

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Kardioprotekció az akut iszkémia/reperfúziós
károsodás ellen: a metabolikus társbetegségek és az
extracelluláris vezikulák szerepe

Dr. Giricz Zoltán



Semmelweis Egyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet
Budapest
2024

*„A valóság az, ami akkor sem tűnik el,
ha már nem hiszünk benne.”*

Philip K. Dick

1. Bevezetés

A dolgozat a kardioprotektív beavatkozások és a metabolikus társbetegségekhez kapcsolódó molekuláris mechanizmusok, valamint az extracelluláris vezikulákkal (EV-kkel) és azok kardioprotektív jelentőségével kapcsolatos technológiai és mechanisztikus kutatások területén elért eredményeinket foglalja össze.

A szívinfarktus mortalitásának és életminőséget rontó következményeinek csökkentése jelenleg is elsődleges népegészségügyi cél. Ilyen eljárás vagy gyógyszerkészítmény még nem került klinikai gyakorlatba, fejlesztésük intenzív. Először mutattuk ki, hogy a távoli iszkémiás prekondicionálás (RIPreC) nem védi a szívet az akut iszkémia/reperfúziós károsodással (IRI-vel) szemben patkányokban a leggyakrabban használt kísérleti protokollok alkalmazásával, valamint hogy a távoli iszkémiás perkondicionálás (RIPerC) hatásossága is elvész akut hiperglikémiában (AHG-ben). Jellemeztük az akut szívinfarktus (AMI) okozta szívelégtelenséget (HF-t) göttingeni minisertésekben a Landrace sertésekkel összehasonlítva, ahol megállapítottuk, hogy a göttingeni minisertésmodell hasonló a humán patológiához a HF-paramétereket figyelembe véve, és hogy az alkalmasabb a HF hosszú távú követésére. Összehasonlítottuk az iszkémiás posztkondicionálás (IPostC) és a RIPerC kardioprotektív hatékonyságát az AMI zárt mellkasú Landrace sertésmodelljében. Ezen eljárások egyike sem csökkentette a nekrozist, de a koszorúér mikrovaszkuláris rendszert védték. Ezek alapján a mikrovaszkuláris védelem fontos lehet az IRI csökkentésében.

Az anyagcsere betegségek az iszkémiás szívbetegségekkel leggyakrabban együtt előforduló kórállapotok. Jelenlétük rontja az IRI következményeit, és annak rizikófaktorai is. A szívre kifejtett hatásaik molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása közelebb vihet azok mérsékléséhez, új gyógyszer támadáspontok azonosításához járulhat hozzá. Megállapítottuk, hogy hiperkoleszterinémiás (HC) patkányokban a szívben az autofágia szabályozott, míg az mTOR-út vonal és az apoptózis serken. Ez a megbomlott egyensúly szerepet játszhat a kardioprotekció megszűnésében hiperkoleszterinémiában. Leírtuk, hogy a szelegilin csökkenti a zsírlerakódást elhízásban, és befolyásolja a glükóz- és lipidanyagcserét, valamint a zsírszöveti gyulladást, ami csökkentheti a szívbetegségek kockázatát.

Az EV-k szerepét nagyszámú életfolyamatban igazolták, segítségükkel sejtek közötti kommunikáció valósul meg. Információtartalmuk diagnosztikai célokra, természetes és szintetikus hatóanyag hordozó képességük pedig terápiás célokra teheti őket alkalmassá. Tanulmányozásuk jelenleg is kihívásokkal teli, többek között számos fejlett módszer kifejlesztése még

váratott magára. Ezért először komplex módszereket dolgoztunk ki az EV-k nagy tisztaságú izolálására. Az anyagcsere betegségekben betöltött szerepüket is tanulmányoztuk, mivel feltételeztük, hogy segítségükkel előre jelezhető lehet a szívre káros állapotok kialakulása. Kimutattuk, hogy a hiperkoleszterinémia megváltoztatja mind a keringő, mind a szívizom EV-k mennyiségét és összetételét, ami hozzájárulhat annak szívhatásaihoz. Az EV-k kardioprotektív eljárásokban betöltött szerepét is vizsgáltuk kutatásaink során. Az irodalomban először mutattuk meg, hogy az EV-k az iszkémiás kondicionálás kardioprotektív jeleit hordozzák, hiányukban RPreC nem váltható ki. Azonosítottuk, hogy a sejtenyészetekből kalcium-ionofór kezelésre felszabaduló EV-k terápiás lehetőséggel rendelkezhetnek iszkémiás szívkárosodás ellen, és felfedtük, hogy a védelem az oxidatív károsodást csökkentő enzimrendszereken keresztül valósul meg. Az EV-k szerepét vizsgáltuk még a hélium-kondicionálás során is, ám ebben a kardioprotektív eljárásban az EV-k nem játszanak szerepet a szív fibroblasztjainak iszkémia utáni káros átépülésének mérsékléséért felelős molekuláris mechanizmusok átvitelében.

2. Célkitűzések

Kardioprotektív beavatkozások és modelljeik fejlesztése az eredmények klinikai vizsgálatokba való sikeresebb átültetésük érdekében

- egy hatékony és robusztus RIPC protokoll létrehozása az akut szívizom IRI patkánymodelljében, valamint a hatékonyság fő tényezőinek azonosítása,
- az IRI két olyan sertésmodelljének jellemzése és klinikai relevanciájának értékelése az MI utáni HF-vizsgálatokhoz, amelyek a kardioprotektív gyógyszerek és/vagy orvostechikai eszközök fejlesztésére használhatók,
- az IPostC és a RPerC hatásainak vizsgálata az IRI mérőszámainak, például a szívizomnekrózis, az ödéma és az MVO in vivo szív MRI és ex vivo szövettani festés által meghatározott mérőszámainak összehasonlításával az AMI klinikailag releváns, zárt mellkasú sertésmodelljében.

A CMD-k hatásainak és mechanizmusainak vizsgálata a kardioprotekcióban

- az autofágia és az mTOR útvonalak, valamint az apoptózis és a nekroptózis vizsgálata hiperkoleszterinémiás patkánymodellben,
- a MAO-B gátló szelegilin kezelés hatásának vizsgálata a metabolikus paraméterekre hiperkoleszterinémiában,
- annak vizsgálata, hogy az AHG hatással van-e a RPerC által kiváltott kardioprotekcióra.

Az EV-k szerepének vizsgálata a CMD-kben és a kardioprotektív eljárásokban

- a vérplazmából történő EV izolálás UC-, DGUC-, SEC-, és BE-SEC-alapú módszereinek fejlesztése és vizsgálata hatékonyságuk és tisztaság tekintetében,
- annak elemzése, hogy a HC hogyan befolyásolja az EV-k metabolomjának összetételét és hogyan módosítja a HC a CM EV kommunikációt,
- annak vizsgálata, hogy az iszkémiás kondicionálás indukálja-e az EV-k felszabadulását a szívből, valamint annak vizsgálata, hogy az EV-k szükségesek-e a RIPC által kiváltott kardioprotekcióhoz,
- annak felfedése, hogy a kalcium-ionofór kezelés után felszabaduló stressz-EV-k képesek-e kardioprotekciót indukálni az akut IRI sejtes modelljeiben,
- annak felmérése, hogy a héliumos kondicionálás indukálja-e a kardioprotektív EV-k felszabadulását szív eredetű fibroblasztokból.

3. Eredmények

3.1. Kardioprotektív beavatkozások és modelljeik fejlesztése az eredmények klinikai vizsgálatokba való sikeresebb átültetésük érdekében

3.1.1. A végtag távoli iszkémiás prekondicionálás kardioprotektív hatékonysága patkányokban: eltérés a metaanalízis és egy háromközpontos *in vivo* vizsgálat között

A budapesti vizsgálóhelyen a femorális erek ciklikus leszorításával és felengedésével végzett RIPC sem uni-, sem bilaterálisan nem csökkentette az IS/AAR-t, míg a pozitív kontroll IPreC-C csoportban az IS/AAR szignifikáns csökkenést mutatott a CON-C csoporthoz képest. A szegedi vizsgálóhelyen a kétoldali érszorítók ciklikus meghúzásával és lazításával végzett RIPC nem csökkentette az IS/AAR-t, míg a pozitív kontroll IPreC-T csoportban az IS/AAR relatív csökkenését mutatták a CON-T-hez képest. Az amszterdami vizsgálóhelyen a RIC-et a hátsó végtagokon alkalmazott egy- vagy kétoldali nyomásmandzsetták ciklikus felfújásával és leeresztésével idézték elő. Sem az egyoldali RIC, sem a kétoldali RIC nem befolyásolta az IS/AAR-t, amikor a 20, 25 vagy 45 perces miokardiális iszkémia előtt végezték, összehasonlítva a megfelelő kontrollokkal.

