

# **Szívizom adaptációs mechanizmusai: hiperkoleszterinémia káros hatásai és kardioprotekció vázizomzat elektromos stimulációjával**

PhD értekezés összefoglalója

**Szabó Márton Richárd**

Témavezetők:

Dr. Csont Tamás PhD, Dr. Csonka Csaba PhD

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Metabolikus Betegségek és Jelátvitel Kutatócsoport  
Biokémiai Intézet  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem



**2023**

## 1 Publikációs lista

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. Szabó, M. R., Gáspár, R.; Pipicz, M.; Zsindely, N.; Diószegi, P.; Sárközy, M.; Bodai, L.; Csont, T., Hypercholesterolemia Interferes with Induction of miR-125b-1-3p in Preconditioned Hearts. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, (11):3744. [D1, IF: 5.924]
- II. Szabó, M. R., Pipicz, M.; Sárközy, M.; Bruszel, B.; Szabó, Z.; Csont, T., Diet-Induced Hypercholesterolemia Leads to Cardiac Dysfunction and Alterations in the Myocardial Proteome. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23, (13):7387. [D1, IF: 5.6]
- III. Szabó, M. R., Csont T; Csonka C., The effect of electrical stimulation of skeletal muscle on cardioprotection and muscle-derived miokine levels in rats: a pilot study *Physiology International* **2023**, 110, (2):135-149 [Q3, IF:1.4]

Kumulatív impkat faktor: 12.924

### Az értekezéshez nem kapcsolódó publikációk

- I. Faragó A., Zsindely N., Farkas A., Neller A., Siági F., Szabó M. R., Csont T., Bodai L., Acetylation State of Lysine 14 of Histone H3.3 Affects Mutant Huntingtin Induced Pathogenesis *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23(23):15173 [D1, IF: 5.6]
- II. Mitra, A.; Sarkar, A.; Szabó, M. R.; Borics, A., Correlated Motions of Conserved Polar Motifs Lay out a Plausible Mechanism of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biomolecules* **2021**, 11, (5). [Q2, IF: 6.064]
- III. Gopisetty, M. K.; Adamecz, D. I.; Nagy, F. I.; Baji, Á.; Lathira, V.; Szabó, M. R.; Gáspár, R.; Csont, T.; Frank, É.; Kiricsi, M., Androstano-arylpyrimidines: Novel small molecule inhibitors of MDR1 for sensitizing multidrug-resistant breast cancer cells. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2021**, 156, 105587. [Q1, IF: 5.112]
- IV. Sárközy, M.; Márványkövi, F. M.; Szűcs, G.; Kovács, Z. Z. A.; Szabó, M. R.; Gáspár, R.; Siska, A.; Kővári, B.; Cserni, G.; Földesi, I.; Csont, T., Ischemic preconditioning protects the heart against ischemia-reperfusion injury in chronic kidney disease in both males and females. *Biology of sex differences* **2021**, 12, (1), 49. [D1, IF: 8.811]

- V. Szabó, M. R.; Pipicz, M.; Csont, T.; Csonka, C., Modulatory Effect of Miokines on Reactive Oxygen Species in Ischemia/Reperfusion. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, (24). [D1, IF: 5.924]
- VI. Demján, V.; Kiss, T.; Siska, A.; Szabó, M. R.; Sárközy, M.; Földesi, I.; Csupor, D.; Csont, T., Effect of *Stellaria media* Tea on Lipid Profile in Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* **2020**, 2020, 5109328-5109328. [Q1, IF: 2.629]
- VII. Adamska-Bartłomiejczyk, A.; Janecka, A.; Szabó, M. R.; Cerlesi, M. C.; Calo, G.; Kluczyk, A.; Tömböly, C.; Borics, A., Cyclic mu-opioid receptor ligands containing multiple N-methylated amino acid residues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 27, (8), 1644-1648. [Q2, IF: 2.442]
- VIII. Váradi, A.; Marrone, G. F.; Palmer, T. C.; Narayan, A.; Szabó, M. R.; Le Rouzic, V.; Grinnell, S. G.; Subrath, J. J.; Warner, E.; Kalra, S.; Hunkele, A.; Pagirsky, J.; Eans, S. O.; Medina, J. M.; Xu, J.; Pan, Y.-X.; Borics, A.; Pasternak, G. W.; McLaughlin, J. P.; Majumdar, S., Mitragynine/Corynantheidine Pseudoindoxyls As Opioid Analgesics with Mu Agonism and Delta Antagonism, Which Do Not Recruit  $\beta$ -Arrestin-2. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59, (18), 8381-8397. [D1, IF: 6.259]
- IX. Kotormán, M.; Simon, M. L.; Borics, A.; Szabó, M. R.; Szabó, K.; Szögi, T.; Fülöp, L., Amyloid-like Fibril Formation by Trypsin in Aqueous Ethanol. Inhibition of Fibrillation by PEG. *Protein and peptide letters* **2015**, 22, (12), 1104-10. [Q2, IF: 1.069]

