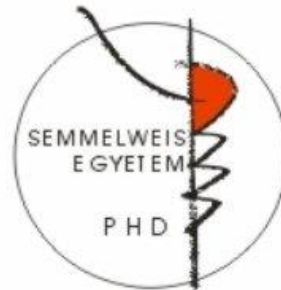


ÚJ TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK KUTATÁSA AZ ISZKÉMIÁS ÉS METABOLIKUS SZÍV-ÉS ÉRRENDSZERI BETEGSÉGEK KEZELÉSÉRE

Doktori tézisek

Nagy Csilla Terézia

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Giricz Zoltán, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Sántha Péter, Ph.D., egyetemi docens

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

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Vásárhelyi Barna, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Pintér Erika, Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Szalay Balázs, Ph.D.

Budapest
2018

1 Bevezetés

1.1 Elhízás és az elhízás terápiái

Az elmúlt évtizedekben az elhízás és annak metabolikus szövődményei a világ egyik legnagyobb közegészségügyi problémájává váltak. Habár az elhízást leggyakrabban a túlzott táplálékfelvétel, a fizikai aktivitás hiánya és a genetikai hajlam okozza, alkalmanként előidézhetik gyógyszerek, endokrin rendellenességek vagy mentális zavarok is. Az elhízás egy olyan állapot, melynek során túlzott zsírfelhalmozódás figyelhető meg a szervezetben. A megnövekedett zsírmennyiség, különösen a viscerális zsírszöveté, a zsírsejtek rendellenes működéséhez vezet. Ez a folyamat az adipokinek diszregulációját eredményezi, ami hozzájárulhat a glükóz- és lipidanyagcsere megváltozásához, valamint a gyulladást okozó válaszok kialakulásához. A viscerális elhízás nagymértékben megnöveli számos betegség kialakulásának kockázatát, mint például a 2-es típusú cukorbetegség, a nem alkoholos zsírmáj betegség, a diszlipidémia (zsíryanagcsere-zavar), a szív- és érrendszeri betegségek, bizonyos típusú tumoros megbetegedések, valamint a depresszió.

A túlsúly és az elhízás kezelésének célja a testsúly csökkentése és a súlyfelesleg visszahízásának megelőzése, valamint az ezzel járó egészségügyi kockázatok csökkentése. A súlycsökkentés az alábbi módszerek kombinációjával érhető el: életmód megváltoztatása (étrend, fizikai aktivitás), műtét (súlycsökkentő műtét) és gyógyszeres terápia (étvágycsökkentők, fogyasztó szerek). Jelenleg a piacon csak kevés elhízás elleni gyógyszer van forgalomban. Az eddig elért jelentős eredmények ellenére a jelenlegi elhízás elleni farmakológiai kezelések csak mérsékelten hatékonyak és számos mellékhatással bírnak. Ezért további kutatások szükségesek egy új stratégia kidolgozásához, mellyel növelhető az elhízás kezelésének hatékonysága és csökkenthetőek a mellékhatások, ideértve a már használatban lévő szerek új célú felhasználását vagy új szerek fejlesztését.

1.1.3 Monoamin oxidáz (MAO) gátlók

A monoaminok (epinefrin, norepinefrin, dopamin és szerotonin) a test számos fiziológias folyamatában vesznek részt. Emlősökben a MAO-oknak két altípusa van: MAO-A és MAO-B. A MAO gátlóknak két fő csoportjuk van: szelektív és nem szelektív, ezeken belül megkülönböztetünk reverzibilis és nem reverzibilis gátlókat. Napjainkban a MAO gátlókat leggyakrabban pszichiátriai és neurológiai rendellenességek kezelésére használják. Korábbi vizsgálatok azonban kimutatták, hogy a szemikarbazid-érzékeny amin-oxidáz gátlók és/vagy bizonyos nem szelektív irreverzibilis MAO-gátlók kombinált adása csökkentheti a testtömeget és a zsírmennyiség felhalmozódását diéta által indukált elhízásos állatmodellekben. A szelegilin egy klinikailag széles körben alkalmazott irreverzibilis, szelektív MAO-B gátló, amelyet elsősorban Parkinson-kór, Alzheimer-kór és depresszió kezelésére használnak. Békési és munkatársai kimutatták, hogy a szelegilin ($5\text{--}10\text{ mg kg}^{-1}$) lipid gazdag étrenddel (1% koleszterin, 10% olívaolaj) etetett patkányokban szignifikánsan csökkentette a májban felhalmozódott zsír mennyiségét, de a testsúlyra nem volt hatással. Ezért azt feltételeztük, hogy a MAO gátlóknak kedvező hatásai lehetnek az anyagcserére elhízásban.