Annak érdekében, hogy a RIPC IS-korlátozó hatását *in vivo* vizsgálatainkban összehasonlíthassuk a korábbi publikációk eredményeivel, metaanalízist végeztünk az áttekintett vizsgálatokon. Emellett metaregresszió segítségével értékeltük a jelentett adatelemek száma és a hatásméret közötti kapcsolatot. A bevont 22 cikkből 23 kontrollált összehasonlítás adatait nyertük ki a RIPC-nek az akut miokardiális IRI patkánymodellekben, társbetegség vagy komedikáció nélkül, amelyek összesen 189 állatot tartalmaztak a kontrollcsoportokban és 188 állatot a RIPC-csoportokban. Azokban a tanulmányokban, ahol a különböző altatószerek hatását vizsgálták a RIPC hatékonyságára, csak a referencia-altatószerrel kezelt csoportokat vettük figyelembe. A vizsgálatok heterogenitása jelentősnek bizonyult. A RIPC 21,28%-kal csökkentette az IS/AAR-t a kontrollcsoportéhoz képest. A publikációs torzítást a tölcserdiagram vizuális értelmezésével értékeltük, ami arra utal, hogy a RIPC kardioprotektív hatékonyságát kis mértékben vagy egyáltalán nem mutató kis tanulmányok alulreprezentáltak lehetnek a publikált eredmények között, azonban az Egger regressziós teszt nem mutatott szignifikáns publikációs torzítást ($p=0,07$), és a nem parametrikus trim-and-fill módszer nem jelzett hiányzó tanulmányokat, amelyek kompenzálnák a tölcserdiagram aszimmetriáját.

Összefoglalva, vizsgálatainkban nem tudtuk kimutatni a RlPreC védőhatását patkányokban egy több központban végzett vizsgálatunkban annak ellenére, hogy az alkalmazott beállítások összhangban voltak az irodalomban fellelhetőkkel. Ez ellentmondásban van a metaanalízisünk eredményével, ami a RlPreC egyértelmű hatásosságát mutatja a közlésre került eredmények alapján, habár felmerült a gyanú, hogy a kis hatást, vagy neutrális eredményt mutató közlemények nem kerülnek publikálásra, ami torzíthatja a kardioprotektív beavatkozásokról alkotott képet, így nehezítheti azok klinikai gyakorlatba való átültethetőségüket.

3.1.2. Miokardiális infarktus utáni szívelégtelenség koszorúér-elzárás/reperfúzió modelljeiben: a zárt mellkasú göttingeni minisértés és a Landrace sertések összehasonlítása

Mivel a sertések testsúlya gyorsan nőhet, ami befolyásolhatja a szív fiziológiáját és ezáltal az AMI-ra adott választ, megvizsgáltuk a fajták anatómiai és funkcionális változásait. A szív növekedési ütemét CMRI-vel mértük. A göttingeni minisértések LVED tömege 6 hónapos korban csak mérsékelten nőtt. Ezzel szemben a Landrace sertésekben az LVED tömege 2 hónapra közel 100%-kal nőtt. Ez azt jelzi, hogy a Landrace sertések kevésbé optimális választás lehet a hosszú távú követéses vizsgálatokhoz, mivel jelentős növekedésük zavarhatja a szívkárosodás számszerűsítését.

Az LVEF-et, mint a bal kamra szisztolés funkciójának legszélesebb körben használt paraméterét szintén CMRI-vel mértük. Az MI az LVEF szignifikáns csökkenését eredményezte a minisértésekben 3 hónapos és 6 hónapos korban. Várározásainkkal ellentétben a Landrace sertésekben az LVEF 2 hónap után nem változott.

A HF jeleinek további vizsgálata érdekében elvégeztük a bal pitvari térfogat mérését a testfelszínhez viszonyítva (LAVi). A LAVi 6 hónap után 34%-kal nőtt a göttingeni minisértésekben, és nem változott jelentősen a Landrace sertésekben 2 hónap után, ami megerősítette előző eredményeinket, miszerint a Landrace sertésekben nem alakul ki jelentős kamrai elégtelenség.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy a felnőtt göttingeni minisértésmodell hosszú távú nyomon követéssel az emberhez hasonlóan utánozza az MI utáni HF funkcionális és morfológiai paramétereit. Adataink azt is mutatják, hogy a Landrace sertések nem alkalmasak a poszt-MI HF értékelésre, elsősorban a test- és szívtömeg gyors növekedésének következményei miatt, ami nem teszi lehetővé a hosszú távú követést, és zavarja a poszt-MI HF patológiáját. A Landrace sertések alkalmasak lehetnek az AMI következményeinek rövidtávú vizsgálatára. Eredményeink hasznosak lesznek az optimális nagyállatmodellek

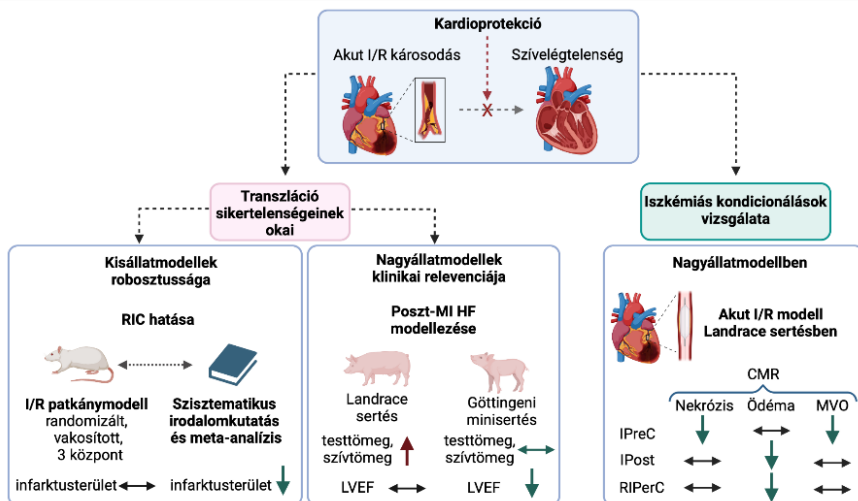
kiválasztásához a poszt-MI HF tanulmányozásához és az e patológia elleni új terápiák kifejlesztéséhez.

3.1.3. A helyi iszkémiás prekondicionálás, posztkondicionálás és távoli kondicionálás által kiváltott kardioprotekció értékelése a reperfundált akut miokardiális infarktusz zárt mellkasú sertésmoelljében: a mikrovaszkulátúra jelentősége

A miokardiális nekrozis, ödéma és MVO számszerűsítése érdekében 3 nappal a koszorúér-okklúzió és a reperfúzió után CMRI-t végeztünk. A miokardiális nekrozist az IPostC és a RPerC nem befolyásolta, az IPreC azonban jelentősen enyhítette azt az Isch csoporthoz képest. Az IPostC és a RPerC szignifikánsan csökkentette a szívizomödémát az Isch csoporthoz képest, azonban az IPreC csak tendenciaszerű csökkenést okozott.

A miokardiális nekrozis és az AAR ex vivo szövettani módszerrel történő értékeléséhez a TTC és az Evans-kék festést alkalmaztuk 3 óra reperfúzió követően. Szövettani módszerekkel az IPostC és a RPerC nem csökkentette a nekrozist, az IPreC azonban csökkentette azt az Isch csoporthoz képest. A csoportok között nem volt különbség az AAR-méretében.

Összefoglalva, ebben a vizsgálatban kimutattuk, hogy az IPostC és a RPerC védte a mikrovaszkulaturát az IRI-vel szemben, mivel csökkentették a szívizom ödémáját, az IPostC pedig az MVO-t. Az IPostC vagy a RPerC azonban nem csökkentette a miokardiális nekrozist, csak a pozitív kontroll IPreC csökkentette azt. Ez volt az első összehasonlító vizsgálat a különböző kondicionáló manőverek IRI-vel kapcsolatos CMRI-paraméterekre gyakorolt eltérő hatásának, valamint annak, hogy az ödéma és az MVO a miokardiális nekrozistól függetlenül változik. Eredményeink alátámasztották a klinikai vizsgálatok azon megállapításait, hogy az ödéma változhat a különböző beavatkozások hatására, és hogy az nem feleltethető meg az AAR-nek.



A kardioprotekció kis- és nagyállatos modelljeinek kutatásában elért
eredmények összefoglalása

3.2. A CMD-k hatásainak és mechanizmusainak vizsgálata a kardioprotekcióban

3.2.1. A hiperkoleszterinémia csökkenti az autofágiát és apoptózist indukál patkányszívben

A koleszterinnel táplált állatok szívében csökkent az LC3-II, a Beclin-1, a Rubicon, és a Rab-7a fehérje mennyisége, ami összhangban van az autofágia kezdeti lépéseinek és a vezikuláris szállítási folyamatok csökkenésével, annak ellenére, hogy az autofágia beindításában részt vevő III. osztályú PI3-kináz felszabályozódott. Az autofágiás clearance markereinek expressziójában a csoportok között nem volt különbség az NBR1 és a SQSTM1/p62 fehérjék expressziója alapján. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az autofágia korai és késői fázisai egyaránt csökkentek a hiperkoleszterinémiás patkányok szívében.

az Akt és az mTOR fehérje expressziójában vagy foszforilációjában nem volt szignifikáns különbség a csoportok között; azonban a riboszomális S6 foszforilációja, ami az mTOR komplex aktivitásának közvetett markere, emelkedett volt a CHOL csoportban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az mTOR-aktivitás felszabályozott volt hiperkoleszterinémiás patkányok szívében.

Az apoptózis markere, a hasított kaszpáz-3 expressziója szignifikánsan emelkedett, míg az apoptózist szabályozó Bcl-2/BAX arány nem változott. Továbbá, a RIP1, a RIP3 és az MLKL fehérjék, a nekroptózis fő markereinek expressziója nem változott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hiperkoleszterinémia felszabályozza az apoptózist, de más szabályozott sejthalál útvonalat, mint pl. a nekroptózist nem befolyásolja a szívben.

