

A SZÍV TÁVOLI ISZKÉMIÁS KONDÍCIONÁLÁSA ÉS ANNAK MECHANIZMUSA

Doktori tézisek

Dr. Baranyai Tamás

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ferdinandy Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Szijártó Attila, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Baczkó István, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Tordai Attila, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Radovits Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Koncz István, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2017

1. Bevezetés

A különböző revaszkularizációs technikák széleskörű elérhetőségének ellenére az akut miokardiális infarktus (AMI) a mortalitási és morbiditási statisztikák vezetője a fejlett országokban. Az iszkémia által okozott miokardiális károsodás megelőzésében elsődleges a koszorúerek áramlásának visszaállítása. Paradox módon azonban a reperfúzió önmagában is további miokardiális károsodást idéz elő. Így mind az iszkémia, mind a reperfúzió felelős a miokardiális károsodás kialakulásáért, melyet iszkémia/reperfúziós károsodásnak nevezünk.

Az iszkémia/reperfúziós károsodás elleni védelemben az iszkémiás kondicionálás egy ígéretes stratégiának tűnik. Elsőként az iszkémiás *prekondicionálásról* (azaz rövid iszkémia/reperfúziós epizódok alkalmazása az érintett éren; IPreC) igazolódott, hogy a rákövetkező miokardiális károsodást mérsékli. Azóta már bizonyossá vált, hogy az iszkémiás kondicionálás kardioprotektív az iszkémiát követően alkalmazva is (iszkémiás *poszt*kondicionálás), mely klinikai alkalmazásra reálisabb alternatíva. Továbbá számos preklinikai vizsgálat igazolta, hogy kardioprotekció úgy is kiváltható, ha a rövid iszkémia/reperfúziós stimulusokat a szív egy nem érintett erén vagy egy másik szervén (pl.: vese, vázizmok) végezzük el. Ezt távoli iszkémiás kondicionálásnak (RIC) nevezünk.

A RIC klinikai gyakorlatba való átültetése ugyanakkor nehéznek bizonyul a számtalan pozitív “proof-of-concept” klinikai vizsgálat ellenére. Eddig egy kis elemszámú klinikai vizsgálat bizonyította, hogy a RIC szignifikánsan csökkenti a jelentős kardiális és cerebrális eseményeket ST-elevációs miokardiális infarktust követően. Azonban a két legnagyobb klinikai vizsgálat ezt nem igazolta szívsebészeti beavatkozást követően (ERICCA és RIPHEART vizsgálatok).

A bizonytalan eredmények hátterében számos faktor állhat, mint például a nem megfelelő betegbeválasztás, a revaszkularizáció típusa, a késői revaszkularizáció lehetősége, a társbetegségek, a gyógyszerhasználat és a RIC ismeretlen hatásmechanizmusa. Sőt bizonyos végpontokhoz (pl.: infarktusméret, a mikrokeringés figyelmen kívül hagyása) való szigorú ragaszkodás tovább gátolhatja a RIC sikeres translációját.

2. Célkitűzések

- A RIC kardioprotektív hatásának vizsgálata egy patkány és egy klinikailag releváns sertés AMI modellben.
- A RIC kardioprotektív hatásának vizsgálata akut hiperglikémiában.
- A kardioprotektív RIC szignál távoli szövetből való vezikuláris transzportjának vizsgálata.

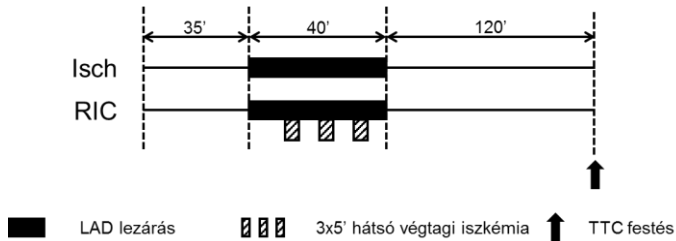
3. Anyagok és módszerek

Kísérleteinket az USA Egészségügyi Intézete, valamint az Európai Unió által aktuálisan kiadott irányelveknek megfelelően végeztük. Kísérletienket engedélyezte a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága.

3.1. Az *in vivo*, patkány kardiális iszkémia/reperfúziós modellben vizsgált távoli iszkémiás kondicionálás kísérleti leírása

Hím Wistar patkányokat pentobarbitál anesztéziában részesítettük. A patkányokat két csoportba osztottuk (1. ábra): (1) kontroll iszkémia és (2) RIC. Az elülső leszálló koszorúeret (LAD) 35 percet követően 40 percre elzártuk egy öltéssel. A RIC-t a jobb femorális erek háromszor 5 perces elzárásával és 5 perces reperfúziójával végeztük el a LAD 10 perces elzárását követően. Mind a

