

Sejtalapú terápiák hatékonyságának vizsgálata szívinfarktus modellben

Doktori értekezés

Benkő Zsolt, M.Sc.

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss Levente, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Radovits Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Prof. Papp Zoltán, D.Sc., tanszékvezető egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Buzás Edit, D.Sc., intézetvezető egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Földes Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Katarova Zoja, Ph.D., kutató

Budapest

2015

1. Bevezetés

A szív- és érrendszeri betegségek komoly egészségügyi és társadalmi problémát jelentenek. Európában a mortalitás 46%-a szív- és érrendszeri megbetegedés következménye. Magyarországon még szomorúbb képet mutatnak az adatok: minden második halálozás kardiovaszkuláris betegség következtében történik. Legjelentősebb ezek közül - részben gyakorisága és hosszú távú életminőséget hátrányosan befolyásoló hatása, valamint magas költségei és ennek társadalmi kihatásai miatt a miokardiális infarktus. Noha a gyógyszeres és műtéti eljárások fejlődése következtében a betegek 90-95%-a túléli az első szívinfarktust, azonban a súlyos szívinfarktus utáni kontraktilisszövet-veszteség és ennek merev, fibrotikus hegszövettel való pótlása különböző kompenzatórikus mechanizmusokat vált ki, melyek a szívfunkció csökkenéséhez és akár súlyos szívelégtelenség kialakulásához vezethetnek. A szívelégtelenség morbiditási és mortalitási adatai emelkednek és jelenleg nem áll rendelkezésre terápia, amely vissza tudná fordítani a szívfunkció hanyatlását.

Mivel miokardiális infarktus után a felnőtt szív sejtjei képtelenek a sérült szövet pótlásához megfelelő mértékű proliferációra, előtérbe kerültek a sejtalapú terápiák a sérült szív gyógyítására. Leírták csontvelő és zsírszövet eredetű mezenchymális őssejtek akut miokardiális infarktus utáni alkalmazásának jótékony hatásait kis- és nagyállat modellekben is. A sejtranszplantáció sok esetben csökkentette az infarktus által érintett terület kiterjedését, növelte az ejekciós frakciót, és fokozta az angiogenezist. Egyre több klinikai vizsgálat támasztja alá a sejtbejuttatás megvalósíthatóságát és az őssejtterápia biztonságosságát. Számos multicentrikus vizsgálat van folyamatban, amelyek a kezelések hatékonyságát vizsgálják. A csontvelő eredetű mezenchymális őssejtek a legtöbbet kutatott és leginkább ismert őssejtcsoport, a klinikai vizsgálatok döntő többségében ezt a sejttypust alkalmazzák. E sejtek különböző irányú differenciálódási képességük mellett képesek a károsodott szívizomban

kialakuló immunológiai folyamatok mediálására is. Habár a csontvelő stabil és megbízható forrása a mezenchymális őssejteknek, a csontvelő kinyerése invazív eljárás és az izolált őssejtek száma alacsony és korfüggő. Ezzel szemben a zsírszövetből nagy mennyiségű őssejt nyerhető ki és maga a zsírszövet is könnyedén és nagy mennyiségben hozzáférhető. Az izolált sejtek *in vitro* körülmények között hosszú távon, stabilan fenntarthatók. A csontvelő és zsírszövet eredetű mezenchymális őssejtek sok tulajdonságban megegyeznek, azonban több különbséget is leírtak már köztük immunfenotípus, differenciációs potenciál, transzkriptom, proteom és immunmoduláló aktivitás tekintetében. A sejterápiás körülmények közötti egymáshoz viszonyított hatékonyságukról azonban kevés adat áll rendelkezésre.

Jelenleg a miokardiális infarktus utáni őssejterápia egyik legnagyobb akadály a csekély beépülés és alacsony túlélés, ami csökkenti a potenciális regenerációs és jótékony funkcionális hatásokat. Ígéretes eredményeket mutat a sejtek túlélésének növelésére azok prekondicionálása fizikai, kémiai, farmakológiai vagy genetikai manipulációkkal mind *in vitro* iszkémiás modellekben, mind *in vivo* transzplantáció esetén. A kísérleteinkben a terápiás sejtek előkezelésére használt PJ34 a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim inhibitora. A PARP inhibíció lehetővé teszi az oxidatív stresszen átesett sejtek ATP és NAD készleteinek megőrzését, ezáltal lehetővé teszi számukra a normális funkció visszanyerését vagy az apoptotikus sejthalált, amely a szervezet számára jóval kedvezőbb, mint a proinflammatorikus nekrotikus sejthalál. Ennek megfelelően a miokardiális infarktus utáni poszt-iszkémiás mikrokörnyezetbe transzplantált sejtek túlélésének fokozására ígéretes lehetőséget jelent a különböző PARP inhibitorokkal történő előkezelés.

