

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Természetes és mesterséges hormonhiány kiváltotta kardiovaszkuláris változások és terápiás lehetőségei patkánymodellben

Matvon Denise

Témavezetők:

Dr. Pósa Anikó, egyetemi docens

Dr. Szabó Renáta, egyetemi adjunktus

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2022

Szeged

Rövidítések jegyzéke

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

Comt: katekolamin o-metil transzferáz

CVD: kardiovaszkuláris betegségek

Esm1: endotélsejt specifikus molekula-1

GOT: glutamát-oxálacetát-aminotranszferáz

GPT: glutamát-piruvát-aminotranszferáz

GSH: redukált glutation

GSSG: oxidált glutation

HO: hem-oxigenáz

HO-1: hem-oxigenáz-1

LAD: bal leszálló koronária artéria

MPO: mieloperoxidáz

Ogn: oszteoglicin

Pcp4: Purkinje-protein 4

TNF- α : tumor nekrosis faktor-alfa

TTC: 2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid

Bevezetés

Társadalmunk egészségét elsősorban a szív- és érrendszer diszfunkciói veszélyeztetik, így az ennek hátterében megbúvó hormonális, inflammatorikus és oxidatív folyamatok mélyebb megértése új terápiás stratégiák kidolgozását segítheti. Jól ismert tény, hogy a fiatal férfiak nagyobb eséllyel válnak a kardiovaszkuláris betegségek (CVD) áldozatává, mint a hozzájuk hasonló korú nők, habár a menopauza után a nők kardiovaszkuláris veszélyeztettsége meredeken nő. A koleszterin eredetű nemi hormonok emberi szervezetben rendkívül széleskörű biológiai hatással bírnak. Az androgének és ösztrogének, a szív- és érrendszerben expresszálandó szteroid receptorokkal való kölcsönhatásaik és metabolikus hatásaik révén, létfontosságú szerepet játszanak a szív egészségében. Kifejeződésük mértéke az életkortól függően és különböző patológiás állapotok eredményeképpen csökkenhet, mely folyamat összefüggésbe hozható a CVD-k kialakulásának kockázatával. Nők esetében az ösztrogénhiány, férfiak esetében a tesztoszteron deficiencia számottevően növeli a szénhidrát- és lipidanyagcsere rendellenességek, valamint a viszcerális elhízás kialakulásának esélyét, ezáltal az ateroszklerózisra és hipertóniára való kockázatot is. Ugyanakkor tanulmányok alátámasztják, hogy a nemi hormonok fiziológiás szintű expressziója a gyulladással és antioxidáns folyamatok modulálásán keresztül hozzájárul a CVD-k megelőzéséhez. Hatékonyan képes csökkenteni bizonyos gyulladással kapcsolatos citokinek, és emelni egyes antioxidánsok szintjét a szervezetben. Legfőbb antioxidáns enzimek közé sorolható a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a glutathion (GSH), és nem utolsósorban a hem-oxigenáz (HO). A HO enzim katalizálta reakció során képződő biliverdint és bilirubint pedig nem enzimatisz antioxidánsokként tartják számon. A HO rendszer antioxidáns hatásai mellett, bizonyítottan anti-inflammatorikus tulajdonságokkal is bír. Sajnálatos módon a szervezet antioxidáns védelme az öregedést kísérő inflammatorikus, oxidatív és hormonális folyamatok eredményeképpen jelentősen csökken, mely patológiás állapot fokozza a krónikus betegségek incidenciáját. Amellett, hogy a CVD-k etiológiájában és klinikai megjelenésében nemi különbségek mutatkoznak, a mozgásszegény életmód is nagyban predisponálja kialakulásukat. A rizikófaktorok eliminálása, így a hormonhiányból eredeztethető társbetegségek és szövődményeinek kezelése eredményesen csökkentheti a mortalitást és morbiditást mindkét nemben. Ennek eszközei lehetnek a hormonpótló terápiák, de a rendszeres, közepes intenzitású testmozgásnak is kulcsszerepet tulajdoníthatunk a CVD-k megelőzésében.

Célkitűzések

Az öregedéssel összefüggő hormonális folyamatok és azok patológiás következményeinek mérséklésére összpontosító kutatások komoly preventív és terápiás célpontokat tárhatnak fel a CVD-k tekintetében. Doktori disszertációmban foglalt vizsgálataink célja, hogy feltérképezzük a tesztoszteron közvetítette lehetséges kardioprotektív hatásokat, továbbá, hogy megvizsgáljuk az életkor előrehaladtával bekövetkező kardiovaszkuláris változások vajon mérsékelhetőek-e életmódbeli változtatásokkal a különböző nemekben.