1.2 Szív- és érrendszeri megbetegedések és terápiái

A szív- és érrendszeri megbetegedések, mint a szívelégtelenség, a magas vérnyomás, a kardiomiopátia, a szívritmuszavar és a koszorúér-betegségek (angina pectoris és miokardiális infarktus), világszerte a vezető halálokok közé tartoznak, kialakulásukban közel 300 kockázati tényező játszik szerepet. A szív- és érrendszeri megbetegedések leggyakoribb típusa a miokardiális infarktus, melynek során a szív egy részén a véráramlás csökkent vagy leáll, oxigén- és tápanyag hiányt okoz a szívizomban, ezáltal miokardiális nekrozishoz vezet. Világszerte a legtöbb szívinfarktus ateroszklerózis következménye, az atheroscleroticus plakk felszakadása vérrögképződést okoz, melynek következtében a koszorúér elzáródik.

A farmakológiai terápiák célja a szív- és érrendszeri megbetegedések megelőzése és a betegek felépülésének elősegítése. A jelenlegi szív- és érrendszeri gyógyszerek, mint pl. a vérlemezke gátlók, az antikoagulánsok, a nitrátok, a béta-

blokkolók, a renin-angiotenzin gátlók és a sztatinok alkalmazása függ a szívbetegség típusától és a tünetektől. Az ezen a területen elért számos eredmény ellenére még mindig vannak bizonyos szív- és érrendszeri megbetegedések, amelyekre nincs megfelelő terápia. Számos tanulmány kimutatta, hogy a kardioprotektív terápiák hatékonyságát jelentősen befolyásolják az olyan társbetegségek, mint az elhízás, a cukorbetegség vagy a diszlipidémia. Egyre több eredmény utal arra, hogy a megnövekedett autofágia kritikus szerepet játszik a kardioprotektív beavatkozásokban, és hogy a MAO gátlás mellett az autofágia potenciális terápiás célpont lehet az anyagcsere betegségek, valamint a szív-érrendszeri betegségek kezelésére.

1.2.2 Autofágia

Az autofágia olyan intracelluláris lebontó folyamat, amely eliminálja a felesleges vagy diszfunkcionális organelleket, valamint a hosszú élettartamú fehérjéket. Az emlőssejtekben az autofágia három fő típusát írták le: mikroautofágia, chaperone-mediált autofágia és makroautofágia. A makroautofágia (a továbbiakban autofágia) megsemmisíti a sérült sejtorganelleket, valamint a fel nem használt fehérjéket. Az autofágia egymást követő lépésekből áll: az iniciációs fázis, szeparációs fázis és lebomlási fázis. Normális körülmények között az autofágia alacsony aktivitással rendelkezik a sejtekben, azonban a metabolikus stressz, például a tápanyaghiány vagy a hipoxia növelheti az autofágia aktivitását. Továbbá az autofágia szerepét széles körben vizsgálták az anyagcsere-rendellenességek kialakulásában (inzulinrezisztencia, elhízás, ateroszklerózis) különböző genetikai állatmodellek alkalmazásával. Ezért az autofágia-indukáló szerek alkalmazása hatékony kezelés lehet a kardiovaszkuláris és anyagcsere betegségekben.

1.2.3 Autofágiát befolyásoló vegyületek

Korábbi vizsgálatok szerint számos, már klinikai alkalmazásban alkalmazott terápiás szerről kimutatták, hogy elsődleges hatásaik mellett is indukálhatnak autofágiát, például a hidrofób sztatinok, a szevoflurán, a szulfafenazol és bizonyos antibiotikumok, mint például a klóramfenikol (CAP) esetében. Kimutatták továbbá, hogy a CAP védi a szívet az iszkémiás/reperfúziós károsodás ellen és fokozza az autofágiás mechanizmusokat. Habár ismert, hogy az autofágia indukciója szükséges a

kardioprotektív mechanizmusokhoz, azonban nem végeztek részletes vizsgálatot arról, hogy a kardioprotekcióhoz az autofágia melyik szakaszának indukálására van szükség. Ezért azt feltételeztük, hogy a CAP a szívizomsejtek autofágiás mechanizmusának bizonyos lépésének a fokozásával indukál kardioprotekciót.

2 Célkitűzések

- A szelegilin kezelés metabolikus paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálata a magas zsír- és cukor tartalmú étrend által kiváltott enyhe elhízásban.
- Megvizsgálni, hogy a CAP által indukált autofágia szükséges-e a kardioprotekcióhoz.
- Annak vizsgálata, hogy az autofágia szekvesztrációs és/vagy lebontási fázisa szükséges a CAP kardioprotektív hatásához.