2. Célkitűzés

A bevezetésben felvázolt körülmények miatt szükséges és hasznos a gyakran felhasznált sejtípusok összehasonlítása és az előkezelések vizsgálata. Kísérleteink során *in vitro* megközelítést alkalmaztunk a miokardiális infarktus utáni sejterápia komplex eseményeinek modellezésére.

Munkám során céloom volt:

- jellemezni a munkacsoport által használt *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellt,
- összehasonlítani csontvelő és zsírszövet eredetű mezenchymális őssejtek túlélését poszt-iszkémiás viszonyok közt,
- összehasonlítani csontvelő és zsírszövet eredetű mezenchymális őssejtek direkt hatásait iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztokra,
- megvizsgálni PARP inhibitorral történő előkezelés hatását terápiásan használt H9c2 sejtek poszt-iszkémiás viszonyok közti túlélésére,
- megvizsgálni terápiásan használt H9c2 sejtek PARP inhibitor általi előkezelésének hatását az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztok életképességére.

3. Módszerek

3.1. Iszkémia-reperfúzió modell

In vitro H9c2 kardiomioblaszt kultúrában az oxigén és glükóz megvonásával modelleztük az iszkémiás környezetet. A sejtek inkubációja DMEM glükóz- és L-glutamin mentes médiumban, 0,5% oxigén (≈ 4 Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on zajlott. Az inkubációs rendszer segítségével szabályozható a hőmérséklet és az O₂ koncentráció, továbbá lehetőség van mikroszkóppal folyamatosan követni a változásokat.

A kísérletekben az iszkémiás kezelés időtartama 160 perc volt. A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőzően egy nappal raktuk ki a H9c2 kardiomioblaszt sejteket 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk a sejtekre. A hipoxiás inkubáció után a médiumot 3 ml 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnel kiegészített DMEM médiumra cseréltük, ezután a sejteket 37°C-os, 5% CO₂ tartalmú, 100%-os páratartalmú atmoszférával rendelkező inkubátorba helyeztük.

3.2. A terápiásan alkalmazott sejtek jelölése - Vybrant DiD

Mivel kísérleteink során nagyon fontos volt, hogy a kokultivációt követően is el tudjuk különíteni a sértett és a hozzáadott sejteket, ezért Vybrant DiD (excitáció/emisszió: 644 nm / 663 nm) fluoreszcens membránfestéket alkalmaztunk a hozzáadott sejtek jelölésére, a festéket 1:2000-es hígításban alkalmaztuk (500 nM).

3.3. A hozzáadott sejtek PARP inhibitor előkezelése

A sejtek PJ34 (Inotek Pharmaceuticals Corp., Beverly, MA, USA) PARP inhibitorral történő előkezelése 1 órán keresztül zajlott normál sejt kultúrás körülmények között, a sejtek tápoldatát kiegészítve a megfelelő koncentrációjú (10 μM vagy 100 μM) PJ34-el vagy a kontroll esetében PBS oldattal. Az inkubációs idő letelte után a PARP inhibitor a sejtek kétszeri PBS-es mosásával távolítottuk el. A kezelést közvetlenül az iszkémia-reperfúzió átesett sejtekhez való hozzáadás előtt végeztük.

3.4. Humán zsírszövet eredetű őssejtekkel kondicionált médium

A humán zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtekkel (hASC) kondicionált médium (AKM) előállításához hASC sejteket inkubáltunk 100 mm-es Petri-csészében, 10 000 sejt/ cm^2 konfluenciával, 8 ml 1 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sztreptomocinnel kiegészített DMEM médiumban, 37°C-os, 5% CO_2 tartalmú, 100%-os páratartalmú atmoszférával rendelkező inkubátorban. A médiumot 48 óra után leszívtuk, és félreraktuk a kísérletekhez.

3.5. Élő/halott jelölés – calcein-ethidium homodimer

Az élő és halott sejtek megkülönböztetéséhez calcein és ethidium homodimer (EthD) festékeket használtunk fel.

A sejtmembránon áthatolni képes, nem fluoreszcens calcein-AM-et egy intracelluláris észteráz enzimatis konverzió révén fluoreszcens membrán-impermeabilis calceinné alakítja. A hidrofíln calcein az élő sejtekben intenzív, zöld fluoreszcenciát mutat (excitáció/emisszió: 494 nm / 517 nm). Amennyiben a membránintegritás meg bomlik, a festék visszatartása csökken, és a sejt fluoreszcens festődése fokozatosan eltűnik.

Az ethidium homodimer (excitáció/emisszió: 528 nm / 617 nm) erős pozitív töltéssel rendelkezik, ezért az ép sejtmembránon nem képes átjutni, így az

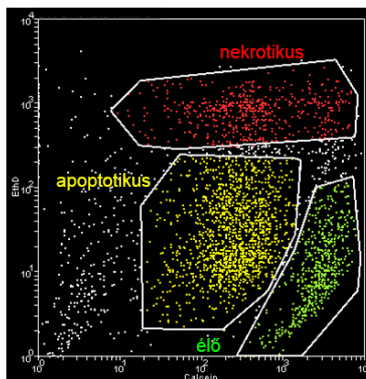
egészséges sejteket nem jelöli, kizárólag a sérült membránnal rendelkező sejtekbe képes bejutni. A DNS-hez való kötődés során a fluoreszcens aktivitása 40-szeresére növekszik, így a sérült és az elpusztult sejtek magja élénk, piros fluoreszcens jelet ad.