3.2.2. A szelegilin csökkenti a magas zsír- és cukortartalmú étrend által kiváltott elhízást hím patkányokban

A szelegilin kezelés csökkentette a HFS étrend által kiváltott elhízást. Itt azt találtuk, hogy a teljes zsigeri és szubkután zsírtérfogat jelentősen megnőtt a HFS-diéta hatására, és hogy a szelegilin-kezelés csökkentette a zsigeri és szubkután zsírszövetek növekedését. Az OGTT- és ITT-vizsgálatok azt mutatták, hogy a 24. héten a HFS-diéta hatására inzulin-tolerancia alakult ki, amit nem befolyásolt a diéta vagy a szelegilin-kezelés. A HFS étrend indukálta a Ccl3 gén expresszióját, amelyet a szelegilin kezelés csökkentett. Ez arra utal, hogy a fehér zsírszövet gyulladását a szelegilin csökkentheti.

Összefoglalva, ez a közlemény volt az első bizonyíték arra, hogy a szelegilin csökkenti zsírraktárak méretét a diéta által kiváltott elhízásban. Továbbá

bemutattuk, hogy a szelegilin befolyásolhatja a fehér zsírszövet glükóz- és lipidanyagcseréjét, és enyhítheti a fehér zsírszövet gyulladását is. Így a MAO-B gátlása szelegilinnel csökkentheti a CVD-k kockázatát, ezáltal a szelegilin az elhízás elleni terápia kiegészítő terápiás eszközeként szolgálhat.

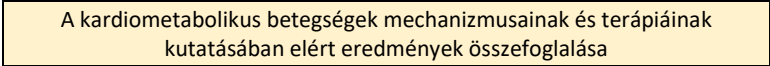
3.2.3. Az akut hiperglikémia megszünteti a távoli iszkémiás perkondicionálás kardioprotektív hatását a nitratív stressz és az mTOR jelátvitel indukciója révén.

Az AHG önmagában nem súlyosbította a szív nekrozisát, Az infarktus mérete kisebb volt az NG + RPerC csoportban az NG + Isch csoporthoz képest, míg a RPerC nem csökkentette az infarktus méretét az AHG-ban.

A szív 3-nitro tirozin szintje szignifikánsan emelkedett az AHG hatására, ami jelzi a nitratív stressz kulcsfontosságú szerepét a kardioprotekció elvesztésében zavart glükóz homeosztázis esetén.

Mivel korábban kimutatták, hogy az oxidatív és nitratív stressz kölcsönhatásban áll az mTOR útvonallal és az autofágiával, megvizsgáltuk azokat AHG-ban. Az mTOR és az S6 foszforilációja szignifikánsan emelkedett, ami arra utal, hogy az mTOR komplex I aktivitása az AHG csoportban megnövekedett. Az AKT foszforilációja szintén emelkedett AHG-ban. Az autofágia fő markere, az LC3II/LC3I arány jelentősen csökkent az AHG hatására, azonban más autofágiával kapcsolatos fehérjék, mint a Beclin-1, nem változtak.

Összefoglalva, először mutattuk ki, hogy a RPerC kardioprotektív hatása elvész AHG fennállakor. Ez AHG által kiváltott nitratív stressz növekedésével és az AKT mTOR útvonal aktiválásával, de nem a szív autofágia zavarával függhet össze. Ezért a RPerC hatékonysága AHG esetén klinikai körülmények között még a normoglikémiához képest is kisebb hatékonyságú lehet.



3.3. Az EV-k szerepének vizsgálata a CMD-kben és a kardioprotektív eljárásokban

3.3.1. Extracelluláris vezikulák izolálása vérplazmából: ultracentrifugációs, méretkizárásos kromatográfiás, valamint sűrűséggradiens ultracentrifugálás és bind-elute kromatográfia kombinációjának minőségi és mennyiségi jellemzése

A kis EV-k UC-val történő izolálása vérplazmából jelentős mennyiségű nem-EV fehérje együttes jelenlétét mutatta.

A kis EV-k vérplazmából UC-vel történő izolálásának hatékonyságának értékeléséhez az UC minden egyes ismétlése után a fennmaradó felülúszót négyszer egymás után újra ultracentrifugáltuk, és az egyes centrifugálási fordulókból nyert pelleteket Western blot segítségével elemeztük. A CD63 és a TSG101 mennyisége a pelletált kis EV izolátumokban az ismételt 1 órás UC után hasonló volt egymáshoz, ahelyett, hogy csökkenő tendenciát mutatott volna (A kísérlet). Ez az eredmény azt jelzi, hogy csak a kis EV-k kisebbsége izolálható 1 órás UC-vel. Kis EV-ket izoláltunk különböző időtartamú, azaz 1h, 3h, 6h és 14h UC segítségével. A kis EV-ket csak azokban az izolátumokban lehetett TEM-mel láthatóvá tenni, amelyeket 1h vagy 3h hosszan ultracentrifugáltunk. Az 1h és 3h UC pelletekben lévő kis EV-k szerkezetileg épnek tűntek. Néhány hólyagos struktúra 6h és 14h UC után is azonosítható volt, bár az amorf anyag nagy mennyisége eltakarta őket.

Több SEC-közeget, köztük a Sepharose 2B, Sepharose CL-4B Sephacryl S-400 médiumokat vizsgáltunk a kis EV-k vérplazmából történő izolálásának megvalósíthatósága és a legfontosabb teljesítményparaméterek értékelése céljából egy egylépéses, kromatográfián alapuló módszerrel. Az izolálás hatékonyságának értékeléséhez azonos mennyiségű SEC-frakciókat elemeztünk, míg a tisztaságot azonos mennyiségű fehérje felhasználásával teszteltük. A Sepharose 2B esetében a CD63 és a TSG101 túlnyomórészt a 6-7. frakciókban volt kimutatható, de albumin is jelen volt ezekben a frakciókban. A Sepharose CL-4B és Sephacryl S-400 oszlopok 6. frakciója azonban kizárólag CD63 és TSG101 jeleket mutatott, jelentős albumin szennyeződés nélkül. A SEC-frakciók azonos térfogatú felvitelével a CD63 és TSG101 túlnyomó többsége minden közeg esetében albuminnal együttesen volt jelen, ami azt jelzi, hogy az elválasztás hatékonysága alacsony.

Összefoglalva, ebben a vizsgálatban bizonyítottuk be, hogy a kis EV-k SEC-el izolálhatók a vérplazmából jelentős mennyiségű albumin szennyeződés nélkül,

de UC-vel nem, és hogy a kis EV-knek csak egy kisebb része izolálható SEC-el vagy UC-vel a vérből.

A vérplazmából származó kis EV-k tisztításának javítása érdekében a jodixanol DGUC módszert alkalmaztuk. Az Alix, Tsg101 és CD81 EV-markerek túlnyomórészt az F6-ban voltak megfigyelhetők, 1,128 g/ml sűrűségben, míg az F5-ben és az F7-ben kisebb mennyiségben mutattuk ki a markereket. A kilomikronokhoz kapcsolódó Apo B48, az LDL-hez kapcsolódó Apo B100 és a HDL-hez kapcsolódó apolipoprotein A1 (ApoA1) főként az alacsony sűrűségű F1-4 frakciókban volt jelen, de az EV-dús frakciókban is kimutatható volt az Apo A1 kisebb mennyisége. A kis EV-kben gazdag F6-ban csak mérsékelt mennyiségű albumin jelet figyeltünk meg, az albumin jel nagyobb hányada az alacsonyabb sűrűségű F1-5 frakciókban volt kimutatható. A lipoprotein és az albumin EV-kből történő hatékony elválasztása ellenére az F6 fibrinogén béta-lánc (FGB) tartalma jelentős volt.

Az EV-gazdag DGUC frakciók finomtisztítására megvizsgáltuk a BE-SEC alkalmazhatóságát HiScreen Capto Core 700 oszlopokkal. Az Alix, Tsg101 és CD81 jelek többsége az EF6-9 frakciókban volt megtalálható. Az albumin és az Apo B100 az EF1-12 frakciókban a kimutatási határ alatt volt, az FGB azonban az EF2-EF6 EV-tartalmú frakciókban kimutatható volt. A BE-SEC tehát hatékony módszernek bizonyult a legtöbb fehérje szennyeződés eltávolítására az EV-ben gazdag DGUC mintákból. Az oszlopon megkötött, majd lemosott CIP frakciók nagy mennyiségű albumint és FGB-t tartalmaztak, de az EV markerek is kimutathatók voltak, ami azt jelzi, hogy az oszlop jelentős mennyiségű EV-t is visszatartott.

Összefoglalva, egy olyan módszert írtunk le vérplazmából származó kis EV-k izolálására, amely a jodixanol DGUC-n, és az azt követő BE-SEC-en alapul. Az itt ismertetett módszerrel nagyobb mennyiségben nyerhetők EV-k, mint a korábban leírt izolálási technikákkal, mint például az UC és a SEC, mindezt jelentős lipoprotein- és albuminszennyezés nélkül. Ugyanakkor ebben a közleményben arról is beszámoltunk, hogy a fibrinogén jelentős szennyeződés lehet a vérplazmából származó EV-izolátumokban.