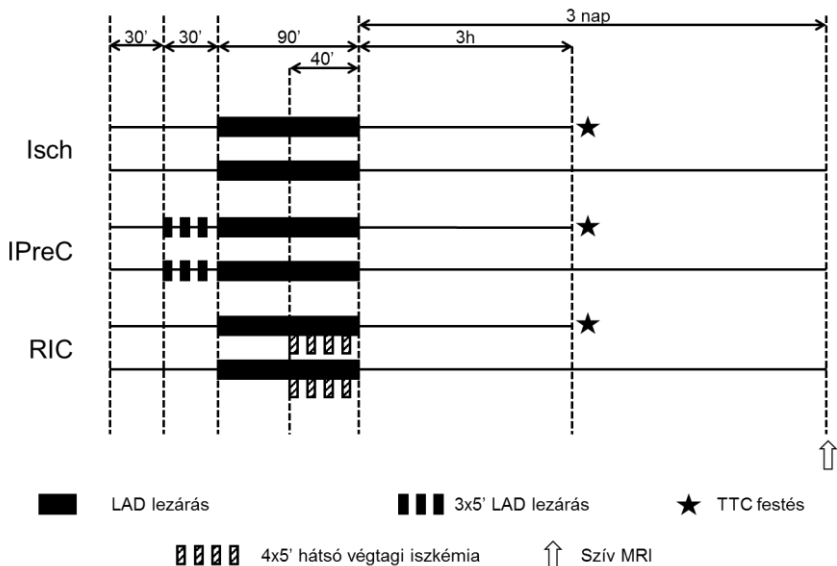
femorális artériát és vénát leztorítottuk egy fém csipesszel az erek izolálását követően. A 40 perces LAD elzárást követően a reperfúziót az öltés lazításával megindítottuk. 120 perc reperfúzió után a szíveket eltávolítottuk, hogy a miokardiális elhalást meghatározzuk.



1. ábra Az *in vivo*, patkány kardiális iszkémia/reperfúziós modellben vizsgált távoli iszkémiás kondicionálás kísérleti leírása. Isch – kontroll iszkémia, RIC – távoli iszkémiás kondicionálás, LAD – elülső leszálló koszorúér, TTC – trifeniltetrazólium klorid.

3.2. Az *in vivo*, klinikailag releváns, sertés kardiális iszkémia/reperfúziós modellben vizsgált távoli iszkémiás kondicionálás kísérleti leírása

Emse házisertéseket “blokk randomizációval” három csoportba osztottuk (2. ábra): (1) kontroll iszkémia (Isch), (2) IPreC és (3) RIC. A kísérletek előtt egy nappal a sertéseket acetilszalicilsavval és klopidoegrélllel előkezeltük. Az állatokat ketamin/xilazin/atropinnal szedáltuk, majd izoflurán inhalációs anesztéziában részesítettük. A bal koszorúér szelektív angiographiáját végeztük. A kiindulási angiogram alapján a katéteres ballont a LAD második diagonálisa után pozicionáltuk. Az AMI kiváltása az intrakoronáriásan elhelyezett ballon felfújásával történt, a reperfúzió (3 h vagy 3 nap) kezdete pedig a ballon leengedésével. Az IPreC-t három 5 perces elzárással és 5 perces reperfúzióval végeztük el a LAD-on, míg a többi csoportban 30 percig a ballon leengedett állapotban volt. Ezt követően a LAD-ot 90 percre lezártuk az intrakoronáriásan elhelyezett ballon segítségével.



2. ábra Az *in vivo*, klinikailag releváns, sertés kardiális iszkémia/reperfúziós modellben vizsgált távoli iszkémiás kondicionálás kísérleti leírása. Isch – kontroll iszkémia, IPreC – iszkémiás prekondicionálás, RIC – távoli iszkémiás kondicionálás, LAD – elülső leszálló koszorútér, TTC – trifeniltetrazólium klorid, MRI – mágneses magrezonancia képalkotás.

A RIC-t a jobb femorális erek négyszer 5 perces elzárásával és 5 perces reperfúziójával végeztük el a jobb hátsó végtag köré húzott tourniquet segítségével a tartós LAD elzáródás 50. percétől kezdve. A végsőreperfúziót angiografiával erősítettük meg. A 3 órás reperfúzió esetében az anesztéziát fenntartottuk, azonban 3 nap esetén a sebeket elláttuk és az izoflurán elvételével felfüggesztettük az anesztéziát. 3 óra reperfúziót követően az állatok szívét izoláltuk a miokardiális elhalás hisztológiai meghatározására. A 3 napos reperfúzió esetében a reperfúziót követően szív MRI-t végeztünk el a miokardiális funkció, elhalás, ödéma és mikrovaszkuláris elzáródás meghatározására.

