

Szívizomkárosodás molekuláris markereinek vizsgálata

36. OTDK Biológia Szekció

Dr. Bognárné Huszár Annamária

Biológus MSc, II. évfolyam

Molekuláris genetika, sejt- és fejlődésbiológia szakirány

Eötvös Loránd Tudományegyetem



Semmelweis Egyetem

Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Témavezető:

Dr. Hegyesi Hargita PhD

egyetemi docens

Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET

Budapest, 2022

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
2. BEVEZETÉS	5
2.1. Kardiokonkológia	6
2.2. A doxorubicin okozta kardiotoxicitás	7
2.3. DL-11, az alternatív doxorubicin	8
2.4. A makrofágok szerepe	8
2.5. Az extracelluláris vezikulák szerepe	9
3. CÉLKITŰZÉSEK	12
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
4.1. Az EV-transzfer bizonyítása: Kondicionált bitranszgénikus egérmodell	13
4.2. Kísérleti terv: doxorubicin és DL-11 kezelés	15
4.2.1. A szívizomsejtek kezelése: HL-1 kísérlet	16
4.2.2. Egér peritoneális makrofágok kezelése: M/I. és M/II. kísérlet	17
4.3. xCELLigence – impedimetriai mérések	18
4.4. Az EV-k izolálásának lépései	19
4.5. NTA, nanorészecske követő elemzés	20
4.6. RNS izolálás	21
4.7. cDNS szintézis és RT-qPCR	22
4.8. Nanostring mRNS panel vizsgálat	23
5. EREDMÉNYEK	24
5.1. A szívizomsejt eredetű EV-transzfer bizonyítása	24
5.1.1. A szívizomsejtek GFP+ EV-ket termelnek	24
5.1.2. A makrofágok EV-felvételének megfigyelése mikroszkópban	25
5.1.3. A makrofágok EV-felvételének megfigyelése áramlási citométerrel	25
5.2. Doxorubicin és DL-11 hatása a sejtsztódásra	26
5.3. RT-qPCR eredmények	27
5.3.1. Doxorubicin és DL-11 hatása a génexpresszióra HL-1sejtekben	27
5.3.2. Doxorubicin és DL-11 közvetlen hatása a makrofágokra	28
5.4. Kardiomiocita eredetű EV-k hatása a makrofágok RNS profiljára	29
5.4.1. Volcano plot: Dox	31
5.4.2. Volcano plot: DL-11	32
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	33
7. KÖVETKEZTETÉSEK	35
8. ÖSSZEFOGLALÁS	36
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	37
10. IRODALOM	38

1. Rövidítésjegyzék

28S	28S riboszomális RNS gén; <i>28S ribosomal RNA gene</i>
Arg-1	argináz 1; <i>arginase 1</i>
Cdkn1a	ciklin-dependens kináz inhibitor 1A; <i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNS	komplementer DNS; <i>complementary DNA</i>
Col2A1	II. típusú alfa-1 kollagén; <i>collagen type II alpha 1 chain</i>
DL-11	doxorubicin-származék; <i>doxorubicin derivative</i>
DNS	dezoxiribonukleinsav; <i>deoxyribonucleic acid</i>
Dox	doxorubicin; <i>doxorubicin</i>
EV	extracelluláris vezikula; <i>extracellular vesicle</i>
EVM	Extracelluláris Vezikula Munkacsoport; <i>Extracellular Vesicle Research Group</i>
FBS	foetális borjú szérum; <i>fetal bovine serum</i>
FosL1	FOS-szerű 1, AP-1 transzkripció faktor alegység; <i>FOS-like 1, AP-1 transcription factor subunit</i>
Fra-1	Fos-rokon antigén 1; <i>Fos-related antigen 1</i>
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz; <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GDF-15	növekedési és differenciálódás faktor-15; <i>growth/differentiation factor 15</i>
GFP	zöld fluoreszcens fehérje; <i>green fluorescent protein</i>
HL-1	AT-1 egérből származó szívizom sejtvonal; <i>cardiac muscle cell line from AT-1 mouse</i>
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid-szintáz; <i>inducible nitric oxide synthase</i>
ISEV	Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság; <i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
IEV	nagyméretű extracelluláris vezikula; <i>large extracellular vesicle</i>
linc-p21	hosszú intergenikus nem-kódoló RNS-p21; <i>long intergenic non-coding RNA-p21</i>
lnc-MHRT	hosszú nem-kódoló, miozin nehézlánchoz kapcsolódó RNS transzkriptum; <i>long non-coding, myosin heavy chain associated RNA transcript</i>
LPM	nagy peritoneális makrofág; <i>large peritoneal macrophage</i>
Map3k5	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 5; <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>

mEV	közepes-méretű extracelluláris vezikula; <i>medium-sized extracellular vesicles</i>
mRNS	messenger RNS; <i>messenger RNA</i>
MVB	multivezikuláris test; <i>multivesicular body</i>
Mφ	makrofág; <i>macrophage</i>
NTA	nanorészecske követő elemzés; <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
p53	gén, a kódolt fehérje sejtciklus szabályozó és tumorszupresszor; <i>cellular tumor antigen p53 (Uniprot)</i>
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat; <i>phosphate-buffered saline</i>
P/S	penicillin/sztreptomycin; <i>penicillin/streptomycin</i>
Rab3b	Ras-rokon Rab-3B fehérjét kódoló gén; <i>Ras-Related Protein Rab-3B coding gene</i>
RNS	ribonukleinsav; <i>ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (médium)
RT-qPCR	kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció; <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
SDF-1	sztórma-eredetű faktor-1; <i>stromal cell-derived factor-1</i>
sEV	kisméretű extracelluláris vezikula; <i>small extracellular vesicle</i>
SPM	kis peritoneális makrofágok; <i>small peritoneal macrophage</i>
Tbx5	T-box transzkripció faktor 5; <i>T-box transcription factor</i>
Wnt2	Wingless-típusú MMTV integrációs, 2. tag; <i>Wingless-type MMTV integration site family, member 2</i>
Wnt2b	Wingless-típusú MMTV integrációs, 2. tag B; <i>Wingless-type MMTV integration site family, member 2B</i>

2. Bevezetés

Napjainkban a kardioonkológia új interdiszciplináris tudományterület, mely az onkológiában használt készítmények kardiológiai mellékhatásaira összpontosít. A rák elleni küzdelemben életmentő kezelések fejlődésének köszönhetően megnőtt a betegek túlélési esélye. Ezzel egyidejűleg nagyobb figyelmet kapnak a kemoterápia szövődményei, különösképpen az antraciklinek (pl. doxorubicin) kardiotoxikus és immunmodulátor hatása. A doxorubicinnel történő kezelés irreverzibilis károkat okozhat a kardiovaszkuláris rendszerben, melyek akár évekkel vagy évtizedekkel a kezeléseket követően jelentkeznek. Az érintettek egy növekvő létszámban lévő betegcsoport, akik a daganatos betegségüket túléltek, de a kemoterápia káros mellékhatásait elszenvedik. A szív- és érrendszer számos része válhat a szövődmények támadáspontjává, a komplikációk hátterében sejtszintű folyamatok állnak.

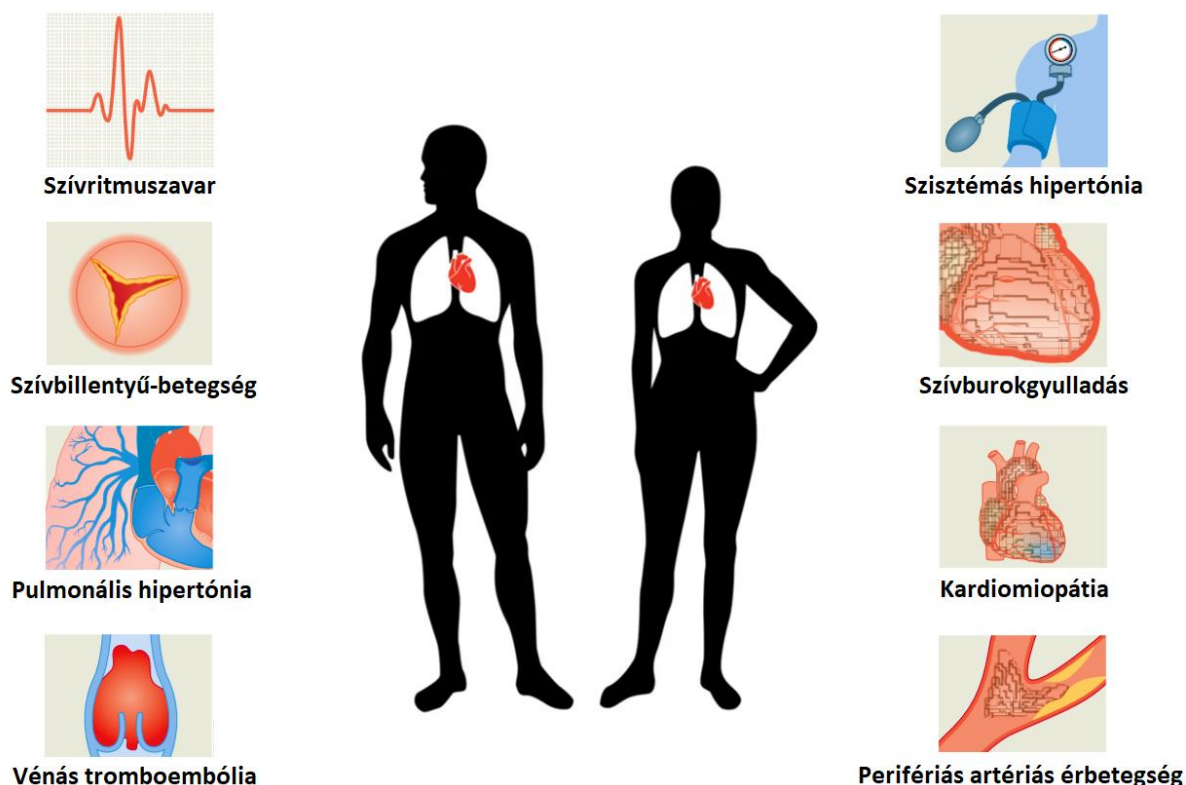
A sejtek aktuális állapotuknak megfelelően extracelluláris vezikulákba (továbbiakban EV) csomagolt nukleinsavak és fehérjék által képesek befolyásolni más sejtek működését. Az EV-k az intercelluláris kommunikáció alapvető résztvevői fiziológias és patológias folyamatokban. Jelentős immunszabályozó szereppel bírnak, részt vesznek a gyulladásos válaszok kialakításában, mindezzel befolyásolva a sejtek, szövetek regenerációs képességét. Az EV-k jelenleg az orvosbiológiai kutatások középpontjában állnak.

Munkám során kondicionált, dupla transzgénikus egértörzsnél bizonyítottam, hogy a szívizomsejtekből származó EV-k a makrofágok által felvételre kerülnek. *In vitro* kísérletben doxorubicin és alternatív doxorubicin (DL-11) kezelésnek kitett HL-1 sejtvonalon, valamint egér peritoneális makrofágokon vizsgáltam a génexpressziós mintázat eltérő változását. A makrofágoknál külön megfigyeltem a közvetlen kezelés és külön a kardiomiocita eredetű EV-k hatására kialakuló változásokat. Az expressziós vizsgálatokat hagyományos, valós idejű PCR-rel és Nanostring expressziós panelen végeztük, emellett számos hagyományos és modern technológiát használtunk kutatásunk során.

Az eredmények segíthetik a terápiás szerek citotoxikus és immunmodulátor hatásának jobb megértését, ezáltal szerepük lehet a szövődmények kivédésében. Az általunk vizsgált molekuláris markerek a későn manifesztálódó mellékhatások predikcióját vetíthetik előre.

2.1 Kardonkológia

A rosszindulatú daganatos megbetegedéseket az elmúlt évtizedekben a vezető halálokok között tartjuk számon. 2020-ban 19,3 millió új esetet és 10 millió halálesetet regisztráltak világszerte. A globális népességnövekedéssel és az átlagéletkor emelkedésével a számok növekvő tendenciát mutatnak, azonban az elmúlt két évtizedben – jellemzően a fejlett országokban – a betegség túlélési mutatói javultak (Sung és mtsai, 2021; Herrmann, 2020). Ez többek között a korszerű kemoterápiás és egyéb daganatellenes kezelések alkalmazásának, és sikeres kombinálásuknak köszönhető. A túlélők arányának emelkedésével egyre inkább előtérbe kerültek a daganatterápia direkt mellékhatásai. Napjainkban a gyógyult rákbetegek morbiditásának és mortalitásának vezető oka a rosszindulatú daganatos betegség kiújulása, közvetlenül a második helyen a szív- és érrendszeri megbetegedések állnak (Lenneman és Sawyer, 2016). Az onkológiai kezelések leggyakoribb kardiovaszkuláris szövődményeit az 1. ábra mutatja.



1. ábra: Az onkoterápia leggyakoribb kardiovaszkuláris szövődményei. Megjegyzendő, hogy számos kezelés a szív- és érrendszer egészére káros hatásokkal bír. (saját ábra; Herrmann, 2020 nyomán)

Ezt felismerve jött létre a kardonkológia tudományterülete, mely az onkológiai terápia során használt készítmények kardiológiai mellékhatásait vizsgálja. Cél az onkológiai kezelésekkel járó kardiotoxikus szövődmények megelőzése, diagnosztikája és gyógyítása.

Mivel a különböző készítmények hatásmechanizmusa, így káros kardiovaszkuláris hatása eltérő, ezért elengedhetetlen a daganatellenes szerek által okozott kardiotoxikus komplikációk molekuláris szintű megértése.

2.2 A doxorubicin okozta kardiotoxicitás

A myocardium számos sejtípusa közül a szívizomsejtek a kontraktilis rendszer elemei és a szívszövet struktúráját adják. A kemoterápia mellékhatásaként jelentkező gyulladásos válasz miatt apoptózis és nekrosis alakul ki, ennek következményeként a szívizomsejtek száma csökken, ami a kardiális funkció romlásához, végül a szívelégtelenség kialakulásához vezet (Földes, 2018).

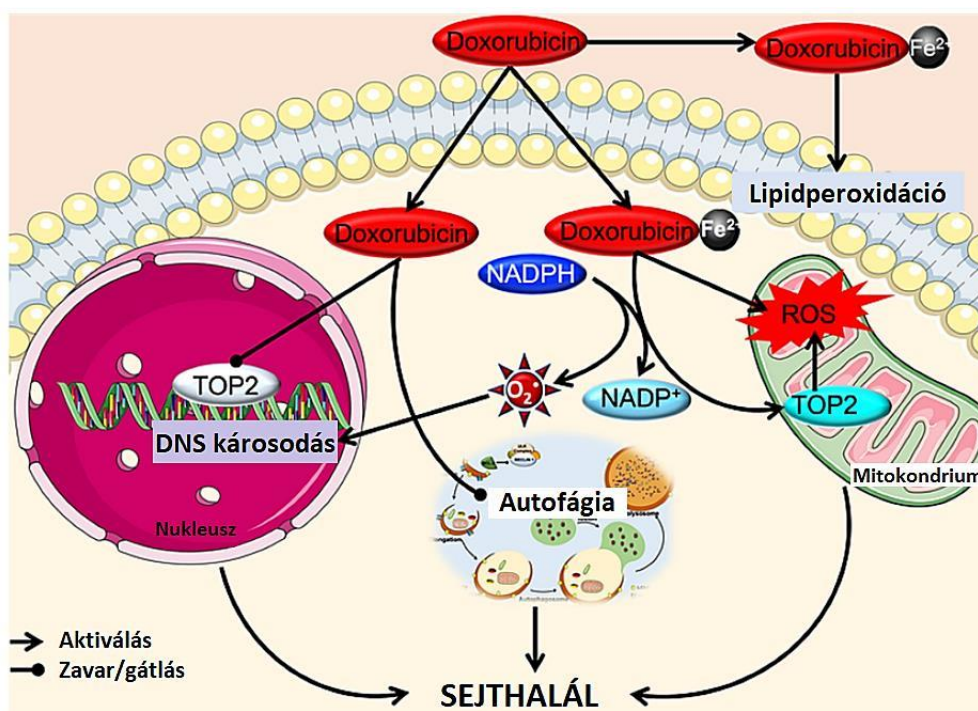
A daganatellenes készítmények között többféle citotoxikus gyógyszer megtalálható, az antraciklinek a topoizomeráz II gátlók közé tartoznak. A vegyületcsalád egyik tagja, a klinikumban széles körben alkalmazott doxorubicin (Gyires és Fürst, 2011). A *Streptomyces peucetius* baktériumból származó vörös színű

Topoizomeráz II: a sejtciklus fontos enzime, a DNS kettős hélix torzióját akadályozza meg fel-, és letekeredéskor. A doxorubicin képes stabilizálni a komplexet a DNS kettős szál törése után, ezzel aktiválva a p53 fehérjét. A folyamat főként a gyors sejtosztódású sejtekben okoz problémát.

kemoterapeutikum kardiotoxikus hatásának pontos mechanizmusa jelenleg még felderítetlen.