3.6. Áramlási citometria

Kísérleteink során 24 órával a szimulált iszkémiás sértést követően tripszinációval választottuk fel a sejteket a tenyésztőlemez felületéről, majd 8 perc 1200 rpm-en végzett centrifugálást követően az élő/halott festékek PBS oldatában reszuszpendáltuk a pelletet. A calceint 1:12000-es, azt EthD-t pedig 1:3000-es hígításban alkalmaztuk. A mérésekhez BD Biosciences, FACSCalibur áramlási citométert és a CellQuest programot használtunk.

A terápiásan alkalmazott sejtek DiD jelölése egyértelműen elkülönült a sértésen átesett DiD-del nem jelölt sejtek jelétől. A kísérletek során a DiD jel alapján történő, úgynevezett kapuzással különböztettük meg az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejteket és a hozzáadott terápiás sejteket.

A kísérleti csoportokban az EthD-Calcein dot-ploton megtalálható (1. ábra) a calceinnel festődő élő és az EthD-val festődő nekrotikus sejtpopuláció, ezen túl megjelent egy köztes festődésű, irodalmi adatok alapján apoptotikusnak tekinthető sejtpopuláció is.



1. ábra Calcein-ethidium homodimer dot-plot. EthD – ethidium homodimer

3.7. Metabolikus aktivitás mérés

A sejtszám és anyagcsere intenzitás kvantitatív mérése az élő sejtek redukáló képességét felhasználva lehetséges. Számos módszer ismert az irodalomban, amely ezen az elven működik, jelen méréseinkben a PrestoBlue reagenst alkalmaztuk. A reagens membránpermeábilis, kék színű resazurin komponenset tartalmaz, amely az élő sejtekben piros színű resorufin vegyületté redukálódik. A redukció során a festék maximális abszorbanciája eltolódik 600 nm-ről (resazurin) 570 nm-re (resorufin), így a kiértékelés a két hullámhosszon történő abszorbancia méréssel végezhető el.

3.8. Malondialdehid mérés

Az iszkémiás sérülés során keletkező reaktív oxigén vegyületek lipidperoxidációt okozhatnak. A malondialdehid (MDA) a többszörösen telített zsírsavak peroxidációjának leginkább alkalmazott markere. Semleges pH-értéknél enolát anion formájában van jelen, melynek kémiai reaktivitása csekély. Az MDA mennyiségi analízise a tiobarbitursavval adott reakcióján alapul, melyet magas hőmérsékleten, savas körülmények között kell véghezvinni. A két tiobarbitursav és egy MDA molekula kondenzációjával keletkező vegyület 532 nm-en spektrofotométerrel detektálható.

3.9. Laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérés

A laktát-dehidrogenáz enzimaktivitás mérése egy kapcsolt reakció segítségével történik. Ennek során a laktát-dehidrogenáz enzim (LDH) a tejsavat piruváttá alakítja, a reakcióban keletkezett redukált koenzim pedig az indonitrotetrazólium formazánná redukálása során regenerálódik, amely 490 nm-en detektálható.

3.10. Kísérleti protokollok

3.10.1. Iszkémia-reperfúzió modell jellemzése

A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőző nap lyukanként 100 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet raktunk ki 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk a sejtekre. A sejteket 160 percig 0,5% oxigén (≈ 4 Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on inkubáltuk. A hipoxiás inkubáció után a médiumot lyukanként 3 ml 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 μ g/ml sztreptomocinnal kiegészített DMEM médiumra cseréltük, ezután a sejteket 37°C-os, 5% CO₂ tartalmú, 100%-os páratartalmú atmoszférával rendelkező inkubátorba helyeztük a kiértékelésig.

A laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérését és az áramlási citométeres kiértékelést a szimulált iszkémia befejezése után 24 órával végeztük a sejtek médiumából.

A malondialdehid mérését a szimulált iszkémia befejezése után 5 órával végeztük, a sejtek médiumából.

3.10.2. Csontvelő és zsírszövet eredetű őssejtek hatásainak összehasonlítása in vitro iszkémia-reperfúzió modellben

A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőző nap lyukanként 30 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet raktunk ki 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk a sejtekre. A sejteket 160 percig 0,5% oxigén (≈ 4 Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on inkubáltuk.

A hipoxiás inkubáció után a különböző csoportokat az alábbiak szerint kezeltük:

- I-R modell: kezeletlen csoport,

- AKM: hASC kondicionált médiummal kezelt csoport,
- hBMSC: hBMSC-vel kezelt csoport,
- hASC: hASC-vel kezelt csoport.