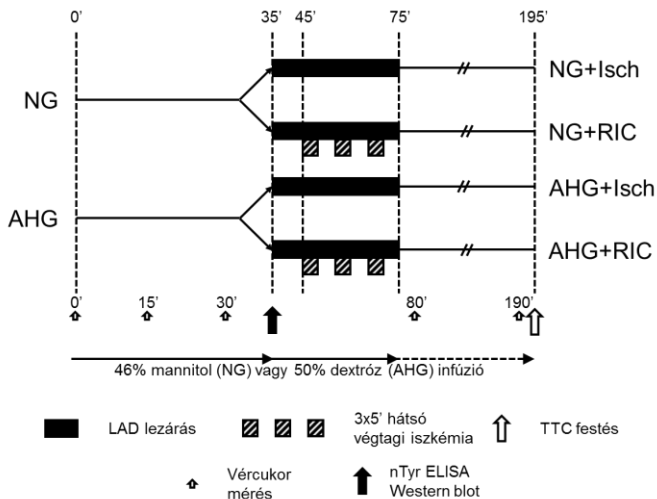
3.3. A hiperglikémia távoli iszkémiás kondicionálásra gyakorolt hatásának kísérleti leírása egy *in vivo* patkány kardiális iszkémia/reperfúziós modellben

Hím Wistar patkányokat pentobarbitál anesztéziában részesítettük. A patkányokat kezdetben két csoportra osztottuk (3. ábra): (1) kontroll normoglikémiás és (2) akut hiperglikémiás. Az akut hiperglikémiás csoportba tartozó állatok 50%-os dextrózinfúzióban részesültek a kísérlet teljes ideje alatt, míg a normoglikémiás állatok esetében azonos ozmolaritású, 46%-os mannitolt alkalmaztunk. 35 perces perfúziót követően az állatok egyik felének szíveit izoláltuk, Krebs-Henseleit oldatban mostuk, majd a további kísérletekig fagyasztottuk. Az állatok másik felét további négy csoportba osztottuk: (1) kontroll iszkémia normoglikémiával (NG + Isch), (2) RIC normoglikémiával (NG + RIC), (3) iszkémia akut hiperglikémiával (AHG + Isch), és (4) RIC akut hiperglikémiával (AHG + RIC). A kísérleti protokoll 35. perce után a LAD-ot lezártuk 40 percre. A RIC-t a jobb femorális erek háromszor 5 perces elzárásával és 5 perces reperfúziójával végeztük el a LAD 10 perces elzárását követően. Mind a femorális artériát és vénát leszorítottuk egy fém csipesszel az erek izolálását követően. A 40 perces LAD elzárást követően a reperfúziót az öltés lazításával megindítottuk. 120 perc reperfúzió után a szíveket eltávolítottuk, hogy a miokardiális elhalást meghatározzuk.

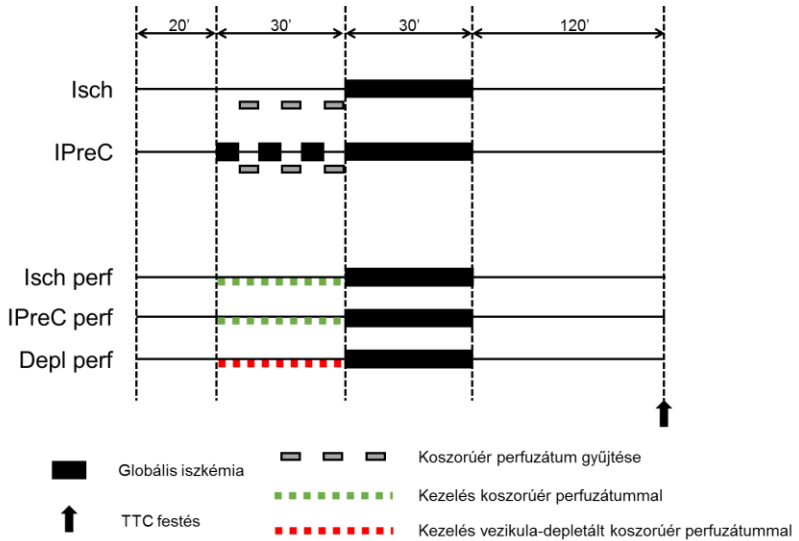
3.4. A távoli iszkémiás kondicionálás vezikuláris természetének *ex vivo* vizsgálatának kísérleti leírása

Hím Wistar patkányokat ketamin/xilazin anesztéziában részesítettük, majd heparinizáltuk. A szíveket izoláltuk és Langendorff szerint perfundáltuk 37°C-os Krebs-Henseleit oldattal 20 percen keresztül stabilizálódás céljából. Ezt követően a szíveket 5 csoportba soroltuk (4. ábra): (1) 30 perces globális iszkémia (Isch); (2) a 30 perces globális iszkémiát megelőzően háromszor 5 perces iszkémia/reperfúzió (IPreC); (3) a 30 perces globális iszkémiát