3 Módszerek

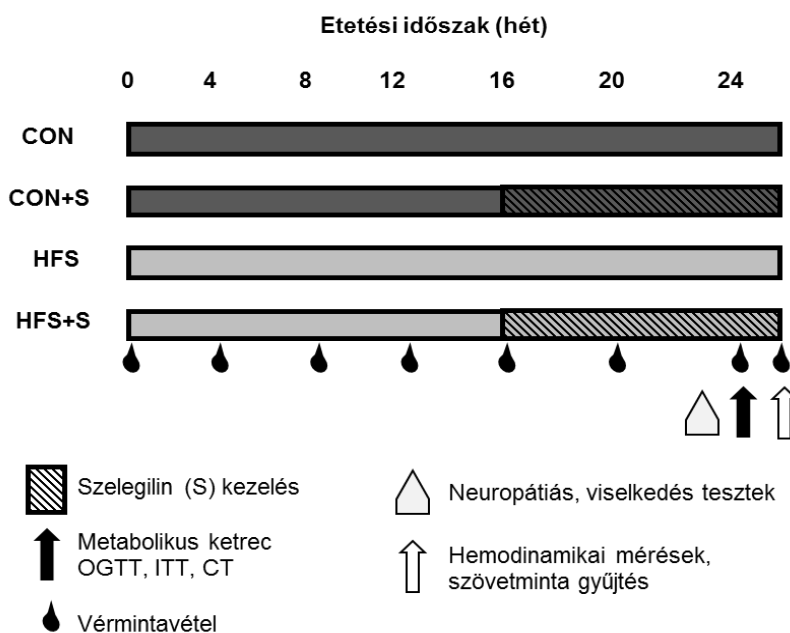
Kísérleteinket az USA Egészségügyi Intézete, valamint az Európai Unió által aktuálisan kiadott irányelveknek megfelelően végeztük, kísérleteinket engedélyezte a San Diego Állami Egyetem, San Diego, Kalifornia és a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága.

3.1. Kísérleti elrendezés: diéta-indukált kísérleti elhízás

Hím Long-Evans patkányokat véletlenszerűen két csoportra osztottuk: kontroll diétás (CON) és magas zsír- és cukor (HFS) diétás csoportokra. A CON csoportot kontroll patkány táppal etettük, míg a HFS csoportnál a tápot kiegészítettük 20% disznózsírral és 15% szukrózzal. A 16. héttől az állatokat tovább csoportosítottuk véletlenszerűen, és naponta egyszer szubkután 0,25 mg kg⁻¹ szelegilinnel (CON + S és HFS + S) vagy vivőanyaggal (CON, HFS) kezeltük.

Az állatok testsúlyát és éhomi vércukorszintjét havonta mértük. A 24. héten orális glükóz tolerancia tesztet (OGTT) és inzulin tolerancia tesztet (ITT) mértünk. A 24. héten a táplálékfelvételt 24 órán át metabolikus ketrecben vizsgáltuk. A 25. héten az állatokat pentobarbitállal altattuk (60 mg kg⁻¹, intraperitoneálisan). A hemodinamikai mérések után az állatokat termináltuk. Az epididimális és intraskapuláris barna

zsírszöveteket - az zsírmennyiség változásának markereit - elkülönítettük és tömegüket megmértük. Vér- és szövetmintákat gyűjtöttünk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk (1. ábra).



1. ábra Kísérleti leírás.

Hím Long-Evans patkányokat kontroll (CON, $n = 10$) vagy magas zsír- és cukortartalmú (HFS, $n = 10$) diétával etettünk 25 hétig. A CON + S ($n = 10$) és a HFS + S ($n = 10$) csoportokat $0,25\text{ mg kg}^{-1}$ szelegilinnel (S) kezeltük a 16. és 24. hét között. A testtömeget és a vércukorszintet havonta mértük. A neuropátiát, a viselkedési tesztet a 22-23. héten mértük. A 24. héten orális glükóz tolerancia tesztet (OGTT), inzulin tolerancia tesztet (ITT), táplálékfelvételt mértünk és komputertomográfiát (CT) végeztünk. A 25. héten végeztünk a hemodinamikai méréseket. A terminálás után mintákat gyűjtöttük.

3.2 Kísérleti elrendezés: CAP hatása az autofágiára szívsejtekben

A legmegfelelőbb modellrendszer kiválasztásához egy előkísérlet során megvizsgáltuk a CAP hatását az autofágiára újszülött patkány kardiomiocitákban (NRCM), H9c2 szív mioblaszt sejtekben és izolált patkányszívben. Azt találtuk, hogy a CAP hatására az autofágia indukálódott izolált szívben, de nem indukálódott NRCM vagy a H9c2 sejtekben. A TAT-HAAtg5^{K130R} hatékonyságát szintén az előkísérletben vizsgáltuk, ahol azt figyeltük meg, hogy az izolált szívekben a 200 nM TAT-HA-Atg5^{K130R} beadása után 15 perccel az LC3-II/I arány csökkent a kontrollhoz képest.

Ezért a fő kísérletsorozatban az iszkémia/reperfúziós károsodás *ex vivo* modelljét alkalmaztuk.

3.3 Teljes testzsír meghatározás

Az elhízás meghatározásához a 24. héten komputertomográfias (CT) méréseket végeztünk a NanoSPECT/CT PLUS-al. Az adipozitás indexet a következő képlettel számítottuk ki: (teljes test zsírszövet térfogata/testsúly) \times 100. A CT képeken a CTan szoftverrel értékeltük ki a szubkután és az teljes viscerális zsír mennyiségét.

