MMP-2 immunfestéssel kombináltan vizsgáltuk, amit konfokális mikroszkóp segítségével vizualizáltunk és egy képfeldolgozó programmal (ImageJ) értékeltünk. Külön, *in vivo* kísérletes elrendezésben, patkányszív modellben teszteltük az ilomastat kardioprotektív hatását. Ebben a kísérletsorozatban hím Wistar patkányokat használtunk. Az iszkémiát az állatok bal koronáriájának elülső leszálló ágának 30 percre történő elzárásával idéztük elő, melyet 120 perc reperfúzió követett. Az ilomastatot, illetve *in vivo* anyagát az állatok intravénásan kapták 5 perccel a koronária okklúziót megelőzően több dózisban (0,3; 0,75; 1,5; és 3,0  $\mu$ mol/kg dózisok, amelyek adását 15 percenként háromszor, felezett dózisban ismételtük az ilomastat plazmakoncentráció fenntartása érdekében). Azonban ennek az adagolási módszernek a klinikai relevanciája limitált. Ezért végeztünk egy újabb kísérletsorozatot, amelyben az ilomastatot, illetve *in vivo* anyagát a reperfúzió kezdete előtt 5 perccel adagoltuk az állatoknak intravénásan (0,75; 1,5; 3,0; és 6,0  $\mu$ mol/kg dózisok, majd 15 percenként ismételve háromszor, felezett dózisban). Ezt követően az infarktus méretet trifenil-tetrazólium-klorid festéssel, illetve leg az azt követő planimetriás elemzéssel határoztuk meg.

A második tanulmányban, SI/R inzultusnak kitett, egér embrionális sejt vonalból származó szívizomsejtekben vizsgáltuk az NO donor SNAP és a partikuláris guanilát-cikláz aktivátor BNP által közvetített, a PKG aktiválásához, illetve leg ATP-dependens  $K^+$  csatornához köthető, citoprotektív hatású jelátviteli útvonalakat, a jelátviteli folyamatokat befolyásoló farmakonokkal. Az egér embrionális sejt vonalból (HM1) származó sejtekben a

kardiogén differenciációt a szívspecifikus Nkx2.5 gén promóteréhez kapcsolt eGFP expressziója jelezte. A vizsgálatok végpontja egy el z leg beállított és validált propidium-jodid fluoreszcencián alapuló viabilitás mérés, ami az elpusztult sejteket jelöli meg. A viabilitás értékeket az eGFP fluoreszcencia értékekre normalizáltuk. A sejteket ebben az esetben is hipoxiás oldattal fedtük, majd hipoxiás inkubátorba helyeztük a szimulált iszkémia id tartamára. Kontrollként normoxiás csoportot használtunk. Els lépésben optimalizálnunk kellett a szimulált iszkémia, illetve reoxigenizációs szakaszok id tartamát. Majd megvizsgáltuk a SNAP (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) és a BNP (1 nM, 10 nM, 100 nM) protektív hatását több koncentrációban. Ezt követ en a jelátviteli folyamatok vizsgálatára egy szelektív PKG inhibitor (KT5823, 60 nM), és egy szelektív ATP-dependens  $K^+$ -csatorna gátló anyagot, a glibenclamidot (1  $\mu$ M) alkalmaztunk a szimulált iszkémia id tartama alatt. Ezekkel az anyagokkal, a viabilitást nem befolyásoló koncentrációban a legkisebb hatékony koncentrációjú SNAP-pal, illetve BNP-vel kombinálva kezeltük a sejteket, illetve vizsgáltuk a sejtek viabilitását SI/R-t követ en. Az endogén NO hatását a nem specifikus nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) gátló N-nitro-L-arginin (L-NNA; 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) segítségével vizsgáltuk.

## Eredmények

Az els tanulmányban, izolált patkányszív homogenizátumon végzett zselatin zimográfia eredményeként azt találtuk, hogy a szívben el forduló egyetlen zselatináz az MMP-2, ezen kívül azt is megállapítottuk, hogy az ilomastat 0,83 nM-os koncentrációban az MMP-2 aktivitását felére csökkentette ( $IC_{50}$  dózis: 0,83 nM). Ezt követ en meghatároztuk a nem szelektív MMP inhibitor ilomastat dózis-hatás görbáját neonatális patkány szívizomsejt modellben, SI/R-t követ en. Eredményeinkben igazoltuk, hogy az ilomastat 0,5 és 5  $\mu$ M-os koncentrációkban szignifikánsan növelte a sejtek viabilitását a viv anyag csoporthoz képest, SI/R inzultust követ en. Továbbá *in situ* zimográfiával és MMP-2 specifikus immunfestéssel sikerült bizonyítanunk, hogy az ilomastat kardioprotektív hatása az intracellulárisan aktiválódott MMP-2 gátlásán keresztül történik. Az ilomastat legkisebb citoprotektív dózisa szignifikánsan csökkentette az *in situ* zimográfiában használt, fluoreszcensen jelzett szubsztrát fluoreszcencia intenzitását a viv anyag kontrollhoz képest, továbbá, az immuncitokémiai vizsgálatokkal kombinált *in situ* zimográfiás eredmények alapján az is elmondható, hogy ez a sejtvéd hatás az intracellulárisan aktiválódott MMP-2 gátlása révén valósult meg. Az *in vivo* patkányszív modellben végzett kísérleteink eredményeként azt kaptuk, hogy a nem szelektív MMP inhibitor ilomastat két dózisban is

(0,75 és 1,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét a *viv* anyag kontrollhoz képest, az iszkémia el tt adva. Az ilomastatot a reperfúzió kezdete el tt adagolva, az el z ekben hatásosnak bizonyult dózisok egyikével sem sikerült kardioprotekciót kimutatni, azonban nagyobb ilomastat dózisonál (6  $\mu\text{mol/kg}$ ) szignifikánsan csökkent az infarktus mérete a *viv* anyag kontrollhoz viszonyítva.

A második tanulmányban, az iszkémiás periódus id tartamára vonatkozólag azt találtuk, hogy 150 perc SI/120 perc reoxigenizáció szignifikánsan megnövelte a sejtelhalás mértékét a normoxiás kontroll csoporthoz képest. A SNAP sejtvéd hatása embrionális ssejt vonalból származott szívizom sejtekben dózisfügg módon érvényesült: a SNAP két koncentrációban is (1  $\mu\text{M}$  és 10  $\mu\text{M}$ ) szignifikánsan csökkentette a sejtpusztulást SI/R-t követ en a *viv* anyag kontrollhoz viszonyítva. Ellenben a BNP nem tudott citoprotektív hatást kifejteni. A nem-specifikus NOS gátló L-NNA egyik dózisa sem változtatott a sejtpusztulás mértékén, A legkisebb hatásos dózisú SNAP (1  $\mu\text{M}$ ) citoprotektív hatása jelent s mértékben gyengült a PKG specifikus gátlószer KT5823 (60 nM), vagy a mitokondriális ATP-dependens  $\text{K}^+$  csatorna gátló glibenclamid (1  $\mu\text{M}$ ) jelenlétében.

## **Diszkusszió**

Az els tanulmány eredményei alapján kutatócsoportunk el ször írta le, hogy a nem szelektív MMP inhibitor ilomastat direkt citoprotektív hatással rendelkezik SI/R inzultusnak kitett, neonatális patkány szívizomsejt modellben. Ez a sejtvéd hatás az intracellulárisan aktiválódott MMP-2 mérsékelt gátlása révén történik. Hasonló kardioprotektív hatást bizonyítottunk *in vivo* patkányszívben akut iszkémia/reperfúziót követ en, amikor az ilomastat adagolását már az iszkémia el tt megkezdtük. Itt két dózis is kardioprotektívnek bizonyult (0,75 és 1,5  $\mu\text{mol/kg}$ ). Ugyanezek az ilomastat dózisok a reperfúzió el tt adva már nem csökkentették szignifikánsan az infarktus méretét a *viv* anyaghoz képest, azonban magasabb dózisban (6  $\mu\text{mol/kg}$ ) az ilomastat ismét kardioprotektívnek bizonyult. Annak ellenére, hogy a nem-szelektív MMP inhibitoroknak számos mellékhatása ismert, a mérsékelt MMP-2 gátlás felveti egy kés bbi klinikai alkalmazás lehet ségét akut szívinfarktusos betegekben.

A második tanulmányban az el zetesen már bizonyított kardioprotektív hatással rendelkező NO donor SNAP és a partikuláris guanilát-cikláz enzimet aktiváló BNP hatását vizsgáltuk SI/R inzultusnak kitett egér embrionális ssejt vonalból származó szívizom sejtekben. Az NO donor SNAP protektív hatása dózisfügg módon érvényesült, ám a BNP nem csökkentette a sejtpusztulás mértékét. Ez azzal magyarázható, hogy a BNP specifikus



receptora még nem expresszálódik a főtális fenotípussal jellemezhető sejt eredet szívizomsejtekben. A nem-specifikus NOS gátló L-NNA alkalmazásakor nem változott a sejtek túlélése SI/R inzultus követően, ami arra utal, hogy az endogén NO termelés befolyásolta az embrionális sejt eredet szívizomsejtek iszkémiás toleranciáját. Ebben a tanulmányban sikerült a SNAP védő hatásának intracelluláris jelátviteli folyamatait is részben vizsgálni: a SNAP által aktivált cGMP-PKG tengely, illetve a mitokondriális ATP-dependens  $K^+$ -csatorna nyitása révén fokozódott a szívizomsejtek túlélése SI/R-t követően. Továbbá, ebben a tanulmányban egy embrionális sejt eredet szívizomsejten m köd tesztrendszert is bemutatunk. A jelenleg használt sejt kultúra alapú tesztrendszerek nagy része primer szívizomsejt-modelleken alapul, melyek felhasználása limitált. Az embrionális sejt eredet szívizomsejt-alapon m köd tesztrendszerek jelentősége a nagy számban kontraháló szívizomsejtek megjelenésében rejlik. Az azonos sejt vonalból származó kultúrák közötti variabilitás alacsony, így megbízható, jól reprodukálható gyógyszeresztel platformok alapját képezhetik. Ebben a tanulmányban tehát létrehoztunk egy sejt eredet szívizomsejt modellben m köd SI/R teszt rendszert, amit az NO donor SNAP-al mint ismert kardioprotektív hatású anyaggal validáltunk. Végezetül megállapíthatjuk, hogy a bemutatott tesztrendszer alkalmas különböző kardioprotektív anyagok intracelluláris jelátviteli útvonalai vizsgálatára is.

### **Köszönetnyilvánítás, támogatók**

Megkülönböztetett köszönet illeti prof. Dr. Dux Lászlót, az SZTE ÁOK Biokémia Intézetének vezetőjét, hogy lehetőséget biztosított a munkám végzésére. Köszönet témavezetőimnek, Dr. Görbe Anikónak és Dr. Bencsik Péternek támogatásukért, tanácsaikért. Köszönet Prof. Dr. Ferdinandy Péternek és a Biokémiai Intézet munkatársainak ösztönzésükért, segítségükért. Köszönet családomnak, Nikinek és Máténak szeretetükért és nem lankadó bátorításukért.

ETT 476/2009; NKFP\_06\_A1-MMP\_2006; HURO/0901/137/2.2.2-HU-RO TRANS-MED; TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005; TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035; NKFP 07 1-ES2HEART-HU (OM-00202/2007); TÁMOP-4.2.2-08/1/2008-0013; TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005; TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012; NKTH-OTKA FP7 "Mobilitás" HUMAN-MB08C-80205; EU FP7 (InduHeart, PEOPLE-IRG-2008-234390; PartnErS, PIAP-GA-2008-218205; InduStem PIAP-GA-2008-230675); COST BM1005; OTKA-PD106001, CHE-PhD-SW-2005-100; CHE-PhD-SW-RG-2007. Csont T. és Görbe A. a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Ösztöndíjának nyertesei, Ferdinandy P. Szentágothai Ösztöndíjas (TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001); Pálóczi J. a Nemzeti Kiválósági Program ösztöndíjasa (TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001); Varga V. Z. a Nemzeti Kiválósági Program ösztöndíjasa (TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001).