Feltételezik, hogy a doxorubicin okozta kardiotoxikus hatás hátterében a doxorubicin DNS szálak közé ékelődése, a topoizomeráz II gátlása, a szabad oxigén gyökök felszabadulása, a mitokondriális diszfunkció áll, mely végül apoptózishoz vezet (2.ábra). A tumorsejtek topoizomeráz II α -t, a kardiomiociták topoizomeráz II β -t expresszálnak, azonban az antraciklinek mindkettőt képesek megcélolni. (Sawyer, 2013; Zhang és mtsai, 2012) A doxorubicin kardiotoxikus hatásának hátterében több útvonal is állhat, további kutatások szükségesek a molekuláris szintű mechanizmusok jobb megértéséhez.

A tumorellenes kezelések kardiális funkciókra gyakorolt káros hatása szükségessé teszi hatékony, de enyhébb mellékhatású szerek fejlesztését az onkológiai terápiában.



2. ábra: A doxorubicin által kiváltott mechanizmusok károsítják a szívizomsejteket és kardiotoxicitást okoznak. A doxorubicin a TOP2-re hat, törést okozva a genomiális és mitokondriális DNS-en, ami a ROS szintjének emelkedéséhez vezet. A vas komplexet képez a doxorubicinnel, ami a NADPH-oxidáz és a lipidperoxidáció révén még több szabad gyököt termel. A doxorubicin a kardiomiocitákban megzavarja az autofágia fluxust azáltal, hogy rontja a lizoszómák savasságát és működését. (TOP2: topoizomeráz II; ROS: reaktív oxigén gyök; Fe^{2+} : vas-anion; NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát; O_2^- : szuperoxid anion (saját ábra; Gabani és mtsai, 2021 nyomán)

2.3 DL-11, az alternatív doxorubicin

A DL-11 kutatás-fejlesztési fázisban lévő doxorubicin származék. A fejlesztés célja, hogy a peptiddel konjugált hatóanyag specifikusan a tumorsejtek által kerüljön felvételre. Ennek értelmében a tumorelles hatás megtartása mellett a kardiotoxikus hatás csökkenhet. Az innováció nagy kollaborációs csapatmunka eredménye, mely jelenleg is folyik. Részfeladat az új vegyület és a hagyományos kemoterápiás szerként széles körben alkalmazott doxorubicin hatásának megfigyelése és összehasonlítása a kardiomiocita makrofág kommunikációban.

2.4 A makrofágok szerepe

A szívizomsejtek mellett a fibroblasztok, az endotélsejtek, a vaszkuláris simaizomsejtek és az immunsejtek a szív fontos sejtípusai. A makrofágoknak döntő szerepe van a szívbetegségek kialakulásában, a kardiovaszkuláris és krónikus gyulladásos folyamatokban

való részvétellel. A szívelégtelenségre adott adaptív sejtválaszként megnő a citokinek, kemokinek és növekedési faktorok szintje. Az aktivált szívizomsejtek emelkedett citokin termelésük révén immunsejteket toboroznak és akut gyulladásos folyamatokat indukálnak. A granulociták, az aktivált monociták/makrofágok megjelenése, az erek megnövekedett permeabilitása segíti a szív regenerációját. Ha a folyamat elhúzódik, a gyulladásos faktorok tartós emelkedésének hatására krónikus gyulladás lép fel, amely fokozza a kardiomiopátia súlyosságát és klinikai kimenetelét (Zhang és mtsai, 2020).

Zhang és munkatársai kísérleteikben a makrofágok dinamikus változásait vizsgálták doxorubicinnel kezelt egereknél. Megállapították, hogy a doxorubicin-indukált kardiomiopátia során a monocita eredetű makrofágok proinflammatorikus fenotípust mutattak, ezzel károsítva a szívműködést. A szívben rezidens makrofágok ezzel szemben érzékenyek voltak a doxorubicin kezelésre. A túlélő, rezidens makrofágokat fokozott proliferáció jellemezte, és reparatív szereppel bírtak. Megállapították, hogy a gyulladás időben történő megszüntetésével a szívelégtelenség kialakulása megelőzhető (Zhang és mtsai, 2020).

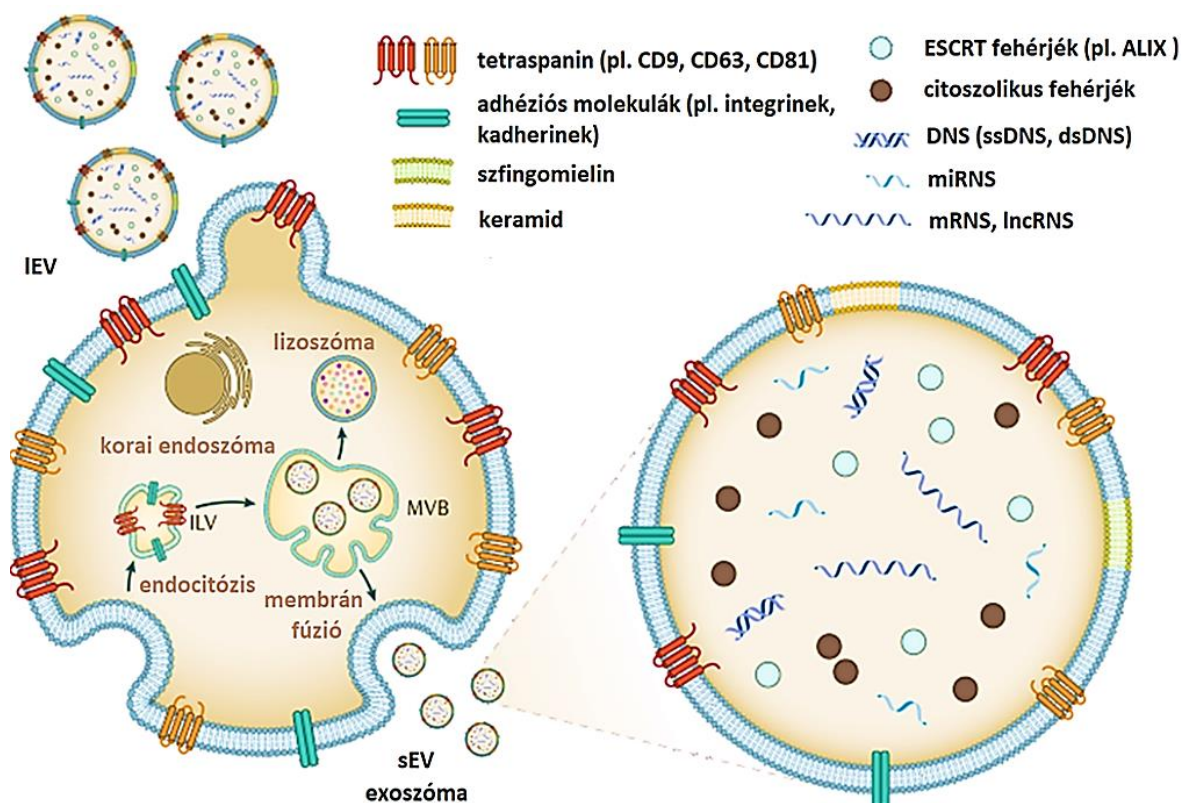
Jelenleg kevés információ van arról, hogy a különböző funkciójú és eredetű makrofágok pontosan hogyan befolyásolják sejtszinten a doxorubicin által kiváltott kardiomiopátia kialakulását. Kutatásom során az extracelluláris vezikulák szerepének tisztázását tűztem ki célul.

2.5 Az extracelluláris vezikulák szerepe

A sejtek aktuális állapotuknak megfelelően üzenetet közvetítenek a mikro környezetükben lévő és a távoli sejtekhez egyaránt. Az EV-k a sejtek közötti kommunikáció résztvevői. Ezek a lipid kettős membránnal körülhatárolt partikulumok folyamatosan fűződnek le sejtjeinkből, lehetnek endoszomális vagy plazmamembrán eredetűek. Az EV-k képződése általános sejtbiológiai jelenség, fiziológias és patológias folyamatokban egyaránt részt vesznek. Az általuk szállított cargo összetétele rendkívül változatos, hiszen lipideket, fehérjéket, metabolitokat, kódoló és nem kódoló RNS-eket tartalmaz (Teng és Fussenegger, 2020; Huszár, 2020) (3.ábra).

A Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (ISEV) jelenlegi ajánlása szerint az EV-k szubpopulációit biofizikai paramétereik alapján (pl. méret, ülepedési fordulatszám) kell csoportokba osztani. Ennek értelmében beszélhetünk kisméretű (smallEV, sEV) és nagyméretű

(largeEV, lEV) vezikulákról. Emellett javasolják még a biokémiai összetétel (pl. CD63+/CD81+ stb.) vagy az állapot/származási sejt (pl. apoptotikus testek, hipoxiás EV-k stb.) alapján történő csoportosítást (MISEV 2018).



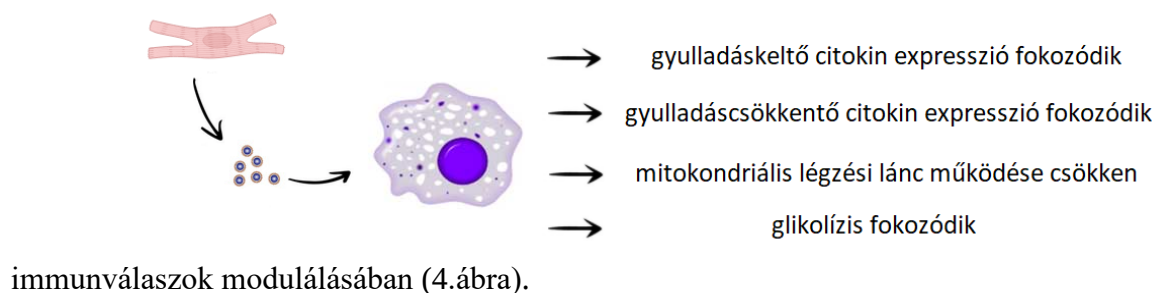
3. ábra: Az EV-k szubcelluláris képletek heterogén csoportja. Populációit kisméretű (sEV) és nagyméretű (lEV) vezikulákra osztjuk. Az exoszómák, azon kisméretű vezikulák, amelyek bizonyítottan az endoszomális útvonalon keletkeznek. Egyes csomagként szállított molekulák bizonyos sorting mechanizmusok révén feldúsulhatnak a vezikulákban (lEV: largeEV; sEV: smallEV; ILV: intraluminális vezikula; MVB: multivezikuláris test) (saját ábra; MISEV 2018; Linxweiler és Junker, 2020 nyomán)

Jelen kutatás szempontjából fontos kitérni az EV-k biogenezisére. Az EV-k létrejöhetnek a sejtmembrán kitüremkedésével, kifelé irányuló bimbózással vagy hasadással. Ilyenkor a plazmamembrán kettős rétegének lipidkomponensei átrendeződnek, ezáltal a membrán merevsége és görbülete megváltozik. A külső rétegben foszfatidil-szerin csoportok és a görbület kialakulását segítő fehérjék lokalizálódnak. A citoszkeletális komponensek közreműködésével a vezikulák leválnak az extracelluláris térbe (Gudbergsson és Duroux, 2017; Tricario és mtsai, 2017). A másik útvonalon az sEV-k csoportjába tartozó exoszómák keletkeznek, melyek a multivezikuláris testek (MVB) exocitózisával ürülnek a sejtéből. Először a plazmamembrán invaginációjával korai endoszómák jönnek létre, ezek összeolvadhatnak a transz-Golgi-hálózattól származó vezikulákkal. A korai endoszómák egyesülésével késői endoszómák alakulnak ki, melyben intraluminális vezikulák (ILV) jönnek létre és kialakul a MVB. A MVB végül a plazmamembránnal fuzionál és a vezikulák

exoszómák formájában az extracelluláris térbe ürülnek. Egyes esetekben a MVB-ek lizoszómákkal is egyesülhetnek (3.ábra) (Teng és Fussenegger, 2020).

Az EV-ket a recipiens sejtek membránfúzió, receptor mediált endocitózis, kaveoláris endocitózis, makropinocitózis vagy fagocitózis révén abszorbeálják. Az EV-k kétféle módon fejthetik ki intercelluláris jelátviteli funkciójukat. Közvetlen érintkezéssel, felületi ligandumaik révén információt tudnak továbbítani a recipiens sejteknek, másrészt képesek fehérjéket és nukleinsavakat (RNS-eket, DNS-eket) a célsejtekbe juttatni (Teng és Fussenegger, 2020).

Kóros körülmények között a szívizomsejtek olyan EV-ket szekretálnak, amelyek képesek megváltoztatni más sejtek – pl. a makrofágok – működését a csomagként szállított nukleinsavak és fehérjék által. Az EV-k aktiváló vagy gátló hatásukkal szerepet játszanak az



4. ábra: A kardiomiocita eredetű EV-k a makrofágok által felvételre kerülnek, ezáltal szerepük lehet az immunszabályozásban (saját ábra; Yarana és mtsai, 2019 nyomán)

Yarana és mtsai beszámoltak arról, hogy az EV-k oxidált molekulákat tartalmaznak, és a makrofágok gyulladásos reakcióit váltják ki. A doxorubicinnel kezelt egérmodellnél megfigyelték a kardiomiocitákból származó EV-k hatását a makrofágok aktiválására. A szívből származó EV-k mind proinflammatorikus, mind gyulladásgátló makrofág-aktivációt indukáltak, az NF κ B és Nrf-2 útvonalak által. A doxorubicin fokozta a kardiomiocitákból származó EV-k hatását, elnyomták a mitokondriális légzést, emelték a makrofágok glikolízisét (Yarana és mtsai, 2019).

Az EV-k sejtek közötti kommunikációban betöltött szerepének megismerése új lépést jelent az orvostudomány számára a különféle emberi betegségek és rendellenességek diagnosztikájában és terápiájában. Ilyen pl. a krónikus gyulladás csökkentése, az autoimmun betegségek és a rákos megbetegedések kezelése (Robbins és mtsai, 2016). Az EV-k potenciális biomarkerek, terápiás célpontok és terápiás eszközök is lehetnek a jövőben. Dolgozatomban a kemoterápiás szerekkel kezelt kardiomiocita eredetű EV-k hatását vizsgálom a peritoneális makrofágok aktivációjára.