3.4 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia előtt a deparaffinizált metszeteken elvégeztük az antigén feltárást. Az endogén peroxidáz aktivitásának blokkolása után a metszeteket szérumban blokkoltuk (2,5% kecske szérum foszfát pufferes sóoldatban). A metszeteket primer antitesttel, majd másodlagos antitesttel inkubáltuk. A specifikus festést Leica DM3000 LED mikroszkóp segítségével vizualizáltuk. A formalin-fixált minták, paraffinba ágyazását követően 4 μ m vastag szövet metszeteket készítettünk és hematoxilinnel és eozinnal festettünk.

3.5 Adipocita keresztmetszet

Az adipociták keresztmetszetét az Adiposoft szoftverrel mértük. Az adipocita szövetek területét μm^2 -ben kifejezve tovább használtuk az elemzéshez.

3.6 Totál RNS izolálás

A fehér zsírszövetből (epididimális) származó totál RNS-t kicsapós módszerrel extraháltuk. Röviden összefoglalva, az egyes mintákhoz RNAzol® RT-t adtunk és TissueLyser-rel homogenizáltuk. A homogenizátumokat centrifugáltuk, a DNS-t és a fehérjéket kicsaptuk. Az RNS-koncentrációkat NanoDrop-al mértük.

3.7 cDNS szintézis és qRT-PCR

A cDNS szintézishez a totál RNS-t alkalmaztuk templátként, a gyártó (Sensifast cDNS szintézis kit) protokollja szerint. A qRT-PCR reakciókat LightCycler® 480 Real-Time PCR rendszerrel végeztük a gyártó protokollja szerint, LightCycler® RNA Master SYBR Green jelenlétében. Az eredmények kiszámításához a $2\log\text{-}\Delta\Delta\text{Cp}$ értékelési módszert alkalmaztuk.

3.8 Plazma lipid, inzulin és leptin szint mérése

Az alacsony sűrűségű lipoproteint, a nagy sűrűségű lipoproteint és a triglicerideket plazma mintákból mértük a gyártó utasítása szerint. A hasnyálmirigy inzulin tartalmának meghatározására porított pancreasmintákat használtunk, valamint plazma inzulint is mértünk [(I-125) IRMA kit]. A plazma leptint ELISA módszerrel mértük a gyártó utasításai szerint.

3.9 A máj lipidtartalmának mérése

A teljes koleszterint és a triglicerideket homogenizált májmintákból mértük a gyártó (Beckman Coulter AU 5800 Klinikai Kémiai Rendszer) által ajánlott protokoll szerint. A máj koleszterin- és trigliceridszintjét a fehérjetartalomra normalizáltuk.

3.10 Hemodinamikai mérések

Az artériás vérnyomásméréseket 2F mikrotip-nyomású mikrokatóéterrel végeztük. Az artériás vérnyomás görbét a PowerLab adatgyűjtő rendszerrel rögzítettük és a LabChart Software System segítségével elemeztük.

3.11 Viselkedés és nociceptív vizsgálatok

Annak teszteléséhez, hogy az elhízás befolyásolhatja-e a motoros aktivitást, a mozgékonyt mérjük. Elemeztük a négy egymást kizáró mozgás fajtával töltött időt: ágaskodás, mozdulatlanság, helyváltoztatás és helyben mozgások. Az új objektum felismerési vizsgálattal (NOR) a rágcsálók vizuális felismerési memóriáját vizsgáltuk.

A prediabéteszben és elhízásban előforduló szenzoros elváltozásokkal összefüggő lehetséges neuropátiás szövődmények vizsgálatához két mechano-nociceptív tesztet végeztünk: dinamikus plantáris eszteziométer (DPA) és Randall-Selitto teszt. A Randall-Selitto tesztet a DPA mérés után végeztük el, hogy elkerüljük az összenyomás esetleges hatását az érintés érzékenységre.

3.12 NRCM-ek izolálása és kezelése, H9c2 sejtek kezelése

Az újszülött patkányokat termináltuk majd a szívüket eltávolítottuk. A bal kamrákból a kardiomiocitákat emésztéses módszerrel izoláltuk. A sejteket 24 óra elteltével 1%-os magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó differenciáló médiumba tettük. A tenyésztés 3. napján a médiumot hordozóval (sóoldat, 5 térfogat%)

vagy 300 μM CAP-mal egészítettük ki, majd 1 órát inkubáltuk. Ezután a sejteket homogenizáltuk, centrifugáltuk és a felülúszót összegyűjtjük.