Ezek után a sejteket 37°C-os, 5% CO₂ tartalmú, 100%-os páratartalmú atmoszférával rendelkező inkubátorba helyeztük a kiértékelésig.

A kiértékeléseket a szimulált iszkémia-reperfúzió befejezése után 24 órával végeztük (áramlási citometria, laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérés, metabolikus aktivitás mérés).

3.10.3. Terápiás sejtek PJ34 PARP inhibitorral való előkezelésének hatása in vitro iszkémia-reperfúzió modellben

3.10.3.1. Előkísérletek

A PJ34 citotoxicitásának meghatározását 96 lyukú lemezen, 10 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet tartalmazó csoportokon végeztük. A sejtek tápoldatát kiegészítettük a megfelelő koncentrációjúra (10 µM vagy 100 µM) PJ34-el vagy a kontroll esetében PBS oldattal. Egy óra normál sejt kultúrás inkubáció után a kiértékelést LDH felszabadulás méréssel végeztük.

A PARP gátlás oxidatív stressz elleni protektív hatásának vizsgálatát 96 lyukú lemezen, 10 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet tartalmazó csoportokon végeztük. A sejtek tápoldatát kiegészítettük a megfelelő koncentrációjúra (10 µM vagy 100 µM) PJ34-el vagy a kontroll esetében azonos térfogatú PBS oldattal. Egy óra normál sejt kultúrás inkubáció után hidrogén-peroxidot adtunk a lyukakba (400 µM végső koncentráció). Két óra inkubáció után a kiértékelést LDH felszabadulás méréssel végeztük.

3.10.3.2. Kísérletek

A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőző nap lyukanként 30 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet raktunk ki 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel,

majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk rájuk. Ezután a sejteket 160 percig 0,5% oxigén (≈ 4 Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on inkubáltuk.

A hipoxiás inkubáció után a különböző csoportokat az alábbiak szerint kezeltük:

- I-R modell: kezeletlen csoport,
- H9c2: H9c2 kardiomioblasztokkal kezelt csoport,
- H9c2 + 10 μ M PJ34: 10 μ M PJ34-el előkezelt H9c2 kardiomioblasztokkal kezelt csoport,
- H9c2 + 100 μ M PJ34: 100 μ M PJ34-el előkezelt H9c2 kardiomioblasztokkal kezelt csoport.

Ezek után a sejteket 37°C-os, 5% CO₂ tartalmú, nedvesített atmoszférájú inkubátorba helyeztük a kiértékelésig.

A kiértékeléseket a szimulált iszkémia-reperfúzió befejezése után 24 órával áramlási citometriás méréssel végeztük.

3.12. Adatelemzés és statisztika

Az áramlási citometriás adatok kiértékeléséhez a Weasel programot (The Walter and Eliza Hall Institute, Parkville, VIC, Australia), a statisztikai elemzés és a diagramok elkészítéséhez a Graphpad Prism programot (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) használtuk. A statisztikai kiértékeléshez kétoldali kétmintás páratlan t-próbát, illetve egy utas varianciaanalízist (ANOVA) és Newman-Keuls post hoc tesztet végeztünk. Az eredmények minden esetben átlag \pm SEM alakban kerültek megadásra. A 0,05-nél kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Iszkémia-reperfúzió modell jellemzése

Áramlási citometriás méréseink alapján az iszkémia-reperfúzió modell szignifikánsan csökkentette az élő sejtek számát ($12,13 \pm 0,75\%$) a kezeletlen kontrollhoz ($90,36 \pm 2,60\%$) képest ($p < 0,001$).

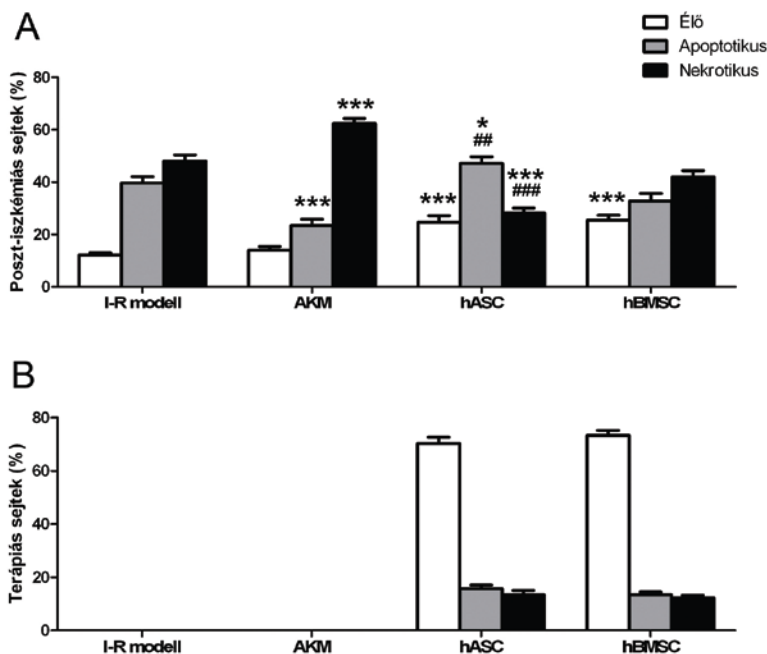
Az oxidatív stressz mértéke az MDA szint meghatározás alapján szignifikánsan emelkedett az iszkémia-reperfúzió modellben ($13,70 \pm 0,81 \mu\text{M}$), a kezeletlen kontrollhoz ($0,47 \pm 0,18 \mu\text{M}$) képest ($p < 0,001$).

Az iszkémia-reperfúzió modell a médiumból mért LDH-szint szignifikáns emelkedéséhez vezetett ($29,58 \pm 6,21\%$) a kezeletlen kontrollhoz ($0,00 \pm 0,81\%$) képest ($p < 0,001$).

4.2. Csontvelő és zsírszövet eredetű őssejtek hatásainak összehasonlítása *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellben

Kísérleteinkben az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek túlélése a kezeletlen csoportban $12,13 \pm 0,75\%$ volt. A túlélő kardiomioblasztok aránya szignifikánsan emelkedett mind a hASC-vel ($24,66 \pm 2,49\%$), mind a hBMSC-vel ($25,41 \pm 1,99\%$) kezelt csoportokban, a kondicionált médiummal kezelt csoportban ($13,94 \pm 1,44\%$) nem találtunk szignifikáns változást. A csontvelő eredetű mezenchymális őssejtekkel és zsírszövet eredetű mezenchymális őssejtekkel kezelt csoportok közt nem volt szignifikáns különbség, viszont mindkét őssejttel kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a poszt-iszkémiás sejtek túlélése, mint a kondicionált médiummal kezelt csoportban (2./A ábra). Az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közül az apoptotikus sejtek aránya $39,62 \pm 2,44\%$ volt a kezeletlen csoportban, mely érték szignifikánsan alacsonyabb volt a kondicionált médiummal kezelt ($23,36 \pm 2,51\%$) és a hASC-vel kezelt ($47,08 \pm 2,61\%$) csoportokban, de nem változott szignifikánsan a hBMSC-vel kezelt csoportban ($32,75 \pm 2,92\%$). A

hASC-vel kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt a poszt-iszkémiás apoptotikus sejtek aránya, mint a hBMSC kezelt csoportban (2./A ábra).



2. ábra Áramlási citometriás mérés. A) Az élő, apoptotikus és nekrotikus poszt-iszkémiás sejtek aránya. I-R modell: élő: 12,13±0,75%, apoptotikus: 39,62±2,44%, nekrotikus: 48,09±2,28%; AKM: élő: 13,94±1,44%, apoptotikus: 23,36±2,51%, nekrotikus: 62,39±1,89%; hASC: élő: 24,66±2,49%, apoptotikus: 47,08±2,61%, nekrotikus: 28,16±1,94%; hBMSC: élő: 25,41±1,99%, apoptotikus: 32,75±2,92%, nekrotikus: 41,88±2,46%. **:p<0,01 vs. I-R modell, ***:p<0,001 vs. I-R modell, ##:p<0,01 vs. hBMSC, ###:p<0,001 vs. hBMSC, ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt, n=17-31 B) Az élő, apoptotikus és nekrotikus terápiás sejtek aránya. hASC: élő: 70,30±2,35%, apoptotikus: 15,79±1,22%, nekrotikus: 13,41±1,67%; hBMSC: élő: 73,30±1,92%, apoptotikus: 13,51±1,02%, nekrotikus: 12,29±0,96%. n=17-31

A kezeletlen csoportban az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közül a nekrotikus sejtek aránya 48,09±2,28% volt, mely érték szignifikánsan csökkent

a hASC-vel kezelt csoportban ($28,16 \pm 1,94\%$), szignifikánsan nőtt a kondicionált médiummal kezelt csoportban ($62,39 \pm 1,89\%$) és nem változott szignifikánsan a hBMSC-vel kezelt csoportban ($41,88 \pm 2,46\%$). A hASC-vel kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a poszt-iszkémiás nekrotikus sejtek aránya a hBMSC-vel kezelt csoporthoz képest (2./A ábra).

A hozzáadott terápiás sejteket vizsgálva azt találtuk, hogy a hozzáadott összejek túlnyomó többsége életben volt, mind a hASC-k ($70,30 \pm 2,35\%$), mind a hBMSC-k ($73,30 \pm 1,92\%$) használata esetén, és nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a két csoport közt. Nem volt szignifikáns különbség a két csoport között az apoptotikus (hASC: $15,79 \pm 1,22\%$, hBMSC: $13,51 \pm 1,02\%$) és a nekrotikus (hASC: $13,41 \pm 1,67\%$, hBMSC: $12,29 \pm 0,96\%$) összejek arányában sem (2./B ábra).

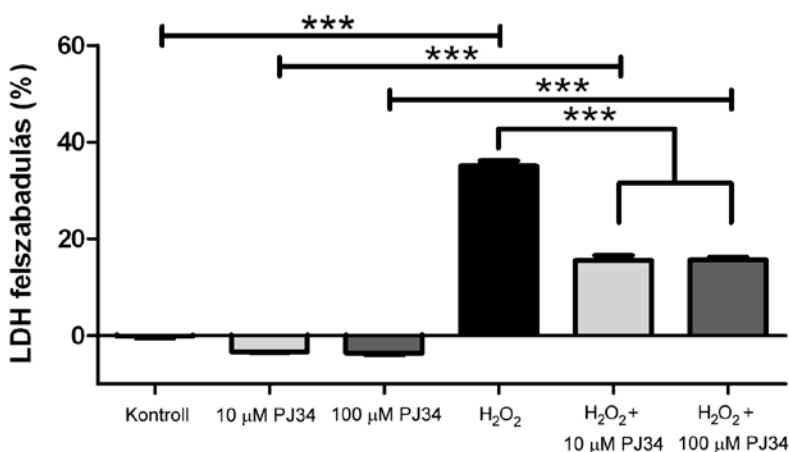
A metabolikus aktivitás mérés megerősítette az áramlási citometriás eredményeinket. A sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan magasabb volt hASC ($0,652 \pm 0,089$ AU, mesterséges egység) és hBMSC kezelés ($0,607 \pm 0,059$ AU) után, mint a kezeletlen csoportban ($0,065 \pm 0,033$ AU). A kondicionált médiummal kezelt csoportban bár kisebb mértékben, de szintén szignifikánsan emelkedett a metabolikus aktivitás ($0,225 \pm 0,013$ AU). Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a hASC-vel és a hBMSC-vel kezelt csoportok közt.

Az LDH felszabadulás értéke szignifikánsan csökkent a kezeletlen csoporthoz ($0,225 \pm 0,006$ AU) képest, mind a hASC-vel ($0,148 \pm 0,005$ AU), mind a hBMSC-vel kezelt ($0,146 \pm 0,004$ AU) csoportban. A kondicionált médiummal való kezelés ($0,208 \pm 0,009$ AU) egy kisebb, de szintén szignifikáns csökkenést okozott. Nem volt szignifikáns különbség a hASC-vel és a hBMSC-vel kezelt csoportok között.

4.3. Terápiás sejtek PJ34 PARP inhibitorral való előkezelésének hatása *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellben

Eredményeink szerint nem növelte az LDH felszabadulást a kontroll csoporthoz képest ($-0,18 \pm 0,36\%$) a PJ34 PARP inhibitorral való 1 órás kezelés sem a 10 μM -os ($-3,40 \pm 0,16\%$) sem a 100 μM -os ($-3,61 \pm 0,27\%$) koncentráció alkalmazása esetén.

A 2 órás 400 μM -os H_2O_2 kezeléssel modellezett oxidatív stressz szignifikánsan növelte az LDH felszabadulás értékét ($35,14 \pm 1,01\%$) a kontroll csoporthoz képest. Az 1 órás PJ34 PARP inhibitor kezelés szignifikánsan csökkentette H_2O_2 kezelés hatását mind a 10 μM -os ($15,65 \pm 0,95\%$) mind a 100 μM -os ($15,69 \pm 0,54\%$) csoportban (3. ábra).



3. ábra PJ34 citotoxicitás és oxidatív stressz elleni védelem. Kontroll: $-0,18 \pm 0,36\%$, 10 μM PJ34: $-3,40 \pm 0,16\%$, 100 μM PJ34: $-3,61 \pm 0,27\%$, H_2O_2 : $35,14 \pm 1,01\%$, $\text{H}_2\text{O}_2 + 10 \mu\text{M}$ PJ34: $15,65 \pm 0,95\%$, $\text{H}_2\text{O}_2 + 100 \mu\text{M}$ PJ34: $15,69 \pm 0,54\%$. ***: $p < 0,001$, ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt, $n=6$

Kísérleteinkben az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek túlélése a kezeletlen csoportban $36,44 \pm 5,05\%$ volt, amely nem változott szignifikánsan

előkezelést nem kapott H9c2-sejtek hozzáadásának hatására ($42,81 \pm 5,11\%$), viszont szignifikánsan emelkedett a $10 \mu\text{M}$ PJ34 PARP inhibitorral előkezelte terápiai sejtek hozzáadásának hatására ($52,07 \pm 5,80\%$) és a $100 \mu\text{M}$ PJ34 PARP inhibitorral előkezelte terápiai sejtek hozzáadásának hatására is ($54,95 \pm 5,55\%$).

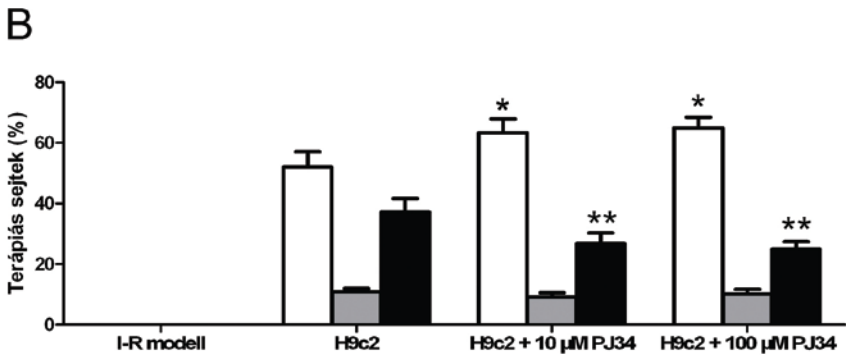
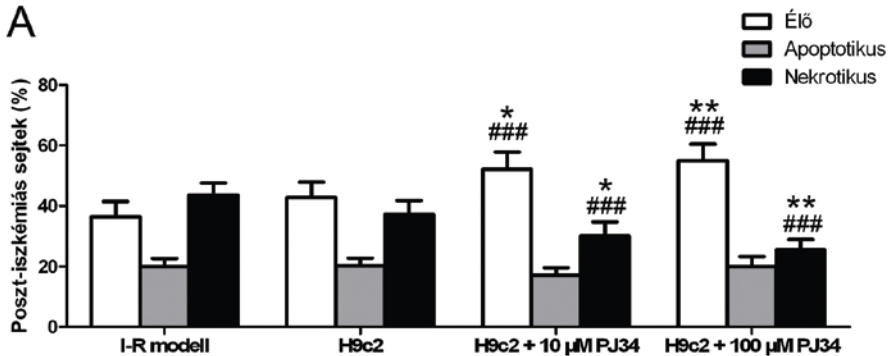
Az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közt az apoptotikus sejtek aránya nem mutatott szignifikáns eltérést a kísérleti csoportok között (I-R modell: $19,94 \pm 2,75\%$, H9c2: $20,23 \pm 2,62\%$, H9c2 + $10 \mu\text{M}$ PJ34: $17,20 \pm 2,42\%$; H9c2 + $100 \mu\text{M}$ PJ34: $20,05 \pm 3,23\%$).

Az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közt nekrotikus sejtek aránya a kezeletlen csoportban $43,64 \pm 4,00\%$ volt, amely nem változott szignifikánsan előkezelést nem kapott H9c2-sejtek hozzáadásának hatására ($37,29 \pm 4,55\%$), viszont szignifikánsan csökkent a $10 \mu\text{M}$ PJ34 PARP inhibitorral előkezelte terápiai sejtek hozzáadásának hatására ($30,18 \pm 4,60\%$) és a $100 \mu\text{M}$ PJ34 PARP inhibitorral előkezelte terápiai sejtek hozzáadásának hatására is ($25,52 \pm 3,47\%$) (4./A ábra).

A hozzáadott terápiai sejteket vizsgálva az eredmények azt mutatják, hogy a PJ34 PARP inhibitorral előkezelte terápiai sejtek túlélése szignifikánsan emelkedett az előkezelést nem kapott terápiai sejtekhez képest (H9c2: $52,02 \pm 5,01\%$, H9c2 + $10 \mu\text{M}$ PJ34: $63,38 \pm 4,50\%$, H9c2 + $100 \mu\text{M}$ PJ34: $64,99 \pm 3,47\%$).

A terápiaián kezelt sejtek közt az apoptotikus sejtek arányában nem volt szignifikáns különbség a különböző csoportok közt (H9c2: $10,87 \pm 1,12\%$, H9c2 + $10 \mu\text{M}$ PJ34: $9,22 \pm 1,28\%$; H9c2 + $100 \mu\text{M}$ PJ34: $10,18 \pm 1,55\%$).

A PJ34 PARP inhibitorral való előkezelés szignifikánsan csökkentette a terápiai sejtek nekrozisát (H9c2: $37,23 \pm 4,40\%$, H9c2 + $10 \mu\text{M}$ PJ34: $26,83 \pm 3,49\%$, H9c2 + $100 \mu\text{M}$ PJ34: $24,96 \pm 2,43\%$) (4./B ábra).



4. ábra Áramlási citometriás mérések. A) Az élő, apoptotikus és nekrotikus poszt-izskémias sejtek aránya. I-R modell: élő: 36,44±5,05%, apoptotikus: 19,94±2,75%, nekrotikus: 43,64±4,00%; H9c2: élő: 42,81±5,11%, apoptotikus: 20,23±2,61%, nekrotikus: 37,29±4,55%; H9c2 + 10 µM PJ34: élő: 52,07±5,80%, apoptotikus: 17,20±2,42%, nekrotikus: 30,18±4,60%; H9c2 + 100 µM PJ34: élő: 54,95±5,55%, apoptotikus: 20,05±3,23, nekrotikus: 25,52±3,47%, *:p<0,05, **:p<0,01 vs. H9c2, ###:p<0,001 vs. I-R modell, ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt, n=18 B) Az élő, apoptotikus és nekrotikus terápiás sejtek aránya. H9c2: élő: 52,02±5,01%, apoptotikus: 10,87±1,12%, nekrotikus: 37,23±4,40%; H9c2 + 10 µM PJ34: élő: 63,38±4,50%, apoptotikus: 9,22±1,28%, nekrotikus: 26,83±3,49%; H9c2 + 100 µM PJ34: élő: 64,99±3,47%, apoptotikus: 10,18±1,55%, nekrotikus: 24,96±2,43%, *:p<0,05, **:p<0,01 vs. H9c2, ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt, n=18

5. Következtetések

Eredményeink alapján a csontvelő és zsírszövet eredetű mezenchymális őssejtekkel való kezelés direkt hatásokon keresztül és azonos mértékben növeli sérült kardiomioblasztok túlélését *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellünkben. A két őssejtípus túlélése a poszt-iszkémiás környezetben szintén hasonló. Azonban a hASC-k a hBMSC-khez képest szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentették a nekrozist, az apoptotikus sejthalál felé terelve a sérült sejteket, amely részben magyarázhatja az ASC sejtek *in vivo* kísérletekben megfigyelt nagyobb hatékonyságát. A könnyen és nagy mennyiségben hozzáférhető zsírszövet egy ígéretes forrás autológ mezenchymális őssejtek kinyerésére, a hASC-k valós alternatívát jelenthetnek az hBMSC-kkel szemben a miokardiális infarktuson átesett szív kezelésére. További vizsgálataink alapján a terápiásan felhasznált sejtek PARP inhibitorral való előkezelése növelte azok túlélését poszt-iszkémiás körülmények között és fokozta sérült kardiomioblasztokra kifejtett terápiás hatásukat. Ha az eredményeinket további *in vivo* tanulmányok is megerősítik, lehetségessé válhat a sejtalapú terápiák hatékonyságának növelése ASC-k szélesebb körű felhasználásával, továbbá a felhasznált sejtek PARP inhibitorral történő előkezelése útján.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A doktori értekezés tárgyát képző közlemények:

Szepes M, **Benkő Z**, Cselenyák A, Kompisch KM, Schumacher U, Lacza Z, Kiss L: Comparison of the direct effects of human adipose- and bone-marrow-derived stem cells on postischemic cardiomyoblasts in an in vitro simulated ischemia-reperfusion model.

Stem Cells Int. 2013;2013:178346. doi: 10.1155/2013/178346. Epub 2013 Jun 19. IF: 2,806 – megosztott első szerzős közlemény

Szepes M, Janicsek Z, **Benkő Z**, Cselenyák A, Kiss L:

Pretreatment of therapeutic cells with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances their efficacy in an in vitro model of cell-based therapy in myocardial infarct.

Int J Mol Med. 2013 Jan;31(1):26-32. doi: 10.3892/ijmm.2012.1186. IF: 1,880

6.2. Egyéb lektorált tudományos közlemények:

Dongó E, **Benkő Z**, Csizmazia Á, Marosi G, Grottke A, Jücker M, Schumacher U, Kiss L.: H2S preconditioning of human adipose tissue-derived stem cells increases their efficacy in an in vitro model of cell therapy for simulated ischemia.

Life Sciences, 2014, in press doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.023 (2013-as IF: 2,296) – megosztott első szerzős közlemény

Cselenyák A, **Benkő Z**, Szepes M, Kiss L, Lacza Z:

Stem cell transplantation in an in vitro simulated ischemia/reperfusion model.

J Vis Exp. 2011 Nov 5;(57):e3575. doi: 10.3791/3575.

Dongó E, Hornyák I, **Benkő Z**, Kiss L:

The cardioprotective potential of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury.

Acta Physiol Hung. 2011 Dec;98(4):369-81. doi: 10.1556/APhysiol.98.2011.4.1. Review. IF: 0,821

Cselenyák Attila, **Benkő Zsolt**, Szepes Mónika, Dr. Horváth Eszter Mária, Dr. Lacza Zsombor, Dr. Kiss Levente:

Az őssejtek szerepe a szívinfarktus kezelésében: in vitro kísérletes módszer a hatásmechanizmus vizsgálatára

Érbetegségek – A Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság tudományos folyóirata, 2011/1 3-11. oldal

Dr. Kiss Levente, Dongó Eleni, Janicsek Zsófia, Szepes Mónika, **Benkő Zsolt**, Cselenyák Attila, Dr. Lacza Zsombor:

Őssejtterápia alkalmazásának eredményei perifériás artériás érbetegségben

Érbetegségek – A Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság tudományos folyóirata, 2010/3 33-38. oldal