3.3.2. A hiperkoleszterinémia megváltoztatja a vérplazmából- és a kardiomiocitákból származó extracelluláris vezikulák metabolomját és proteomikai profilját

Megvizsgáltuk, hogy a HC étrend hogyan módosítja a keringő EV k és a plazma metabolitjait. Az azonosított koleszterinészterek össz mennyisége jelentősen megemelkedett a HC-csoportban annak ellenére, hogy a HC-diéta nem növelte az állatok testtömegét. Emellett több triacilglicerid (TG) plazmakoncentrációja megnövekedett, míg több glicerofosfolipid (GP) koncentrációja csökkent a

HC-diéta hatására. Számos foszfatidil-kolin (PC) mennyisége csökkent az EV kben, míg néhány közülük a plazmában ellentétes változást mutatott. Hasonlóképpen, a TG-szintek inverz változásának tendenciája volt megfigyelhető az EV és a plazma között. Az aminosavak, az aminosavakkal kapcsolatos metabolitok, a zsírsavak és a TG-k koncentrációjában nem volt korreláció a plazma és az EV k között. Ez az elemzés azt bizonyítja, hogy a HC differenciáltan modulálja az EV k és a plazma metabolitjait.

Annak megismerésére, hogy a HC megváltoztatja-e a CM-ek EV-termelését, megvizsgáltuk a HC-kezelés hatását az AC16 sejtek által szekretált EV-kre. A kezelés hatására a CM-ek lipidtartalma megnövekedett. mivel a koleszterin befolyásolja a plazmamembránok merevségét és rugalmasságát, AFM méréseket alkalmaztunk AC16-ből származó EV ken, hogy feltárjuk, hogy a CM EV k biofizikai tulajdonságai megváltoznak-e. A HC kezelés nem befolyásolta az AC16 EV k rugalmasságát. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a keringő EV-kkel ellentétben a HC nem befolyásolja a CM-ből származó EV k lipidösszetételét, vagy azok biofizikai tulajdonságait.

Annak feltárására, hogy a HC-kezelés hogyan befolyásolja a CM EV k lehetséges biológiai funkcióit, folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriával elemeztük a HC-kezelt AC16 sejtekből izolált EV k fehérjeösszetételét. Összesen 2137 génből származó 2156 fehérjét azonosítottunk. Ezeket a géneket összehasonlítottuk a Vesiclepedia adatbázisával. Összesen 1999 gén fedett át az adatbázissal, amelyek közül 84 volt az EV kben leggyakrabban azonosított 100 fehérje között. Összehasonlítottuk az EV k fehérjeösszetételét a kezelési csoportok között. Harminchárom fehérje mennyisége csökkent, míg 77 fehérje koncentrációja nőtt az EV kben HC kezelés hatására. A kisebb mennyiséget mutató fehérjék között számos hisztont és extracelluláris mátrix (ECM) vagy sejtadhézióhoz kapcsolódó fehérjét azonosítottunk (GO:0007155, FDR < 0,01; GO:0030198, FDR < 0,02; GO:0005925, FDR < 0,001). Szintén csökkent a szállításhoz szükséges többszörös endoszomális szortírozó komplexek (ESCRT) alkotóelemeinek (GO:0039702, FDR = 0,014) vagy a hozzájuk kapcsolódó fehérjéknek a mennyisége. Az a megállapításunk, hogy az ESCRT fehérjék mennyisége csökkent a HC EV kben, alátámasztja, hogy a HC-indukált EV-felszabadulás a CM-ekben a megemelkedett koleszterinszint, nem pedig egy fokozott ESCRT-függő EV-szekréciós útvonal eredménye lehet. Adataink arra is utalnak, hogy a CM EV k információt hordoznak donorsejtjeik metabolikus állapotáról, mivel a kation-független mannóz-6-foszfát receptor (IGF2R) mennyisége, amely a cukorbetegségben emelkedett, és a Prolow-density lipoprotein receptorral kapcsolatos fehérje 1 (LPR1) csökkent HC kezelés hatására az AC16 sejtekből kibocsátott EV-kben.

Mivel az EV-k szerepet játszanak a gyulladásban és a CM EV-k módosítják az immunsejteket a különböző betegségekben, a CM EV-k potenciális gyulladásmoduláló hatásának vizsgálatát tűztük ki célul. Sem a kontroll, sem a HC EV-k nem növelték a THP1-ASC-GFP sejtek aktivációját jelző GFP-expressziót. Továbbá sem a pro-inflammatorikus faktorok, mint az Interleukin 1 béta (IL-1 β), a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α), sem a gyulladásgátló faktor Interleukin 10 (IL-10) génexpressziója nem változott HC EV kezelés hatására. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy sem a kontroll, sem a HC kezelt CM-ek nem bocsátanak ki olyan EV-ket, amelyek monocitákat aktiválnak.

Összefoglalva, ebben a közleményben az adataink azt mutatták, hogy a HC-kezelés jelentősen befolyásolja a CM EV-k felszabadulását és proteomikai összetételét. Az RNS-asszociált fehérjékben való gazdagodás arra utal, hogy az EV-k RNS-rakománya is módosulhat. Ugyanakkor nem azonosítottunk olyan specifikus sejtes szignalizációs útvonalat, amely közvetlenül kapcsolódna a HC által kiváltott kardiomiopátiákhoz. Valamint a megváltozott összetételű és mennyiségű CM EV-k nem járulnak hozzá a hiperkoleszterinémiában megfigyelhető gyulladáshoz.

3.3.3. Az extracelluláris vezikulák részt vesznek a távoli iszkémiás preconditionálás által kiváltott kardioprotekció közvetítésében

Annak vizsgálatára, hogy az EV-k részt vesznek-e az iszkémiás kondicionálás kardioprotektív stimulusának átvitelében, izolált szívmodellt alkalmaztunk, ahol a neurális hatások értelemszerűen nem érvényesülhetnek. A PRE szívekből származó perfuzátumok több EV-t tartalmaztak, mint a kontroll szívekből (CON) származók, amint azt a HSP60 Western blot bizonyította. Így megerősítettük, hogy az iszkémiás kondicionálás növeli az EV-k felszabadulását a szívből. Annak bizonyítására, hogy a szív által kibocsátott EV-k nem csak az iszkémiás inzultus következményei, hanem a kardioprotektív jelátvitel hordozói vagy effektorai, eltávolítottuk az EV-ket a perfuzátumokból, mielőtt beadtuk volna a nem kondicionált naiv szíveknek. A PRE szívekből gyűjtött perfuzátummal perfundált szívekben az infarktus mérete szignifikánsan kisebb volt, mint a CON szívekből származó perfuzátummal perfundált szívekben. Ha azonban a PRE szívekből nyert, EV-kben szegényített perfuzátumot adtuk a recipiens szíveknek, az infarktus mérete 30 perces iszkémia és 2 órás reperfúzió után nem különbözött jelentősen a CON perfuzátummal kezelt szívekben megfigyelt infarktus mértékétől.

Ebben a közleményben mutattuk ki először az irodalomban, hogy az EV-k felelősek a távoli kondicionálás továbbításáért, bizonyítva a kardioprotektív jelek továbbításának új, vezikuláris mechanizmusát. Ez magyarázatot adhat a

távoli kondicionálás feltételezett humorális és/vagy felszabadult neuronális faktorainak továbbítására.

3.3.4. A kalcium-ionofór hatására felszabaduló extracelluláris vezikulák a hem-oxigenáz 1 indukciójával közvetítik a citoprotekciót a szimulált iszkémia/reperfúziós sérüléssel ellen

Annak érdekében, hogy olyan EV készítményt kapjunk, amely reprodukálható kardioprotekciót válthat ki egy olyan rendszerből, amely alkalmas a méretnövelésre, megvizsgáltuk a HEK293 sejtek kalcium-ionofór kezelését. Az A23187-kezelés után HEK293 sejtekből felszabaduló részecskék (a továbbiakban stresszEV-k) között voltak mEV-k és nagy EV-k (100-1000 nm átmérőjűek), valamint egy 100 nm-nél kisebb átmérőjű populáció (kis EV-k).

Ezután megvizsgáltuk, hogy a stresszEV készítményeinkkel képesek vagyunk-e kardioprotekciót indukálni. Mivel a TLR-4 indukciója EV-k által korábban bizonyítottan kardioprotekciót váltott ki, megvizsgáltuk a stressz-EV-k hatását a TLR4 aktiválását jelző azon gének mRNS-expressziójára, amelyek a sejtek túlélési programjait indíthatják el a H9c2 sejtekben. A stresszEV indukálta a *Tnfa* és az *iNOS* mRNS expresszióját. A sejtek előinkubálása a TLR4-inhibitor TAK-242-vel csökkentette a *Tnfa* és az *iNOS* expresszióját a stresszEV stimuláció után. Másrészt a citoprotektív gének, a *Hmox1* (HO-1) és a *Txnrd1* (TR1) mRNS-expressziója emelkedett a stresszEV kezelt csoportokban a kontrollhoz képest, de a TLR4 ligand LPS nem indukálta ezek expresszióját. Ez arra utal, hogy a stresszEV-k a TLR4-től eltérő jelátviteli mechanizmusokon keresztül befolyásolhatják a citoprotektív útvonalakat a H9c2 sejtekben.