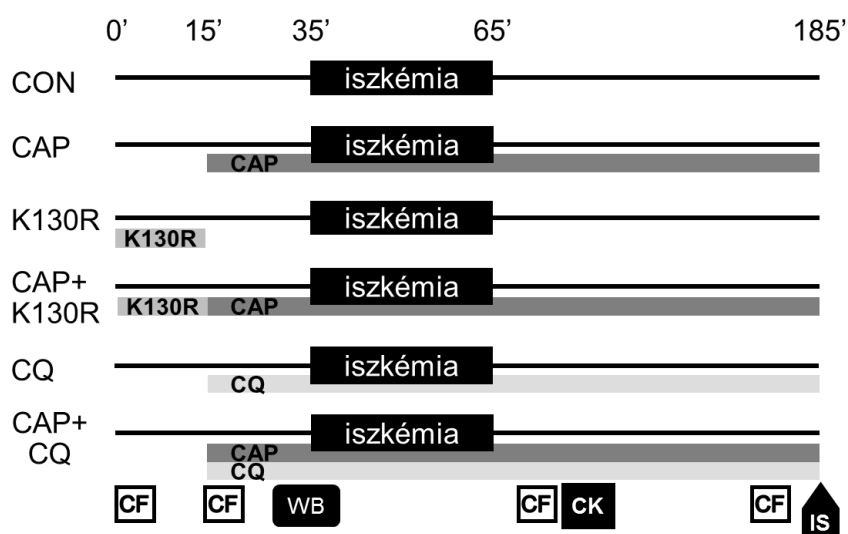
A H9c2 sejteket 300 μM CAP-al vagy oldószerrel kezeltük (CON). A sejteket 1 óráig inkubáltuk, ezután 200 μl RIPA lízis puffer segítségével felszedtük. Ezután a sejteket homogenizáltuk, centrifugáltuk és a felülúszót összegyűjtjük.

3.13 A K130R előállítása

A TAT-HA-Atg5^{K130R} fehérjét BL21(DE3)pLysS E. coli baktériumokból tisztítottuk, amelyeket pTAT-HA-Atg5^{K130R} plazmiddal transzformáltunk. Röviden, a nyers celluláris kivonatot Ni-NTA oszlopon tisztítottuk, majd PD-10 oszlopon sótalanítottuk. A tisztított fehérjét az *ex vivo* kísérletekhez használtuk.

3.14 *Ex vivo* szív perfúzió

A Sprague-Dawley patkányokat (250–300 g) i.p. pentobarbitállal altattuk (30 mg/kg), a véralvadás gátlására i.v. heparint (100 U/kg) adtunk az állatoknak. A szíveket kivágtuk, majd Langendorff-módon 15 percig perfundáltuk Krebs-Henseleit-oldattal (KH). A 15. perctől kezdve a szívek egy csoportja 300 μM CAP-t tartalmazó KH-t kapott. Az autofagoszóma képződés gátlásához a szívek egy másik csoportja a protokoll első 15 percében 200 nM sejtpemeábilis rekombináns TAT-HA-Atg5^{K130R}-t (CAP+K130R) tartalmazó KH kapott, ezután csak a 300 μM CAP-ot kapták. A szívek egy másik csoportja 300 μM CAP-ot és 10 μM CQ-t (CAP+CQ) kapott a protokoll alatt, hogy gátolja a CAP-indukált autofagoszóma lizoszomális lebomlását. A további csoportok esetében vagy csak 10 μM CQ-val vagy csak 200 nM TAT-HA-Atg5^{K130R}-rel perfundáltuk a szíveket (CQ és K130R; lásd a 2. ábrát).



2. ábra Kísérleti leírás.

CAP- Klóramfenikol, CON- Kontroll, K130R- TAT-HA-Atg5^{K130R}, CQ- Klorokin, CK- Kreatin kináz, CF– koronális áramlásmérés, WB– Western blot, IS– Infarktus terület.

3.15 Infarktusterület, koronária áramlás és kreatin kináz felszabadulás mérése

A perfúzió végén a szíveket 2 mm vastag szeletekre vágtuk, és a jobb kamrákat eltávolítottuk. A szeleteket 1%-os trifenil-tetrazolium-kloridba tettük, majd 24 órán át 4%-os formalinban tartottuk és szkenneltük. A koronária áramlási sebességét a koronáriafolyadék adott időközönkénti gyűjtésével mértük a protokoll alatt. A kreatin kináz (CK) felszabadulását a reperfúzió kezdete utáni tizedik és huszadik perc között begyűjtött koronáriafolyadék kolorimetriás vizsgálatával mértük.

3.16 Western blot

Egyenlő fehérjemennyiséget választottunk el Tris-glicin-SDS poliakrilamid gélen (bal kamra vagy teljes szív minták). A fehérjéket polivinilidén-difluorid membránra vittük át. A membránokat borjú szérum albuminnal vagy zsírmentes, száraz tejporral blokkoltuk. A membránokat primer antitestekkel és megfelelő torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcens technika segítségével detektáltuk.

3.17 Statisztika

Az értékeket átlag \pm átlagos standard hiba (SEM) formában adtuk meg. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t alkalmaztunk Fisher's LSD post hoc teszttel vagy egyutas ANOVA-t Fisher's LSD post hoc teszttel vagy Student-féle t-próba vagy nem-paraméteres Kruskal-Wallis tesztet (koronária áramlási adatok, 14–20 perc időpont) a GraphPad Prism 6 szoftverrel. A motoros aktivitáshoz statisztikai értékelésként többváltozós varianciaanalízist végeztünk. A statisztikai szignifikanciát $p < 0,05$ esetén fogadtuk el.