1. Első kísérletsorozatunkban tisztázni kívántuk, hogy milyen különbségek mutatkoznak tesztoszteronhiány, valamint az említett hormon pótlásának hatására fiatal és idős hím patkányokban a szervezet gyulladáscsökkentő és antioxidáns paramétereiben?
2. Második kísérletsorozatunkban pedig arra kerestük a választ, hogy:
 - Hogyan módosul különböző kardiovaszkuláris homeosztázisban központi szerepet betöltő fehérjék koncentrációja a szívben szabadidős testmozgás hatására idős nőstény és hím állatokban?
 - Továbbá vizsgálni kívántuk, hogy ennek hatására miképp változik a szív iszkémiára való hajlama?

Anyagok és Módszerek

1. **A tesztoszteron által közvetített antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatások szívben**

Kísérleti protokoll

Első kísérletsorozatunkban 10 hetes, illetve 24 hónapos hím Wistar patkányokat használtunk. A fiatal és idős állatcsoportokon belül kasztrált és áloperált patkányokat különítettünk el. A sebészi kasztrálás során a heréket és mellékheréket kimetszettük, az áloperálás során az állatok

herezacskóját szintén felnyitottuk, azonban heréjüket nem távolítottuk el. A műtéti eljárásokat követő kéthetes pihenő időszak után az állatok egy része naponta, szájon át, 2.5mg/ttkg dózisú ciproteron acetát kezelésben részesült az androgének termelésének teljes blokkolása érdekében, míg az állatok másik felét 8mg/kg dózisú tesztoszteron undekanoát injekcióval kezeltük hetente, *intramusculárisan (i.m)*. A 6 hetes kísérleti periódust követően az állatoktól vért vettünk, eutanizációt hajtottunk végre, majd meghatároztuk a bal szívkamra teljes glutation (GSH+GSSG) szintjét, a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) expresszióját, a tumor nekrózis faktor-alfa (TNF- α) gyulladáscitokin koncentrációját, a mieloperoxidáz (MPO) és hem-oxigenáz (HO) enzimek aktivitását, illetve a HO-1 izoforma szintjét. Az állatokból vett vérmintából pedig detektáltuk a tesztoszteron, a glutamát-oxálacetát-aminotranszferáz (GOT) és a glutamát-piruvát-aminotranszferáz (GPT) koncentrációját.

A HO enzim aktivitásmérés a szívszövetben

A HO enzim aktivitását spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg, a képződött bilirubin mennyiség alapján. A HO-aktivitást nmol/óra/mg fehérjeként fejeztük ki.

A GSH+GSSG tartalom mérése szívszövetben

A szív GSH+GSSG szintjét spektrofotometriás módszerrel 405 nm-en mértük, a kapott GSH szinteket pedig nmol/mg fehérjeként fejeztük ki.

A cGMP, TNF- α , HO-1 koncentráció mérése szívszövetben

A HO-1, TNF-alfa, cGMP szintjének meghatározása ELISA módszerrel történt a gyártói előírásokat betarva. HO-1 szintet ng/mg fehérje, a TNF- α értékeket pg/mg fehérje, míg a cGMP koncentrációt pmol/mg fehérje értékben adtuk meg.

MPO aktivitásmérés szívszövetben

A bal kamra MPO aktivitását spektrofotometriásan detektáltuk. Az értékeket μ U/mg fehérjeként fejeztük ki.

Szérum tesztoszteron, GOT, GPT koncentrációjának meghatározása

A szérum tesztoszteron szintjét Immulite 2000XPi kemilumineszcens immunoassay segítségével, míg GOT, GPT koncentrációját Biolis 24i (Siemens) klinikai kémiai analizátorral határoztuk meg. A GOT és GPT értékeket U/L-ben, míg a tesztoszteron szintet ng/dl mértékegységben fejeztük ki.

Fehérjetartalom mérése Bradford-módszerrel

A minták fehérjekoncentrációját a Bradford-módszert alkalmazva 595 nm-en mértük spektrofotométerrel, eredményeinket μg fehérje/ml koncentrációban kaptuk meg.

Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag \pm S.E.M.-ként fejeztük ki. A csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVA-val, határoztuk meg, Tukey Post-hoc teszttel kiegészítve. A kapott eltéréseket $p \leq 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

2. A testmozgás hatása az öregedés okozta szívfunkcióban történő változásokra, hím és nőstény patkányokban

Kísérleti protokoll

Második kísérletsorozatunk során 20 hónapos nőstény és hím Wistar patkányokkal dolgoztunk. Az állatokat két csoportra randomizáltuk az általuk végzett testmozgás alapján, így megkülönböztettünk futó és nem futó hím és nőstény patkányokat. A testmozgást nem végző, kontroll állatok (CTRL) standard, míg a futó állatok a kísérlet teljes időtartama alatt hozzáférhető, futókerékkel felszerelt ketrecben voltak elhelyezve. A testmozgás protokollt szabadidős testmozgásként definiáltuk, hiszen az állatok a saját bioritmusuknak megfelelően, a nap 24 órájában bármikor futhattak. 12 hetes kísérleti periódus végeztével az állatokat termináltuk, szívüket eltávolítottuk. A szerveket vagy azonnal *ex vivo* izolált szívperfúziós vizsgálat alá vetettük, vagy jobb- és bal kamrára elkülönítve -80°C fokos fagyasztóba helyeztük a biokémiai vizsgálatokig.

Iszkémia-reperfúziós (I/R) sérülés modellezése Langendorff perfúziós rendszerrel

Az állatok szívét az aortán keresztül felfüggesztve Langendorff perfúziós oszlopra helyeztük. A szívek retrográd perfúziójának indítása után az iszkémiás sérülést a bal leszálló koronária artéria (LAD) 30 perces lekötésével modelleztük, melyet 120 perces reperfúzió követett. Ezt követően a szíveket 1%-os Evans-kék oldattal perfundáltuk majd -20 °C-os fagyasztóba helyeztük a további vizsgálatokig.

Infarktusos terület meghatározása

A fagyasztott szíveket az apico-bazális axisra merőlegesen felszeleteltük, majd 1%-os 2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid (TTC) oldatban és 10%-os formalinoldatban inkubáltuk. A szívseleteket két üveglemez közé helyezve Image J programmal értékeltük, az infarktusos terület nagyságát a veszélyeztetett területekre vonatkozó százalékos arányban adtuk meg.

Comt, Ogn, Pcp4 és Esm1 koncentráció meghatározása szív szövetből

A Comt, Ogn, Pcp4 és Esm1 szintjének meghatározása ELISA módszerrel történt a gyártói előírásokat betarva. A Comt, Ogn és Pcp4 szinteket pg/μg fehérjeként fejeztük ki, míg az Esm-1 értékeket pg/mg fehérjeként határoztuk meg.

Fehérjetartalom mérése Bradford-módszerrel

A minták fehérjekoncentrációját a Bradford-módszert alkalmazva 595 nm-en mértük spektrofotométerrel, eredményeinket μg fehérje/ml koncentrációban kaptuk meg.

Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag ± S.E.M.-ként fejeztük ki. A csoportok közötti különbségeket Student t-tesztel határoztuk meg. A kapott eltéréseket $p \leq 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

1. A tesztoszteron által közvetített antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatások szívben

Idős hímeknél, valamint a here eltávolításából adódó mesterséges tesztoszteronhiány eredményeképpen, szignifikánsan nőtt a szívben detektált MPO enzim aktivitása, illetve a TNF- α inflammatorikus citokin szintje a kontroll állatokhoz képest. Eredményeink alapján elmondható továbbá, hogy a férfi nemihormon-hiánya miatt csökkent a szív antioxidáns védelme is, melyet a bal kamrából mért HO enzim aktivitása, a HO-1 expressziója és nem utolsósorban a GSH szintje is alátámaszt. A szérumból meghatározott, emelkedett GOT és GPT paraméterek is igazolják a tesztoszteronhiány szívkárosító hatásait. A hormonpótló terápia hatására jelentősen mérséklődött az oxidatív károsodás és gyulladás mértéke mind fiatal, mind idős állatok szívében. Ezáltal kijelenthető, hogy a tesztoszteronterápia a szervezetre kifejtett pozitív hatásain keresztül, több támadásponton keresztül szolgálta a szív- és érrendszer védelmét.