Mivel a HO-1 fokozott expresszióját figyeltük meg, arra voltunk kíváncsiak, hogy a stresszEV-k közvetítik-e a citoprotekciót a HO-1-en keresztül. A stresszEV-k által okozott citoprotekciót csökkentette a HO-1 gátlása a H9c2 sejtek HO-1 inhibitor ZnPP IX-el történő együttes kezelésével. Ez azt jelzi, hogy az EV-k citoprotektív hatása a HO-1-en keresztül közvetített, és az a TLR4 jelátviteltől független mechanizmusokon keresztül érvényesül a H9c2 sejtekben. Hasonló eredményeket kaptunk AC16 humán sejtekben is.

Összefoglalva, ebben a tanulmányban mutattuk be először, hogy a kalcium-ionofórral indukált sejtekből felszabaduló EV-k felhasználhatók a szívizomsejtekben szimulált IRI elleni kezelési lehetőségként, és hogy ennek a citoprotektív jelnek a kulcsmechanizmusa az antioxidáns útvonalak, például a HO-1 és a TR1 indukciója. Ezen eredmények alapján úgy véljük, hogy a kalcium-ionofór által kiváltott stresszEV-k új utakat tárhatnak fel az iszkémiás szívbetegségek, például az MI elleni kardioprotektív kezelések fejlesztésében.

3.3.5. A hélium kondicionálás fokozza a szív fibroblasztok migrációját, ami nem vihető át oldható faktorokon vagy extracelluláris vezikulák segítségével

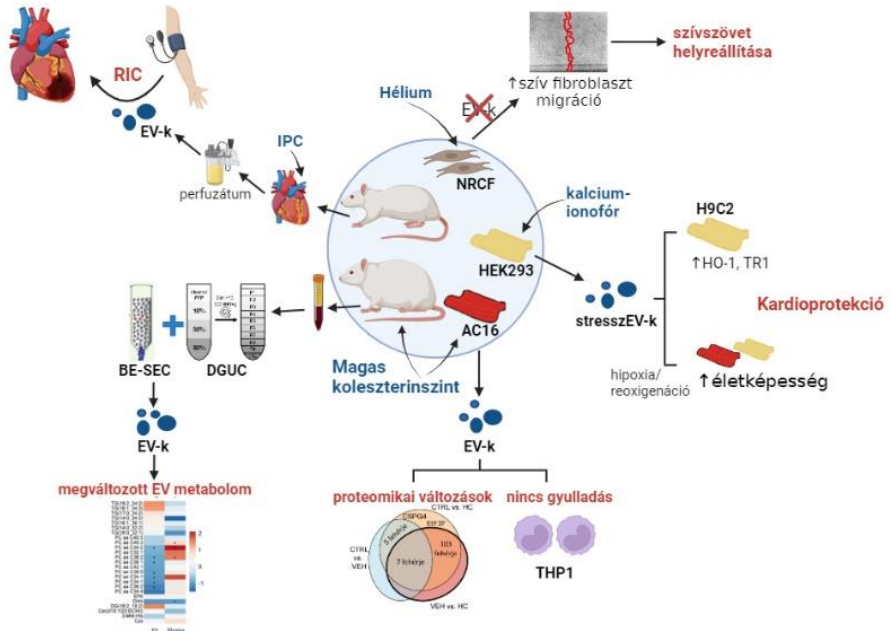
A HeC NRCF-ekre gyakorolt lehetséges hatásainak vizsgálatához megmértük a kondicionálást követő migrációjukat. Azt találtuk, hogy a HeC 8 órán belül jelentősen megnövelte az NRCF-ek migrációját (72. ábra A). Ez a hatás azonban 24 óránál már nem volt szignifikáns, ami arra utal, hogy a HeC-ek átmenetileg felgyorsítják az NRCF-ek migrációját. Ezután azt elemeztük, hogy a fokozott sejtmigráció összefügg-e a fibroblasztok aktiválásával. Megvizsgáltuk a simaizom alfa-aktin (α -SMA) és az 1-es típusú alfa-2 kollagénnel (Col1 α 2) mint a miofibroblasztokban leggyakrabban indukálódó gének, valamint a fibroblaszt aktivációs fehérje (FAP) mRNS-expresszióját. A transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) mennyiségét szintén elemeztük a fibroblasztok aktiválódásának vizsgálatára, valamint az IL1 β és az IL6 szintjeit, amik a gyulladás markerei. Azt találtuk, hogy az elemzett gének egyikét sem módosította a HeC (72. ábra B), ami arra utal, hogy a HeC nem indukálja az NRCF-ek aktiválódását, miofibroblaszt transzformációját vagy gyulladást elősegítő folyamatait.

Megvizsgáltuk, hogy a HeC hogyan befolyásolja az NRCF-ek felülúszójából történő mEV-szekréción. A teljes részecskekoncentráció elemzésével kimutattuk, hogy a HeC legtöbb esetben csökkenti az NRCF-ek mEV-szekréción, miközben a modális részecskeméret változatlan maradt.

Mivel az EV-k és más oldható anyagok fontos közvetítői lehetnek az MI-re adott intercelluláris válasznak, megvizsgáltuk, hogy a HeC-kezelt NRCF-ek befolyásolják-e a szöveti átépülést a fibroblasztok vagy az EC-k aktiválásán keresztül. Ezért kontroll és HeC-kezelt NRCF-ek felülúszóját naiv NRCF-ekre vagy HUVEC-TERT2 sejtekre helyeztük. A sejtek migrációja nem változott a kezelést követően, ami azt jelzi, hogy az NRCF-ek HeC által indukált migrációját az EV-k vagy más, HeC hatására felszabaduló oldható faktor nem közvetíti. Hasonlóképpen, a HeC- kezelt NRCF-ek felülúszója nem befolyásolta a HUVEC-TERT2 in vitro csőképződését sem, ami tovább erősíti, hogy várakozásaink ellenére a HeC nem indukálta a sejtmigrációt elősegítő faktorok felszabadulását az NRCF-ekből.

Összefoglalva, ebben a vizsgálatban bemutattuk, hogy a HeC fokozza a fibroblasztok migrációját, ami hozzájárulhat a szívszövet helyreállításában betöltött jótékony szerepéhez. Ez a hatás azonban nem volt átvihető távoli sejtekre a felszabaduló EV-ekkel vagy más, oldható faktorok által. Bár ezek az eredmények a HeC sejtszintű mechanizmusait és potenciális előnyeit mutatják az MI utáni szöveti helyreállításban, további vizsgálatokra van szükség a HeC transzlációs potenciáljának értékeléséhez. Továbbá adataink azt mutatták,

hogy az EV-k szelektíven továbbítják a sejtek állapotát, mivel a kondicionált donorsejtekben indukált kardioprotektív mechanizmusok nem terjedtek át a naiv célsejtekre. Így ez a tanulmány egyike azon keveseknek, amelyek reális képet rajzolnak az EV-k mint terápiás eszközök lehetőségeiről és korlátairól a kardiovaszkuláris gyógyászatban.

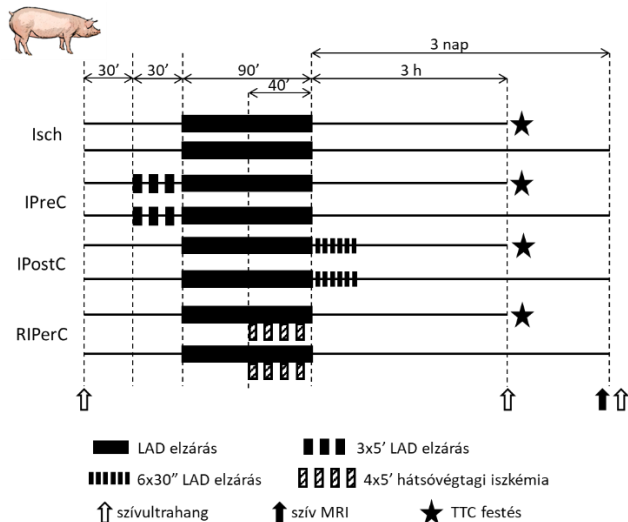


Az EV kutatások eredményeinek összefoglalása

4. Főbb módszerek

4.1. Nagyállatmodellek

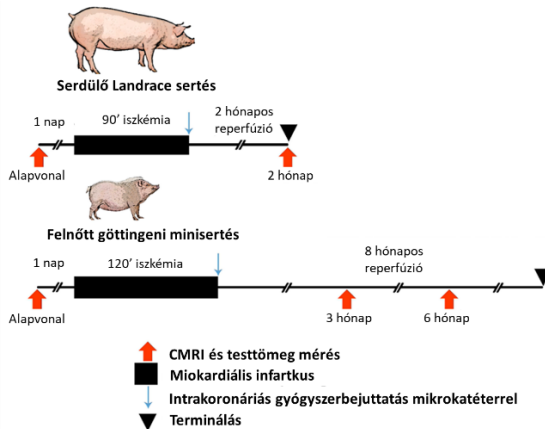
Az IRI translációs modelljeiben a kardioprotektív beavatkozások hatékonyságát nőstény házisertésekben vizsgáltuk. A sertéseket négy csoportba osztottuk: Isch, IPreC, IPostC, és RIPerC. A sertéseket 250 mg acetil-szalicilsav és 300 mg klopido­gre­l töltődózisával előkezeltük, napi 100 mg, illetve napi 75 mg fenntartó dózisokkal. Az állatokat ketaminnal, xilazinnal és atropinnal szedáltuk. Az állatokat intubáltuk, és az anesztéziát izoflurán oxigénkeverék inhalálásával tartottuk fenn. Ballonkatétert helyeztünk el az LAD 2. diagonális ágának eredése utánra, amit 90 percig 5 atmoszférával felfújtunk, majd leeresztettük, ami reperfúziót eredményezett (3 óra vagy 3 nap). Az IPreC csoportban a bal leszálló koronária artériát (LAD-ot) 3x5 percre elzártuk, amit 5 perces reperfúzió követett. A RIC-et 4 ciklusban, 5 perces elzárással és 5 perces reperfúzióval végeztük a combhajlati ereken, a jobb hátsó végtag körüli hurok meghúzásával és elengedésével, a LAD elzárásának 50. percétől kezdve.