4 Eredmények

4.1 MAO-B gátlás hatása enyhe elhízásban

Ebben a kísérletben a HFS és HFS + S csoportokban a testsúly enyhén, de szignifikánsan megemelkedett a 16. héttől, a vizsgálat végén 14% -os növekedés volt megfigyelhető, amely mérsékelt elhízást jelent. A kalóriabevétel minden csoportban hasonló volt, mivel a HFS és a HFS+S csoportokban a táplálékfelvétel lecsökkent. A szelegilinnek nem volt hatása a testtömegre vagy a táplálékfelvételre.

Azt találtuk, hogy a teljes zsigeri és szubkután zsírmennyiség jelentősen megnövekedett a HFS diéta hatására, továbbá a szelegilin kezelés csökkentette a teljes vizcerális és szubkután zsírraktárakat. Míg a HFS diétában az epididimális zsírszövet súlya megemelkedett a kontroll csoporthoz képest, a perirenális vagy barna zsírszövet mennyiségében nem tapasztaltunk különbséget a csoportok között. Továbbá a szelegilin kezelés jelentősen csökkentette az epididimális zsírszövet tömegét a HFS diétában. Nem találtunk szignifikáns különbséget a szervtömegekben, a plazma leptin és a lipid szintek között. Megmértük a pajzsmirigyhormonok vérszintjét is, de nem találtunk különbséget az étrend vagy a szelegilin kezelés hatására a csoportok között. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a máj teljes koleszterin és trigliceridszintje szignifikánsan magasabb volt a HFS diétával etetett csoportokban. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az elhízás modellünkben a szelegilinnek nincs hatása a máj lipidszintjére.

Ebben a tanulmányban célunk volt a krónikus HFS diéta által kiváltott glükóz-homeosztázis változásainak jellemzése. Az OGTT és az ITT vizsgálatok azt mutatták, hogy a 24. héten a HFS diéta következtében inzulin tolerancia alakult ki, habár

éhgyomri vércukorszint vagy a plazma és a hasnyálmirigy inzulin szintjére nem volt hatással a diéta vagy a szelegilin kezelés. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a krónikus HFS diéta prediabetikus állapot kialakulásához vezetett.

A viscerális fehér zsírszövet glükózfelvételének vizsgálatához megmértük a *Glut1* és *Glut4* expresszióját. Vizsgálatunkban a HFS diéta jelentősen megnövelte a *Glut1* génexpresszióját, de a *Glut4*-ét nem. A HFS diéta indukálta a *Gapdh* expresszióját a zsírszövetben, de a szelegilin nem volt hatással a *Gapdh* expressziójára. Továbbá, hogy a HFS diéta indukálta a *Dgat* expresszióját a zsírszövetben, azonban a szelegilin kezelés nem befolyásolta ezt a paramétert. Azt is megállapítottuk, hogy sem az étrend, sem a szelegilin nem befolyásolta az *Acc*, *Pnpla2* és *Cd36* gén expresszióját fehér zsírszövetben. Megállapítottuk azonban, hogy a HFS diéta indukálta *Srebp-1c* és *Ndufa1* expresszióját, valamint hogy a szelegilin kezelés modulálta ezen gének expresszióját. Továbbá megmértük a zsírszöveti gyulladási markerek génexpresszióját. Nem találtunk különbséget a *Ccl2* expressziójában és a makrofágok számában az epididimális és az ingvinális fehér zsírszövetben. Azonban a HFS diéta indukálta a *Ccl3* gén expresszióját, amelyet a szelegilin kezelés csökkentett.

Annak megvizsgálására, hogy a HFS étrend vagy a szelegilin befolyásolja-e a hemodinamikai paramétereket, megmértük a szívfrekvenciát, az artériás szisztolés és a diasztolés nyomást. Azt tapasztaltuk, hogy a szelegilin jelentősen csökkentette a szisztolés nyomást kontroll diétával etetett patkányokban, azonban ez a hatás eltűnt a HFS diétában.

Célunk volt, hogy modellünkben megvizsgáljuk a szelegilin hatását a motoros aktivitásra és a felismerő memóriára. A vizsgálatához spontán motoros aktivitás tesztet és új objektumfelismerési tesztet végeztünk, melynek során sem a HFS étrend, sem a szelegilin kezelés nem befolyásolta jelentősen a motoros aktivitást vagy a felismerési memóriát. A neuropátia és a neuropátiás fájdalom jelenlétének kimutatására a HFS diétában két nociceptív tesztet végeztünk: Randall-Selitto talpnyomás tesztet és DPA-t. Az eredmények nem mutattak különbséget a fájdalom küszöbértékek között a csoportok között sem a DPA, sem a Randall-Selitto tesztek esetében.

4.2 A CAP az autofágia szekréció indukálásával csökkenti az infarktus méretet

Előkísérleteink során célunk volt, hogy összehasonlítsuk a CAP autofágiára gyakorolt hatását neonatális kardiomiocitákban, H9c2 sejtekben és *ex vivo* kezelt

szívekben. Ezért az autofágiában bekövetkezett változások meghatározásához a leggyakrabban használt autofágia markert, az LC3-at használtuk. Az izolált patkány neonatális kardiomiocitákban és a H9c2 sejtekben nem volt szignifikáns különbség az LC3-II/I arányban CON és CAP csoportok között. A CAP-al perfundált szívek bal pitvarában az LC3-II és az LC3-I aránya 35 perc után szignifikánsan megemelkedett a CON mintákhoz viszonyítva. Mivel a CAP nem indukált autofágiát az NRCM-ekben és a H9c2 sejtekben, további kísérleteinkben az izolált patkány-szívmodellt használtunk. Megvizsgáltuk a CAP és a TAT-HA-Atg5^{K130R} hatását az autofágiában jelentős LC3 fehérje-expressziójának alakulására teljes szívszövetben.