2. A testmozgás hatása az öregedés okozta szívfunkcióban történő változásokra, hím és nőstény patkányokban

Második kísérletsorozatunkban született eredményeinkkel bizonyítottuk, hogy a szabadidős testmozgás jótékony hatással van a szív- és érrendszerre, melyet a kardiovaszkuláris rizikóval összefüggésbe hozható fehérjék koncentrációja mellett, az infarktusos terület nagysága is igazolt. Míg a Comt és az Ogn fehérjék szintjében a hím futó állatok szívében szignifikáns csökkenést figyeltünk meg; addig a Pcp4 és Esm-1 fehérjék koncentrációja mindkét nemben emelkedett. Ezen eredményekkel összhangban, a LAD lekötésre válaszul kialakuló iszkémiás sérülés mértéke is nagymértékben lecsökkent a futó állatokban. A nőstény és hím állatok eredményeiben tapasztalt eltérések valószínűsíthetően a különböző nemi hormonok szteroid receptorain keresztül megvalósuló eltérő genomikus hatások eredményeképpen születtek, azonban ezen folyamatok pontos háttérmechanizmusainak feltérképezéséhez további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalás

- Hím állatokban a részleges, vagy abszolút tesztoszteron deficiencia miatt csökkent a HO útvonal révén érvényesülő gyulladáscsökkentő és antioxidáns tulajdonságú végtermékek biológiai aktivitása, mely hozzájárult a gyulladással kapcsolatos paraméterek koncentrációjának és aktivitásának növekedéséhez.
- Eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk felállított hormonhiányos modellekben a tesztoszteron farmakológiai visszapótlása nagyban hozzájárult a szív normál működéséhez, a HO útvonalon keresztül érvényesülő antioxidáns és gyulladáscsökkentő folyamatok indukálásával.
- A gyógyszeres terápián kívül azonban, a rendszeres testmozgás beiktatásával is számottevően mérsékelhetők az öregedéssel járó kardiovaszkuláris rizikótényezők mindkét nem esetében. A korral járó hormonális változások és az azok következtében kialakuló hiányállapotok magas kockázatot jelentenek a szív- és érrendszeri megbetegedések szempontjából, azonban kellő odafigyeléssel, életmódbeli változtatásokkal jelentősen javíthatók az életkilátások.

Tudományos közlemények listája:

Matvon Denise MTMT azonosító: 10062102

A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény:

Szabó, R., **Börzsei, D.***, Kupai, K., Hoffmann, A., Gesztelyi, R., Magyariné Berkó, A., Varga, C., & Pósa, A. (2019). *Spotlight on a New Heme Oxygenase Pathway: Testosterone-Induced Shifts in Cardiac Oxidant/Antioxidant Status*, *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 8(8), 288.
<https://doi.org/10.3390/antiox8080288>

**megosztott elsőszerzőség*

IF: 4,520

Börzsei, D. *, Priksz, D., Szabó, R., Bombicz, M., Karácsonyi, Z., Puskás, L. G., Fehér, L. Z., Radák, Z., Kupai, K., Berkó, A. M., Varga, C., Juhász, B., & Pósa, A. (2021). *Exercise-mitigated sex-based differences in aging: from genetic alterations to heart performance*. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 320(2), H854–H866.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00643.2020>

**megosztott elsőszerzőség*

IF: 4,026

Egyéb közlemények:

Börzsei, D. *, Sebestyén, J., Szabó, R., Lesi, N. Z., Pálszabó, A., Pálszabó, P., Szász, A., Priksz, D., Juhász, B., Veszélka, M., Turcsán, Z., Deim, Z., Varga, C., Pósa, A. (2022) *Resveratrol as a Promising Polyphenol in Age-Associated Cardiac Alterations*,
<https://doi.org/10.1155/2022/7911222>

**megosztott elsőszerzőség*

IF: 6,543

Börzsei, D. *, Szabó, R., Hoffmann, A., Harmath, A., Sebestyén, J., Osman, J., Juhász, B., Priksz, D., Varga, C., & Pósa, A. (2021). *Multiple Applications of Different Exercise Modalities with Rodents*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 3898710. <https://doi.org/10.1155/2021/3898710>

***elsőszerzőség**

IF: 6,543

Börzsei, D.*, Szabó, R., Hoffmann, A., Veszelka, M., Pávó, I., Turcsán, Z., Viczián, C., Kupai, K., Varga, C., & Pósa, A. (2020). *Distinct Approaches of Raloxifene: Its Far-Reaching Beneficial Effects Implicating the HO-System*. *Biomolecules*, 10(3), 375. <https://doi.org/10.3390/biom10030375>