megelőzően az Isch csoportban a háromszor 5 percben gyűjtött perfuzátummal 20. perctől kezdve perfundált szívek (Isch perf); (4) a 30 perces globális iszkémiát megelőzően az IPreC csoportban a háromszor 5 percben gyűjtött perfuzátummal 20. perctől kezdve perfundált szívek (IPreC perf); (5) a 30 perces globális iszkémiát megelőzően az IPreC csoportban háromszor 5 percben gyűjtött a 20. perctől kezdve vezikuladepletált perfuzátummal perfundált szívek (Depl perf). 120 perc reperfüzió után meghatároztuk a miokardiális elhalást. Az extracelluláris vezikulákat a gyűjtött perfuzátumokból szűréssel és elkülönítő centrifugálással izoláltuk, a felülűszót használtuk fel vezikula-depletált perfuzátumként. A vezikula-depletált perfuzátumot az eredetileg gyűjtött perfuzátum térfogatára egészítettük ki Krebs-Henseleit oldattal. Ezen perfuzátumokat még aznap felhasználtuk.



3. ábra A hiperglikémia távoli iszkémiás kondicionálásra gyakorolt hatásának kísérleti leírása egy *in vivo* patkány kardiális iszkémia/reperfüziós modellben. NG – normoglikémia, AHG – akut hiperglikémia, nTyr – 3-nitrotirozin, ELISA – enzim-kötött immunoszorbens próba, TTC – trifeniltetrazólium klorid.



4. ábra A távoli iszkémiás kondicionálás vezikuláris természetének *ex vivo* vizsgálatának kísérleti leírása. Isch – csak iszkémia, IPreC – iszkémiás prekondicionálás, perf – az Isch vagy IPreC csoportokból gyűjtött perfuzátummal perfundált szívek, Depl perf – az IPreC csoportban gyűjtött extracelluláris vezikulamentesített perfuzátummal perfundált szívek, TTC – trifeniltetrazólium klorid.

3.5. A miokardiális károsodás meghatározása

A rizikózóna meghatározása: A reperfúziót követően az LAD-t újra lezártuk, és a rizikózónát negatívan Evans kézzel festettük retrográd módon. A rizikózónát a bal kamra tömegéhez viszonyítva fejeztük ki. Azon esetekben, amikor MRI készült, a rizikózónát a koszorúérfestésen alapuló APPROACH pontrendszerrel határoztuk meg.

A miokardiális elhalás szövettani meghatározása: A miokardiális elhalás meghatározásához az izolált patkány és sertés szíveket szeleteltük, majd trifeniltetrazólium kloriddal megfestettük az életképes területet. A miokardiális elhalást planimetriával határoztuk meg.

A miokardiális elhalás, ödéma és mikrovaszkuláris elzáródás meghatározása MRI-vel: A miokardiális elhalás, ödéma és mikrovaszkuláris elzáródás meghatározására szív MRI-t végeztünk el 3 nappal a reperfúzió megkezdését követően egy 1.5 T készülék segítségével. A miokardiális elhalás és mikrovaszkuláris elzáródás meghatározására T1-súlyozott, késői gadolinium halmozású felvételeket készítettünk 12-15 perccel a gadolinium alapú kontrasztanyag beadását követően. A miokardiális ödéma meghatározására T2-súlyozott felvételeket készítettünk "sötét vér" szekvenciával kiegészítve. A miokardiális elhalás, ödéma és mikrovaszkuláris elzáródás kvantifikációja planimetriával történt.

3.6. Az extracelluláris vezikulák karakterizálása

Az extracelluláris vezikulák morfológiai vizsálatára elektron mikroszkópos képalkotást használtunk. Az extracelluláris vezikulák méreteloszlását dinamikus fényszórás analízisen alapuló goniométer segítségével határoztuk meg. A partikulumok méreteloszlásának meghatározásához a maximum entrópia elvét használtuk. A szférikus megközelítés elvét alkalmaztuk a partikulumok átmérőjének meghatározására.

3.7. Ritmuszavar analízis patkányokban

A kísérlet során elektrokardiogramot regisztráltunk. A Lambeth konvencióknak megfelelően meghatároztuk a ritmuszavarok előfordulási gyakoriságát és hosszúságát jellemző pontszámokat.

3.8. Fehérjemeghatározás Western blottal különböző mintákban

Az extracelluláris vezikulák előkészítése Western blottra: Az extracelluláris vezikulák jelenlétének vagy hiányának igazolására az vezikulákat pelletáltuk az Isch vagy IPreC szívekből gyűjtött perfuzátumokból. a felülúszót használtuk fel vezikula-depletált perfuzátumként. A pelleteket felszuszpendáltuk proteázgátló-tartalmú homogenizáló pufferben.

A szívminták előkészítése Western blottra: A bal kamrai szövetet proteázgátló-, nátrium fluorid- és fenilmetilszulfonil fluorid-tartalmú homogenizáló pufferben.