Összesített kumulatív impakt faktor: 56.834

## 2 Bevezetés

### 2.1 *Az iszkémiás szívbetegségek jelentősége*

Az iszkémiás szívbetegségek jelentős mértékben hozzájárulnak a szív- és érrendszeri halálozás magas arányához. Az iszkémiás szívbetegségek egy olyan betegségcsoport, melyet a szívizom csökkent oxigén- és tápanyagellátása jellemez, ami a későbbiekben a szívizom funkcionális és strukturális romlását okozza.

### 2.2 *Az iszkémia/reperfúziós károsodás*

Az akut miokardiális infarktus az iszkémiás szívbetegségek legsúlyosabb megnyilvánulása. A szívizom csökkent vérellátása aritmiákat, kontrakciós zavarokat majd visszafordíthatatlan szívizomsejt-károsodást eredményez. A véráramlás időben történő visszaállítása, az úgynevezett reperfúzió, elengedhetetlen az érintett terület károsodásának mérséklésére. Azonban paradox módon az iszkémiás szövet oxigén- és tápanyagellátottságának helyreállítása további károsodáshoz vezet; ezért az így kialakult szöveti sérülést együttesen iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodásnak nevezzük.

### 2.3 *Szívizom adaptációja az iszkémiás sérülés mérséklésére*

A szívizom rendkívüli adaptációs képességgel rendelkezik mellyel csökkenthető az iszkémiás károsodás mértéke. Az egyik leghatékonyabb stratégia a szívizom endogén kardioprotektív mechanizmusainak aktiválására az iszkémiás prekondicionálás (IPre), mely során rövid, ismétlődő I/R ciklusokat alkalmaznak a letális iszkémia előtt. Emellett olyan alternatív eljárások is ismertek, amelyek szívizomzatra gyakorolt közvetlen hatás nélkül is képesek szívizom kondicionálást kiváltani.

#### 2.3.1 *A mikroRNS-ek szerepe az iszkémiás prekondicionálásban*

Számos tanulmány kimutatta, hogy a mikroRNS-ek (miR) fontos szerepet játszanak mind az I/R károsodás, mind pedig az IPre mechanizmusában. Korábbi tanulmányok kimutatták a miR-125b család, különös tekintettel a miR-125b-1-3p szerepét a szívizom kondicionálásban. Habár kísérletes eredmények utalnak arra, hogy a miR125b-1-3p kardioprotektív hatással bír az iszkémiás szívizomban, az már kevésbé ismert, hogy ezek a kedvező hatások a szívinfarktusra hajlamosító rizikófaktorok jelenlétében is megnyilvánulnak-e.

### 2.4 *A hiperkoleszterinémia az iszkémiás szívbetegségek egyik fő kockázati tényezője*

Az iszkémiás szívbetegségek a valóságban komplex megbetegedések, melyek egyes ismert kardiovaszkuláris rizikófaktorok és társbetegségek talaján alakulnak ki. Számos kockázati tényező közül az egyik legjelentősebb a vér kórosan emelkedett koleszterin szintje,

másnéven hiperkoleszterinémia. Az emelkedett keringő koleszterinszint az erek ateroszklerózisához, majd ezek trombózisán keresztül miokardiális infarktushoz vezethet, ezáltal jelentős kockázati tényezője a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának.

#### *2.4.1 A hiperkoleszterinémia közvetlen hatása a szívizomra*

A hiperkoleszterinémia az ateroszklerózistól függetlenül direkt szívhatásokkal is bír, melyek befolyással lehetnek akár az iszkémiás szívbetegségek kialakulására, lefolyására illetve prevenció és terápia technikák hatékonyságára. Ezen direkt szívkárosító hatásoknak tekintjük a hiperkoleszterinémia során megfigyelhető fokozott reaktív oxigénradikálok képződését, kardiális diszfunkciót illetve a szívizom csökkent stresszadaptációs képességét. Habár a hiperkoleszterinémia káros kardiális hatásai jól ismertek, a pontos molekuláris mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak. Ebből kifolyólag az alternatív kondicionálási technikák tesztelése alapot nyújthat olyan módszerek kidolgozásához, melyek segítségével megismerhetők ezen folyamatok és akár fennálló hiperkoleszterinémia esetében is képesek aktiválni a szívizom endogén adaptációs mechanizmusait.