***elsőszerzőség**

IF: 4,694

Szabó, R., **Börzsei, D.***, Karácsonyi, Z., Gesztelyi, R., Nemes, K., Berkó, A. M., Veszelka, M., Török, S., Kupai, K., Varga, C., Juhász, B., & Pósa, A. (2019). *Postconditioning-like effect of exercis: new paradigm in experimental menopause*. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 316(2), H400–H407. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00485.2018>

***megosztott elsőszerzőség**

IF: 3,569

Osváth, P., Szűcs, M., **Börzsei, D.**, Szabó, R., Lesi, Z. N., Turcsán, Z., Veszelka, M., Sebestyén, J., Juhász, B., Priksz, D., Varga, C., & Pósa, A. (2022). *Andrological Aspects of Exercise: Moderate Swimming Protects against Isoproterenol Induced Testis and Semen Abnormalities in Rats*. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(3), 436. <https://doi.org/10.3390/antiox11030436>

IF: 6,313

Szabó, R., Szabó, Z., **Börzsei, D.**, Hoffmann, A., Lesi, Z. N., Pálszabó, P., Pálszabó, A., Dvorácskó, S., Gesztelyi, R., Kupai, K., Priksz, D., Juhász, B., Altmayer, A., Varga, C., & Pósa, A. (2022). *Potential Implications of Rimonabant on Age-Related Oxidative Stress and Inflammation*. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(1), 162. <https://doi.org/10.3390/antiox11010162>

IF: 6,313

Szabó, R., **Börzsei, D.**, Hoffmann, A., Lesi, Z. N., Gesztelyi, R., Juhász, B., Szebeni, G. J., Osman, J., Sebestyén, J., Nagy, A., Szegedi, S., Varga, C., & Pósa, A. (2021). *Lifestyle-Induced Redox-Sensitive Alterations: Cross-Talk among the RAAS, Antioxidant/Inflammatory Status, and Hypertension*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 3080863. <https://doi.org/10.1155/2021/3080863>

IF: 6,543

Szabó, R., Hoffmann, A., **Börzsei, D.**, Kupai, K., Veszélka, M., Berkó, A. M., Pávó, I., Gesztelyi, R., Juhász, B., Turcsán, Z., Pósa, A., & Varga, C. (2021). Hormone Replacement Therapy and Aging: A Potential Therapeutic Approach for Age-Related Oxidative Stress and Cardiac Remodeling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 8364297. <https://doi.org/10.1155/2021/8364297>

IF: 5,076

Szabó, R., **Börzsei, D.**, Szabó, Z., Hoffmann, A., Zupkó, I., Priksz, D., Kupai, K., Varga, C., & Pósa, A. (2020). A Potential Involvement of Anandamide in the Modulation of HO/NOS Systems: Women, Menopause, and "Medical Cannabinoids". *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8801. <https://doi.org/10.3390/ijms21228801>

IF: 4,556

Szabó, R., Ménesi, R., H Molnár, A., Szalai, Z., Daruka, L., Tóth, G., Gardi, J., Gálfi, M., **Börzsei, D.**, Kupai, K., Juhász, A., Radács, M., László, F. A., Varga, C., & Pósa, A. (2019). New Metabolic Influencer on Oxytocin Release: The Ghrelin. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(4), 735. <https://doi.org/10.3390/molecules24040735>

IF: 3,06

Varga, C., Veszélka, M., Kupai, K., **Börzsei, D.**, Deim, Z., Szabó, R., Török, S., Priksz, D., Gesztelyi, R., Juhász, B., Radák, Z., & Pósa, A. (2018). *The Effects of Exercise Training and High Triglyceride Diet in an Estrogen Depleted Rat Model: The Role of the Heme Oxygenase System and Inflammatory Processes in Cardiovascular Risk*. *Journal of sports science & medicine*, 17(4), 580–588.

IF: 1,774

Szabó, R., Karácsonyi, Z., **Börzsei, D.**, Juhász, B., Al-Awar, A., Török, S., Berkó, A. M., Takács, I., Kupai, K., Varga, C., & Pósa, A. (2018). *Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 6709742. <https://doi.org/10.1155/2018/6709742>

IF: 4,593

Pósa A, Szabó R, Kupai K, Berkó AM, Veszélka M, Szűcs G, **Börzsei D**, Gyöngyösi M, Pávó I, Deim Z, Szilvássy Z, Juhász B, Varga C: *Cardioprotective Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator Raloxifene Are Mediated by Heme Oxygenase in Estrogen-Deficient Rat*, *Oxid Med Cell Longev*, 2017;2017:2176749. doi: 10.1155/2017/2176749

IF: 4,593

Összesített IF: 72,716