Annak vizsgálatára, hogy az autofágia szekréción és/vagy lebontási fázisa szükséges-e a CAP kardioprotektív hatásához, *ex vivo* Langendorff szív perfúziós kísérleteket végeztünk. A CAP kezelés jelentősen csökkentette az infarktus méretét és a CK felszabadulását a CON szívekhez képest. A TAT-HA-Atg5^{K130R}-el végzett előkezelés megakadályozta a CAP infarktusméret csökkentő hatását, míg a CQ-al történő előkezelés nem befolyásolta a CAP által kiváltott kardioprotekciót. Az izolált szív mintákban is megmértük az LC3 expressziót, melynek során a Western blot eredmények azt mutatták, hogy a CAP növelte az LC3-II/I arányt. Miközben a CQ nem, viszont a TAT-HA-Atg5^{K130R} csökkentette a CAP által kiváltott LC3-II növekedést.

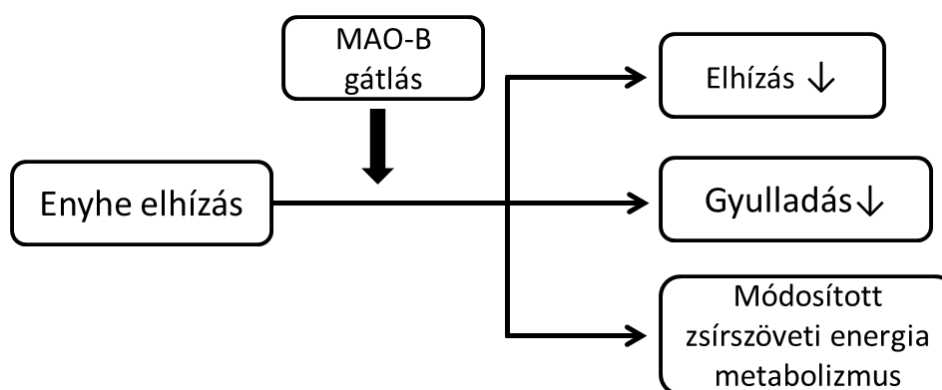
Mivel az autofágia kezdeti szakaszát gátló K130R kezelés hatására eltűnt a CAP által indukált kardioprotekció, az eredmények azt jelzik, hogy a CAP által indukált kardioprotekcióhoz az autofagoszóma kialakulása, de nem az autofagoszóma lebomlása szükséges. A CAP által modulált kardioprotektív jelátviteli mechanizmusok jellemzésére a RISK/SAFE útvonalban részt vevő fehérjék aktiválódását mértük. Azt tapasztaltuk, hogy az Akt nem, de az Erk1/2 fehérje foszforilációja jelentősen növekedett a CAP kezelés következtében.

5 Következtetések

5.1 A szelegilin mérsékli a HFS diéta által kiváltott elhízást

Ez az első bizonyíték arra, hogy a szelegilin csökkenti a zsírszövet mennyiségét, modulálja a zsírszövet energia metabolizmusát és enyhíti a HFS diéta által kiváltott zsírszöveti gyulladást (3. ábra). Kimutattuk, hogy a *Srebp-1c*, *Glut1* és *Ccl3* HFS diéta által indukált expressziója zsírszövetben csökkent a szelegilin kezelés hatására. Kísérleteink során azonban a szelegilin kezelés nem volt hatással a testtömegre, a glükóz homeosztázis károsodására, és nem befolyásolta a viselkedést. Eredményeink azt mutatják, hogy a szelegilin befolyásolhatja a fehér zsírszövet glükóz- és lipid metabolizmusát, és enyhítheti a fehér zsírszövet gyulladását.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a MAO-B specifikus gátlása szelegilinnel enyhítheti az elhízás káros hatásait, és csökkentheti a szív- és érrendszeri betegségek kockázatát, így a szelegilin adjuvánsként szolgálhat az elhízás elleni kezeléshez.