Western blot: Egyenlő térfogatban jelenlévő fehérjéket (extracelluláris vezikulák esetében) vagy egyenlő fehérjemennyiséget (szív minták) Tris-glicin SDS poliakrilamid gélen elválasztottunk. A fehérjéket polivinilidén difluorid membránra transzferáltuk. A membránokat borjú szérum albuminnal vagy zsírmentes tejjel blokkoltuk. A membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk, valamint megfelelő tormaperoxidáz-kapcsolt másodlagos antitesttel. A jeleket kemilumineszcens technikával vizualizáltuk. A foszforilált epitópokat felismerő antitesteket erős detergenssekkel eltávolítottuk a teljes fehérje specifikus elsődleges antitesttel való inkubáció előtt.

3.9. A miokardiális 3-nitrotirozin meghatározása

A nitratív stressz mértékének megítélésére, meghatároztuk ELISA-val a miokardiális szabad 3-nitrotirozin szintjét a balkamrai mintákból a gyártó utasításainak megfelelően.

3.10. Statisztika

Két folytonos változó összehasonlításához t-próbát alkalmaztunk. Több folytonos változó összehasonlítása esetén *egy-utas ANOVA*-t használtunk. Több folytonos változó időbeli összehasonlítását *ismételt méréses ANOVA*-val végeztük el. Két változó (akut hiperglikémia és RIC) hatásának és interakciójának vizsgálatakor *két-utas ANOVA*-t használtunk. Az *ANOVA*-kat követően *LSD* vagy *Dunnett post hoc* tesztet alkalmaztunk. A kardiális MRI elemszámának minimalizálása miatt, 1000 mintás bootstrapping analízist alkalmaztunk. Több kategorikus változót tartalmazó csoport (pl.: pontszámok) összehasonlítása *Kruskal–Wallis analízissel* történt. Statisztikai szignifikanciát $p < 0.05$ esetén fogadtuk el. A statisztikai számításokat az IBM SPSS Statistics, Version 19-cel végeztük el.

4. Eredmények

4.1. A távoli iszkémiás kondicionálás kardioprotektív hatása a patkány és sertés szívekben

A távoli iszkémiás kondicionálás egy *in vivo* patkány iszkémia/reperfúziós károsodás modellben (1. ábra): RIC jelentősen csökkentette a miokardiális elhalást a kontroll csoporthoz képest patkányokban (n=5-6). A rizikózóna tekintetében nem volt különbség a csoportok között (n=5-6).

A távoli iszkémiás kondicionálás egy *in vivo* sertés iszkémia/reperfúziós károsodás modellben (2. ábra): A miokardiális elhalás, ödéma és mikrovaszkuláris elzáródás *in vivo* meghatározására 3 nappal reperfúzió megindítását követően szív MRI-t végeztünk. A RIC (n=8) nem befolyásolta a miokardiális elhalást az Isch (n=7) csoporthoz képest, ugyanakkor az IPreC (n=4) szignifikánsan csökkentette azt. A RIC (n=7) az Isch (n=7) csoporthoz képest jelentősen lecsökkentette a miokardiális ödémát, míg az IPreC (n=4; p=0.06) esetében csak csökkenő tendenciát mutatott. Az angiográfia alapján számított rizikózóna nem volt különböző a csoportokban. Az IPreC (n=4) jelentősen csökkentette a mikrovaszkuláris elzáródás kiterjedését az Isch (n=7) csoporthoz képest, míg a RIC (n=8) nem.

A miokardiális elhalás és a rizikózóna *ex vivo* hisztológiai meghatározására a standard trifeniltetrazólium klorid- és Evans kék-festéseket alkalmaztuk 3 óra reperfúziót követően. A RIC (n=5) nem csökkentette a miokardiális elhalást, azonban az IPreC (n=6) szignifikánsan csökkentette azt az Isch csoporthoz (n=5) képest a trifeniltetrazólium klorid-festés alapján. A kísérleti csoportok között a rizikózóna tekintetében nem volt különbség az Evans kék-festés alapján.

4.2. Az akut hiperglikémia semlegesíti a távoli iszkémiás kondicionálás kardioprotektív hatását

Az *in vivo* iszkémia/reperfúziós patkány modellünkben az akut hiperglikémiát dextróz infúziójával hoztuk létre (3. ábra). A vércukorszint jelentősen megemelkedett a dextrózinfúzió hatására az AHG+Isch és AHG+RIC csoportokban a megfelelő normoglikémiás csoportokhoz képest. A megemelkedett vércukorszint nem befolyásolta az állatok szívfrekvenciáját és vérnyomását.

A miokardiális elhalás jelentősen kisebb volt az NG+RIC csoportban (n=10) az NG+Isch csoporthoz (n=7) képest, míg a RIC nem változtatta meg a miokardiális elhalás mértékét az AHG+RIC (n=6) csoportban az AHG+Isch csoporthoz (n=5) képest. Az akut hiperglikémia önmagában nem növelte a miokardiális elhalás mértékét. A kísérleti csoportok között a rizikózóna tekintetében nem volt különbség.

Az akut hiperglikémia jelentősen növelte az aritmiák előfordulási gyakoriságát és időtartamát. A RIC nem befolyásolta az aritmiákat sem normoglikémiában, sem akut hiperglikémiában.