Kísérleti elrendezés a kardioprotektív intervenciók hatásosságának összehasonlítására Landrace sertésekben.

Az IRI translációs modelljei közötti különbségek tanulmányozására ivarérett nőstény göttingeni minisertést Landrace sertést használtunk. Egy nappal a műtéti beavatkozás előtt 500 mg acetil-szalicilsavat és 300 mg klopido­gre­l adtunk be, és elvégeztük a kiindulási szív MRI vizsgálatot. Az eljárás során 30

percenként magnézium-szulfátot adtunk a kamrai tachycardia és kamrafibrilláció megelőzésére. A bal fő koszorúér és a BARI (Bypass Angioplasty Revascularization Investigation Myocardial Jeopardy Index) pontozását végeztük el. A LAD-on történő elzárás helyét úgy választottuk ki, hogy körülbelül 25-30%-os miokardium-terület kerüljön a rizikózónába. Egy ballonkatétert vezetünk be a LAD-ba, amit felfújtunk. A reperfúziót göttingeni minisértésekben 120 perc szívizskémia után, Landrace sertésekben 90 perc után a indítottuk el. Az állatokat a 2-8 hónapos időszakban megfigyeltük. A MI-utáni HF kialakulását szív MRI és biokémiai mérésekkel követtük.



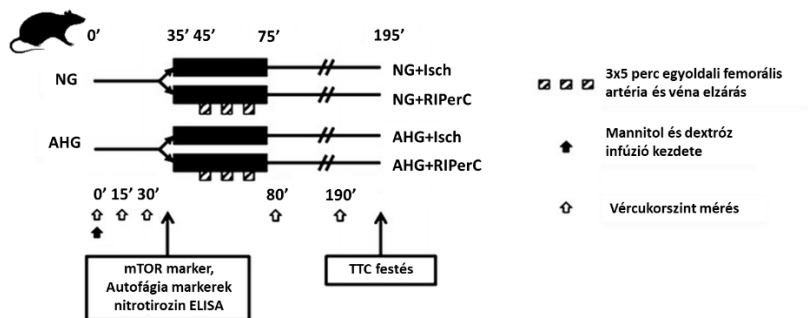
A szívinfarktus utáni szívelégtelenség kísérleti protokollja Landrace sertésekben és göttingeni minisértésekben

4.2. Kisállatmodellek

A hiperkoleszterinémia tanulmányozására hím Wistar patkányokat 12 héten át kontroll- (NORM) vagy 2% koleszterinnel és 0,25% kólsavval dúsított takarmányt (CHOL) kaptak. Az állatok altatását követően a szíveket kimetszettük és lefagyasztottuk, majd elvégeztük a biokémiai méréseket.

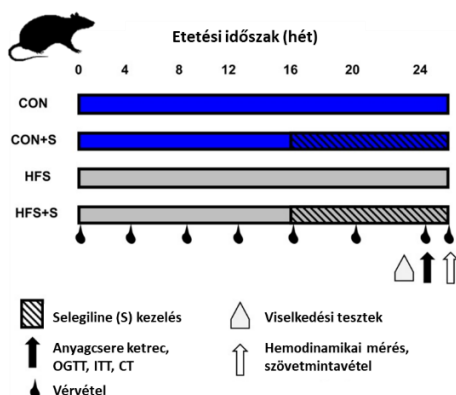
Az AHG kardioprotektív hatásának vizsgálatához hím Wistar patkányokat altattunk és lélegeztettünk. Az AHG állatok 50 %-os dextróz infúziót kaptak, hogy a vércukorszint 15 és 20 mM között legyen. Az NG állatoknak 46 %-os mannitolat adtunk. A 35 perces perfúzió után az NG és az AHG csoportok állatainak felét feláldoztuk, a szíveket kimetszettük és szíveket lefagyasztottuk. Az állatok másik felét a következő csoportokba soroltuk: kontroll iszkémiás normoglikémiával (NG + Isch), távoli iszkémiás perkondicionált NG-vel (NG + RPerC), iszkémiás AHG-vel (AHG + Isch) és távoli iszkémiás perkondicionált AHG-vel (AHG + RPerC). A thoracotómia után a bal első leszálló koszorúeret (LAD) 40 percre elzártuk. A RPerC-et a jobb

combhajlati erek 3 ciklusban történő 5 perces elzárásával és 5 perces reperfúziójával idéztük elő, a LAD elzárásának 10 percétől. A 40 perces index-
iszkémiás időszak végén a varrat meglazításával reperfúziót indítottunk el. A 120 perces reperfúzió végén a szíveket az infarktus méretének értékeléséhez
kimetsztük és Evans-kékkel perfundáltuk, majd szeletekre vágva TTC
festésnek vetettük alá.

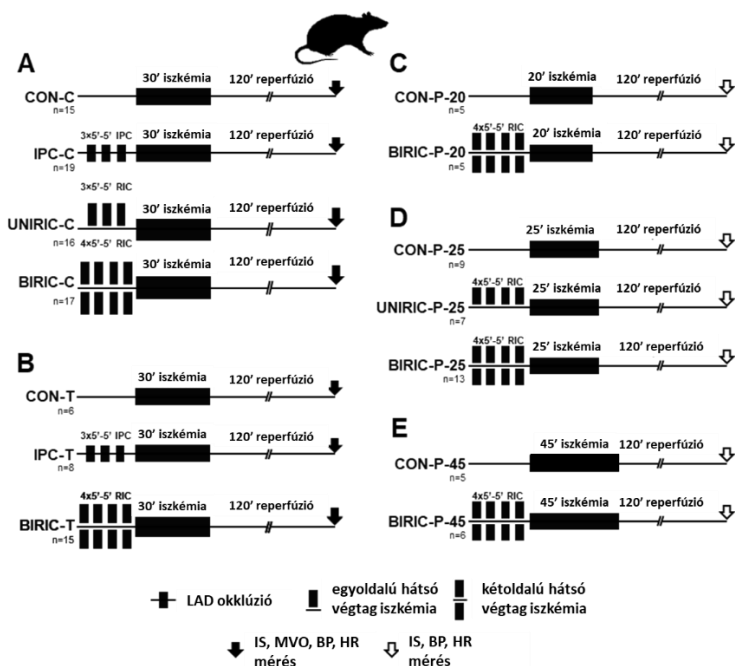


Kísérleti protokoll az akut hiperglikémia kardioprotekcióra kifejtett hatásainak vizsgálatára.

A MAO-B gátlás elhízásra gyakorolt hatásának vizsgálatához hím Long-Evans patkányokat használtunk. A patkányokat kontroll (CON) és magas zsír- és szukróztartalmú csoportra osztottuk (HFS). A HFS csoport 20% zsírral és 15% szacharózzal kiegészített takarmányt kapott. A 16. héttől kezdve naponta egyszer 0,25 mg/kg szelegilin (CON+S és HFS+S) vagy vivőanyag (CON, HFS) szubkután injekcióját kapták. Az állatok élettani értékeit megmértük, majd szöveteket izoláltunk a biokémiai mérésekhez.



Kísérleti elrendezés a szelegilin elhízásra gyakorolt hatásainak vizsgálatára



A szívizom iszkémia/reperfúziós sérülésének kísérleti protokolljai és különböző iszkémiás kondicionálási módszerek patkányokon.

4.3. Sejtkultúrák

A HEK293 és HEK293T sejteket, H9c2 patkány kardiomioblaszt sejteket és AC16 humán szívsejteket tenyésztettük. A hiperkoleszterinémiás kezeléshez az AC-16 sejteket Refeed®1-kiegészítővel vagy annak vivőanyagával kiegészített tápfolyadékban tartottuk 48 órán keresztül. Az újszülöttkori patkányszív fibroblasztokat (NRCF) 1-3 napos hím Wistar patkányok szívéből izoláltuk. Immortalizált humán köldökvénás endotélsejteket (HUVEC-TERT2), valamint zöld fluoreszcens fehérjével fuzionált CARD-domént tartalmazó, apoptózissal asszociált foltszerű fehérjét (ASC-GFP) expresszáló THP1 humán monocitákat tenyésztettünk az EV-k hatásainak vizsgálata céljára.