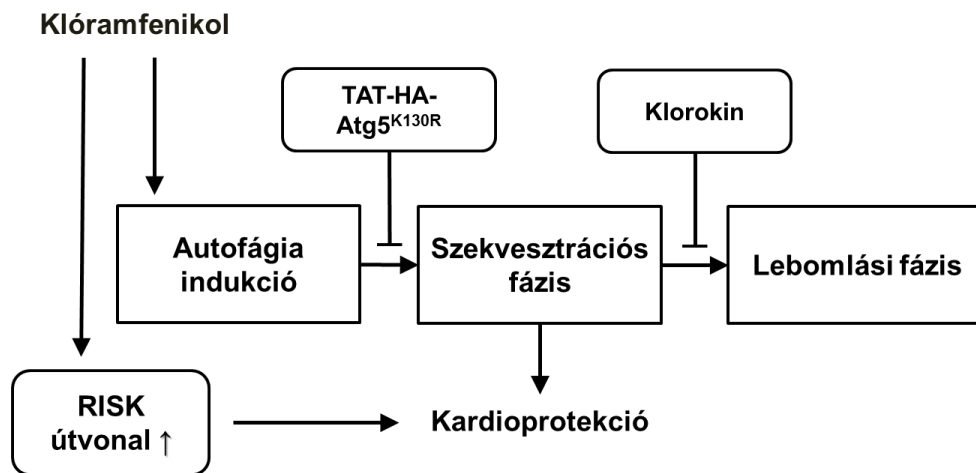
3. ábra MAO-B gátlás hatása enyhe elhízásban.

5.2 A CAP csökkenti az infarktus méretét az autofágia szekréció indukálásával

Az irodalomban először kimutattuk, hogy az autofágiának a szekvesztrációs, és nem a lebontási fázisa szükséges a CAP kardioprotektív hatásához (4. ábra). Kísérletünkben a CAP beadása csökkentette a myocardialis infarktust *ex vivo* patkány szívben. A CAP kezelés következtében az LC3-II/I arány és az Erk1/2

foszforilációjának növekedése volt megfigyelhető a szívben. A CAP által indukált kardioprotekció megszűnt az autofágia kezdeti szakaszát gátló K130R kezelés hatására.

Ezért az autofágiás mechanizmus szekréciós fázisának indukálásán alapuló terápiás eszközök kifejlesztése új terápiás lehetőségekhez vezethet az akut miokardiális iszkémia/reperfúziós károsodás ellen.



4.ábra A klóramfenikol által kiváltott kardioprotekcióhoz az autofágia szekvesztrációs fázisának kialakulása, nem pedig lebomlási fázis szükséges.

7 Saját publikációk

7.1 A tézishoz felhasznált publikációk:

1. **Nagy CT**, Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Tuza S, Kassai F, Ernyey AJ, Gyertyán I, Király K, Oláh A, Radovits T, Merkely B, Bukosza N, Szénási G, Hamar P, Mathé D, Szigeti K, Pelyhe C, Jelemenský M, Onódi Z, Helyes Z, Schulz R, Giricz Z, Ferdinandy P.

Selegiline reduces adiposity induced by high-fat, high-sucrose diet in male rats

BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 2018 Sep;175(18):3713-3726.

IF:6.81 (2017)

2. Giricz Z, Varga ZV, Koncsos G, **Nagy CT**, Gorbe A, Mentzer RM Jr, Gottlieb RA, Ferdinandy P

Autophagosome formation is required for cardioprotection by chloramphenicol

LIFE SCIENCES 186: pp. 11-16. (2017) **IF: 3.234**

7.2 A tézishoz fel nem használt publikációk:

1. Onódi Z, Pelyhe C, **Nagy CT**, Brenner GB, Almási L, Kittel A, Manček-Keber M, Ferdinandy P, Buzás EI, Giricz Z

Isolation of high-purity extracellular vesicles by the combination of iodixanol density gradient ultracentrifugation and bind-elute chromatography from blood plasma

Frontiers in Physiology, Volume 9; 10.3389/fphys.2018.01479 (2018)

IF: 3.394 (2017)

2. Kiscsatari L, Varga Z, Schally AV, Gaspar R, **Nagy CT**, Giricz Z, Ferdinandy P, Fabian G, Kahan Z, Gorbe A

Protection of neonatal rat cardiac myocytes against radiation-induced damage with agonists of growth hormone-releasing hormone

PHARMACOLOGICAL RESEARCH 111: pp. 859-866. (2016) **IF: 4.48**

3. Baranyai T, **Nagy CT**, Koncsos G, Onodi Z, Karolyi-Szabo M, Makkos A, Varga ZV, Ferdinandy P, Giricz Z
Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning
CARDIOVASCULAR DIABETOLOGY 14:(1) Paper 151. 10 p. (2015) **IF: 4.534**

4. Emri T, Tóth V, **Nagy CT**, Nagy G, Pócsi I, Gyémánt G, Antal K, Balla J, Balla G, Román G, Kovács I, Pócsi I.
Towards high-siderophore-content foods: optimisation of coprogen production in submerged cultures of *Penicillium nalgioense*
JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE 93:(9) pp. 2221-2228. (2013) **IF: 1.879**

5. Tóth V, **Nagy CT**, Pócsi I, Emri T
The echinocandin B producer fungus *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic
APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 95:(1) pp. 113-122. (2012) **IF: 3.689**

6. Tóth V, **Nagy T C**, Miskei M, Pócsi I, Emri T
Polyphasic characterization of “*Aspergillus nidulans* var. *roseus*” ATCC 58397.
FOLIA MICROBIOLOGICA 56: pp. 381-388. (2011) **IF: 0.677**