A kardioprotektív beavatkozások semleges hatása háttérben gyakori ok az emelkedett nitratív stressz. Ezért a patkányok szíveiben meghatároztuk egy nitratív stressz marker, a 3-nitrotirozin mennyiségét. A miokardiális 3-nitrotirozin mennyisége jelentősen megemelkedett akut hiperglikémia hatására (n=8-8).

Mivel ismert, hogy a nitratív stressz összefüggésben van az mTOR útvonallal, meghatároztuk az mTOR útvonal különböző fehérjéinek expresszióját és foszforilációját. Az mTOR (Ser2448) és S6 (Ser235/236) foszforiláltsága szignifikánsan megnőtt az akut hiperglikémia hatására (n=7-9), ami az mTOR komplex I fokozott aktiváltására utal. Továbbá az AKT (Ser473) foszforiláltsága is jelentősen megemelkedett akut hiperglikémia

hatására (n=7-9). Ugyanakkor az akut hiperglikémia nem befolyásolta az egyéb mTOR szabályozó elemek (p-AMPK α [Thr172] és p-Erk1/2 [Thr202/Tyr204]) foszforiláltságát a normoglikémiás állapothoz képest (n=7-9).

Mivel ismert, hogy a nitratív stressz és az mTOR útvonal jelentős szabályozója az autofágiának, meghatároztuk az autofágia különböző markereinek expresszióját és foszforiláltságát. Az akut hiperglikémia hatására az LC3II/LC3I arány jelentősen megemelkedett, ugyanakkor az autofágia egyéb szabályozó elemeinek (Beclin-1, p62, p-ULK1 [Ser555], ATG7 és BNIP3) expresszióját vagy foszforiláltságát nem befolyásolta (n=7-9).

4.3. A távoli iszkémiás kondicionálást extracelluláris vezikulák mediálják

Az extracelluláris vezikulák RIC-ben betöltött szerepét egy patkány *ex vivo* kardiális iszkémia/reperfúziós rendszerben vizsgáltuk (4. ábra).

Az IPreC szívek koszorúereiből származó perfuzátum több extracelluláris vezikulát tartalmazott, mint az Isch szívekből gyűjtött, melyet a HSP60, egy extracelluláris vezikulamarker, Western blototos meghatározása alapján igazoltunk. Elektronmikroszkópos vizsgálat alapján az extracelluláris vezikulák két csoportját vizualizáltuk: exoszómák és mikrovezikulák. Egy dinamikus fényszóráson alapuló módszer segítségével három mérettartományba eső partikulumot detektáltunk: (1) ~10 nm, (2) exoszómák (<100 nm) és (3) mikrovezikulák (100–1000 nm).

Az IPreC szignifikánsan lecsökkentette a miokardiális elhalást az Isch csoporthoz képest. Az IPreC csoportban gyűjtött koszorúér perfuzátum jelentősen csökkentette az IPreC perf csoportban a miokardiális elhalást az Isch csoportban gyűjtött perfuzátumhoz képest. Abban az esetben, ha az IPreC csoportban gyűjtött perfuzátumokból eltávolítottuk az extracelluláris vezikulákat és azzal kezeltük a szíveket (Depl perf csoport), akkor a miokardiális elhalás nem változott jelentősen az Isch perf csoporthoz képest (n=5-8).

5. Megbeszélés

5.1. A távoli iszkémiás kondicionálás ígérete: a mikrokeringés szerepe

A klinikai gyakorlat számára hasznos intervenciók fejlesztéséhez nélkülözhetetlenek a translációs AMI modellek. Erre a célra a sertés egy kiváló modell, mivel a szív anatómiája és kardiovaszkuláris élettana nagyon hasonló az emberéhez.

A korábbi tanulmányokhoz hasonlóan demonstráltuk, hogy a RIC csökkenti a miokardiális elhalás mértékét egy *in vivo* patkány iszkémia/reperfúziós károsodás modellben. Azonban az *in vivo* sertés iszkémia/reperfúziós károsodás modellünkben a RIC nem csökkentette a miokardiális elhalást, viszont a pozitív kontroll, IPreC, igen. Korábban ballonkatéteres sertés modellben már igazolták, hogy a RIC csökkenti a miokardiális elhalás mértékét. Az ellentmondás hátterében a perioperatív gyógyszerelés és kísérleti elrendezés jelentős különbségei állhatnak. A korábbi tanulmányok csak a kísérleti körülmények létrehozásához szükséges szereket használták (pl.: anesztézia, érzéstelenítés). Azonban az AMI terápiájához egyéb gyógyszerek is hozzátartoznak. Kísérleteink során a sertéseket acetilszalicilsavval és klopidoztrellal kezeltük a klinikai irányelvek alapján. Azonban ismert, hogy a ciklooxygenáz-2 egy lényeges mediátora az iszkémiás kondicionálásoknak. Továbbá a klopidoztrellról retrospektíve igazolódott, hogy csökkenti az AMI-hoz kapcsolódó kardiovaszkuláris események számát, melynek hátterében feltehetően a vérlemezkegátló és direkt kardioprotektív hatás áll. A fentiek alapján elképzelhető, hogy a szív már eleve egy protektív állapotban van, és további védelem már nem érhető el. Az anesztéziát izofluránnal tartottuk fenn. Ismert, hogy bizonyos anesztetikumok, mint például a fluránok, kardioprotektív hatással rendelkeznek és semlegesítik

kardioprotektív beavatkozások protektív hatását. Eredményeink alátámasztják, hogy a kardioprotektív beavatkozások vizsgálatához megfelelő perioperatív medikáció szükséges.