3. Célkitűzések

- ❖ Szívizomsejt eredetű EV-transzfer bizonyítása a szívizomsejt-makrofág interakcióban, bitranszgenikus egérmodellen.
- ❖ HL-1 egér sejtvonalon végzett *in vitro* kísérletekben a közvetlen doxorubicin (továbbiakban Dox) és DL-11 kezelés hatásának vizsgálata 10 gén (és két háztartási gén) expressziós mintázatán.
- ❖ A Dox és a DL-11 kezelés közvetlen hatásának vizsgálata *in vitro* peritonális makrofágokon, három gén (és egy háztartási gén) expressziójának változásán.
- ❖ A Dox és DL-11-kezelt HL-1 sejt eredetű extracelluláris vezikulák hatásának vizsgálata a peritoneális makrofágok génexpressziós mintázatára.
- ❖ A Dox és a DL-11 hatásának összehasonlítása a fenti vizsgálatok alapján.

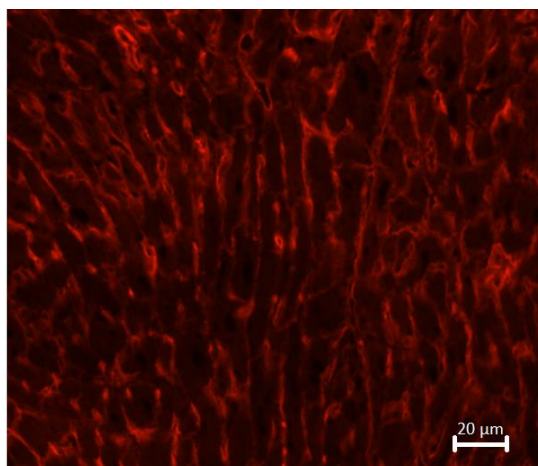
4. Anyagok és módszerek

4.1 Az EV-transzfer bizonyítása: Kondicionált bitranszgénikus egérmodell

Az EV-k által közvetített hatás vizsgálatának első lépéseként fontosnak tartottam bizonyítani, hogy a kardiomiocita eredetű EV-k a makrofágok által felvételre kerülnek. Ehhez kondicionált bitranszgénikus egérmodell volt a segítségemre, melyet az Extracelluláris Vezikula Munkacsoportunk (továbbiakban EVM) a világon egyedülállóan két transzgénikus egértörzs keresztezésével hozott létre. Az új modell vizsgálatokor jól elkülöníthetők a szívizomsejt eredetű vezikulák minden más sejt által termelt EV-től. A két transzgénikus egértörzs a Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, Egyesült Államok) cégtől került beszerzésre.

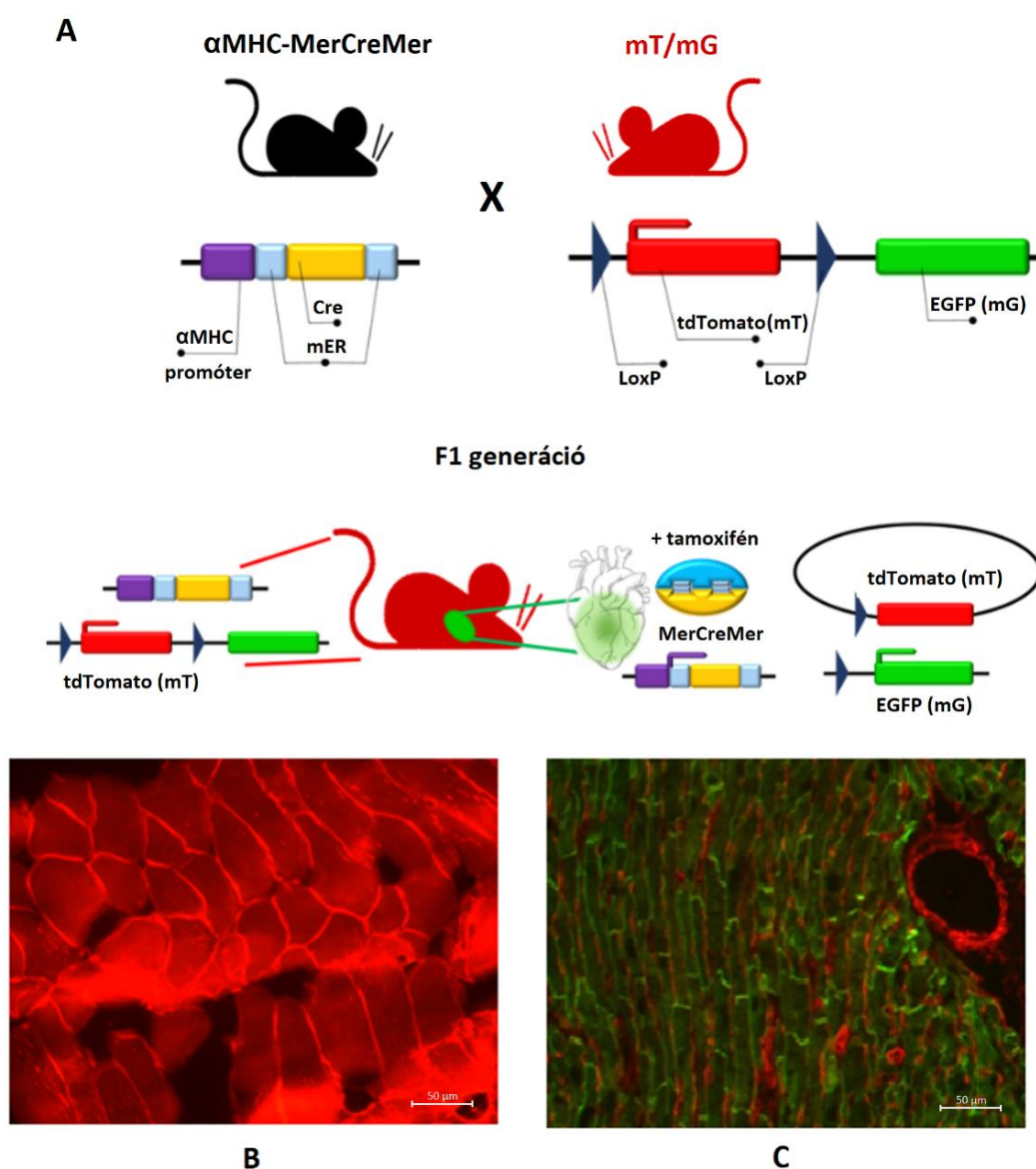
Az egyik az mT/mG, a sejtmembránon lokalizált, kettősen fluoreszcens riporter egérmodell (Stock No: 007576). A Cre-rekombináz által közvetített kivágás nélkül a sejtmembránra lokalizált tandem dimer Tomato (mT) fluoreszcencia az állat minden sejtjében és szövetében megjelenik. Homozigóta tenyészet létrehozásával, a kardiomiociták izolációját követően ellenőriztük, hogy a sejtek expresszálják a Tomato jelet (5.ábra) (Muzumdar és mtsai, 2007).

Cre/LoxP a P1 fágból izolált integrációs rendszer. Használatával a genom meghatározott pontján hozhatunk létre DNS-módosítást. A rekombinációs folyamat a két LoxP inszerciós helyek között jön létre, az irányultságától függően inverzió vagy deléció alakul ki. A Cre enzim aktivitása szabályozható, hogy a DNS-módosítás egy adott sejttypusban fejeződjön ki.



5. ábra: Szív keresztmetszet. Az mT/mG egér sejtjei piros színű Tomato-t expresszálnak a sejtmembránban. (fluoreszcens mikroszkóp (Leica M205 FC/A), EVM felvétele)

A másik transzgénikus egértörzs az α MHC-MerCreMer (Stock No: 005657). A transzgénikus állatok tamoxifén által indukálható Cre-rekombinázt fehérjét expresszálnak, melyek az egér szívspecifikus α -miozin nehézlánc promóter (α MHC) irányításával mutáns ösztrogén-receptor ligandumkötő doménekhez (MerCreMer) kapcsolódnak a szívizomsejtekben. Megvizsgálták a Cre-rekombinázt aktivitását embrionális, újszülött és felnőtt szívben. Indukció nélkül nem volt Cre-aktiváció, de négy tamoxifén injekció után >80%-os aktivitást tapasztaltak (Sohal és mtsai, 2001). A Cre-rekombinázt expresszáló sejtek - és a belőlük származó jövőbeni sejtvonalak - a kivágás után a sejtmembránon lokalizált EGFP (mG) fluoreszcencia-expresszióval helyettesítik a piros fluoreszcenciát (Muzumdar és mtsai, 2007).



6. ábra: A két transzgénikus egértörzs keresztezési sémája (A). F1 generációban a combizom harántcsíkolt izomsejtjei pirosan (B), a szívszövetben a szívizomsejtek zölden, a nem-szívizomsejtek pirosan világítanak (C). (fluoreszcens mikroszkóp (Leica M205 FC/A), saját ábra)

A dupla transzgénikus egerek F1 generációjában a tamoxifén-indukció hatására, a loxP-határolt Tomato jel kivágódik a Cre-rekombináz által. Minden szívizomsejtben zölden fluoreszkáló EGFP termelődik, minden más szövetben a piros fluoreszcens Tomato expresszálódik. A fluoreszcens markerek a sejtmembránban lokalizálódnak (6.ábra).

4.2 Kísérleti terv: doxorubicin és DL-11 kezelés

A kutatás során háromféle kísérlet-sorozatot végeztem el, mindegyiket több technikai párhuzamossal megerősítve. A kísérleti összeállítást a 7.ábra mutatja.

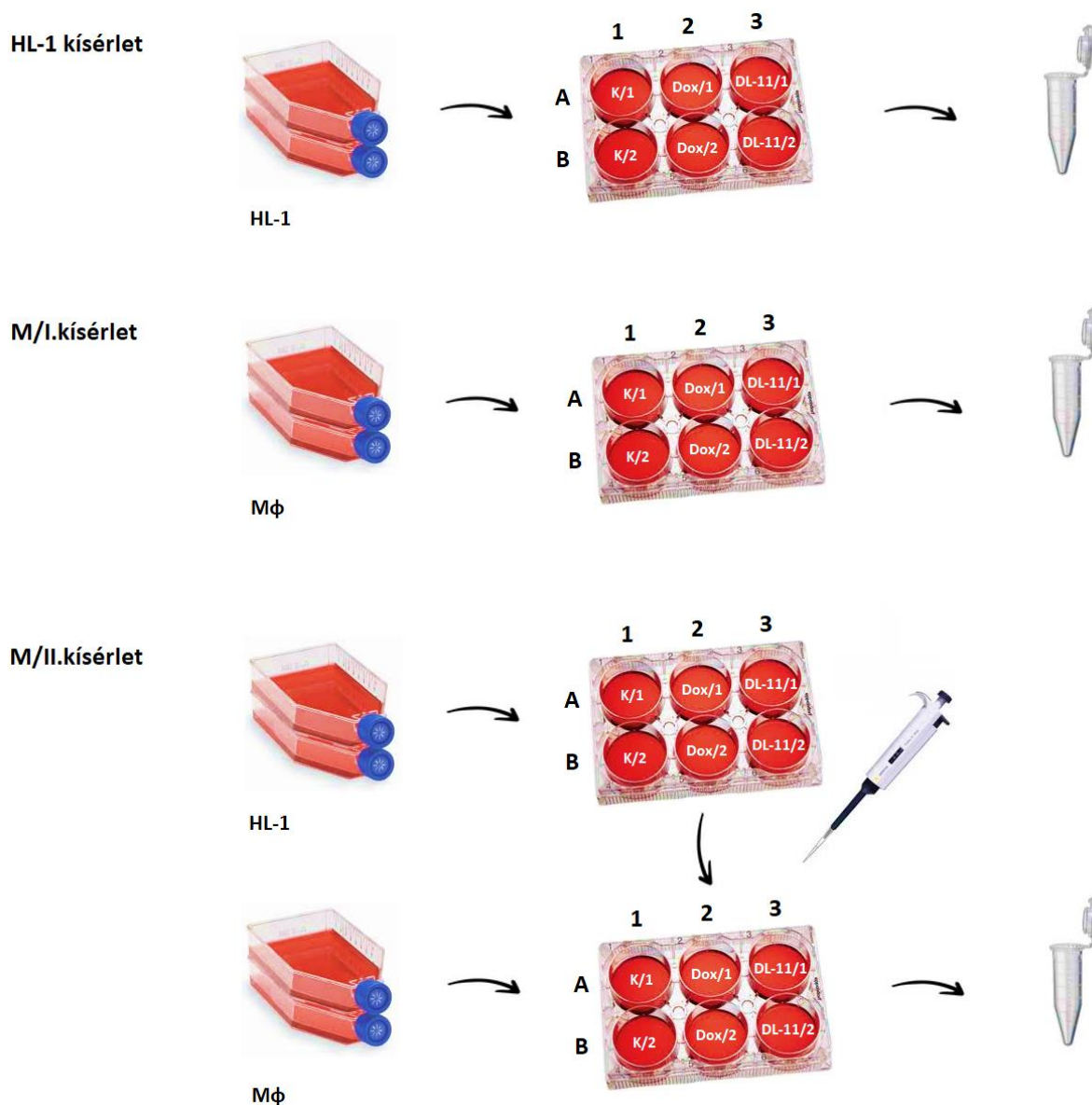
1. A HL-1 (egér kardiomiocita sejtvonal, Sigma SCC065) sejtek Dox és DL-11 kezelést kaptak (**HL-1 kísérlet**). Megfigyeltem a kemoterápiás szerek hatását a sejtsztódásra, emellett 10 génen (és két háztartási génen) mértem a génexpresszió változását. A kezelt HL-1 sejtek tápközegét – az EV-kal – az M/II.kísérletben használtam fel. A HL-1 kísérletet három független alkalommal két-két technikai párhuzamossal végeztem.
2. Az **M/I.kísérletben** megfigyeltem a Dox és DL-11 direkt hatását a peritoneális makrofágokra, három gén (és egy háztartási gén) expressziós mintázatának változását vizsgáltam. Három különböző alkalommal izoláltam makrofágokat, a génexpresszió-változását két technikai párhuzamossal mértem.
3. Az **M/II.kísérletben** a Dox-kezelt kardiomiocita eredetű EV-k immunszabályozó hatását vizsgáltam a makrofágok aktivációjára. Az aktivációs RNS profil mintázatot Nanostring panelen mértük. Kontrollként a kezeletlen HL-1 sejtek kondicionált médiumát párhuzamosan, a peritoneális makrofágok kezeletlen tenyészetére helyeztem át. A kísérlet-sorozatban négy biológiai párhuzamost vizsgáltam.

A sejtek tenyésztése, fenntartása, a kísérletek inkubációja 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú, 95%-os páratartalmú termosztátban történt. A letapadó sejtek tenyésztéséhez T25-s és T75-s (Eppendorf) sejttenyésztő flaskákat használtam. A kezeléseket a letapadó sejtekhez használt, hatlyukú platen (Eppendorf) végeztem (7.ábra).

A plate-kre az adott sejttípusnak megfelelő médium (ld. később) került, az alábbi kezelésekkkel (500 nM) kiegészítve:

- | | | |
|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| • A1: K/1 (kontroll) | A2: Dox/1 kezelés | A3: DL-11/1 kezelés |
| • B1: K/2 (kontroll) | B2: Dox/2 kezelés | B3: DL-11/2 kezelés |

A kezeléseket minden esetben 24 órás inkubálás követte. Ezt követően a sejtekből RNS-t izoláltam, melyet cDNS szintézis és RT-qPCR követett. Az M/II.kísérlet RNS mintáit Nanostring elemzésre is elküldtem, a kapott adatokat kiértékeltem.



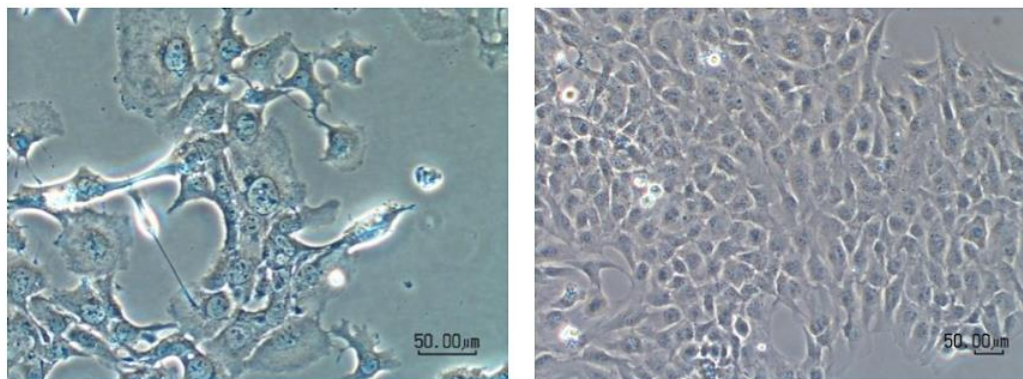
7. ábra: A Dox és DL-11 kezelések kísérleti összeállítása. A HL-1 kísérletben a kardiomiociták, az M/I. kísérletben a makrofágok közvetlen kezelést kaptak. Az M/II. kísérlet esetén a makrofágokra a kezelt HL-1 sejtek kondicionált médiumát helyeztem (saját ábra)

4.2.1 A szívizomsejtek kezelése: HL-1 kísérlet

A HL-1 szívizom sejt vonal sejtjei *in vitro* kontrakcióra képesek és mutatják a felnőtt, differenciált kardiomiocita fenotípusát, adhéziós jellemzőit, génexpressziós mintázatát, elektrofiziológiai és biokémiai tulajdonságait (8.ábra). A HL-1 sejt vonal az AT-1, transzgénikus egér proliferáló pitvari kardiomiocita vonalából származik. Alkalmas sejt- és

molekuláris szinten a kardiomiociták tanulmányozására fiziológias és patológias állapotokban (Claycomb és mtsai 1998).

HL-1



8. ábra: A HL-1 sejtek (balra) és a konfluens sejt kultúra (jobbra). A HL-1 sejtek gyorsan növekednek és osztódnak, passzálást követően is megtartják a szívizomra jellemző fenotípust (EVM felvétele, fáziskontraszt-mikroszkóp)

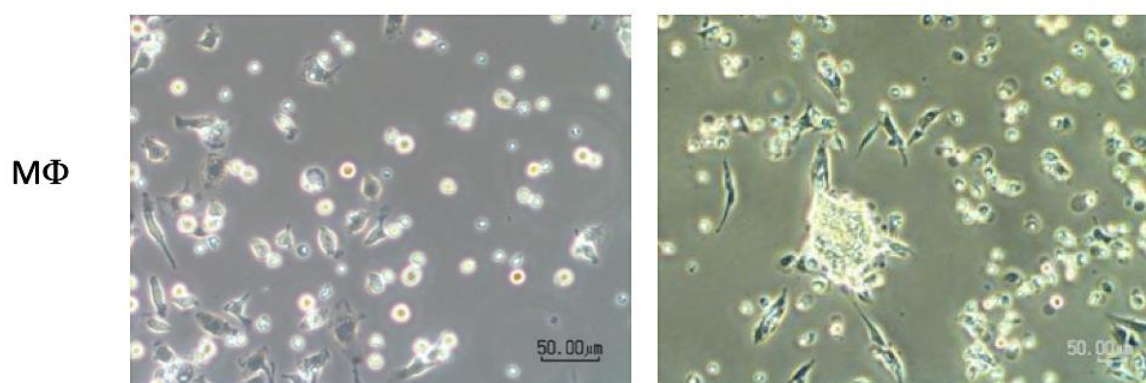
A HL-1 tenyészeteket -80°C -on tárolt állományból hoztam létre, a sejtvonal mikoplazma fertőzést nem mutatott, ezt PCR-rel ellenőriztem. A sejtvonalat a protokoll szerint (Sigma SCC065) – a kísérleti modell létrehozójáról elnevezett – 87%-os Claycomb médiumban növesztettem (Sigma 51800C-500ML), 10% foetális borjú szérum (FBS) (Sigma TMS-016), 1% 2 mM L-glutamin (Sigma G7513), 1% 1 mM norepinephrin (Sigma A0937, 30 mM aszkorbinsavban (Sigma A7506) készítve), 1 % 100 mg/ml penicillin/sztreptomycin (P/S) (Sigma P0781) jelenlétében (továbbiakban HL-1 médium). A T25-s sejtenyészítő flasksához 5 ml, majd a passzálást követően a T75-s flasksához 15 ml tápközeget adtam. A sejteket a tenyészet növekedésének megfelelően 1-2 naponta etettem. A konfluens tenyészetet hatlyukú plate-be osztottam szét (kb. 1 millió sejt/well). 24 órás inkubálást követően a HL-1 sejtek megkapták a 500 nM-koncentrációjú Dox és DL-11 kezelést (7.ábra).

4.2.2 Egér peritoneális makrofágok kezelése: M/I. és M/II. kísérlet

A szöveti makrofágok feladata a homeosztázis fenntartása, fertőzések és szöveti sérülések során hozzájárulnak az immunválaszok kialakulásához. A hashártyán belül a peritoneális makrofágok találhatóak, melyek kulcsfontosságú modulátorai az immunfolyamatoknak. Alkalmask a szöveti makrofágok akut és krónikus gyulladásos-, valamint regeneratív folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatához. Az egér peritoneális makrofágokon belül megkülönböztetünk két szubpopulációt, a nagy peritoneális (LPM) és kis peritoneális (SPM) makrofágokat. Mindkettő magas fagocita aktivitású, de eltérő eredettel,

fenotípussal, funkcionális tulajdonságokkal, felületi markerekkel rendelkeznek. A peritóneumban nagy számban az LPM-ek vannak jelen, melyek a peritoneális üreg homeosztázisáért felelnek. Fertőzés vagy gyulladás esetén a peritóneum sejttöszetetele drámaian megváltozik, ahol az LPM-ek eltűnnek, és a gyulladásos monocitákkal a gyulladást elősegítő SPM-ek válnak a jelentősebb sejtpopulációvá (Dos Anjos Cassado és mtsai, 2015).

A kísérletekhez a peritoneális makrofágokat felnőtt C57/Bl egerek hasüregéből, foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk ki (9.ábra). Az állatokat CO₂-eutanáziával altattuk el, figyelve arra, hogy a kiválasztott egyed semmilyen sérüléssel ne rendelkezzen, ami befolyásolhatná a makrofágok aktivitását.



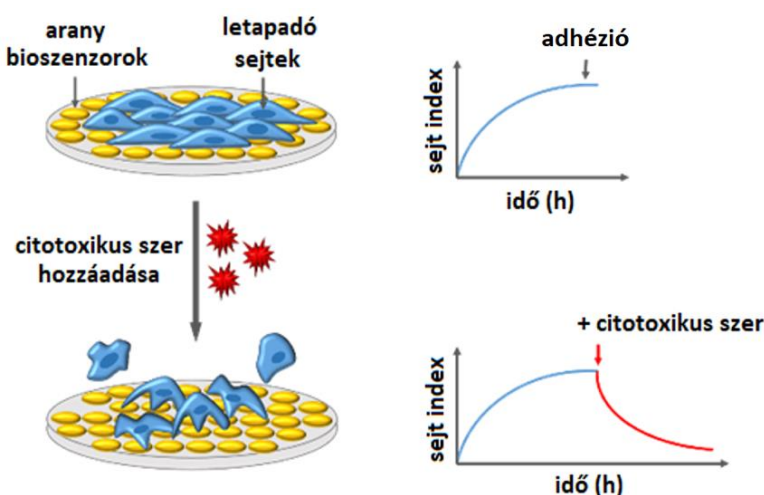
9. ábra: A peritoneális makrofágokról a felvétel röviddel az izolálást követően készült. Jól látszik a populáció heterogenitása, illetve, hogy a sejtek a letapadás előtt gömb alakot vesznek fel (MΦ) (EVM felvétele, fáziskontraszt-mikroszkóp)

A makrofágok elsődleges tenyésztését 10%FBS-t (Sigma TMS-016) és 1% P/S-t (Sigma P0781) tartalmazó Roswell Park Memorial Institute tápközegben (Sigma R0883) neveltem (továbbiakban RPMI médium) 24 órán át, T25-s flaskákban. Ezt követően hatos sejttenyésztő plate-re ültettem ki a sejteket (kb. 500.000 sejt/well). Egy napos inkubálás után 500 nM koncentrációjú Dox és DL-11 tartalmú 5 ml RPMI médiummal kezeltem a sejteket. Az M/II. kísérletnél az RPMI tápközegét HL-1 kondicionált közegre cseréltem a párhuzamos lyukakból (7.ábra). A makrofágokat további 24 órán át inkubáltam. A sejtekből RNS-t izoláltam, a mintákat Nanostring vizsgálatra küldtük el.

4.3 xCELLigence – impedimetriai mérések

A sejtek életképességét valós idejű sejtanalízissel, xCELLigence (ACEA Biosciences, San Diego, Kalifornia, Egyesült Államok) rendszerben mértük. Az impedancia-alapú műszerben speciális mikrotiter lemezeket (E-plate) használunk, az adhézión felületet 80%-ban

egy arany elektróda-array képezi. A letapadó élő sejtek szigetelőként viselkednek, befedik a mérőkamrák alján található elektródákat, ezáltal emelik az elektromos impedancia értékét, mely arányos a letapadt sejtek számával és az adhézio mértékével (10.ábra). Információt kapunk a sejtek fiziológiás állapotáról, többek között a sejtek morfológiai változásait, csökkent proliferációját (sejtciklus leállítását), a citotoxicitás mértékét, az öregedést, a sejthalált dinamikusán, valós időben követhetjük nyomon (Ke és mtsai, 2011).



10. ábra: A sejtek életképességének, azaz a citotoxicitás mértékének vizsgálata xCELLigence technológiával. A letapadó sejtek száma és az adhézio mértéke alapján kapjuk meg a viabilitási értéket (saját ábra, OLS alapján, 2021.11.23.)

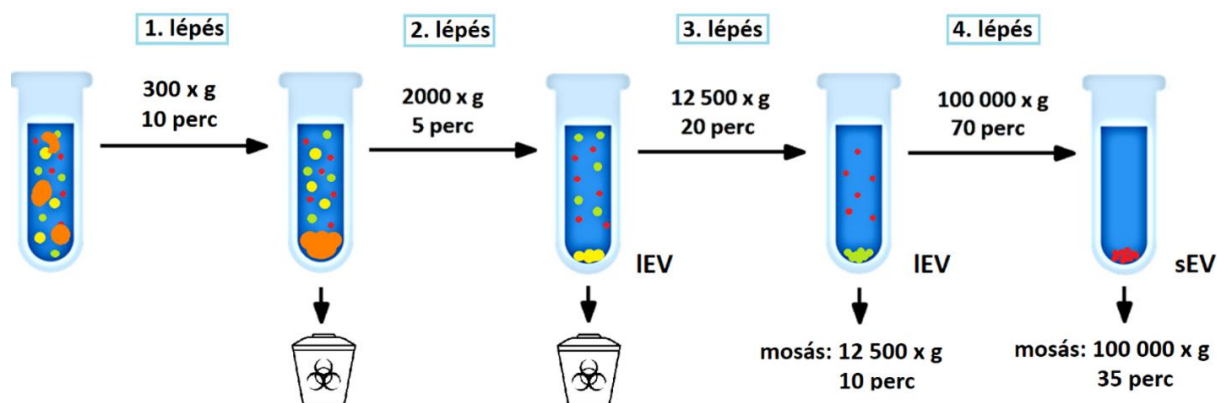
A valós idejű monitorozás során a Dox és a DL-11 citotoxikus hatását vizsgáltam a sejtek életképességére. A sejtek kiültetését (2×10^5 sejt/well) 24 órás inkubálás követte, majd kezeltem a sejteket (500 nM Dox, 500 nM DL-11). A mérést 24 órával a kezeléseket követően végeztem el, mert a makrofágok kezelése is 24 órás kezelt, kondicionált médiummal történt (M/II.kísérlet).

4.4 Az EV-k izolálásának lépései

Az EV-transzfer tisztázásához elengedhetetlen az EV-frakció elkülönítése és a különböző szubpopulációk izolálása. Jelenleg nincs egységes protokoll, az izolálási módszert az adott kísérlethez igazítva kell megválasztani. A kardiomiocita eredetű EV-k izolálásakor figyelembe vettük az ISEV jelenlegi ajánlását (MISEV 2018). Az izolálás lépései (11.ábra):

Alacsony fordulatszámú, rövid idejű centrifugálással (300 g, 10 perc) eltávolítottam az elhalt sejteket és a sejttörmelékét a kondicionált médiumból (1.lépés), a következő lépésben csak a felülúszót használtam fel. Az 2. lépést (2000 g, 5 perc) követően ismét a felülúszóval dolgoztam tovább. A 3. lépés (12500 g, 20 perc) eredményeként kapott IEV frakciót PBS-sel átmostam

(12500 g, 10 perc). A felülúszót 0,2 szűrőn csepegtettem le és a 4. lépésben (100.000 g, 70 perc) ultracentrifugáltam (Beckman Coulter, Optima MAX-XP; Brea, Kalifornia, Egyesült Államok). A pelletet ezután PBS-sel átmostam (100.000 g, 35 perc). Az EV-transzfer bizonyításához izoláltam IEV és sEV frakciókat.



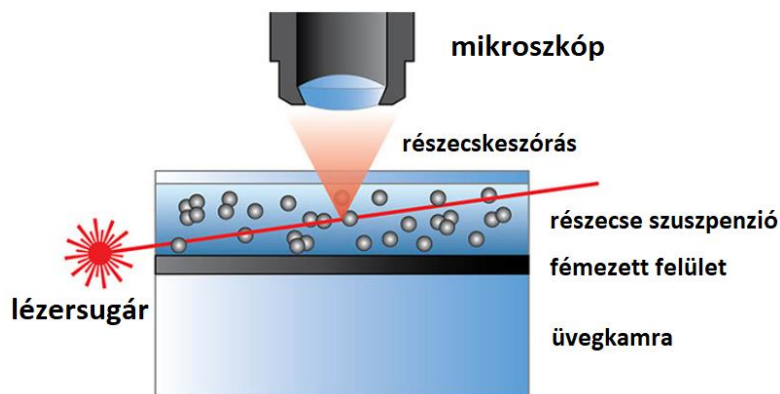
11.ábra: Az EV-k differenciál centrifugálási protokollja. Az egymást követő lépésekben egyre kisebb részecskéket pelletálunk, ehhez egyre nagyobb RCF (g) értékkel és egyre hosszabb ideig centrifugálunk (saját ábra)

(Megjegyzés: A kísérletek elvégzésekor a 3. lépés (12500 g, 20 perc) után kapott EV-populációt még közepes méretű, mediumEV-nek (mEV) neveztük. Az új nomenklatura szerint az mEV-eket az IEV-khez soroljuk.)

4.5 NTA, nanorészecske követő analízis

A Nanoparticle Tracking Analysis (NTA, nanorészecske követő analízis) folyékony szuszpenzióban, a fényszórás és a Brown-mozgás alapján meghatározza és elkülöníti a mintában lévő részecskéket méreteloszlásuk, koncentrációjuk, felületi töltésük és fluoreszcenciájuk szerint. Az NTA két fő része: egy lézeres mikroszkópos rendszer (Particle Metrix, PMX-120) és egy fényérzékeny kamera. A lézersugár átvilágítja a mintakamrát és a szuszpenzióban lévő részecskéket a 20x-os nagyítású fénymikroszkóp segítségével, a 10-1000 nm tartományba eső partikulákat fényszórással tesszük láthatóvá (12.ábra) (Dragovic és mtsai, 2011). A kamera nyomon követi és videót készít a részecskék mozgásáról. A különböző nanorészecskék azonosítását az NTA szoftver végzi (Particle-Metrix, 2021.11.15.).

Az EV izolálás során kapott EV pelleteket 50 µl PBS-ben vettük fel. A mintákat 0,1 µm-es filterrel szűrt PBS-sel hígítottuk a megfelelő részecske-koncentráció eléréséhez, 1:10 arányban. Az NTA mérést a ZetaView BASIC NTA (Nanoparticle Tracking Video) segítségével, az elemzést a ZetaView 8.05.10 szoftverrel végeztük.



12.ábra: NTA működési elve. A fényszórás és a Brown-mozgás alapján a szoftver kiszámítja a mintában lévő nanopartikulák méretét és koncentrációját (saját ábra; Webdepot alapján, 2021.11.20.)

4.6 RNS izolálás

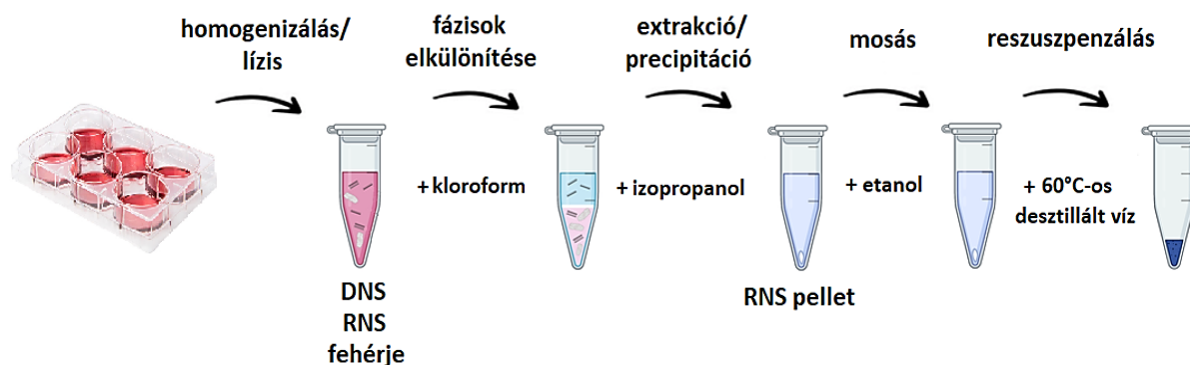
Az előkészületek során a kontroll és kezelt sejteket a hatlyukú platen, lyukanként 3 ml 1x PBS-sel átmostam, majd 1 ml tripszin-EDTA-val (BioTech XCT1717/100) vettem fel. A mintákhoz egyesével 4 ml HL-1/RPMI médium került. A plate-kből a mintákat Eppendorf-csővekbe pipettáztam. Következő lépésben 300 g-n, 5 percig centrifugáltam (Eppendorf, 5804R) a sejteket. Ezt újabb PBS mosás (3 ml) és centrifugálás (300 g, 5 perc) követte. Minden csőhöz 500 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen 79306) puffert adtam.

Az RNS izolálás lépései (13.ábra):

1. 150 µl kloroformot (Reanal, 03547-01-65) adtam a csövekhez.
2. A csövek tartalmát vortexeltem.
3. Centrifugálás: 12000 g 15 perc 4 °C
A keletkező három fázis legfelső rétegét óvatosan felszívtam és a mintákat egyesével újabb Eppendorf-csővekbe pipettáztam.
4. 500 µl izopropanolt (Molar Chemicals, DQ77715747) adtam a csövekhez.
5. A csövek tartalmát alaposan összekevertem.
6. Inkubáltam 10 percig szobahőmérsékleten.
7. Centrifugálás: 1200 g 10 perc 4 °C
8. A felülúszót leöntöttem.
9. 1 ml 75%-os etanolt (Lach-Ner, UN 1170) adtam a csövekhez.
10. Centrifugálás: 7500 g 5 perc 4 °C
11. A felülúszót óvatosan leszívam.
12. 5-10 percig szárítottam a csöveket szobahőmérsékleten.

13. 10 µl 60 °C-os szűrt (0,2 µm) desztillált víz (VWR Chemicals, 7732-18-5) került a csövekbe, melyeket azonnal jégre tettem.

14. Az RNS koncentrációt NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) spektrofotométerrel mértem. (1 µl)



13. ábra: Az RNS izolálás fontosabb lépései. A sejtek feltárása lízispufferrel történik, kloroformmal az RNS-tartalom elkülöníthető a sejt többi komponensétől, a kicsapást izopropanollal, a mosást etanollal végezzük (saját ábra; Addgene alapján, 2021.11.15.)

4.7 cDNS szintézis és RT-qPCR

Az adott sejttypusban kifejeződő fehérjék érett mRNS-szekvenciáiból reverz transzkripcióval cDNSt (komplementer DNS) szintetizáltunk. A NanoDrop ND-100 spektrofotométerrel kiszámítottam az RNS minták koncentrációját. A kapott értékek alapján és a gyártó utasításai szerint (Bioline SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit, Cat. Numbers: BIO-65054; Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, Egyesült Államok) végeztem el a szintézist. A cDNS mintákat a valós idejű PCR vizsgálatok során használtam fel.

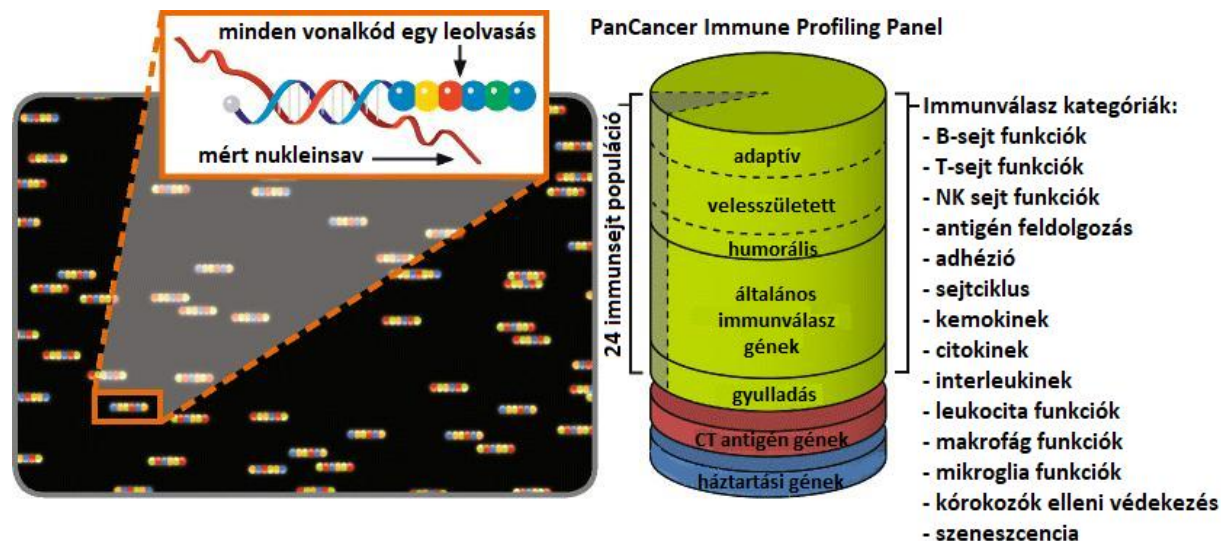
A RT-qPCR során a DNS amplifikációja kvantitatívan nyomon követhető. A vizsgálatokat a BIO-RAD CFX96 RT-PCR Detection System rendszerrel végeztem (Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok) a gyártó utasításai szerint (Bioline SensiFAST™ SYBR Hi-ROX Kit, Cat. Numbers: BIO-92005; Meridian Bioscience, Ohio, Egyesült Államok).

A HL-1 sejteknél azokat a géneket vizsgáltam, amelyek expressziója a EVM korábbi kísérletei alapján, kardiotoxikus hatásra jelentősen emelkedik: *GAPDH* (háztartási gén), *28S* (háztartási gén), *GDF-15*, *lnc-MHRT*, *linc-p21*, *Wnt2*, *Wnt2b*, *Rab3b*, *Tbx5*, *SDF-1*, *Fra-1* (*FosL1*), *Col2A1*. A peritoneális makrofágoknál az alábbi gének expressziós mintázatát vizsgáltam: *28S* (háztartási gén), *Arg-1*, *Fra-1*, *iNOS*. Nem teljeskörű expressziós változást néztünk, hanem ismert aktivációs markereket választottunk a rendelkezésre álló irodalom alapján (Martinez és mtsai, 2008; Medvedeva és mtsai, 2021).

4.8 Nanostring mRNS panel vizsgálat

A NanoString nCounter (Seattle, Washington, Egyesült Államok) technológiával nukleinsavak (DNS, RNS) mennyiségi meghatározását végezhetjük el. A technológia robusztus és reprodukálható, kis mennyiségű RNS mintát igényel. 100 bp-os célpontokat képes detektálni. Minden vizsgálat két, a célpontokkal komplementer 50 bp-os próbából áll: egy biotinhoz kapcsolt befogó szondából és az egyedi fluoreszcens vonalkódot tartalmazó riporter próbából. Miután a próba-célpont komplexek hibridizációja megtörtént, a komplexek streptavidinnel bevont felületre rögzülnek a biotinhoz kapcsolt befogó szonda segítségével. A digitális képalkotás során egy szkennel megszámol külön-külön minden RNS- vagy DNS-molekulához hibridizált fluoreszcens vonalkódot (Bioxpedia, 2021.11.10.).

Kísérletünkben Nanostring PanCancer Immune Profiling Panelen végeztük a multiplex génexpressziós elemzést. A panel alkalmas az egér makrofágokból származó gének vizsgálatára, az immunválasz profilozására. Főként ellenőrzőpont-inhibitorokat, CT-antigéneket, gyulladásos folyamatokban szerepet játszó géneket, általános immunválasz géneket, valamint az adaptív és a veleszületett immunválaszt egyaránt lefedő géneket vizsgál (14.ábra).



14. ábra: Nanostring PanCancer Immune Profiling Panel-en végeztük a makrofágok génexpressziós elemzését. Az ábrán látható mechanizmusokban szerepet játszó gének a vizsgálat célpontjai (saját ábra; Cesano, 2015 nyomán)

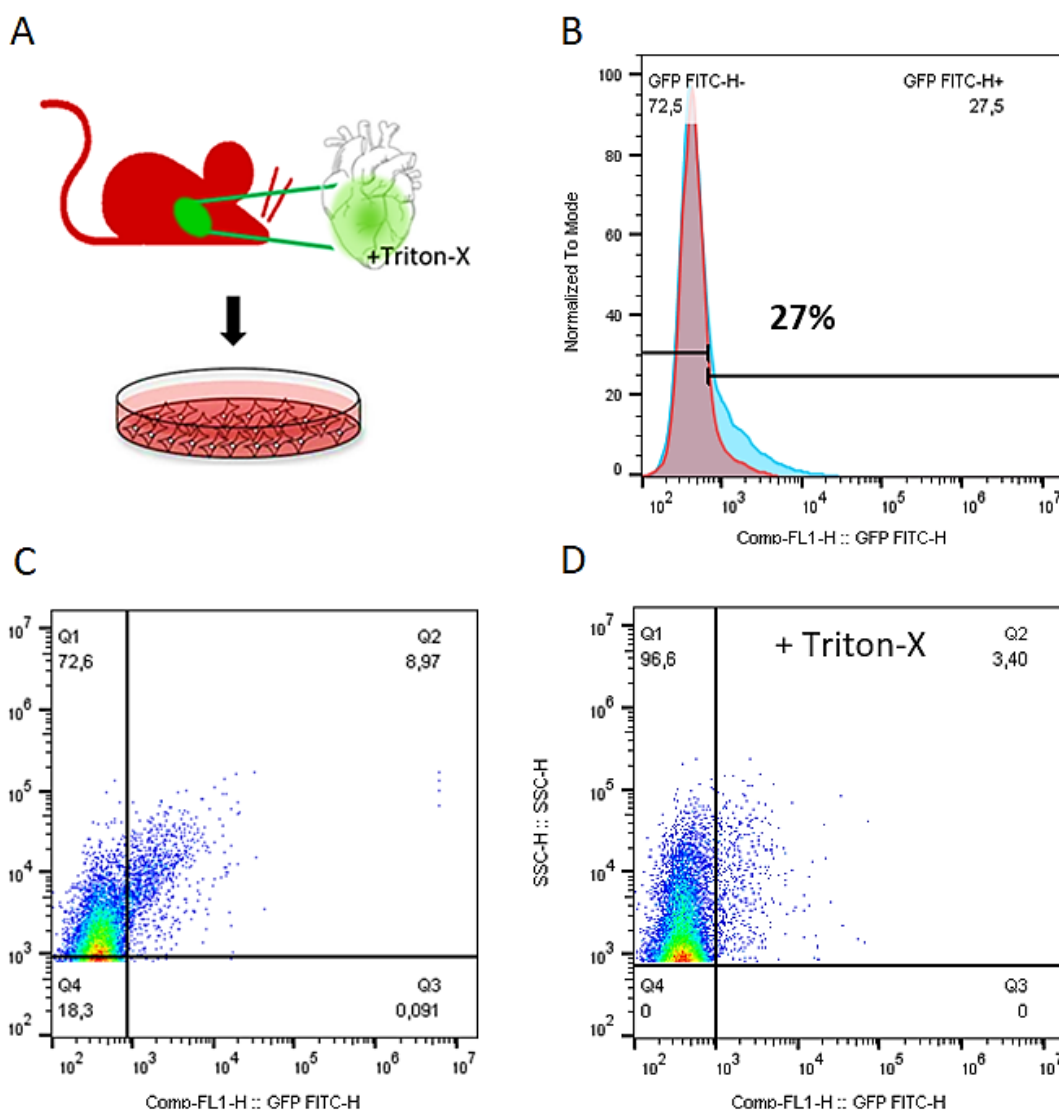
Központi kérdésünk, hogy a kezelt kardiomiocita eredetű EV-k milyen hatással vannak a makrofágok aktivációjára. Ennek értelmében a vizsgálatra az M/II.kísérlet sejtjeiből izolált RNS mintákat küldtem el. Az expressziós változásokat Volcano plot-on ábrázoltam, a nyers adatokat Rosalind programmal értékeltem (Rosalind, 2021.11.22.)

5. Eredmények

5.1 A szívizomsejt eredetű EV-transzfer bizonyítása

5.1.1 A szívizomsejtek GFP+ EV-ket termelnek

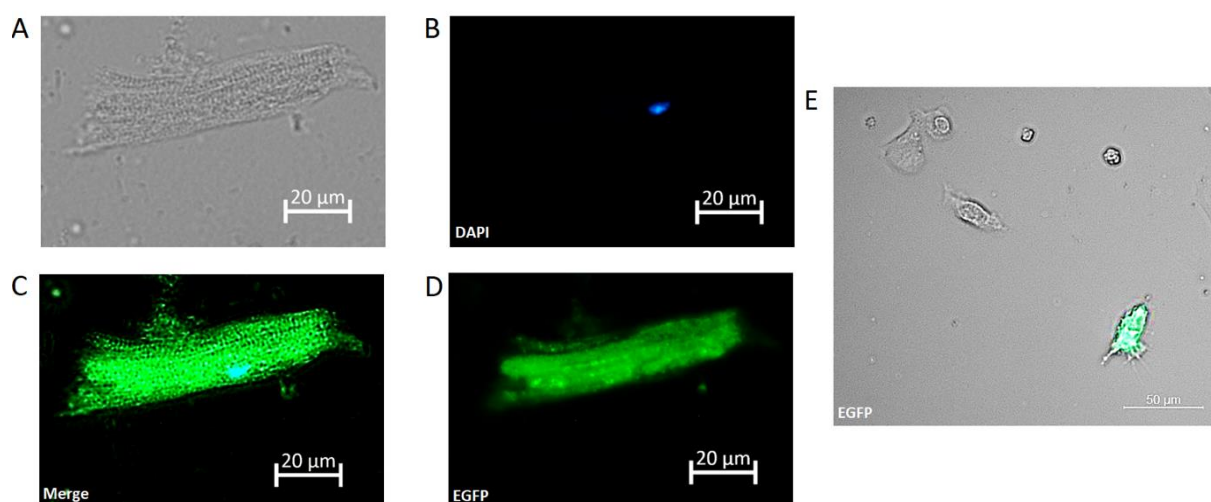
A dupla transzgénikus egérmódelnek köszönhetően a kardiomiocita eredetű, zölden fluoreszcens vezikulák könnyen megkülönböztethetők minden más sejt által termelt, pirosan fluoreszcens vezikuláktól. A bitranszgénikus egérből nyert primer szívizomsejtek egysejtes szuszpenzióját 24 órán át tenyésztettem (15.ábra/A). Áramlási citométerrel (Beckman Coulter Cytoflex S; Brea, Kalifornia, Egyesült Államok) ellenőriztem, hogy az izolált EV-k mutatják-e a GFP jelet (15.ábra/C-D). Az IEV frakció 27%-a GFP+ volt (15.ábra/B).



15.ábra: A bitranszgénikus egérből (A) származó kardiomiociták kimutatható mennyiségű GFP+ vezikulát termelnek (27%, B). Az EV-populáció (C) Triton kezelés hatására eltűnt, de nem tűnt el teljesen a festődés. Feltételezzük, hogy a vezikula kapun belül fehérje aggregátum és lipoprotein komplexek maradtak (D) (Beckman Coulter Cytoflex S; Brea, Kalifornia, Egyesült Államok)

5.1.2 A makrofágok EV-felvételének megfigyelése mikroszkópban

Az EGFP fluoreszcencia-expresszió a sejtmembránon lokalizálódik a dupla transzgénikus egér szívizomsejtjeiben (16.ábra/C-D), így a kettős membránnal borított EV-k is GFP+-ak lesznek. Kimutattuk, hogy a kardiomiociták GFP+ vezikulákat termelnek (16.ábra). A makrofágok azonosítását az F4/80 és a CD11b sejtfelszíni markerek együttes használatával, áramlási citométerrel végeztem (ábra nem mutatja). A naív makrofágokat a kondicionált médiumból centrifugálással nyert EV frakcióval kezeltem. A kardiomiocita eredetű EV-k a makrofágok által felvételre kerültek (16.ábra/E).



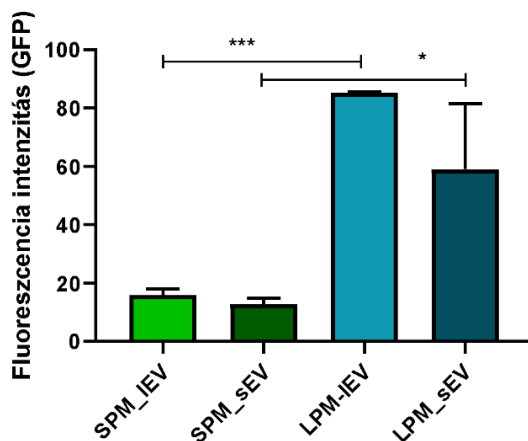
16. ábra: A kardiomiocita (A-D) membránja zölden világít (C, D). A DAPI-val festett sejtmag kék színű (B). Átlagosan a makrofágok felénél láthatók a fagocitózissal felvett zölden világító EV-k (E). (Celldiscoverer 7, Zeiss, Oberkochen, Németország)

5.1.3 A makrofágok EV-felvételének megfigyelése áramlási citométerrel

A vizsgálathoz a kardiomiocita sejtek kondicionált médiumából IEV-ket (12500g frakció) és sEV-ket (100.000g frakció) izoláltam. Az EV-k koncentrációját NTA-val határoztuk meg. Dox kezelés hatására a sEV kibocsátás megnőtt, míg a DL-11 esetében ez nem bizonyult szignifikánsnak. A nagyobb méretű IEV frakcióban (12500g) az EV-k száma inkább csökkent. A vezikulák méreteloszlása nem változott a kezelésektől, az sEV-k mérete $75-185 \pm 15$ nm között, az IEV-k mérete $128-650 \pm 78$ nm között mozgott.

Az áramlási citométeres vizsgálat előkészítésénél az izolált EV-ket friss médiumban hígítottam (IEV: 1×10^7 /ml, sEV: 1×10^9 /ml) összesen 5 ml tápoldathoz. Az akceptor sejteket 24

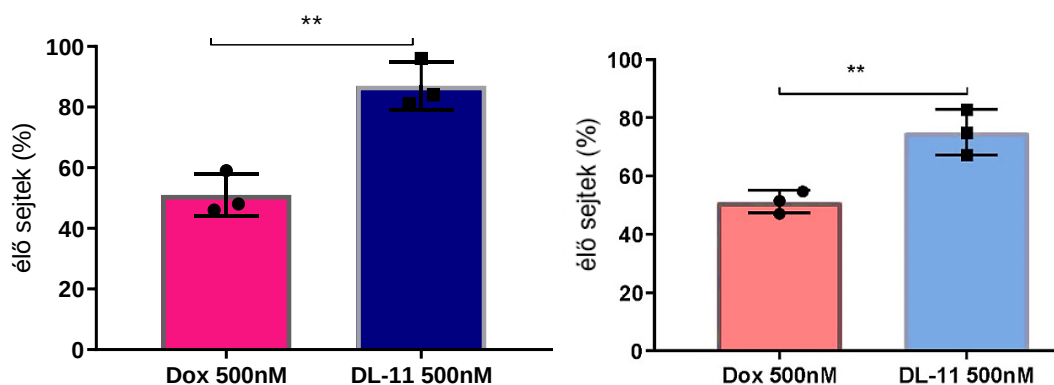
óráig inkubáltam CO₂ termosztátban. A makrofágokat Tripszin-EDTA (BioTech XCT1717/100) oldattal felszuszpendáltuk, és PBS mosás után F4/80-PE jelölés mellett PE/GFP-csatornán mértük a piros és zöld fluoreszcencia szignált. A GFP jel alapján az LPM-k nagyobb mértékben vették fel az IEV-ket és az sEV-ket. (Terjedelmi korlátok miatt ábra nem mutatja.) A 17. ábrán a mérési adatok kiértékelése látható.



17. ábra: GFP+ EV-k felvétele a makrofágokban. A mérési adatok kiértékelésekor is jól látszik, hogy a LMP-k vették fel az IEV és sEV populáció nagy részét (LMP: nagy peritoneális makrofág; SMP: kis peritoneális makrofág; IEV: nagyméretű extracelluláris vezikula; sEV: kisméretű extracelluláris vezikula) (GraphPad 8.0)

5.2 Doxorubicin és DL-11 hatása a sejtosztódásra

A sejtek közvetlen kezelésénél a toxicitás mértékét xCELLigence rendszerben mértük. A sejtek kiültetését 24 órás inkubálás követte, majd a sejteket 500 nM koncentrációjú Dox és DL-11 kezelésnek vettem alá, amit 24 órás inkubálást követett. A viabilitási értékek összehasonlításával látható, hogy azonos körülmények között - a HL-1 sejtek és a makrofágok esetén is - a Dox szignifikánsan több sejtet pusztít el, mint a DL-11 (18.ábra). A DL-11 konjugátumnál is megfigyelhető a citotoxikus hatás, de kisebb mértékben, mint a szabad hatóanyagnál.

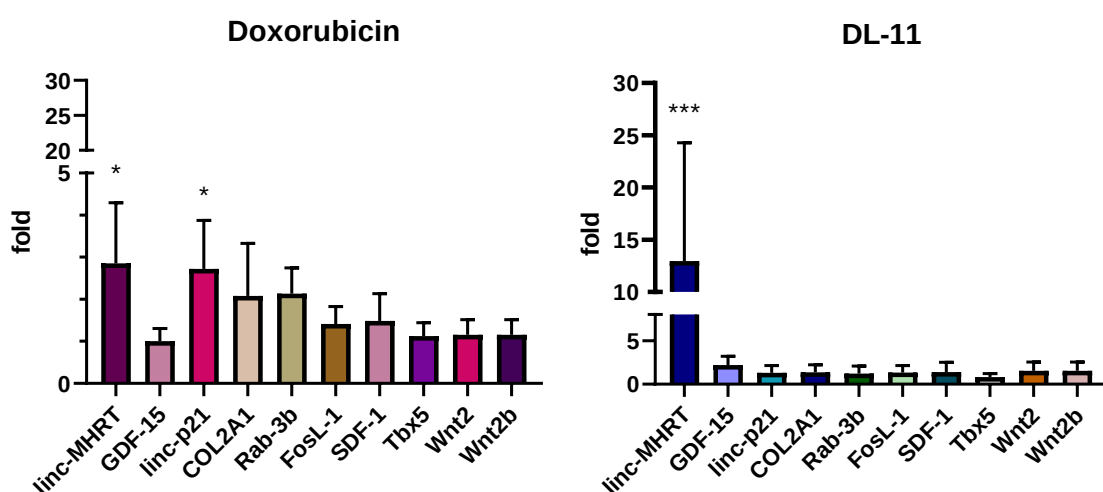


18. ábra: A HL-1 sejtek (balra) és a makrofágok (jobbra) viabilitási értékei a kezeléseket követően (átlag%/szórás%). A Dox jelentősebb mértékben csökkentette a sejtek életképességét. (GraphPad 8.0)

5.3 RT-qPCR eredmények

5.3.1 Doxorubicin és DL-11 hatása a génexpresszióra HL-1 kardiomiocitákban

A munkacsoport korábbi eredményei alapján kiválasztottunk azokat a géneket, melyekről feltételeztük, hogy kardiotoxikus kezelés hatására expressziójuk változik. A HL-1 kísérlet esetén a RT-qPCR eredményeit boxplottal vizualizáltam (19.ábra). A diagram mutatja a mérések átlagát és szórását. Csillaggal jelöltem azokat a géneket, amelyek szignifikánsan változtak. (GraphPad 8.0, egyutas ANOVA, *= $p < 0.005$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$)



19. ábra: HL-1 sejteknél megfigyelt génexpressziós-változás a kezelések hatására. A Dox kezelés esetén a linc-p21, mindkét kezelés esetén a kardioprotektív linc-MHRT expressziója változott szignifikánsan, $n=3$ (GraphPad 8.0)

Mindkét kezelésnél a hosszú, nem kódoló (lnc) RNS-ek expressziója változott, melyek a transzkripciót és a poszttranszkripciót szabályozzák. Hatással vannak a szív- és érrendszeri betegségek kialakulására, valamint a sejtek szeneszcenciájára (Xie és mtsa, 2018).

A szívizom-specifikus **lnc-RNS MHRT** expresszió mindkét kezelésnél szignifikánsan változott, nagyobb mértékben a DL-11 hatására. Expressziója szívinfarktust követően szignifikánsan emelkedik a betegek vérében. Egerek esetén az MHRT kiütése több apoptotikus sejthez vezetett. Az MHRT védőfaktornak tekinthető a kardiomiociták számára (Zhang és mtsai, 2016). Ez alapján feltételezhető, hogy a mi rendszerünkben a DL-11 kezelés, ezen génindukción keresztül szerepet játszik a kardiomiocita regenerációban.

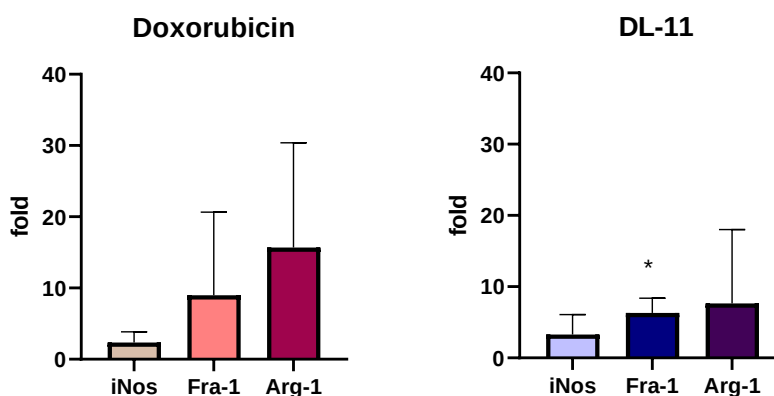
A **lincRNS-p21** expressziója csak a Dox-kezelés hatására növekedett számottevően. Részt vehet a szívizomsejtek öregedésében a Dox-indukált kardiotoxicitás során. Xie és mtsai

leírták, hogy a linc-p21 elnémításával enyhült a kardiotoxikus hatás. A Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonal szabályozásában játszik szerepet (Xie és mtsa, 2018). A linc-p21 modulálása kardioprotektív potenciált rejt a Dox-nal kezelt rákbetegek terápiájában.

A többi vizsgált gén nem mutatott eltérést a kontrollhoz képest. Az általam mért expressziós változás kapcsolatba hozható a kardiotoxikus hatás kivédésére irányuló molekuláris válaszhoz. Arra is kerestük a választ, hogy a kardiomiocitákban a kezelésre emelkedő expressziót mutató gének a vezikulákba is becsomagolódnak-e? A HL-1 sejteket Dox és DL-11-gyel kezeltem 24 óráig, majd a kondicionált médiumból IEV-ket és sEV-ket izoláltam. Az izolált EV-ből RNS-t izoláltam és a két hosszú nemkódoló RNS expresszióját valós idejű PCR-rel mértem. A vezikulákban háztartási génnek a 28S riboszómális RNS-t használtam. Igazoltam, hogy a hosszú nemkódoló RNS-ek a vezikulákban is kimutathatók.

5.3.2 Doxorubicin és DL-11 közvetlen hatása a makrofágokra

Megvizsgáltuk, hogy a két doxorubicin milyen közvetlen hatást vált ki a makrofágokon. A valós idejű PCR vizsgálat hasonló módon történt, mint a HL-1 vizsgálatoknál. Az inducible nitric oxide synthase (iNOS) indukciója a proinflammatorikus irányba differenciálódó makrofágokra jellemző, az argináz-1 (Arg-1) az anti-inflammatorikusokra, ezért kíváncsiak voltunk ezek változására a kísérleti elrendezésben. A Fra-1-nek az immuntolerancia kiváltásában van szerepe, ezért szintén megvizsgáltuk a kísérletek során (Medvedeva és mtsai, 2021). Az eredményeket a 20. ábrán mutatom be. A kiértékelést GraphPad 8.0 programmal végeztem, a kontrolltól való eltérést egyutas ANOVA-val számoltam. A két kezelés ugyanazokat a géneket célozta, de a DL-11 jóval kisebb mértékben hatott az expressziókra.



20. ábra: Direkt kezelésnek kitett makrofágok génexpressziós mintázatának változása az M/I. kísérletben, a kemoterápiás szerek közvetlen hatására. A vizsgált géneket irodalmi adatok alapján választottuk ki (Medvedeva és mtsai, 2021), n=3 (Maestro)

A **Fra-1** (FosL-1) gén által kódolt fehérje az AP-1 (aktivátor fehérje 1) transzkripció faktor komplex tagja. Az AP-1 szabályozza a génexpressziót különféle ingerek pl. citokinek, növekedési faktorok, stressz stb. hatására. Számos sejtszintű folyamatot regulál, beleértve a differenciálódást, a proliferációt és a sejthalált (Genecards Fra-1, 2021.11.20.). Kísérletünkben ennek a génnek az expressziója emelkedett szignifikánsan.

Az **Arg-1** fehérjekódoló gén, mely a májspecifikus argináz I-et kódolja. Az enzim az urea ciklusban, az ammónia lebontásában játszik szerepet, emellett az immunrendszer kulcsszereplője. Gyulladásos folyamatok különböző aspektusaiban vesz részt. A makrofágok által termelt argináz-1 az extracelluláris mátrix átrendeződését segíti elő, így a sebgyógyulási folyamatok fontos szereplője (Munder, 2009). Az expresszió emelkedése korai makrofág differenciálódásra utal az M2 irányban.

Az **iNOS** (indukálható nitrogén-monoxid-szintáz) a többi NOS-sal ellentétben kalcium-független, és számos sejt termelheti citokinek vagy más ingerek hatására. Az iNOS képes bioaktív nitrogén-monoxidot (NO) szintetizálni, mely fontos gyulladást elősegítő mediátor, ezáltal hatással van az immunrendszerre. Az NO képes befolyásolni az immunsejtek differenciálódását, a gyulladásos betegségek kialakulását. Xue és mtsai arról számoltak be, hogy a NO szabályozza a veleszületett immunitásban szerepet játszó molekulák expresszióját, gátolja az M1 makrofágok polarizációját. Kísérleteikben az iNOS-hiányos egerek fokozott M1-makrofág-polarizációt mutattak (Xue és mtsai, 2018).

A DL-11 ebben a kísérletben is mérsékeltebb expresszió változást okozott a vizsgált gének esetén. Szignifikánsan a Fra-1 szintje emelkedett a DL-11 hatására, melynek az immuntoleranciában van szerepe.

5.4 Kardiomiocita-eredetű EV-k hatása a makrofágok RNS profiljára

Az M/II. kísérletben a Dox-tartalmú HL-1 sejtek kondicionált médiumával kezelt peritoneális makrofágok génexpressziós változását hasonlítottam össze a DL-11-tartalmú HL-1 sejtek kondicionált médiumával kezelt peritoneális makrofágok génexpressziós mintázatának változásával. A peritoneális makrofágok génexpressziós mintázat-változásának analízisét végeztem el, hogy a gének szignifikánsan különböznek-e az EV-kel kezelt sejtekben.

A Nanostring eredményét Volcano plot-on ábrázoltam. A Volcano plot egyszerre jeleníti meg a Student-teszt p értékét és a változás mértékét (fold change). A vízszintes tengely mutatja, hogy mekkora volt a $\log_2$ fold change, a függőleges tengelyen a $-\lg(p\text{-érték})$ van feltüntetve. Azok a gének változnak szignifikánsan, melyek < 0.05 p értékkel rendelkeznek. Az expresszió mértékénél 1.5x nagyobb, illetve 0.5x kisebb változásnál lett meghúzva a kiértékelési határ. Az eredményeket a Rosalind programmal vizualizáltuk, amely a 21. illetve 22. ábrán látható molekuláris útvonalakra mutatott rá. A színes pontok az adott, relevánsan változó géneket jelölik, amelyek szignifikánsak és elég nagy mértékben növekedtek (zöld) illetve csökkentek (lila).

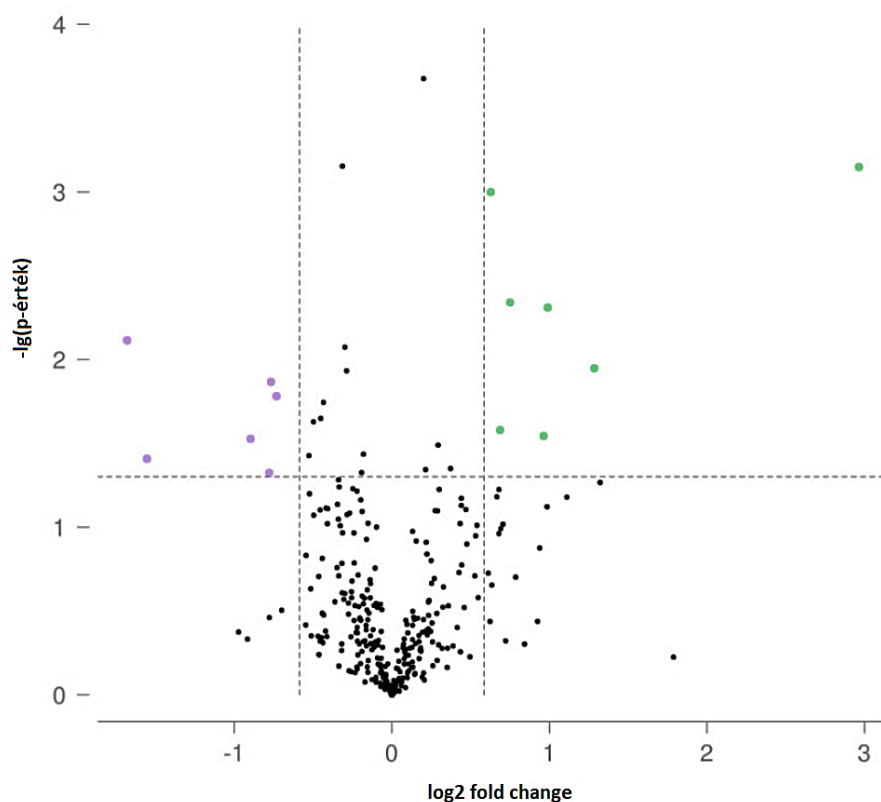
A változó géneket a jövőben szeretnénk független módszerrel, egyesével is validálni. Az alábbiakban terjedelmi korlátok miatt, arról a két génről szeretnék írni, amelyek az M/II. kísérletben mindkét kezelésnél megváltoztak.

A **Cdkn1a** (más néven p21) expresszió mindkét esetben megnőtt. A gén által kódolt fehérjének szerepe van a sejtciklus G1 és S fázisában, a replikáció megállításában és a DNS-károsodás helyreállításában. Sejt-stressz esetén a p53 tumorszupresszor fehérje a p21 expressziót keresztül a sejtciklus leállítását indukálhatja (Genecards Cdkn1a, 2021.11.20.). Ezek alapján érthető, hogy a DNS-károsító kezelés miatt hat a p21 expresszióra. Az általunk vizsgált két szer hatása között azonban sokszoros expresszió-különbség mutatható ki. Mindkét csoportban kiemelkedő a Cdkn1a (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1) expressziója (4,54- vs. 7,8-szoros). A Dox vált ki jelentősebb emelkedést, ami a citotoxikus hatással is magyarázható.

A **Map3k5** (más néven ASK1, apoptózis szignál-szabályozott kináz 1; apoptosis signal-regulating kinase 1) fehérjekódoló gén mindkét kezelésnél downregulálódott. A környezeti hatások által kiváltott sejtválaszban vesz részt. Közvetíti a differenciálódást, a túlélést, a különböző stresszorok (pl. az oxidatív stressz) és a gyulladásos folyamatok jelátvitelét. Döntő szerepet játszik az apoptózis indukálásában (Uniprot Map3k5, 2021.11.20.). Genotoxikus kezelés hatására úgy értelmezhető a változás, – melyet a gén alulreprezentáltsága mutat – hogy a sejtválasz az apoptózis, nem pedig a túlélés irányába tolódott.

Dox-nel kezelt kardiomiocita EV-k hatására az expressziós mintázat a korai öregedés irányába és gyulladásos géntonológiai kategóriákra mutat, az expresszió változás a DL-11 esetében mérsékeltebb a makrofág szeneszenciára utaló géneknél.

5.4.1 Volcano plot: Dox



Gén		fold	p-érték
Cdkn1a	ciklin-dependens kináz inhibitor 1A (P21)	7.80409	0.000711
Fos	FBJ oszteosarkóma onkogén	2.43679	0.011286
Bax	BCL2-asszociált X protein	1.9854	0.004897
Cd80	CD80 antigén	1.94958	0.028598
Zbp1	Z-DNS-kötő fehérje 1	1.6817	0.004568
Cd53	CD53 antigén	1.60952	0.026347
Cd22	CD22 antigén	1.54432	0.001002
Timd4	T-sejt immunglobulint és mucint-tartalmazó 4-es m.	-1.6604	0.016550
Map3k5	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 5	-1.70206	0.013611
Cxcl13	kemokin (C-X-C motívum) ligandum 13	-1.71477	0.047470
Ebi3	Epstein-Barr vírus indukált gén 3	-1.86161	0.029720
Mmp9	mátrix metallopeptidáz 9	-2.93598	0.039085
Cd163	CD163 antigén	-3.20455	0.007693

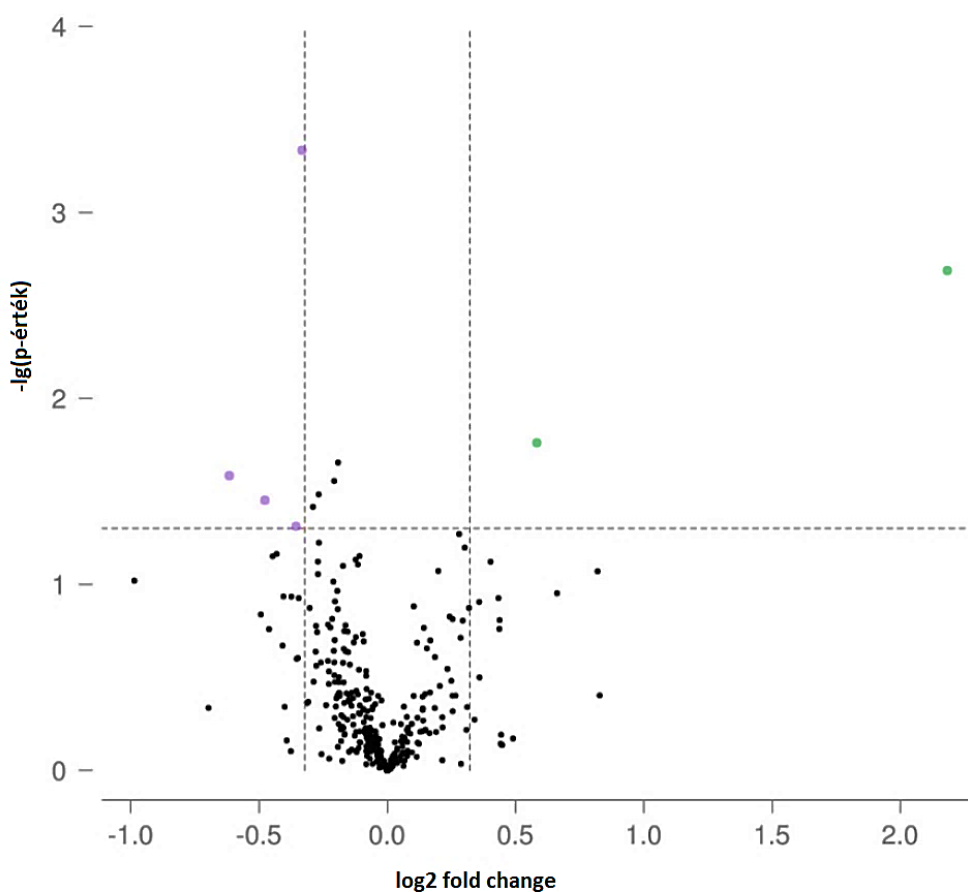
▼ NANOSTRING ANNOTÁCIÓK

Gén elemzés

Kifejeződés	Szignifikancia
Szeneszencia	2.4702
Rák progresszió	2.2934
Transzporter funkciók	2.1852
B-sejt funkciók	2.0943
Sejtciklus	2.0752

21. ábra: A Dox-indukált EV-k által közvetített hatás vizsgálata Volcano plot analízissel. A zöld pontok az upregulálódott, a lila pontok a downregulálódott géneket jelölik. A gének ezen együttállása arra utal, hogy a makrofágok szeneszencia állapotba kerülnek (Rosalind program)

5.4.2 Volcano plot: DL-11



Gén		fold	p-érték
Cdkn1a	ciklin-dependens kináz inhibitor 1A (P21)	4.53974	0.002055
Pycard	PYD és CARD domént tartalmazó protein	1.49741	0.017341
Casp8	kaspáz 8	-1.25941	0.000463
Siglec1	sziálsav-kötő Ig-szerű lektin 1, szialoadhezin	-1.28032	0.048755
Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma	-1.39247	0.035323
Map3k5	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 5	-1.53315	0.026057

▼ NANOSTRING ANNOTÁCIÓK

Gén elemzés

Kifejeződés	Szignifikancia
Rák progresszió	2.075
Szenescencia	1.8335
Makrofág funkciók	1.8002
Sejtciklus	1.611
B-sejt funkciók	1.5166

22. ábra: A DL-11-indukált EV-k által közvetített hatás vizsgálata Volcano plot analízissel. A DL-11 hatására kevesebb gén expressziója változott szignifikánsan. Zölddel az upregulálódott, lilával a downregulálódott gének vannak jelölve (Rosalind program)

6. Az eredmények megvitatása

A kísérletek első részében arra helyeztük a hangsúlyt, hogy bizonyítsuk a sejtek közötti EV-transzfert. Dupla transzgénikus egérmodellel sikerült igazolnunk, hogy a szívizomsejtek vezikulákat bocsátanak ki, majd a makrofágok azonosítását követően igazoltuk, hogy felveszik ezeket az EV-ket. (Ennek idő és koncentráció függése nem része a dolgozatnak, de a jövőben tisztázni kívánjuk a felvétel dinamikáját is.) A kardiomiociták és a makrofágok közötti kommunikáció mechanizmusairól jelenleg kevés információnk van. Elsőként Almeida Paiva és mtsai bizonyították, hogy a kardiomiocita eredetű EV-k hatással vannak a makrofágok aktivációjára, modulálják azok fenotípusát és funkcióját. Miokardiális iszkémiás modell vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy a szívizomsejt eredetű EV-k rontották a makrofágok védő funkcióit, ezáltal kedvezőtlenül befolyásolták a gyógyulást (Almeida Paiva és mtsai, 2019).

A Dox kezelés növelte a sEV kibocsátást, de mindkét szer csökkentette az lEV termelődést. Ez a különböző dinamikájú EV biogenezisre utalhat, már korábban is találkoztunk azzal a jelenséggel, hogy a stressz az sEV leadás fokozódásával jár (Anselmo és mtsai, 2021). Főként a nagyobb méretű makrofágok (LPM) fagocitálták az EV-populációkat. Az eredmény összefüggésben lehet azzal, hogy a peritoneális makrofágok izolálásakor a homeosztázis fenntartásáért felelős LMP-k voltak nagyobb számban jelen a peritoneumban (Dos Anjos Cassado és mtsai, 2015).

A közvetlen Dox-kezelés mind a kardiomiociták, mind a makrofágok esetén citotoxikusnak bizonyult. Az életképességi vizsgálatok során a Dox jóval nagyobb mértékben károsította a sejteket. Ez a tendencia a génexpressziós változásoknál is megfigyelhető. A kardiomiociták vizsgálatakor a kardioprotektív hatású hosszú-nemkódoló RNS-ek expressziója emelkedett, ez a sejtek túlélése, a kardiotoxikus hatás kivédése szempontjából életmentő lehet (Fa és mtsai, 2021). Makrofágok esetén a Dox hatására jelentősen emelkedett az Arg-1 expresszió, mely korai makrofág differenciálódásra utal. A DL-11 kisebb mértékben hatott a makrofágokra. A konjugátum mérsékeltebb citotoxikus hatása jelentős előrelépést jelenthet a betegek életminőségében. A DL-11 fejlesztés célja, hogy a konjugátum csak a tumorsejtek által kerüljön felvételre, s kizárólag ezen sejtekre fejtse ki citotoxikus hatását. Ez magyarázza, hogy a konjugátum kevésbé volt sejtkárosító hatású, a szabad hatóanyaghoz képest. A kutatócsoport célja a DL-11 tumorspecifikus hatásának további növelése.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy milyen változást generál a makrofágokban, ha a donor kardiotoxikus kezelést kap, azaz a kemoterápiás szerekekkel kezelt kardiomiocita eredetű EV-k által közvetített hatást vizsgáltuk a makrofágokra. A gének együttállása és a változás mértéke arra utal, hogy az EV-k a szeneszcencia irányába befolyásolják a makrofágokat, a fagocitáló képességük csökken, gyulladásos fenotípus jön létre. Ez összefüggésben van azzal, hogy a károsodott kardiomiociták a távoli makrofágok túlélését is csökkenthetik (Gomez és mtsai, 2018). Ezért van nagy jelentősége annak, hogy a DL-11 sokkal kevésbé tűnik toxikusnak és az EV közvetített hatásban is kevésbé befolyásolja a makrofágok működését.

A DL-11 ugyanabban a koncentrációban hat a tumorsejtekre és enyhébb mellékhatás profilú, ezért a Dox-nál előnyösebb szer lehet a jövőben. Az eredmények potenciális szívizomkárosodási markerekre mutattak rá, melyeket további kísérletek során fogok vizsgálni. A molekuláris markerek a személyre szabott orvoslás, a molekuláris onkológiai kezelések potenciális célpontjai lehetnek a jövőben.

7. Következtetések

Kísérleteink során igazoltuk, hogy a dupla transzgénikus egérből izolált kardiomiociták EV-ket bocsátanak ki. A nagyméretű EV-frakció (IEV) 27%-a volt GFP pozitív. A kardiomiocita eredetű EV-k felvételét mikroszkóppal figyeltük meg és áramlási citometriával is mértük. A donor sejtek kondicionált médiumából IEV és sEV-frakciókat izoláltunk, méretüket és koncentrációjukat NTA-val határoztuk meg. Mindkét szer esetében csökkent az IEV termelés, míg a Dox kezelés növelte a sEV leadást.

A szöveti makrofágok képesek felvenni ezeket az EV-ket. A peritoneumból izolált naív makrofágokat kettős jelöléssel, F4/80 és CD11b markerekkel azonosítottuk. Elsősorban a nagyobb méretű makrofágok (LPM) vették fel mind a nagyobb méretű (IEV), mind a kisméretű vezikulákat (sEV).

HL-1 egér szívizomsejt sejtvonalon és C57/Bl egérből izolált peritoneális makrofágokon igazoltuk, hogy a sejtek életképessége csökken a közvetlen kezelések hatására. A Dox kb. 50%-ban volt citotoxikus, a DL-11 jóval kisebb mértékben károsította a sejteket. Génexpressziós szinten kardiomiocitákban a hosszú-nemkódoló RNS-ek expressziója emelkedett meg. A DL-11 sokszorosára növelte a kardioprotektív hatású MHRT expresszióját, mely szerepet játszik a kardiotoxicitás mérséklésében. Dox hatására emellett aktiválódott a linc-p21, mely a szívizomsejtek szeneszcenciájában játszik szerepet. A makrofágok közvetlen kezelésénél a DL-11 – szemben a doxorubicinnel – kevésbé fokozta a makrofágok gyulladással való válaszát.

Központi kérdésünk, hogy a sejtek közötti kommunikáció kulcslépését, az EV felvételt követően milyen változások mennek végbe az akceptor sejtekben. A Nanostring eredményei alapján a Dox-nel és Dox-konjugátummal kezelt kardiomiocita sejtekből származó EV-k az RNS profil alapján a szeneszcencia irányába mozdítják el a makrofágokat. Ennek mértéke is a DL-11-gyel kezelt kardiomiocita EV-k esetén bizonyult mérsékeltebbnek. Feltételezhetjük, hogy a károsodott szívizomsejt eredetű EV-ken keresztüli immunszuppresszív hatás kisebb mértékű. A DL-11 minden kísérletben mérsékelten volt sejtkárosító hatású, kisebb mértékű génexpresszió-változást okozott a vizsgált stressz géneken, és kevésbé fokozta a makrofágok funkció változását.

8. Összefoglalás

A daganatok elleni küzdelemben a terápiás lehetőségek fejlődésének köszönhetően megnőtt a betegek túlélési esélye. A kardiotoxicitás, mint az onkológiában használt gyógyszerek legsúlyosabb mellékhatása egyre több beteget érint és a figyelem középpontjába került. A klinikumban széles körben alkalmazott doxorubicin több, mint 60 éve a kemoterápia meghatározó vegyülete, toxikus hatásának fő célpontjai a szívizomsejtek. Munkám során az antraciklinekkel kezelt kardiomiociták és a makrofágok közötti kommunikáció molekuláris mechanizmusait vizsgáltam. Jelenleg kevés adat áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy az EV-knek – mint az intercelluláris kommunikáció résztvevőinek – milyen szerepe van a kardiovaszkuláris komplikációk kialakulásában.

A kutatás során bizonyítottam a szívizomsejtek és a makrofágok közötti EV-transzfert. Megvizsgáltam a kemoterápiás szerek közvetlen hatását a szívizomsejtekre és a makrofágokra. Központi kérdésünk az volt, hogy a kemoterápiás kezeléseknek kitett szívizomsejtek extracelluláris vezikuláikban milyen üzenetet közvetítenek a makrofágoknak.

A kardiomiocita eredetű EV-k makrofágok általi felvételét két transzgénikus egértörzs keresztezésével létrehozott kondicionált bitranszgénikus egérmodellel igazoltam. A doxorubicin (Dox) és a Dox-konjugátum (DL-11) közvetlen hatásának vizsgálatakor a Dox erősen toxikusnak bizonyult mindkét sejttípus viabilitására, de a DL-11 sokkal enyhébb mértékben volt sejtkárosító hatású. Hasonló eredményeket kaptunk a valós idejű PCR vizsgálatok során. A Dox nagyobb mértékű génexpresszió-változást okozott a vizsgált stressz géneken. A DL-11 kezelés jelentősen növelte a kardioprotektív gén expresszióját, ezáltal szerepet játszik a kardiotoxicitás mérséklésében.

A vezikulák által közvetített hatás vizsgálatakor Dox-nel kezelt EV-k hatására az expressziós mintázat a korai öregedés és a gyulladásos fenotípus irányába mutat, ez a hatás DL-11 esetében sokkal mérsékeltebb, kevesebb gén változott szignifikánsan. Itt is megfigyelhető, hogy a makrofágok szeneszcens állapotba kerülnek, de kisebb a változás mértéke, enyhébb a stressz szignálokra adott válasz. Az eredmények arra utalnak, hogy a DL-11 egy enyhébb mellékhatás profilú szer és a jövőben egy új kezelési stratégia része lehet.

További kutatások szükségesek a kardiotoxicitás és a szövetkárosodás kivédésére irányuló mechanizmusok eléréséhez. Az extracelluláris vezikulák ígéretes terápiás és diagnosztikai szerepet tölthetnek be a modern orvoslásban.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Hegyesi Hargitának, a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet habilitált docensének, hogy mindvégig megértő türelemmel fordult felém. Köszönöm, hogy a kezdetektől felügyelte és hasznos tanácsaival, iránymutatásaival, észrevételeivel segítette munkámat. Remélem, hogy a jövőben, mint PhD hallgatója dolgozhatok együtt a Tanárnővel.

Szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Buzás Editnek, a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette kutatásomat. Köszönöm bizalmát. Megtiszteltetés, hogy a laborjában dolgozhatok.

Külön köszönöm Dr. Csikós Györgynek az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék adjunktusának biztatását és önzetlen segítségét, amellyel végig kísérte az egyetemi éveimet. Nagyon sokat tanulhattam a Tanár Úrtól.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet munkatársainak, mindenekelőtt köszönöm Dr. Láng Orsolyának a mikroszkópos felvételek elkészítésénél tanúsított végtelen türelmét és szakmai segítségét. Köszönöm továbbá Dr. Lajkó Eszternek a DL-11 és az xCELLigence analízissel kapcsolatos támogatását.

Köszönöm férjemnek, Gábornak, kislányomnak, Annabellának és édesanyámnak, Editnek kimagasló támogatásukat, a mindennapokban nyújtott kitartó segítségüket és megértő türelmüket. Hálás vagyok, hogy mindig támogatják a jövőre irányuló terveimet.

10. Irodalom

1. Addgene: <https://www.addgene.org/protocols/kit-free-rna-extraction/>
2. Almeida Paiva R, Martins-Marques T, Jesus K, Ribeiro-Rodrigues T, Zuzarte M, Silva A, Reis L, da Silva M, Pereira P, Vader P, Petrus Gerardus Sluijter J, Gonçalves L, Cruz MT, Girao H. (2019) *Ischaemia alters the effects of cardiomyocyte-derived extracellular vesicles on macrophage activation*. J Cell Mol Med, 23(2), 1137–1151.
3. Anselmo A, Frank D, Papa L, Viviani Anselmi C, Di Pasquale E, Mazzola M, Panico C, Clemente F, Soldani C, Pagiatakis C, Hinkel R, Thalmann R, Kozlik-Feldmann R, Miragoli M, Carullo P, Vacchiano M, Chaves-Sanjuan A, Santo N, Losi MA, Ferrari MC, Puca AA, Christiansen V, Seoudy H, Freitag-Wolf S, Frey N, Dempfle A, Mercola M, Esposito G, Briguori C, Kupatt C, Condorelli G. (2021) *Myocardial hypoxic stress mediates functional cardiac extracellular vesicle release*. Eur Heart J, 42(28):2780-2792.
4. xBioxpedia: <https://www.bioxpedia.com/nanostring-ncounter-technology/>
5. Cesano A. (2015) *nCounter(®) PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA)*. J Immunother Cancer, 3, 42.
6. Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. (1998) *HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(6):2979-84.
7. Dos Anjos Cassado A, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. (2015) *Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function*. Front Immunol, 6:225.
8. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. (2011) *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*. Nanomedicine. 7(6):780-8.
9. Fa HG, Chang WG, Zhang XJ, Xiao DD, Wang JX. (2021) *Noncoding RNAs in doxorubicin-induced cardiotoxicity and their potential as biomarkers and therapeutic targets*. Acta Pharmacol Sin, 42(4):499-507.
10. Földes G. (2018) *A szívszöveti átépülés jelátviteli folyamatai*. (MTA Doktori értekezés) Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Budapest. 1.1. Szívizomsejtek szívelégtelenségben, 9.
11. Fujiu K, Nagai R. (2013) *Contributions of cardiomyocyte-cardiac fibroblast-immune cell interactions in heart failure development*. Basic Res Cardiol, 108(4):357.
12. Genecards Cdkn1a: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN1A>
13. Genecards Fra-1: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOSL1>

14. Gomez I, Duval V, Silvestre JS. (2018) *Cardiomyocytes and Macrophages Discourse on the Method to Govern Cardiac Repair*. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5:134.
15. Gudbergsson JM, Duroux M. (2017) *Extracellular Vesicles From Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Tumor Therapy*. *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators*, Chapter 21, 521-549.
16. Gyires K, Fürst Zs. (2011) *A farmakológia alapjai*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, ISBN: 9789632263243. 15. A daganatos megbetegedések gyógyszerei, 62. Citotoxikus gyógyszerek, 1076-1077.
17. Herrmann, J. (2020) *Adverse cardiac effects of cancer therapies: cardiotoxicity and arrhythmia*. *Nat Rev Cardiol*, 17(8):474-502.
18. Huszár A. (2020) *Az exoszomális miRNS szerepe a szöveti kommunikációban, különös tekintettel a metasztázis képzésére*. (BSc szakdolgozat) Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi kar, Biológiai Intézet, Budapest. 2. Bevezetés, 7.
19. Lenneman CG, Sawyer DB. (2016) *Cardio-Oncology: An Update on Cardiotoxicity of Cancer-Related Treatment*. *Circ Res*, 118(6):1008-20.
20. Linxweiler J, Junker K. (2020) *Extracellular vesicles in urological malignancies: an update*. *Nat Rev Urol*. 17(1):11-27.
21. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. (2011) *The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability*. *Methods Mol Biol*, 740:33-43.
22. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. (2008) *Macrophage activation and polarization*. *Front Biosci*, 13(1), 453-461.
23. Medvedeva GF, Kuzmina DO, Nuzhina J, Shtil AA, Dukhinova MS. (2021) *How Macrophages Become Transcriptionally Dysregulated: A Hidden Impact of Antitumor Therapy*. *Int J Mol Sci*. 6;22(5):2662.
24. MISEV 2018: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>
25. Munder M. (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*, 158(3): 638–651.
26. Muzumdar DM, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. (2007) *A global double-fluorescent Cre reporter mouse*. *Genesis*, 45(9):593-605.
27. OLS: <https://www.ols-bio.de/products/live-cell-analysis-system-xcelligence>
28. Particle-Metrix: <https://particle-metrix.com/technology/2020>
29. Robbins PD, Dorronsoro A, Booker CN. (2016) *Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicle*. *J Clin Invest*, 126(4):1173-80.
30. Rosalind: www.rosalind.bio/nanostring
31. Sawyer DB. (2013) *Anthracyclines and Heart Failure*. *N Engl J Med*, 368(12), 1154–1156.

32. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, Molkentin JD. (2001) *Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein*. Circ Res, 89(1):20-25.
33. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021) *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 71(3):209-249.
34. Teng F, Fussenegger M. (2020) *Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering*. Adv Sci, 27;8(1):2003505.
35. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. (2017) *Biology and biogenesis of shed microvesicles*. Small GTPases, 8:4, 220–232.
36. Uniprot Map3k5: <https://www.uniprot.org/uniprot/O35099>
37. Webdepot:[https://www.webdepot.umontreal.ca/Usagers/wilkinsk/MonDepotPublic/nanoparticle-tracking-analysis-\(nta\).html](https://www.webdepot.umontreal.ca/Usagers/wilkinsk/MonDepotPublic/nanoparticle-tracking-analysis-(nta).html)
38. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. (2004) *Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 286(3):H823- 9.
39. Xie Z, Xia W, Hou M. (2018) *Long intergenic non-coding RNA-p21 mediates cardiac senescence via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Mol Med Rep, 17(2):2695-2704.
40. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. (2018) *Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases*. Int J Mol Sci, 19(12):3805.
41. Yarana C, Thompson H, Chaiswing L, Butterfield DA, Weiss H, Bondada S, Alhakeem S, Sukati S, St Clair DK. (2019) *Extracellular vesicle-mediated macrophage activation: An insight into the mechanism of thioredoxin-mediated immune activation*. Redox Biol, 26:101237.
42. Zhang H, Xu A, Sun X, Yang Y, Zhang L, Bai H, Ben J, Zhu X, Li X, Yang Q, Wang Z, Wu W, Yang D, Zhang Y, Xu Y, Chen Q. (2020) *Self-Maintenance of Cardiac Resident Reparative Macrophages Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Through the SR-A1-c-Myc Axis*. Circ Res, 127(5):610-627.
43. Zhang J, Gao C, Meng M, Tang H. (2016) *Long Noncoding RNA MHRT Protects Cardiomyocytes against H₂O₂-Induced Apoptosis*. Biomol & Ther, 24(1): 19-24.
44. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ETH. (2012) *Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Nat Med, 18(11), 1639-1642.