4.4. Az extracelluláris vezikulák izolációja és vizsgálata céljára használt főbb módszerek

Az NRCF- vagy AC16-sejtek felülréséből a közepes méretű EV-eket (mEV-eket) differenciális centrifugálással izoláltuk. A pelleteteket újra szuszpendáltuk PBS-ben a Western-blot, az áramlási citometria és a dinamikus fényszórás (DLS),

illetve a nanorészecske-követéses elemzés (NTA) céljából. Az AC16 felülszókat mEV-k kinyerése után 174 900×g-vell 4°C-on 3 órán át ultracentrifugáltuk. A pelleteket reszuszpendáltuk az atomerő-mikroszkópiához (AFM).

HEK293 sejteket A23187 kalcium ionofórral stimuláltuk, majd a stresszEV-ket 1 órás stimuláció után gyűjtöttük ultracentrifugálással. A H9c2 sejteket 6 vagy 8 órás stresszEVs-stimuláció előtt 1 órán át előinkubáltuk TAK-242-vel. A sejteket Western-blothoz lizáltuk. A HEK293T sejteket a pFlag-CMV-hTLR4, pDUO-hMD-2/hCD14, valamint a pELAM1-luciferáz (Nf-κB promóter) és a phRL-TK Renilla luciferáz expressziós plazmidjaival transzfektáltuk, majd 24 órán keresztül stresszEV-kkel stimuláltuk. A sejteket lizáltuk és a luciferáz-aktivitást kettős luciferáz-teszt segítségével elemeztük. A sejtek életképességét AC16 sejteken CytoTox-Glo teszttel is megvizsgáltuk. Az AC16 és H9c2 sejteket 4 órán keresztül stresszEV-kkel stimuláltuk, és elemeztük a kaszpáz 3/7 aktivitást.

A si/R vagy stresszEV kezelés hatására bekövetkező nekrotikus sejthalált H9c2 kardiomioblasztok felülszójából vizsgáltuk. A sejteket 1 órán keresztül TAK-242-vel vagy cink-protoporfirin IX-cel (ZnPP IX) előkezeltük, majd 6 órán keresztül stresszEV-vel stimuláltuk normál O₂ koncentráció mellett. Ezután a sejtcsoportokban a növekedési tápfolyadékot 16 órán keresztül normoxiás oldattal vagy hipoxiás oldattal helyettesítettük a fentiek szerint. A 16 órás normoxiás vagy si/R körülményeket követően a sejteket normál O₂ koncentrációban tartottuk növekedési tápfolyadékban. A sejtek felülszójából elemeztük az LDH-aktivitást. A sejtek életképességét kalcein festéssel végeztük.

A héliumos kondicionáláshoz NRCF-eket használtunk, amelyeket 95% hélium + 5% CO₂ gázkeverékkel töltött műanyag zsákokba helyeztünk, majd ötször cseréltük a gázt, hogy az összes oxigént kiűzzük. A flaskákat 1 órára 37 °C-os inkubátorba helyeztük, majd 1 órára visszahelyeztük normál növekedési körülmények közé. Ezt 4 alkalommal megismételtük, majd 40 órán át normál növekedési körülmények között hagytuk a sejteket. Az NRCF felülszót HUVEC-TERT2 sejteken angiogenezis, vagy NRCF-eken migráció vizsgálatához használtuk.

A monociták aktivációjának vizsgálatához THP1-ASC-GFP sejteket 10⁷ -10⁹ részecske/ml HC-EV, CON-EV, vagy VEH-EV-vel, a megfelelő EV felülszókkal vagy az AC16 sejtek teljes médiumával kezeltük egy éjszakán át. A sejteket PFA-val fixáltuk, majd áramlási citometriát végeztünk. A THP1-ASC-GFP sejteket először az SSC és az FSC alapján az élő sejtekre, majd a GFP⁺ populáció alapján osztottuk csoportokra.

Hím Wistar patkányok hasi aortájából, valamint négy önkéntes ember vénájából antikoaguláns citrát-dextróz-A tartalmú csőbe vérmintát gyűjtöttünk. A sejtes összetevőket 2500×g-n végzett centrifugálással távolítottuk el. A felülúszót (azaz a vérlemezke-mentes plazmát, PFP) ezután 18 000×g-vel centrifugáltuk (tisztított PFP). A felülúszót 0,22 µm-es szűrőkön keresztül szűrtük (előtisztított plazma). A kis EV-ket UC-vel 2 alkalommal 120 000×g-on pelletáltuk.

A kardioprotekció vizsgálatához az EV-ket szűréssel és differenciális centrifugálással izoláltuk az összegyűjtött perfuzátumokból. A pelleteket kis EV-gazdag pelletként, a felülúszót pedig EV-mentes PERF-ként őriztük meg.

A PFP-mintát különböző mátrixú (Sephacryl 2B, CL-4B vagy Sephacryl S-400), 10 vagy 120 ml ágytérfogató oszlopokra töltöttük, és a frakciókat gyűjtöttük. A TEM-hez a frakciókat centrifugaszűrőkön koncentráltuk.

A denzitás-ultracentrifugáláshoz (DGUC) az Optiprepet 30%-ra és 10%-ra hígítottuk 0,25M szacharóz pufferben, és egy diszkontinuus gradienst alakítottunk ki. A PFP-t ezután ezekre a gradiensekre rétegeztük. Ezt követően a mintákat 24 órán keresztül 120 000×g-vel centrifugáltuk. A frakciókat összegyűjtöttük (F1-F10). A stresszEV-k centrifugálását 40%, 20%, 10% és 5% jodixanol gradienseken végeztük. A kisméretű DGUC EV-gazdag frakcióját 5 ml-re hígítottuk, majd ultracentrifugáltuk.

A bind-elute méretkizárásos kromatográfiához az EV-gazdag DGUC frakciókat HiScreen Capto Core 700 oszlopra töltöttük és PBS-sel eluáltuk (EF1-12), majd az oszlopot 0,1M NaOH-dal mostuk 30%-os 2-propanolban, ahol a clean-in-place frakciókat gyűjtöttük (CIP1-20).

Az atomerő-mikroszkópos felvételekhez az EV-mintákat frissen hasított csillámfelületre helyeztünk, és 30 percig inkubáltuk. Ezeket Cypher ES atomerő-mikroszkóppal vizsgáltuk. A felvételeket érintésmentes üzemmódban, pufferben készítettük. Ezután kontakt üzemmódú mérést végeztünk in situ erőspektroszkópia céljából vezikulákon, amelyek magassága meghaladta a 15 nm-t. Az erőter-spektroszkópia során a tűt egy előre beállított magasságból a vezikula felé mozgattuk amíg a 100 pN-os terhelési küszöbértéket el nem értük, majd visszahúztuk.

Az AC16 EV izolátumok proteomikai mérését az UCD Conway Intézet tömegspektrometriás központi laboratóriumában végeztük. A mintákat 6 M karbamidban oldottuk fel, valamint ditiotreitól hozzáadásával redukáltuk. A mintákat jodoacetamid hozzáadásával karboxiláltuk, ezután egy éjszakán át tripszinnel emésztettük. A mintákat Empore™ szilárd fázisú extrakciós membránokon tisztítottuk, majd minden mintát egy Evosep tipre töltöttünk. Az automatikus mintavevő eluálta a szétválasztott peptideket. A

tömegspektrométert pozitív ion üzemmódban üzemeltettük. Az összes adatot a műszer csapdázott ionmobilitás-spektrometriás üzemmódban működő készülékkel szereztük. A csapdába esett ionok kiválasztása ms/ms-re történt párhuzamos akkumulációs soros fragmentáció alkalmazásával. A nyers adatokat az Uniprot Swissprot adatbázis Homo sapiens alcsoportjában kerestük a Maxquant keresőmotorral. Az intenzitásokat a Perseus program segítségével elemeztük. Az eredmények értékeléséhez és a génontológiai dúsulás elemzéséhez a STRING szoftvert használtuk.

5. Új megállapítások

Kardioprotektív beavatkozások és modelljeik fejlesztése területén:

- A RIPC nem csökkenti az infarktusterületet IRI patkánymodelljében, függetlenül a kísérleti beállításoktól, ami ellentmond az irodalomnak
- Landrace sertésekkel összehasonlítva az IRI Göttingeni minisértésmodellje alkalmasabb az MI utáni HF hosszútávú utánkövetésére
- az IPostC és a RIPerC kardioprotektív hatása az AMI zárt mellkasú sertésmodelljében az ödéma csökkentésével jön létre, míg az IPreC a nekrozist csökkenti.

A CMD-k hatásainak és mechanizmusainak vizsgálata a kardioprotekcióban:

- a hiperkoleszterinémia a szívben leszabályozza az autofágiát és az mTOR útvonalat, valamint serkenti az apoptózist
- prediabetészes állapotban a MAO-B gátló szelegilin csökkenti a fokozott zsírlerakódást és a zsírszöveti gyulladást
- az akut hiperglikémia megszünteti a RIPerC által kiváltott kardioprotekciót.

Az EV-k szerepe a CMD-kben és a kardioprotektív eljárásokban

- vérplazmából nagy tisztaságú EV-k izolálására alkalmas, DGUC és BE-SEC-alapú módszert fejlesztettünk ki
- a hiperkoleszterinémia modulálja az EV-k metabolomját, de nem indukál gyulladást serkentő jeleket a szívből származó EV-kben
- az iszkémiás kondicionálás indukálja az EV-k felszabadulását a szívből, amik szükségesek a RIPC által kiváltott kardioprotekcióhoz,
- a kalcium-ionofór kezelés után felszabaduló stressz-EV-k kardioprotekciót indukálnak a hem-oxigenáz indukciója révén
- a héliumos kondicionálás nem indukálja a kardioprotektív EV-k felszabadulását szív eredetű fibroblasztokból, de elősegíti a fibroblasztok migrációját.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném kifejezni hálámat szüleimnek és családomnak, akik lehetőséget és szárnyakat adtak a terveim megvalósításához, elviselnek és megbocsátják, hogy ennyi időt töltök a másik szerelmemmel, a kutatással.