### **2.5 Elektromiostimuláció, mint alternatív kondicionálási technika**

A klasszikus iszkémiás kondicionálási módszereken kívül a szívizom kondicionálása kiváltható egy másik szervén és szöveten keresztül is. Jól ismert a fizikai aktivitás szívre gyakorolt jótékony hatása, azonban a rendszeres testmozgás gyakran különböző egészségügyi okok miatt korlátozott. Ilyen esetben az elektromos izomstimuláció vagy elektromiostimuláció (EMS), az izmok elektromos impulzusokkal kiváltott ritmikus kontrakciója, egy alternatív módot jelenthet a testmozgás előnyeinek részleges kihasználására. Az EMS széles körben alkalmazott módszer a sport- és rehabilitációs terápiaiban, és ígéretes alternatíva szívelégtelen betegek életminőségének és állóképességének javítására. Azonban az kevésbé ismert, hogy EMS alkalmazásával kiváltható-e szívizom prekondicionálás és I/R sérüléssel szembeni védelem.

#### *2.5.1 A miokinek szerepe a vázizomzat által közvetített kardioprotekcióban*

A fizikai aktivitás kedvező hatásaiban humorális és neurális faktorok egyaránt szerepet játszanak. Egy ilyen molekulacsoport az úgynevezett miokinek, melyek endokrin jelátviteli utakon keresztül közvetítik a testmozgás szisztémás hatásait. A miokin vagy exerkín kifejezést együttesen olyan citokinek és fehérjék széles skálájára használják, amelyeket túlnyomórészt az összehúzódó vázizmok termelnek és szabadítanak fel. Keveset tudunk azonban arról, hogy az elektromos ingerek által kiváltott izomösszehúzódások kiválthatják-e a különböző miokinek expresszióját és szekrécióját.

### 3 Célkitűzések

Jelen dolgozat célja az I/R sérüléssel szembeni szívadaptációs mechanizmusok különböző aspektusainak vizsgálata volt. Munkánk során a hiperkoleszterinémia szívre gyakorolt káros hatásait vizsgáltuk, valamint azt, hogy az elektromos ingerek által kiváltott vázizom-összehúzódnás kivált-e szív prekondicionálást normokoleszterinémiában. A dolgozat konkrét céljai a következők:

1. Az "omika" technikák terén a közelmúltban elért eredmények hatékony eszközt jelentenek a különböző állapotok és betegségek molekuláris jellemzésében. Ezért célunk volt a proteomikai és az azt követő bioinformatikai elemzések felhasználásával a bal kamrai proteom jellemzése hiperkoleszterinémiás állapotban. További célkitűzésünk volt olyan molekuláris útvonalak és fehérje kölcsönhatási hálózatok azonosítása melyekben összefüggésbe hozhatóak a hiperkoleszterinémia direkt szívizomra gyakorolt hatásaival.
2. Az IPre által kiváltott szívizom kondicionálás jelentős mértékben csökken hiperkoleszterinémiás állapotban, azonban a folyamat pontos molekuláris háttérre és a hiperkoleszterinémia direkt szívhatásaival szembeni lehetséges javító stratégiákra vonatkozó ismeretek korlátozottak. Ezért célkitűzéseink között szerepelt annak vizsgálata, hogy van-e összefüggés hiperkoleszterinémia jelenlétében az IPre által kiváltott miR-125b-1-3p expressziós szint és az IPre csökkentett kardioprotektív hatása között.
3. A különböző társbetegségek jelenlétében a kardioprotekciót biztosító alternatív kondicionálási technikák kifejlesztése nagy klinikai jelentőséggel bírnak. Az EMS terápiás potenciálját figyelembe véve teszteltük, hogy rövid távú EMS-kezelés képes-e szívizom kondicionálást és kardioprotekciót kiváltani normokoleszterinémiás állatokban. Továbbá a vázizomból származó miokin expresszió és szekréció, mint az EMS által kiváltott kardioprotekció lehetséges mediátorainak vizsgálata is a jelen dolgozat célkitűzései között szerepelt.

## 4 Anyagok és módszerek

### 4.1 Kísérleti állatok

A kísérlet megfelel a laboratóriumi állatok ellátásáról és felhasználásáról szóló irányelvnek, valamint szigorúan betartottuk az 1998-as XXVIII számú magyar szabályozásokat az állatok védelméről. A tanulmányt a Szegedi Tudományegyetem helyi etikai bizottsága engedélyezte (XV.1181/2013, XV.2153/2022). Kísérleteinkben 300-350 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat párban tartottuk, egyedileg szellőztetett ketrecekben állandó hőmérsékletet, 12 h fény/sötét ciklust és ad libitum táphoz és csapvízhez való hozzáférést biztosítva.

### 4.2 A hiperkoleszterinémia hatása a bal kamrai proteomra

#### 4.2.1 Kísérleti elrendezés

Hím Wistar patkányokban, 2% koleszterinnel és 0,25% kólsavval dúsított táppal etettük nyolc héten keresztül. A kontroll állatok standard tápot kaptak. Az etetési időszak végén a szíveket izoláltuk, majd a bal kamrai szövetmintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és a proteomikai elemzéseig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

#### 4.2.2 Transztorakális echokardiográfia

A szív morfológiáját és funkcióját transztorakális echokardiográfiával vizsgáltuk Vivid IQ ultrahang készülékkel, 5,0 - 11 MHz-es fázisos transzducer alkalmazásával.

#### 4.2.3 Vér lipid meghatározás

Az etetési időszak végeztével a kísérleti állatoktól vért vettünk összkoleszterin- és triglicerid koncentráció meghatározásához.

#### 4.2.4 Proteomikai analízis

A bal kamrai szövetmintákat homogenizáltuk és a fehérjéket tisztítottunk. Az emésztett mintákból folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás mérést végeztünk. Az emésztett minták folyadékkromatográfiás elválasztását nanoAcquity UPLC rendszerrel végeztük, majd nagy felbontású Q Exactive Plus kvadrupol-orbitrap hibrid tömegspektrométerhez kapcsoltuk. A spektrumkönyvtár kvantitatív elemzését az Encyclopedia v0.9 programban végeztük.

#### 4.2.5 A proteomikai adatok bioinformatikai elemzései

A proteomikai analízissel azonosított fehérjék hálózat analízisét a web-alapú g:Profiler nyilvános szerver és a Cytoscape v3.8.2 EnrichmentMap v3.3.2 alkalmazásával végeztük. A fehérjék közötti fehérje-fehérje interakciós elemzését a STRING v11.5 adatbázissal

végeztük, majd a kapott interkációs hálózatot a STRINGApp v1.7.0 és a STRING Enrichment alkalmazásokkal módosítottuk. A klaszterelemzést a clusterMaker2 segítségével végeztük. A teljes proteomikai adatsort Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) v4.1.0 szoftverrel elemeztük. A GSEA analízis eredményeit tovább vizsgáltuk a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome adatbázist alapul véve a Pathview Web segítségével.

### ***4.3 A hiperkoleszterinémia hatása a prekondicionálás indukált miR-125b-1-3p expresszióra***

#### *4.3.1 Kísérleti elrendezés*

Egy külön kísérletsorozatban hiperkoleszterinémiás állapotot idéztünk elő a fentebb leírtak szerint. A nyolchetes etetési időszak végén mindkét etetési csoport szívét izoláltuk és Langendorff szerint perfundáltuk. Az izolált szíveket globális I/R vagy IPre csoportokra osztottuk. Az I/R protokoll során a szíveket 45 percig ekvilibráltuk majd 35 perces globális iszkémiát és a 120 perces reperfüziót alkalmaztunk. Az IPre során 15 perc ekvilibrációs időt követően háromszor 5-5 perc I/R ciklusokat alkalmaztunk a hosszú globális iszkémiát megelőzően. A reperfüzió végeztével infarktus méret meghatározást illetve miR-analízist végeztünk.

#### *4.3.2 Infarktus méret meghatározása*

A kamrákat egyenlő szeletekre vágtuk, és trifenil-tetrazolium-klorid-oldatban (TTC) inkubáltuk. A festett szívszeletekről készült képeket planimetriás módszerrel értékeltük ki.

#### *4.3.3 Kreatin-kináz felszabadulás mérése*

A reperfüzió kezdetétől számított 2, 5, 30 és 120 perc elteltével szíven átfolyó koronária perfuzátumot gyűjtöttünk a szívspecifikus kreatin-kináz (CK-MB) enzim felszabadulásának mérésére.

#### *4.3.4 A szív miR-125b-1-3p szintjének mérése miR-szekvenálással*

A bal kamrából teljes RNS-t izoláltunk, és a miR-125b-1-3p expressziójának vizsgálatára Illumina MiSeq berendezéssel újgenerációs szekvenálást végeztünk. A szekvenálási leolvasásokat kvalitatív analízist követően a mirdeep2 csomaggal elemeztük.

### ***4.4 A vázizomzat elektromos stimulációjának hatása kardioprotekcióra és az izomból származó miokin szintekre***

#### *4.4.1 Kísérleti elrendezés*

Az EMS-kezelést normokoleszterinémiás patkányokon végeztük. Három EMS kezelést alkalmaztunk az állatok hátsó végtagján; 10 Hz frekvenciával, 35 percig tartó



folyamatos stimulációval. Huszonnégy órával az utolsó EMS-kezelést követően az állatoktól vért és *gastrocnemius* izommintákat vettünk a miokinszint mérésekhez. Az EMS-kezelt és kezeletlen állatok szívét izoláltuk és Langendorff szerint perfundáltuk; 15 perc ekvilibrációt 30 perc globális iszkémia és 120 perc reperfúzió követett. A reperfúzió alatt a szíveken átfolyó koronária perfuzátumot összegyűjtöttük laktát dehidrogenáz (LDH) és CK-MB felszabadulásának mérésére. A reperfúzió végén az infarktus méretét TTC-festéssel határoztuk meg a fent leírtak szerint.

#### 4.4.2 Elektromos izomstimuláció

Az EMS-kezelést hordozható elektrostimulációs készülékkel végeztük. Az EMS során stimuláló elektródákkal *gastrocnemius* izmokat céloztuk naponta egyszer, három egymást követő napon keresztül.

#### 4.4.3 A vázizomzat miokin expressziójának és szekréciójának meghatározása

A *gastrocnemius* izmokból totál RNS-t izoláltunk miokin expressziós szintek qPCR-ral történő meghatározásához. A *gastrocnemius* és a szérummintákból irisin, dekorin, mionektin, miogloblin, interleukin-6, interleukin-15 és FSTL1 miokin fehérjékre specifikus ELISA méréseket végeztünk.

#### 4.4.4 Western Blot analízis

A bal kamrai mintákból Western blottal vizsgáltuk az ERK1/2, az AKT és a STAT3 fehérjék foszforilációs szintjeit.

### 4.5 Statisztikai elemzés

Student féle t-próbával értékeltük a koleszterinnel dúsított táp hatását a vér lipidszintjére és az echokardiográfiás paraméterekre, valamint az EMS hatását az infarktus méretére. Az IPre infarktusméretre gyakorolt hatásának értékelésére kétutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk. A proteomikai adatok esetében a statisztikai szignifikanciát Welch-teszttel vizsgáltuk. A többszörös összehasonlítású korrekciót alkalmaztuk a hálózatanalízis során feldúsult útvonalak és interakciók elemzése során. Wald-tesztet végeztünk a miR-expressziós analízisben. Az LDH és a CK-MB felszabadulások értékelésére ismételt méréses ANOVA-t alkalmaztunk. A miokinek relatív expressziós szintjét a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  módszerrel határoztuk meg. A kísérletek értékelésénél  $p < 0,05$  értéket tekintettük a csoportok közötti szignifikáns különbség jelzőjének.

## 5 Eredmények

### 5.1 A bal kamrai proteom jellemzése és hálózatanalízise hiperkoleszterinémia jelenlétében

#### 5.1.1 A koleszterinnel dúsított táp hatása a plazma lipid szintekre

A nyolchetes etetési időszak végén a koleszterinnel dúsított táppal való etetés szignifikáns mértékben megemelte a plazma összkoleszterin szintet a kontroll csoporthoz képest. Hasonló emelkedést tapasztaltunk a plazma trigliceridszintjében is a hiperkoleszterinémiás állatokban.

#### 5.1.2 Transztorakális echokardiográfiával vizsgált szívfunkció

A diasztolés funkciót jellemző korai (E) és késői (A) kamrai beáramlási sebességek tendenciaszerűen csökkentek hiperkoleszterinémiás állatokban, viszont megemelkedett az E/A arány, ami a kontraktilis funkció károsodására utal. Diasztolés diszfunkció jelenlétére utal a szignifikánsan csökkent mitrális annuluson mért korai diasztolés sebesség (e') és a mitrális beáramlás decelerációs ideje is.

#### 5.1.3 A hiperkoleszterinémiás bal kamrai szövet proteomikai jellemzése

Differenciál expresszió analízis során 23 fehérje upregulációját és 22 fehérje downregulációját mutattuk ki legalább 20 %-os mennyiségi változással a hiperkoleszterinémiás állatok bal kamrájában a normokoleszterinémiás kontrollokhoz képest.

#### 5.1.4 Szignifikánsan változást mutató fehérjék hálózatanalízise

Gén ontológiai (GO) hálózatanalízis alapján a szignifikánsan megváltozott fehérjék a kontraktilis funkcióval és a citoskeletális szerveződéssel kapcsolatosak. Emellett a mitokondriális fehérjék kisebb mértékű feldúsulását is megfigyeltük.

#### 5.1.5 Azonosított fehérjék funkcionális kölcsönhatásainak vizsgálata

Fehérje-fehérje funkcionális kölcsönhatásainak elemzése alapján a downregulált béta-aktin (ACTB) alkotta a szignifikánsan változott fehérjék interakciós hálózatának központját. Továbbá a klaszterelemzés néhány kisebb alhálózatokat is feltárt, amelyek metabolikus funkciók és hozzá köthető energiatermelés zavaraihoz kapcsolhatók össze.

#### 5.1.6 Teljes proteom mintázatanalízise

A teljes bal kamrai proteom analízise során hasonló downregulált expressziós mintázatot tapasztaltunk a mitokondriális légzési lánc komplexeihez kapcsolódó fehérjék, valamint a szívizom kontrakcióban szerepet játszó fehérjék között.

## **5.2 A hiperkoleszterinémia hatásának vizsgálata az iszkémiás prekondicionálás által indukált miR-125b-1-3p expresszióra és kardioprotekcióra**

### **5.2.1 A hiperkoleszterinémia hatása az iszkémiás prekondicionálásra**

A normokoleszterinémias patkányok szívében az IPre szignifikáns mértékben csökkentette az infarktus méretét az I/R kontrollcsoporthoz képest, azonban a hiperkoleszterinémias állatok szívében az IPre nem tudta kifejteni kardioprotektív hatását. Továbbá, az IPre csak normokoleszterinémias szívekben volt képes szignifikánsan csökkenteni a reperfüzió végén mért CK-MB enzim felszabadulás mértékét.

### **5.2.2 Az IPre hatása a miR-125b-1-3p expressziós szintjére**

A reperfüzió végén az IPre upregulálta a miR125b-1-3p expressziót normokoleszterinémias szívekben az I/R kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a hiperkoleszterinémias állatok szívében elmaradt az IPre miR-125b-1-3p expresszióra kifejtett hatása.

## **5.3 A vázizomzat elektromos stimulációjának hatása szívizom adaptációra és izomból származó miokin szintekre**

### **5.3.1 A vázizom EMS hatása ex vivo I/R károsodásra**

Az EMS kezelés hatására szignifikáns mértékben csökkent a szívből felszabaduló CK-MB és LDH-felszabadulás mértéke a reperfüzió végén. Bár az infarktus méretének átlagértéke az EMS csoportban alacsonyabb volt a nem stimulált kontrollcsoporthoz képest (körülbelül 20%-kal), az alkalmazott EMS-kezelés nem tudta szignifikánsan csökkenteni az elhalt terület mértékét.

### **5.3.2 A miokin expressziós szintek a stimulált izomban**

A vizsgált miokinek közül az alkalmazott EMS-kezelés hatására az *Fstl1*, *Il6* és *Igf1* mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett a stimulált *gastrocnemius* izomban. Emellett az Irisin, Decorin, Mionektin, FSTL1 és Mioglobin fehérje szinten is upregulálódott az EMS hatására.

### **5.3.3 A szérumban miokin szintek EMS hatására**

A mintavételi időpontban egyik vizsgált miokin sem mutatott szignifikáns különbséget EMS hatására a kezeletlen kontroll állatokhoz képest.

### **5.3.4 Az EMS hatása a szívizom kondicionálással kapcsolatos útvonalakra**

Az ERK1 és ERK2 foszforilációja az EMS kezelt állatok szívében tendenciózusan növekedett a kezeletlen kontrollokhoz képest, viszont a STAT3 és AKT fehérjék foszforilációjára az alkalmazott protokoll nem volt hatással a bal kamrai szövetben.

## 6 Megbeszélés és következtetések

Jelen dolgozatban a szívizom I/R károsodását és annak fő kockázati tényezőjét, a hiperkoleszterinémia különböző aspektusait vizsgáltuk. Eredményeink alapján a hiperkoleszterinémia befolyásolja a kontraktilis és citoskeletális rendszer, valamint az energiatermelő folyamatokkal kapcsolatos fehérjék expresszióját. Azt is kimutattuk, hogy összefüggés van az IPre hiperkoleszterinémiában tapasztalt csökkent kardioprotektív hatása és a miR-125b-1-3p indukció között, ami arra utal, hogy a miR-125b-1-3p fontos aktivátora lehet az IPre által indukált kardioprotekciónak. Továbbá, annak ellenére, hogy normokoleszterinémiában nem volt szignifikáns infarktusméret csökkenés, mégis úgy tűnik, hogy az EMS alkalmazása csökkentheti az I/R okozta sejtkárosodás mértékét, és befolyással bír vázizomzat által szintetizált miokinekre, amelyek potenciális közvetítői lehetnek az EMS szívizomra kifejtett kedvező hatásainak.

### 6.1 Új eredmények

Az értekezés új eredményei a következőkben foglalhatók össze:

- A hiperkoleszterinémia megváltoztatja a bal kamrai proteomot.
- Hálózatanalízissel kimutattuk, hogy a hiperkoleszterinémia befolyással bír a kontraktilis és citoskeletális rendszer, valamint a mitokondriális légzési lánc fehérjéinek mennyiségére.
- A miR-125b-1-3p IPre által indukált upregulációja elvész hiperkoleszterinémia jelenlétében.
- Az EMS kezelés kedvező módon befolyásolja az ex vivo perfundált normokoleszterinémiás szívek I/R károsodásának mértékét.
- Az EMS módosított miokin mRNS- és fehérjeszintekkel jár együtt a stimulált izomszövetben.

### 6.2 *A kontraktilis és citoskeletális rendszer valamint a mitokondriális légzési lánc fehérjéinek mennyiségi változásai hozzájárulhatnak a hiperkoleszterinémia direkt szívhatásaihoz*

Jelen munkában proteomikai adatsor bioinformatikai elemzésének előnyeit használtuk ki annak érdekében, hogy a hiperkoleszterinémia direkt szívhatásai mögött meghúzódó fehérje szintű változásokról egy átfogó képet kapjunk. Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan enyhe diasztolés diszfunkció alakult ki a hiperkoleszterinémiás patkányokban, amivel

összhangban mérsékelt proteom szintű változásokat tapasztaltunk a bal kamrai szövetben. A szubcelluláris struktúrák és makromolekuláris komplexek lehetséges átrendeződését az azonosított fehérjék hálózatanalízisének eredményei is alátámasztják, melyek a bal kamra kontraktilis apparátusának és citoszkeletális rendszerének változásaira utalnak. Hasonlóképp a szignifikáns változást mutató fehérjék között azonosított kölcsönhatások a downregulálódott ACTB és hozzá asszociált járulékos fehérjékkel központi szerepét emelték ki, ami szintén hiperkoleszterinémia indukált citoszkeletális átrendeződésre utal.

A teljes bal kamrai proteom mélyebb elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a hiperkoleszterinémia negatívan befolyásolta a mitokondriális légzési lánc komplexeinek fehérje alkotóit. Megfigyelésünket erősíti, hogy a mitokondriumok károsodott működése szerepet játszik a hiperkoleszterinémia direkt szívhatásaiban. A jelen dolgozat eredményei alapján megállapítható, hogy a hiperkoleszterinémia mennyiségi változásokat indukált a bal kamra proteomjában, melyek mind a kontraktilis és citoszkeletális apparátust, mind a mitokondriális légzési láncot érintik. Ezen változások összhangban állnak a hiperkoleszterinémiában megfigyelhető kontraktilis diszfunkcióval. Jelen hálózatanalízisek eredményei hozzájárulhatnak kardiovaszkuláris megbetegedésre hajlamosító rizikófaktor jelenlétében fellépő szív működési zavarok jobb megértéséhez és ezt enyhítő terápiás megközelítések kidolgozásához.

### ***6.3 A hiperkoleszterinémia csökkenti az iszkémiás prekondicionáláshoz asszociált miR-125b-1-3p indukciót***

Az IPre alkalmazása jelentősen növeli a szív iszkémiás sérüléssel szembeni ellenálló képességét. Korábbi eredmények azt sugallták, hogy a miR-125b-1-3p upregulációja fontos közvetítője lehet az IPre által kiváltott kardioprotekciónak. Vizsgálatunkban az IPre hiperkoleszterinémia jelenlétében nem volt hatással a miR-125b-1-3p expressziós szintre az I/R kontroll csoporthoz képest. Ez összhangban van a korábbi megfigyelésekkel, amelyek azt mutatták, hogy a hiperkoleszterinémia jelenlétében az IPre kardioprotektív hatása elvész. Továbbá kísérletes adatok igazolták, hogy a hiperkoleszterinémia önmagában megváltoztatja a szív miR expressziós profilját, ami összefügghet a csökkent szívizom adaptációs képességgel.

Habár számos tanulmány kimutatta az IPre és a szív miR expresszió közötti összefüggéseket normokoleszterinémiás állapotban, arról nem áll rendelkezésre kísérletes adat, hogy a hiperkoleszterinémia befolyásolná az IPre által kiváltott miR expressziós változásokat. A miR-125b-1-3p upregulációját az IPre indukált adaptív válasznak tekintik,

azonban az mRNS célpontok még nem tisztáztak. Eredményeink arra utalnak, hogy a miR-125b-1-3p IPre-re adott válaszként történő upregulációja fontos eleme lehet a kardioprotektív mechanizmusnak, azonban további vizsgálatoknak szükségesek a közvetlen ok-okozati összefüggések megismeréséhez.

#### ***6.4 Az elektromiosztimulációs kezelés csökkentheti az I/R sérülést mértékét - a miokinek lehetséges szerepe***

Az EMS-t széles körben használják mint alternatív edzésforma különböző rehabilitációs kezelésekben. Jelen dolgozatban ex vivo szívperfúziós módszert alkalmaztunk annak eldöntésére, hogy vajon az EMS valós alternatívája lehet a szívizom prekondicionálásának is. Perfúziós modellünkben a reperfúzió során az LDH és a CK-MB felszabadulása csökkent az EMS kezelésben részesült állatok ex vivo perfundált szívében, viszont az infarktus méretet nem tudta szignifikáns mértékben csökkenteni. Ennek ellenére eredményeink arra utalnak, hogy az EMS szívizom kondicionáló hatással rendelkezik, mely jótékony hatás részben megmaradt az ex vivo szívperfúzió során is. Megfigyeléseink összhangban vannak korábbi vizsgálatokkal, amelyekben a végtagok perifériás idegeinek célzott elektromos ingerlése közvetlenül az I/R előtt fokozta az iszkémiás szövet túlélését és mérsékelte a szívizom funkcionális romlását rágszáló modellben. Ebből fakadóan a vázizomzat EMS kezelése egy alternatív prekondicionálási technikát jelenthet; azonban a módszer mélyebb vizsgálata előtt a protokoll további optimalizálása indokolt.

Az vázizom több száz citokint és oligopeptidet, úgynevezett miokint termel és szabadít fel az izomzat kontrakciója során. A miokinek molekuláris mediátorokként közvetítik az aktív izommunka szervezetre gyakorolt jótékony hatásait. Mindazonáltal a miokinek többségéről kimutatták, hogy védelmet nyújtanak az iszkémiás károsodás ellen is. Eredményeink alapján az alkalmazott EMS protokoll több miokin expresszióját is megváltoztatta a stimulált izomszövetben. Így feltételezhető, hogy a testmozgáshoz hasonlóan a miokinek az EMS által indukált szívizom kondicionálásban is részt vehetnek, viszont mechanisztikus szerepük igazolása jövőbeli vizsgálatok tárgyát képezi.

## 7 Köszönetnyilvánítás

A kutatási témát az OTKA-NKFIH (K115990), az EFOP 3.6.2-16-2017-00006, a GINOP 2.3.2-15-2016-00006, a GINOP-2.3.2-15-2016-00040 és a TKP2021-EGA-32 projekt támogatta. Jelen munka az Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Programja által biztosított ÚNKP-19-3-SZTE-269 pályázat támogatásával valósult meg.

Szeretném kifejezni köszönetemet Prof. Dr. Dux Lászlónak, hogy lehetőséget biztosított számomra a Biokémiai Tanszékhez való csatlakozásra.

Hatalmas köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Csont Tamásnak és Dr. Csonka Csabának tudományos útmutatásukért, bátorításukért és rengeteg hasznos javaslatukért az elmúlt évek során mind szakmai, mind személyes vonatkozásban.

Hálás vagyok kutatócsoportunk senior tagjainak, Dr. Pipicz Mártonnak, Dr. Sárközy Mártának és Dr. Szűcs Gergőnek gyakorlati javaslataikért és tanácsaikért.

Jelen munka nem valósulhatott volna meg Dr. Molnár-Gáspár Renáta, valamint PhD hallgató társaim, Dr. Apjok-Sója Andrea, Dr. Demján Virág és Diószegi Petra hozzájárulása nélkül.

Külön köszönettel tartozom a Biokémiai Tanszék minden tagjának, különösen Čolić Atinának, Csóré Dórának, Plechl Évának, Somogyi Rékának, Engi Ildikónak, Bodnár Tündének, Ocsovszki Imrének és Papp Józsefnek a készséges technikai támogatásukért és segítségükért. Hálás vagyok továbbá volt TDK hallgatóimnak, Dr. Marik Rékának és Dr. Nagy Kamillának a közös tudományos munkánk során tanúsított lelkesedésükért.

Szeretnék köszönetet mondani kollaborációs partnereinknek, Dr. Bodai Lászlónak és Dr. Zsindely Nórának, hogy lehetővé tették számunkra a miRNS szekvenálást, valamint Dr. Szabó Zoltánnak és Bruszel Bellának a kvantitatív proteomikai mérésért.

Szívből jövő hálával tartozom korábbi mentoromnak, Dr. Borics Attilának, aki elindított a tudományos pályán.

Ezt az utat nem tudtam volna végigjárni apukám, anyukám, édesanyám férje, Árpi, testvéreim, Tina, Patrik, Oli és Levi, valamint legjobb barátom, Tomi támogatása nélkül. Mindezen túl szavakkal nem tudom kifejezni hálámat feleségemnek, Anikónak; véget nem érő szeretete és hatalmas erőfeszítése, hogy stabil háttérrel biztosítson gyermekeink számára mindig ösztönzően hatott átsegítve ezzel valamennyi nehézségen.