Ex vivo Evans kék-festés és *in vivo* angiográfiás pontszámozás segítségével igazoltuk, hogy a rizikózóna nem módosul, míg a miokardiális ödéma jelentősen csökken RIC hatására, mely mérséklődött mikrokeringési károsodást jelent. Eredményeink igazolják, hogy a miokardiális ödéma kiterjedése független a rizikózóna kiterjedésétől a kardioprotektív vizsgálatokban. Ezért a rizikózónaként alkalmazott miokardiális ödéma téves következtetések levonásához vezethet a klinikai vizsgálatok során.

5.2. Az akut hiperglikémia semlegesíti a távoli iszkémiás kondicionálás kardioprotektív hatását

Igazoltuk, hogy az előzetes cukorbetegség nélkül jelentkező akut hiperglikémia semlegesíti a RIC kardioprotektív hatását egy *in vivo* kardiális iszkémia/reperfúziós modellben. Továbbá igazoltuk, hogy az akut hiperglikémia nem befolyásolja az autofágiát, viszont fokozza a nitratív stressz mértékét feltehetően az aktiválódott AKT-mTOR útvonal következtében. Eredményeink támogatják korábbi tanulmányok eredményeit, miszerint az iszkémiás kondicionálás egyéb formáinak (pl.: IPreC) kardioprotektív hatását jelentősen befolyásolja az akut hiperglikémia. Ugyan esetünkben az akut hiperglikémia nem befolyásolta a miokardiális elhalás kiterjedését, néhány korábbi tanulmány leírta, hogy az akut hiperglikémia növeli a miokardiális elhalás kiterjedését.

Az akut hiperglikémia kardioprotekciót semlegesítő hatásának oka nem teljesen ismert. Ismert, hogy a különböző társbetegségekhez kapcsolódó megnövekedett oxidatív és nitratív stressz semlegesíti a kardioprotektív eljárásokat, melyek részben a nitratív stressz csökkentésén keresztül fejtik ki hatásukat. *In vivo* patkány modellünkben az akut hiperglikémia fokozta a

nitratív stressz mértékét, melyet hiperglikémiás oldattal perfundált, izolált patkány szívekben már leírtak. Ezen eredmények egyértelműen jelzik a nitratív stressz kiemelt szerepét a semlegesített kardioprotektív beavatkozások hátterében.

Ezen túlmenően ismert, hogy a nitratív stressz közvetlenül károsítja az autofágia folyamatát. Így megvizsgáltuk az akut hiperglikémia hatásait a kardiális autofágiára és annak egyes szabályozó elemeire. Vizsgálatunk alapján ugyan az LC3II/LC3I arány jelentősen csökkent, az autofágia valószínűleg nem érintett, mivel az autofágia egyéb elemeit nem befolyásolta az akut hiperglikémia. Azonban az autofágia egyik legfontosabb modulátora az mTOR útvonal aktiválódott. Mivel ismert, hogy az mTOR gátlása rapamicinnel *in vivo* kardioprotektív hatással bír, és hogy a RIC kardioprotektív hatása mellett csökkenti az mTOR aktivitását, feltételezzük, hogy az aktivált mTOR útvonal felelős az akut hiperglikémia RIC-t semlegesítő hatásáért.

5.3. A távoli iszkémiás kondicionálást extracelluláris vezikulák mediálják

Bizonyítottuk, hogy az IPreC hatására megnövekszik a szívből az extracelluláris vezikulák felszabadulása, és ezen extracelluláris vezikulák felelősek a kardioprotektív RIC szignál transzportjáért.

Eddig a RIC protektív hatásának szállításának hátterében felmerült különböző humorális és neuronális faktorok szerepe, ugyanakkor ezek általánosan nem elfogadottak. Elsőként a humorális faktorok kiemelt jelentősége merült fel: IPreC-en átesett nyulak vérével történt transzfúzió kardioprotektív hatást gyakorolt nem kondicionált állatokban. A neuronális útvonalat is tanulmányozzák, de szerepe nem egyértelmű.

Tanulmányunkban egy új, vezikuláris mechanizmus szerepét igazoltuk a RIC kardioprotektív szignáljaként, mely hatékony eszközként szolgálhat mind a humorális, mind a neuronális faktorok transzmissziójában. Tanulmányunkkal összhangban leírták már, hogy iszkémia hatására extracelluláris vezikulák

szabadulnak fel sejtkultúrákból. Multipotens őssejtkultúrából izolált exoszómák kardioprotektív hatással rendelkeztek egerekben, valamint csontvelői őssejtkultúrából izolált mikrovezikulák csökkentették neonatális szívizomsejt kultúrák iszkémiás károsodását. Mivel ezen kísérletek bizonyították, hogy sejtkultúrák iszkémiás indukció nélkül izolált extracelluláris vezikulák is kardioprotektív hatással rendelkeztek, nem tudjuk kizárni, hogy esetünkben az alapállapot során felszabadult vezikulák is protektívek lennének abban az esetben, ha nagyobb mennyiségben lennének jelen, mint az IPreC esetében.

6. Következtetések

- A távoli iszkémiás kondicionálás csökkenti a miokardiális elhalást patkányokban, míg egy klinikailag releváns sertés miokardiális infarktus modellben védi a mikrokeringést.
- Az akut hiperglikémia semlegesíti a távoli iszkémiás kondicionálás kardioprotektív hatását.
- A távoli iszkémiás kondicionálást extracelluláris vezikulák mediálják.

7. Saját publikációk

A tézishez felhasznált publikációk:

Baranyai T, Giricz Z, Varga ZV, Koncsos G, Lukovic D, Makkos A, Sárközy M, Pávó N, Jakab A, Czibalmos C, Vágó H, Ruzsa Z, Tóth L, Garamvölgyi R, Merkely B, Schulz R, Gyöngyösi G, Ferdinandy P. In vivo MRI and ex vivo histological assessment of the cardioprotection induced by ischemic preconditioning, postconditioning and remote conditioning in a closed-chest porcine model of reperfused acute myocardial infarction:

importance of microvasculature. *J Transl Med.* 2017 Apr 1;15(1):67. [IF: 3.694]

Baranyai T, Nagy CT, Koncsos G, Onódi Z, Károlyi-Szabó M, Makkos A, Varga ZV, Ferdinandy P, Giricz Z. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovasc Diabetol.* 2015 Nov 18;14(1):151. [IF: 4.534]

Giricz Z, Varga ZV, Baranyai T, Sipos P, Paloczi K, Kittel A, Buzas EI, Ferdinandy P. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Mar;68:75-8. [IF: 4.655]

A téziszhez fel nem használt publikációk:

Giricz Z, Koncsos G, Rajtík T, Varga ZV, Baranyai T, Csonka C, Szobi A, Adameová A, Gottlieb RA, Ferdinandy P. Hypercholesterolemia downregulates autophagy in the rat heart. *Lipids Health Dis.* 2017 Mar 23;16(1):60. [IF: 2.137]

Pavo N, Lukovic D, Zlabinger K, Zimba A, Lorant D, Goliasch G, Winkler J, Pils D, Auer K, Jan Ankersmit H, Giricz Z, Baranyai T, Sárközy M, Jakab A, Garamvölgyi R, Emmert MY, Hoerstrup SP, Hausenloy DJ, Ferdinandy P, Maurer G, Gyöngyösi M. Sequential activation of different pathway networks in ischemia-affected and non-affected myocardium, inducing intrinsic remote conditioning to prevent left ventricular remodeling. *Sci Rep.* 2017 Mar 7;7:43958. [IF: 5.228]

Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Boengler K, Rohrbach S, Li L, Schlüter KD, Schreckenberger R, Radovits T, Oláh A, Mátyás C, Lux Á, Al-Khrasani M, Komlódi T, Bukosza N, Máthé D, Deres L, Barteková M, Rajtík T, Adameová A, Szigeti K, Hamar P, Helyes Z, Tretter L, Pacher P, Merkely B, Giricz Z, Schulz R, Ferdinandy P. Diastolic dysfunction in prediabetic male

rats: Role of mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Oct 1;311(4):H927-H943. [IF: 3.324]

Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlágh B, Baranyai T, Gircz Z, Wiener Z, Turiák L, Drahos L, Pállinger É, Vékey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzás EI. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep*. 2016 Apr 18;6:24316. [IF: 5.228]

Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, El Andaloussi S, Pálinkás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI, Ferdinandy P, Gircz Z. Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One*. 2015 Dec 21;10(12):e0145686. [IF: 3.057]

Baán J, Varga ZV, Leszek P, Ku Mierczyk M, Baranyai T, Dux L, Ferdinandy P, Braun T, Mendler L. Myostatin and IGF-I signaling in end-stage human heart failure: a qRT-PCR study. *J Transl Med*. 2015 Jan 16;13(1):1. [IF: 3.694]

Baranyai T, Terzin V, Vajda A, Wittmann T, Czako L. Acute pancreatitis caused by hypertriglyceridemia. *Orv Hetil*. 2010 Nov 7;151(45):1869-74.