Külön köszönettel tartozom mentoromnak Ferdinandy Péter professzor úrnak, aki még egyetemi hallgató koromban kutatócsoportjába fogadott, szakmai igényességre tanított, valamint tanácsaival irányt mutatott bukdácsolásaim során és mindenben támogatta tudományos tevékenységemet, szakmai pályafutásomat.

Köszönöm külföldi mentoraimnak Afshin Samali és Roberta Gottlieb professzoroknak a közös felfedezések élményét, hogy hozzájárultak a szakmai horizontom nagymérvű tágításához.

Külön köszönettel tartozom Buzás Edit professzor asszonynak az inspirációért, együttműködésért és folyamatos támogatásért az extracelluláris vezikula kutatások területén.

A kutatás természetesen nem magányos hivatás, minden eredmény csapatmunka. Hálával tartozom kutatócsoportunk valamennyi volt és jelenlegi tagjának, a kaposvári nagyállatos vizsgálatokban résztvevő munkatársaknak, valamint a TDK és PhD hallgatóimnak az évek során végzett munkájukért és az együtt töltött rengeteg időért. Külön köszönöm rendkívül tehetséges munkatársaimnak Baranyai Tamásnak és Onódi Zsófiának, hogy rendkívül értékes kutatómunkát végezhattünk együtt.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet valamennyi munkatársának, akikkel volt szerencsém együtt dolgozni az elmúlt 12 évben a sok gondolatindító és kritikus szakmai vitát, valamint hogy mindvégig támogatták munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani valamennyi hazai és nemzetközi együttműködő partnerünknek is.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom a kutatásainkat pályázatok útján támogató szervezeteknek, első sorban a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak, a Magyar Tudományos Akadémiának, és a Semmelweis Egyetemnek.

7. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Sayour, NV; Brenner, GB; Makkos, A; Kiss, B; Kovácsné, C; Gergely, TG; Aukrust, SG; Tian, H; Zenkl, V; Gömöri, K; Szabados Tamara, Bencsik, P; Heinen, A; Schulz, R; Baxter, GF; Zuurbier, CJ; Vokó, Z; Ferdinandy, P; **Giricz, Z.** Cardioprotective efficacy of limb remote ischaemic preconditioning in rats: discrepancy between a meta-analysis and a three-centre in vivo study. **CARDIOVASCULAR RESEARCH** 119 : 6 pp. 1336-1351. , 16 p. (2023)

Független idézetek száma: 5; SJR indikátor: D1 impakt faktor: 14,4

2. Brenner, GB; **Giricz, Z;** Garamvölgyi, R; Makkos, A; Onódi, Z; Sayour, NV; Gergely, TG; Baranyai, T; Petneházy, Ö; Kőrösi, D; Szabó Gergő P., Vago, H; Dohy, Z; Czibalmos, C; Merkely, B; Boldin-Adamsky, S; Feinstein, E; Horváth, IG; Ferdinandy, P. Post-Myocardial Infarction Heart Failure in Closed-chest Coronary Occlusion/Reperfusion Model in Göttingen Minipigs and Landrace Pigs. **JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS** 2021 : 170 Paper: e61901 , 25 p. (2021)

Független idézetek száma: 8; SJR indikátor: Q2; impakt faktor: 1, 4

3. Baranyai, T; **Giricz, Z;** Varga, ZV; Koncsos, G; Lukovic, D; Makkos, A; Sarkozy, M; Pavo, N; Jakab, A; Czibalmos, C; Vago, H; Ruzsa, Z; Toth, L; Garamvölgyi, R; Merkely, B; Schulz, R; Gyongyosi, M; 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. **JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE** 15 : 1 Paper: 67 , 13 p. (2017)

Független idézetek száma: 16; SJR indikátor: D1; impakt faktor: 3,7

4. **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. **LIPIIDS IN HEALTH AND DISEASE** 16 : 1 Paper: 60 , 8 p. (2017)

Független idézetek száma: 19; SJR indikátor: Q2; impakt faktor: 2,0

5. Nagy, CT; Koncsos, G; Varga, ZV; Baranyai, T; Tuza, S; Kassai, F; Ernyey, AJ; Gyertyan, I; Kiraly, K; Oláh, A; Radovits, T; Merkely, B; Bukosza, N; Szenasi, G; Hamar, P; Mathe, D; Szigeti, K; Pelyhe, C; Jelemensky, M; Onodi, 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** 175 : 18 pp. 3713-3726. , 14 p. (2018)

Független idézetek száma: 13; SJR indikátor: D1; impakt faktor: 6,8

6. 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)

Független idézetek száma: 59; SJR indikátor: Q1; impakt faktor: 4,0

7. Baranyai, T; Herczeg, K; Onodi, Z; Voszka, I; Modos, K; Marton, N; Nagy, G; Mager, I; Wood, MJ; El Andaloussi, S; Palinkas, Z; Kumar, V; Nagy, P; Kittel, A; Buzás, El; Ferdinandy, P; **Giricz Z.** Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. **PLOS ONE** 10 : 12 Paper: e0145686 , 13 p. (2015)

Független idézetek száma: 504; SJR indikátor: Q1; impakt faktor: 3,2

8. Onódi, Z; Pelyhe, C; Nagy, CT; Brenner, GB; Almás, L; Kittel, Á; Manček-Keber, M; Ferdinandy, P; Buzás, El; **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** 9 Paper: 1479 , 11 p. (2018)

Független idézetek száma: 148; SJR indikátor: Q2; impakt faktor: 3,3

9. Kovácsházi, C; Hambalkó, S; Sayour, NV; Gergely, TG; Brenner, GB; Pelyhe, C; Kapui, D; Weber, BY; Hültenschmidt, AL; Pállinger, É; Buzás, El; Zolcsák, Á; Kiss, B; Bozó, T; Csányi, C; Kósa, N; Kellermayer, M; Farkas, R; Karvaly, GB; Wynne, K; Matallanas, D; Ferdinandy, P; **Giricz, Z.** Effect of hypercholesterolemia on circulating and cardiomyocyte-derived extracellular vesicles. **SCIENTIFIC REPORTS** 14 : 1 Paper: 12016 , 14 p. (2024)

SJR indikátor: D1; impakt faktor: 3,8 (2023-as adat)

10. **Giricz, Z;** Varga, ZV; Baranyai, T; Sipos, P; Paloczi, K; Kittel, Á; Buzás, El; Ferdinandy, P. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. **JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY** 68 pp. 75-78. , 4 p. (2014)

Független idézetek száma: 218; SJR indikátor: D1; impakt faktor: 4,6

11. Pečan, P; Hambalkó, S; Ha, VT; Nagy, CT; Pelyhe, C; Lainšček, D; Kenyeres, B; Brenner, GB; Görbe, A; Kittel, Á; Barteková, M; Ferdinandy, P; Manček-Keber, M; **Giricz, Z.** Calcium Ionophore-Induced Extracellular Vesicles Mediate Cytoprotection against Simulated Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiomyocyte-Derived Cell Lines by Inducing Heme Oxygenase 1. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES** 21: 20 Paper: 7687 , 17 p. (2020)

Független idézetek száma: 5; SJR indikátor: D1; impakt faktor: 4,5

12. Jelemenský, M; Kovácsházi, C; Ferenczyová, K; Hofbauerová, M; Kiss, B; Pállinger, É; Kittel, Á; Sayour, VN; Görbe, A; Pelyhe, C; Hambalkó, S; Kindernay, L; Barančík, M; Ferdinandy, P; Barteková, M; **Giricz, Z.** Helium Conditioning Increases Cardiac Fibroblast Migration Which Effect Is Not Propagated via Soluble Factors or Extracellular Vesicles. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES** 22: 19 Paper: 10504 , 13 p. (2021)

Független idézetek száma: 3; SJR indikátor: D1; impakt faktor: 6,2

8. Tudománymetriai adatok az MTMT2 alapján

Giricz Zoltán tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása (2024.10.07)

MTA V. Orvosi Tudományok Osztálya

Tudományos közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk²	81			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		65	2396	2911
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		0	0	0
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		1	151	242
összefoglaló közlemény		15	1391	1748
rövid közlemény		0	0	0
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	2			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		2	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		2	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)		81	3938	4901
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	83		3938	4901

V. További tudományos művek	8			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságu folyóiratban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		3	0	4
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		4	14	19
Ötalmak (szabadalmak)		1	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok⁵	8		8	13
Összes hivatkozás¹			3960	4937
Hirsch index⁶	32			
g index⁶	70			

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	12	604
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	14	925
A tudományos fokozat (PhD 2006) elnyerése utáni teljes tudományos folyóiratcikkek száma	73	4121
Az utolsó 10 év (2014-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	64	3629
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	502	10,17%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		365
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	1	88

Megjegyzések:

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé