

ALAPTUDOMÁNYOK

Javítható-e a sejtalapú terápiák hatékonysága poli(ADP-ribóz) polimeráz-inhibitoros előkezeléssel?

Írta: ZOLCSÁK ZITA*, UDVARHELYI ANNA*, JANICSEK ZSÓFIA, SZEPES MÓNICA, DR. KISS LEVENTE

Egy in vitro iszkémia-reperfúzió modell eredményei

Bevezetés

Európában jelenleg a szív- és érrendszeri megbetegedések a halálesetek közel feléért felelősek. Ennek alapján megközelítőleg minden második ember halálát koszorúér megbetegedés, és minden harmadikét stroke okozza [1]. A koronáriabetegségben szenvedők száma az utóbbi 30 évben Észak- és Nyugat-Európában csökkenni kezdett, de Közép- és Kelet-Európában továbbra is erősen növekszik. A WHO legfrissebb hozzáférhető adatai szerint a 75 éves koruk előtt elhunyt férfiak körében 38%, míg a nőknél 42% volt a szív- és érrendszeri betegség következtében elhalálozottak aránya [1]. A miokardiális infarktus egyre eredményesebb kezelése ellenére sem valósul meg a károsodott szívizom funkciójának vissza - állítása, ezért a betegek jelentős részében hosszú távon szívelégtelenség alakul ki. A funkcionális regenerációt létrehozó sejtalapú terápiák alkalmazása - kombinálva a konvencionális módszerekkel - jelentheti a jövőt ezen betegek kezelésében.

Sejtalapú terápiák

Napjainkban az őssejtek terápiás alkalmazása a biológia és az orvostudomány egyik leginkább kutatott és legígéretesebb területe. Az egyik lehetséges felhasználási módot a szívinfarktust követő őssejtbeültetés jelenti [2]. A sejtranszplantációval történő szívizom-regeneráció új távlatokat nyitott az infarktus kezelésében, és több különböző kutatás is bebizonyította, hogy ennek a megközelítésnek valóban kedvező hatása van a sérült szív funkciójának fokozásában [3, 4]. Azonban közel ezer ischaemiás szívbetegségben szenvedő személy vizsgálata kimutatta, hogy a csontvelői eredetű sejtek transzplantációja mindössze 3,66%-os javulást mutatott a bal kamrai ejekciós frakcióban [5-7]. Ez az eredmény jóval az új terápiához fűzött elvárások alatt volt. Ez a kiábrándító adat a sejtalapú terápiák tisztázatlan hatásmechanizmusának lehet következménye. A mechanizmust tekintve a legvalószínűbb feltételezés az, hogy a sejtek parakrin módon befolyásolják a környezetüket, és így hoznak létre pro-angiogenetikus és anti-inflammatorikus hatásokat, de elképzelhető a sejtek direkt kölcsönhatása is [8-12]. Megjegyzendő továbbá, hogy a legtöbb terápiásan hozzáadott sejt elpusztul a posztiszkémiás miokardium agresszív környezetében [13-15]. Egyes irodalmak szerint a terápiásan alkalmazott sejtek hatása kimerül abban, hogy apoptózissal elpusztulva visszafogják a gyulladásos folyamatokat [16], és ez a jelenség akár terápiásan is alkalmazható lehet [17]. A beadott sejtek differenciálódása a célszerv sejtjévé az irodalom alapján nem történik meg, azonban ritkán sejtfúzió tapasztalható [18]. A jelenlegi terápiás megoldások ezért lényegében a mikrokörnyezet befolyásolását tűzik ki célul, elsősorban parakrin mediátorok által. A parakrin faktorok mellett a mikrokörnyezet

befolyásolásában szerepe lehet a sejtek között kialakuló nanocsöveknek is, amelyeken keresztül mitokondriumok és egyéb sejtorganellumok áramlását figyelték meg [19]. A mechanizmusok aránya a regeneráció során is feltehetően dinamikusan változik. Kezdetben a sejtek parakrin gyulladáscsökkentő és anti-apoptotikus hatása, később az érképzés és az elpusztult szívizomszövet pótlása és regenerálása lehet a legfontosabb. A mechanizmusokat tekintve feltételezhető, hogy a hozzáadott sejtek túlélésének növelése a terápia hatékonyságának növekedésével járna együtt, akár parakrin úton, akár sejt-sejt közötti kapcsolatok által fejtik ki. E feltevés a különböző előkezelések hatására elért jobb túléléssel már igazolást nyert [20-23].

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)

Az infarktus kezelése során kialakuló reperfüzio nemcsak oxigént és glukozt, hanem fehérvérsejteket is szállít az érintett területre, s utóbbiak számos gyulladáskeltő faktort, többek között interleukinokat és szabad gyököket bocsátanak ki a sérült szövettel találkozva. A makrofagok interleukinok hatására nitrogén-oxid szintetizálnak, ami L-arginin szubsztrátból nitrogén-monoxidot (NO) termel. A keletkezett nitrogén-monoxidból a mikro- környezetben különösen reaktív nitrogénvegyületek keletkezhetnek: nitrozium kation (NO^+), nitroxil anion (NO^-), illetve szuperoxiddal reagálva a különösen reaktív peroxinitrit (ONOO^-). A szabad gyökök a sejteket károsítják azáltal, hogy DNS-törést, koros fehérjeszerkezetet, lipidperoxidációt okoznak. Az oxidatív DNS-sérülés poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP) nukleáris enzim aktivációját hozza létre. A PARP egy nukleáris enzim, mely DNS-törések felismerésére és javítására képes. Kis noxa esetén a PARP aktivációja segíti a sejt túlélését, a DNS-repair mechanizmusát, nagy noxa esetén azonban a NAD^+ elhasználásával és az ATP-szintézis csökkentésével sejtnekrózishoz vezet **(1. ábra)**.

A PARP gyakorlati jelentősége

Az ADP-ribóz polimerek akkumulációja figyelhető meg stroke-ban, infarktust követően, szívtranszplantációkor, valamint a bélrendszerben, a tüdőben és a szívben szepszis vagy hemorrhagiás sokk esetén. Emelkedett PARP aktivitás figyelhető meg a reperfüziót követő 2. és 24. óra között, ez a reaktív oxigén és nitrogénvegyületek hosszan tartó jelenlétére utal a szívizomban [24]. Jellemzően a nekrotikus zónában és a "veszélyeztetett területen" a legmagasabb az aktiváció. Számos in vivo és in vitro modellben kimutatták, hogy az enzim gátlásával tulajdonképpen direkt módon gátolható a celluláris energiaháztartás összeomlása, ezáltal a szívizomsejtek nekrózisa a peri-infarktusos zónában. Knock-out egerekben a PARP funkcionális génjének hiánya protektívnek bizonyult a reperfüziós károsodással szemben.

A különböző PARP inhibitorokkal végzett kísérletek során az infarktus által érintett zóna mérete csökkent, megőrződött az ATP-készlet és csökkent a kreatinfoszfokináz szintje [25, 26]. Stroke-ban játszott szerepét állatkísérletekkel támasztották alá, PARP knock-out egerekben a közepagi artéria tranzienst okklúziója után jelentősen csökkent infarktusméret volt megfigyelhető, és ez kizárólag a PARP-1 gén termékének hiányával volt magyarázható [27]. Haddad és mtsai Swiss hím egerekben a bal arteria cerebri media 1 órás okklúziójával agyi infarktust okoztak. A PARP-inhibitor PJ34 csökkentette a $\text{TNF}\alpha$ plazmaszintjét 6 óra elteltével, továbbá az mRNS-ek vizsgálatakor mind a $\text{TNF}\alpha$, mind az IL-6, E-szelektin és az ICAM-1

molekulák esetében is szignifikáns csökkenést találtak [28]. Egy 2004-es tanulmányban azt találták, hogy a 90 perces a. cerebri media okklúzió után a PARP szint emelkedett és a NAD⁺ mennyiségének csökkent 1 órás reperfúziót követően. Ugyanakkor PARP-inhibitor csökkentette a káros értékeket 24 órával az infarktust követően. [29].

A PARP aktiváció kapcsolatba hozható a szisztémás gyulladással és a keringési sokkal is, mely összefügg az emelkedett oxigénigény szinttel továbbá az iNOS túlexpresszióval. Az NO és szuperoxid egymással reagálva peroxinitritet hoz létre, és mind a három forma szerepet játszik a kardiális diszfunkció és sokszervi elégtelenség patogenezisében. A peroxinitrit a sokkhoz hasonló patofiziológiai változásokat képes létrehozni, és ezek a változások részben összefüggést mutatnak a PARP aktivációval. A PARP gátlás ilyen körülmények között is előnyösnek mutatkozott [27]. *Virág és mtsai* immunhisztokémiai úton detektálták, hogy a PARP aktivitás már 2 órával a reperfúzió megkezdődése után nőtt a reperfundált miokardiumban, s további 24 óráig emelkedett marad. A legmagasabb PARP aktiváció a nekrosis területén, illetve a peri-infarktuszos zónában volt mérhető. Festési eljárásokkal azt találták, hogy a legnagyobb PARP aktivitás a szívizomsejtekben van, és nem az odavándorló mononukleáris sejtekben. Megállapításuk szerint mivel a PARP aktiváció indukálja a sejtnekrozist a celluláris energetika összeomlása által, a PARP inhibitorok kardioprotektív szerepét ki lehetne használni a terápiában [27]. Egy további kutatási irányt jelent az iszkémiás prekondicionálás, mely közismerten védelmező hatással rendelkezik a szívizom iszkémiás-reperfúziós sérüléseiben. Ennek mechanizmusa minden bizonnyal összefüggésben van a PARP aktivációjával. A prekondicionálás alatt a sejtek kisebb koncentrációban találkoznak reaktív oxigén- és nitrogén vegyületekkel, amelyek mérsékelt PARP aktivációt váltanak ki, vélhetően a PARP autoribozilációját is kiváltva, mely az enzim gátlásához vezet. A későbbi reperfúziós sérülés alatt a nem kezelt egyedekhez képest csillapított PARP aktiválódás következik be, csökkentve a későbbi káros következményeket. *Fiorillo és mtsai* PARP inhibitorral (PJ34) végzett kísérleteikben a gátlószert az iszkémia-reperfúziós károsodást szenvedett sejtekhez adták a reoxigenizáció kezdetekor, s vizsgálták az oxidatív stresszt, a PARP-1, NAD⁺ és ATP depléciót, LDH szintet. A mért paraméterek mindegyike csökkent a PJ34 szerrel kezelt csoportban [30]. Ezekben a vizsgálatokban a postiszkémiás sejtekhez adták a gátlószert, viszont a sejterápia esetén a nagy kihívást az jelenti, hogy a sejtranszplantációt követően a sejtek nagy része elvesz a rossz véráramlás, az iszkémia-reperfúziós károsodás és a gyulladásos faktorok miatt. Ezért kísérleteink célja in vitro körülmények között szimulált iszkémia-reperfúzió (I-R) modellben annak vizsgálata, hogy növeli-e a hozzáadott sejtek PARP gátlása a hozzáadott sejtek életképességét, illetve a posztiszkémiás sejtek életképességét.

Anyagok és módszerek

Felhasznált sejtípusok

Kísérleteinkhez patkányból származó H9c2 kardio - mioblaszt sejtvonalat (ATCC, Wesel, Németország) használtunk. A kardiomioblasztokat 4,5 g/l glükóztartalmú DMEM-ben tenyésztettük, amely tartalmazott még 10% FCS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint, 37°C-on és 5%-os CO₂ környezetben. A sejtenyésztésre tett médiumot 2-3 naponta cseréltük, és a Petri csészék 70-80%-os konfluencia - szintjénél passzáltuk a sejteket. A kísérletekhez 7

és 13 közötti passzázsszámú sejteket használtunk. A H9c2 kardiomioblaszt sejtvonal embrionális patkány szívből származik, szívizomra és vázizomra is jellemző elektrofiziológiai és biokémiai tulajdonságokat mutat, ezért mind szívizom, mind vázizom in vitro modelljeként használatos [31].

In vitro iszkémia-reperfúzió modell

In vitro patkány H9c2 kardiomioblaszt kultúrában az oxigén és glükóz megvonása iszkémiás jellegű viszonyok kialakulásához vezet. A sejtek inkubációja glükózmentes médiumban, 0,4% oxigén (3,25 Hgmm) és 99,6% nitrogén összetételű atmoszférában zajlott 160 percen keresztül (PECON inkubációs rendszer). Az inkubációs rendszer a konfokális mikroszkóp része, segítségével szabályozható a hőmérséklet és az O₂ koncentráció. A szimulált iszkémia optimális időtartamát kísérleti úton határoztuk meg. A két napos protokoll első napján a H9c2 sejteket 42 mm-es tárgylemezre tettük ki, majd egy napig 37°C-os, 5%-os széndioxid szintet biztosító inkubátorban növesztettük. Az egy napos várakozás oka az volt, hogy a sejtek biztosan letapadjanak az új felszínhez, s az új környezetet megszokva, „normál” funkciót (növekedést, sejtciklust, sejt-sejt kapcsolatot) mutassanak. A második napon történt az oxigén és glükóz megvonás, melynek során a glükózmentes médium calcein és ethidium-homodimer festékeket tartalmazott. Konfokális mikroszkóppal 1 kép/perc gyakorisággal felvételeket készítettünk és a két fluoreszcens festék intenzitás változását követtük nyomon. Végpontnak azt az állapotot vettük, amikor az összes sejt kizárólag EthD festődést mutatott (2A és 2B ábrák). A fluoreszcenciák időbeli lefutását értékelve kiválasztottuk azt az időpontot (160 perc), amikor a sejtek megközelítőleg fele, nekrotizált [12].

In vitro sejtalapú terápia modell

A terápiás céllal alkalmazott H9c2 sejteket 3 kísérleti csoportba osztottuk és 1 órási előkezelésnek vetettük alá: (1) fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoport (2) 10 µM PJ34-el kezelt csoport (PARP inhibitor, Inotek Pharmaceuticals Corp., Beverly, MA, USA), (3) 100 µM PJ34-el kezelt csoport. Az előkezelést követően a H9c2 sejteket kétszer mostuk PBS-sel, hogy a PARP-gátlóból ne maradjon az oldatokban, majd a sejteket feltripszineztek a Petri-csészékből, centrifugálással összegyűjtöttük, és 20 000 sejtet adtunk a 12 lyukú lemez minden egyes kompartmentjébe, amelyekben 30 000 "posztiszkémiás" sejt esett át a szimulált ischaemia-reperfúzió. A sejteket további 24 órán át inkubátorban tartottuk, majd laktátdehidrogenáz- felszabadulási és metabolikus aktivitási méréseket, továbbá áramlási citometriás méréseket végeztünk (2C. ábra).

Laktát-dehidrogenáz és malondialdehyd szint mérése

A felhasznált iszkémia-reperfúzió modellt ellenőriztük és a sejtek környezetét, illetve károsodását különböző vizsgálatokkal mértük fel. Az LDH mérés elve, hogy a sejtek nekrozisának mértéke, vagy egy adott anyag citotoxicitása meghatározható a membrán integritását vizsgáló módszerek segítségével. A laktát-dehidrogenáz (LDH) alapvetően intracelluláris enzim, extracellulárisan abban az esetben fordul elő, ha a sejtmembrán sérülésein keresztül képes elhagyni a sejtet. Számos más cito - plazmatikus enzimmel ellentétben stabil, nagy mennyiségben van jelen, és a plazmamembrán sérülését követően azonnal detektálható a sejt-kultúra

felülúszójában.

Az LDH aktivitás egy párosított enzimreakció segítségével határozható meg, melynek során az LDH a laktátot piruváttá oxidálja és közben redukált koenzim (NADH) képződik. A redukált koenzimet a NADH dehidrogenáz oxidálja, eközben az indonitrotetrazóliumból formazan képződik. A formazán mennyiségének növekedése közvetlenül korrelál a lizált sejtek számával, és spektrofotométerrel mérhető.

Az LDH kibocsátást három különböző ok miatt vizsgáltuk, egyrészt az iszkémia-reperfúziós modellünk értékelésére, másrészt, hogy meghatározzuk a PJ34 citotoxicitását és hatásosságát a H9c2 sejteken, harmadrészt a kísérletes csoportokban a nekrotikus sejtek számának összehasonlítására. A modell értékelésére 100 000 H9c2 sejtet használtunk és 24 órával a reperfúzió kezdete után végeztünk méréseket. A PJ34 PARP inhibitor hatásosságának vizsgálatára mértünk két sejtcsoportot melyek 10 μ M illetve 100 μ M PJ34-el voltak előkezelve és egy kontroll csoportot, melyen nem történt előkezelés (**2C. ábra**). Inkubáció után a különböző csoportokból 10 000 sejtet helyeztünk a 12 lyukú lemez minden egyes kompartmentjébe és mindegyik csoportot vagy vehikulummal kezeltük, vagy 400 μ M H₂O₂-t raktunk a sejtekre 2 órára, hogy az inhibitor hatékonyságát vizsgáljuk. A sejtek ezt követően lizálásra kerültek 1% Triton-X-el vagy sejtlizáló oldattal, hogy megkapjuk a háttér és a teljes LDH tartalmat. A harmadik esetben 24 órával a reperfúzió után a sejtek felülúszójában mértük a teljes LDH szintet és összehasonlítottuk a vehikulummal kezelt csoport (H9c2) értékeivel. Az abszorbanciát 450 nm és 650 nm-en mértük és ebből számoltuk a citotoxicitás mértékét. A nekrosis mértéke mellett az oxidatív stressz mértékét is meg kívántuk határozni, ezért malondialdehid mérést végeztünk a felülúszóból. Az utóbbi években számos in vivo és in vitro módszert dolgoztak ki a malondialdehid kimutatására [32]. A malondialdehid (MDA) szint a szimulált iszkémiareperfúziós modellben keletkezett lipidperoxidáció mértékét mutatja meg és tiobarbiturát savra reaktív anyaggal mérhetővé tehető. A mérési protokoll limitációja miatt itt 1 000 000 sejtet használtunk. 5 órával a szimulált reperfúzió kezdete után 50 μ l-t a sejtek felülúszójából egy reaktív elegyhez adtunk, mely 50 μ l 8,1% sodium dodecyl szulfátot, 375 μ l 20%-os ecetsavat (pH 3,5) és 150 μ l desztillált vizet tartalmazott. A keverék 375 μ l frissen előállított, forrási hőmérsékletű tiobarbiturát sav (0,8%) hozzáadásával lett teljes, majd 95°C - on egy órán keresztül inkubáltuk. Szobahőmérsékletre való lehűtés után, 200 μ l felülúszót 96 lyukú microplatekbe osztottuk szét, majd 532 nm-en mértük az abszorbanciát.

Áramlási citométriás mérések

Áramlási citometriával 24 órával a reoxigenizáció után vizsgáltuk a sejteket (FACSCaliburTM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Ennek során a sejteket tripszinálás után reszuszpendáltuk 250 nM calcein-AM (ex/em: 494/517 nm, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), és 350 nM ethidium-homodimer-2 (ex/em: 536/624 nm, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartalmú 500 μ l PBS oldatban. Az áramlási citometria segítségével el tudtuk különíteni a terápiásan hozzáadott sejteket a postiszkémias sejtektől Vybrant DiD jelölésük alapján (ex/em: 633/665 nm; Molecular Probes, USA), és a megfelelő sejtek további analízisre kerültek. A sejthalál mértékének felmérése élő-halott festés alapján történt [33]. Összefoglalva, a maximálisan ethidium-homodimer-2 pozitív, és minimálisan calcein-AM negatív sejteket tekintettük nekrotikusnak, az ethidium-homodimer-2 negatív de calcein-AM pozitív sejteket pedig élőnek, illetve egy külön csoportját a sejteknek melyek

közepesen festődtek, apoptotikusnak **(3. ábra)** Az áramlási citometriás mérések kiértékelése a Weasel programmal történt (WEHI, Ausztrália)

Anyagcsere-intenzitás

A sejtproliferáció és anyagcsere-intenzitás kvantitatív mérése az élő sejtek redukáló képességét felhasználva lehetséges. Számos módszer ismert az irodalomban, amely ezen az elven működik, mi a PrestoBlue reagenst választottuk méréseinkhez. Az oldat membránpermeabilis, kék színű resazurin komponenst tartalmaz, amely nem fluoreszcens. Az élő sejtekben piros színű erősen fluoreszcens resorufin vegyületté redukálódik. Spektrofotometriás kiértékelés esetén az abszorbancia eltolódása mérhető 600 nm-ről (resazurin) 570 nm-re (resorufin).

Statisztika

Az adatok statisztikai elemzése során varianciaanalízist és t-próbát alkalmaztunk a csoportok számától függően. Az adatok átlag±standard hiba(SEM) formában kerültek megadásra. A $p < 0,05$ érték esetén tekintettük a különbségeket statisztikailag szignifikáns eltérésnek.

Eredmények

Szimulált iszkémia-reperfúziós protokoll

Az MDA vizsgálaton alapuló oxidatív stressz szint szignifikánsan emelkedett az iszkémia-reperfúziós modellben (I-R: $13,70 \pm 0,81 \mu\text{M}$) a nem kezelt kontroll sejtekhez képest ($0,47 \pm 0,18 \mu\text{M}$ 4A ábra). Az oxigén és a glükóz megvonása az LDH-szint szignifikáns emelkedés - éhez vezetett a felülúszóban a kontroll körülményekhez képest (kontroll: $0,00 \pm 0,81\%$; I-R model: $29,58 \pm 6,21\%$; **4B. ábra**). Az oxigén és a glükóz megvonása az LDH-szint szignifikáns emelkedés - éhez vezetett a felülúszóban a kontroll körülményekhez képest (kontroll: $0,00 \pm 0,81\%$; I-R model: $29,58 \pm 6,21\%$; **4B. ábra**). A PJ34 PARP inhibitor a használt koncentrációkban nem fejtett ki citotoxikus hatást a H9c2 sejtekre és szignifikánsan megvédte ezeket a sejteket a H_2O_2 által indukált sérülésektől (kontroll + H_2O_2 : $35,14 \pm 1,01\%$; $10 \mu\text{M}$ PJ34 + H_2O_2 : $15,65 \pm 0,95\%$; $100 \mu\text{M}$ PJ34 + H_2O_2 : $15,69 \pm 0,54\%$; **4C. ábra**).

Áramlási citometriás mérések

A terápiásan hozzáadott sejtek áramlási citometriás vizsgálata az élő, az apoptotikus és a nekrotikus populációiban is szignifikánsan nagyobb túlélést mutatott a PARP inhibitoros előkezelés esetén (H9c2: $52,02 \pm 5,01\%$, H9c2 + $10 \mu\text{M}$ PJ34: $63,38 \pm 4,50\%$, H9c2 + $100 \mu\text{M}$ PJ34: $64,99 \pm 3,47\%$), továbbá a PJ34 előkezelésnél a nekrotikus sejtek aránya csökkent (H9c2: $37,23 \pm 4,40\%$, H9c2 + $10 \mu\text{M}$ PJ34: $26,83 \pm 3,49\%$, H9c2 + $100 \mu\text{M}$ PJ34: $24,96 \pm 2,43\%$). Az apoptotikus sejtek arányában nem volt eltérés (H9c2: $10,87 \pm 1,12\%$, H9c2 + $10 \mu\text{M}$ PJ34: $9,22 \pm 1,28\%$, H9c2 + $100 \mu\text{M}$ PJ34: $10,18 \pm 1,55\%$; **5A ábra**). A beállításoknak megfelelően nem volt szignifikáns különbség az I-R modell és a H9c2 kezelt csoport között az élő sejtek (I-R modell: $36,44 \pm 5,05\%$, H9c2: $42,81 \pm 5,11\%$) és nekrotikus sejtek (I-R modell: $43,64 \pm 4,00\%$, H9c2: $37,29 \pm 4,55\%$) arányát tekintve. Fontos azonban, hogy a posztiszkémiás sejtek túlélése magasabb volt, amikor PARP gátlóval kezelt terápiás

sejteket használtunk (H9c2 + 10 μ M PJ34: 52,07 $\pm$ 5,80%, H9c2 + 100 μ M PJ34: 54,95 $\pm$ 5,55%) és a nekrotikus sejtek aránya szintén csökkent (H9c2 + 10 μ M PJ34: 30,18 $\pm$ 4,60, H9c2 + 100 μ M PJ34: 25,52 $\pm$ 3,47%). Az apoptotikus sejtek arányában nem volt statisztikai különbség a csoportok között (kontroll: 19,94 $\pm$ 2,75%, H9c2: 20,23 $\pm$ 2,62%, H9c2 + 10 μ M PJ34: 17,20 $\pm$ 2,42%; H9c2 + 100 μ M PJ34: 20,05 $\pm$ 3,23%; **5B. ábra**).

Laktát dehidrogenáz (LDH) citotoxicitás vizsgálat

A terápiás sejtek PARP gátlóval történő előkezelése esetén az LDH szint szignifikánsan csökkent. 10 μ M és 100 μ M PARP inhibitor használva az LDH kibocsátás 6,04 $\pm$ 3,61%, illetve 8,68 $\pm$ 3,98%-kal mutatott alacsonyabb értéket (**6A. ábra**).

Metabolikus aktivitás

A 10 μ M PJ34 használatával létrehozott PARP-gátlás szignifikánsan serkentette a sejtek összmolekulás aktivitását (H9c2: 0,64 $\pm$ 0,04; 10 μ M PJ34: 0,71 $\pm$ 0,04; önkényes egység). A 100 μ M PJ34-el előkezelt szívizomsejtek esetén csak egy nem szignifikáns trend volt kimutatható (0,68 $\pm$ 0,04; **6B. ábra**).

Diszkusszió

Tanulmányunk során kimutattuk, hogy a terápiás sejtek PJ34-gyel történő előkezelése javítja a túlélésüket, és növeli a posztisztkémiás sejtek életképességét is az általunk alkalmazott in vitro iszkémia-reperfúziós modellben.

A modellt először az oxidatív stressz, nekrotikus tulajdonságok vizsgálatára kalibráltuk, majd megnéztük a PARP-gátló szerünk citotoxicitását és hatásosságát. Azt találtuk, hogy az oxigén és a glükóz megvonásával párhuzamosan nőtt az MDA-szint (ahogy ez in vivo is megfigyelhető), illetve az LDH-méréssel kimutatható membránkárosodás alakult ki. Így az alkalmazott modellünk megfelelően szimulálja az iszkémia-reperfúziós sérülést. A sejtek hozzáadásának időpontját részben irodalmi adatok és részben saját kezdeti vizsgálataink alapján választottuk, utóbbiak azt sugallták, hogy eredményesebb a sejterápia, ha a reperfúzió kezdetét követő 30 perc elteltével adjuk be a sejteket.

A PARP inhibitoros előkezelés hatásosságát áramlási citométerrel vizsgáltuk. A terápiás sejtek PARP inhibitorral való előkezelése javítja saját túlélésüket, ekkor nő a túlélő posztisztkémiás sejtek mennyisége is. Ugyanakkor kezeletlen terápiás sejtek adása nem volt szignifikáns hatással ezen a sejtpopuláción. Így arra következtethetünk, hogy az előkezelés miatti nagyobb túlélő terápiás sejtszám okozza a posztisztkémiás sejtek javuló életképességét. Ez a hatás azonban nem lehet a PARP-gátló kezelés hatása a posztisztkémiás sejtekre, hiszen az előkezelés a terápiás sejtek posztisztkémiás sejtekhez adása előtt történt, melyet egy médiós átmosás követett, így a PARP inhibitor nem juthatott át a posztisztkémiás sejtekhez. A PJ34 védő hatása tehát a kezelés után is tart, és az elhúzó PJ34 hatása nem kapcsolódik az inhibitor folyamatos jelenlétéhez, de kapcsolatban állhat a sérülés okozta pozitív feed-back mechanizmusok végleges megszakításával.

In vivo a hozzáadott sejtek az infarcterület nagyságát csökkenthetik. Korábbi vizsgálataink [12, 34] és más kutatócsoportok eredményei [10, 35] alapján úgy gondoljuk, hogy ez a kedvező hatás kapcsolatos lehet részben a sejt-sejt

kapcsolatokkal és részben a terápiás sejtekből felszabaduló parakrin faktorokkal. Korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy a PARP inhibitorok gátolják az adhézíós receptorok expresszióját és a mononukleáris sejtek infiltrációjának mértékét csökkentik, így gátolva az intracelluláris prooxidánsok termelését [27]. Fontos megjegyezni, hogy mivel a PARP inhibitor blokkolja a DNS-javító mechanizmusokat, ezért felmerült, hogy potenciálisan genotoxikus lehet. Ezt azonban korábbi vizsgálatok cáfolják, egy tanulmány kimutatta, hogy a poli(ADP-ribozil)áció gátlása nem módosítja a genotoxicitást [36], míg egy másik bakteriális reverz mutációs teszttel, in vitro kromoszóma aberráció teszttel és csontvelő micronucleus teszttel arra a következtetésre jutott, hogy a PARP gátlás nem genotoxikus [37]. Kísérleteinkben a PARP gátlással történő előkezelés hatását LDH és PrestoBlue-festődés mérésekkel vizsgáltuk. Ez a két módszer tükrözi mindkét sejtpopuláció nekrozisának mértékét és metabolikus aktivitását a sejtek hozzáadását követően 24 óra elteltével. Az LDH értékek jelentősen csökkentek mindkét alkalmazott koncentrációjú PJ34 előkezelés esetében. Az előkezelés 10 μ M PJ34-gyel szignifikánsan növelte a metabolikus aktivitást a sejt kultúrában szemben a kezeletlen H9c2 populációval, de a 100 μ M PJ34 előkezelés esetén csak egy tendenciózus növekedést tapasztaltunk. A PARP aktiváció erőteljesebb blokkolásával növekvő védelmet várnánk. A magasabb koncentráció kísérleteinkben azonban nem javítja a további jótékony hatást, illetve a PrestoBlue esetén ez csak egy nem szignifikáns növekedést jelent. Így, azt gondoljuk, hogy 10 μ M-os tartományú PJ34 teljes mértékben gátolja a PARP enzimet a H9c2 sejtekben 1 óra elteltével. Az az eredmény, hogy a magasabb koncentrációjú PJ34 nem javítja szignifikánsan a posztiszkémiás sejtek metabolikus aktivitását azt tükrözheti, hogy a magasabb koncentrációjú PARP gátlók metabolikus szuppressziót okozhatnak, azonban ennek a hipotézisnek igazolásához további vizsgálatok szükségesek. Következtetéseinket korlátozza, hogy a két populáció együttes LDH és metabolikus aktivitás szintjét mértük. Azonban ezeket a mérési módszereket gyakran használják a sejt alapú terápiák vizsgálatában és azt gondoljuk, hogy a két csoportot jellemző értékek értékes adatokat adnak tanulmányunkhoz. További, a vizsgálatot limitáló tényezők:

1. Vizsgálatainkat in vitro végeztük, ezen vizsgálati módszer minden előnyével és hátrányával. Hátrányt jelent, hogy a folyamatokat (pl. immunológiai) nem tudtuk teljes komplexitásában megjeleníteni/vizsgálni. Ugyanakkor előnye a módszerünknek, hogy standardizálható: a paraméterek (I-R ideje, hőmérséklet, O₂ koncentráció) könnyen kontrollálhatók, a vizsgálat megismételhető, a terápiás és a posztiszkémiás sejtek mennyisége meghatározható. A 24 óra kokultivációs időt korábbi kísérleteinkre alapoztuk, ekkor már elegendő az idő a sejtek közötti kapcsolatok kialakulására, de még nem történik sejtproliferáció.
2. H9c2 sejt vonallal dolgoztunk. A váz izom vagy patkány szívizom sejtek mellett ezt a sejt vonalat is gyakran használják hasonló kísérletekben [31, 38]. A terápiás sejteink szintén H9c2 sejt vonalból kerültek ki, amely nem őssejt és nem humán sejt vonal. Ugyanakkor korábbi kísérleteink kimutatták, hogy az egészséges H9c2 sejtek javítják a szomszédos, oxidatív stresszen átesett sejtek túlélőképességét. Sőt, a hasonló eredmény a H9c2 és az őssejtek adása esetén azt tükrözi, hogy nem szükségesek multipotens sejteket adnunk

a terápiás hatás eléréséhez, ami kiszélesítheti a sejterápiához szükséges sejtforrást.

Eredményeink összhangban állnak az eddigi, előkezeléssel kapcsolatos irodalmi adatokkal. Yao és *mtsai* [21] lipopoliszachariddal előkezelt mesenchymalis őssejteket adtak in vivo patkányokba. Jobb vaszkularizációt, kisebb mértékű fibrózist találtak a myocardiumban, és a terápiás sejtek túlélőképessége is nőtt. *Hahn és mtsai* [22] növekedési faktorral előkezelt sejteket használtak és a sejtek életképességét 30 perces 0,5%-os hypoxia után vizsgálták. 20%-os növekedést figyeltek meg. Ez a hatás mennyiségileg hasonló az általunk is talált PJ34 gátlószerrel elért eredményünkhöz a H₂O₂ modellünkben. *Kubo és mtsai* a csontvelő eredetű mesenchymalis őssejteket H₂O₂-vel 30 percen keresztül előkezelve a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor szintjének növekedését és az endothelsejt felé történő differenciációt figyelték meg [20]. *Mangi és mtsai* a terápiás sejtek retrovirális úton kialakított Akt1 túlexpresszióját állította be, s ez a szív hatékonyabb működéséhez vezetett [23]. Ugyanakkor ismereteink szerint a mi vizsgálatunk az első kvantitatív életképességi adatokat felmutató vizsgálat, amelyben a terápiás sejtek előkezelése a posztiszkémiás sejteken lévő változást is bemutatja. Összefoglalva tehát a PARP-inhibitorral előkezelt sejtek hozzáadása súlyosan károsodott szívizomsejtekhez javíthatja a túlélést és csökkentheti a nekrozist egy in vitro sejterápiás iszkémia-reperfúzió modellben. Ez a megközelítés □ ha humán sejt, illetve in vivo vizsgálatokban is megerősítést nyer - hatékonyabb sejtalapú terápiához vezethet egy viszonylag egyszerű és gazdaságos előkezelési folyamattal.

Köszönetnyilvánítás

Jelen tanulmány az OTKA 83803, TÉT-SIN, TÁMOP 4.2.2-08/1/KMR-2008-0004, TÁMOP-4.2.1 / B 09/1/KMR- 2010-0001 támogatásával készült el.

Irodalom

1. European cardiovascular disease statistics 2008. [cited 2011; Available from: <http://www.heartstats.org/datapage.asp?id=7683>.
2. Cselenyak, A., et al., Stem cell transplantation in an in vitro simulated ischemia/reperfusion model. J Vis Exp, 2011(57): p. e3575.
3. Dill, T., et al., Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. Am Heart J, 2009. 157(3): p. 541-7.
4. Medicetty, S., et al., Percutaneous Adventitial Delivery of Allogeneic Bone Marrow Derived Stem Cells Via Infarct Related Artery Improves Long-term Ventricular Function in Acute Myocardial Infarction. Cell Transplant, 2011.
5. Paul, D., S.M. Samuel, and N. Maulik, Mesenchymal stem cell: present challenges and prospective cellular cardiomyoplasty approaches for myocardial regeneration. Antioxid Redox Signal, 2009. 11(8): p. 1841-55.

6. Penn, M.S., et al., Stem cells for myocardial regeneration. *Clin Pharmacol Ther*, 2011. 90(4): p. 499-501.
7. Abdel-Latif, A., et al., Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and metaanalysis. *Archives of internal medicine*, 2007. 167(10): p. 989-97.
8. Dayan, V., et al., Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 2011.
9. Ramos, G.A. and J.M. Hare, Cardiac cell-based therapy: cell types and mechanisms of actions. *Cell Transplant*, 2007. 16(9): p. 951-61.
10. Gnechchi, M., et al., Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*, 2008. 103(11): p. 1204-19.
11. Plotnikov, E.Y., et al., Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in coculture. *J Cell Mol Med*, 2008. 12(5A): p. 1622-31.
12. Cselenyák, A., et al., Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Bio*, 2010. 11: p. 29.
13. Wu, K.H., et al., Stem Cell Engraftment and Survival in the Ischemic Heart. *Ann Thorac Surg*, 2011.
14. Singla, D.K., et al., TGF-beta2 treatment enhances cytoprotective factors released from embryonic stem cells and inhibits apoptosis in infarcted myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 300(4): p. H1442-50.
15. Singla, D.K. and D.E. McDonald, Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 293(3): p. H1590-5.
16. Copland, I.B. and J. Galipeau, Death and inflammation following somatic cell transplantation. *Semin Immunopathol*, 2011. 33(6): p. 535-50.
17. Lichtenauer, M., et al., Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study. *Basic Res Cardiol*. 106(6): p. 1283-97.
18. CE Murry, e.a., Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature Reports Stem Cells*, 2004(428): p. 664-8.
19. M Koyanagi, e.a., (10): p. . Cell-to-Cell Connection of Endothelial Progenitor Cells With Cardiac Myocytes by Nanotubes: A Novel Mechanism for Cell Fate Changes? *Circ Res*, 2005(96): p. 1039-1041.
20. Kubo M, L.T., Suzuki R, Ohshima M, Qin SL, Hamano K, Short-term pretreatment with low-dose hydrogen peroxide enhances the efficacy of bone marrow cells for therapeutic angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 292: p. H2582-H2588.
21. Yao, Y., et al., Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci*, 2009. 16: p. 74.

22. Hahn, J.Y., et al., Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardio - myocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 51(9): p. 933-43.
23. Mangi AA, N.N., Kong D, et al., Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. . *Nat Med*, 2003. 9: p. 1195-1201.
24. László Virág, C.S., The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose)Polymerase Inhibitors. *Pharmacol Rev*, 2002(54).
25. Pieper AA, W.T., Wei G, Clements EE, Verma A, Snyder SH, and Zweier JL Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption. *Mol Med*, 2000(6): p. 271-282.
26. J Zhang, V.D., TM Dawson, SH Snyder, Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neuro - toxicity. *Science* 1994(263): p. 687-689.
27. Virag, L. and C. Szabo, The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 2002. 54(3): p. 375-429.
28. M Haddad, H.R., C Bloquel, B Coqueran, C Szabó, M Plotkine, D Scherman, I Margaill, Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADPribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice. *British Journal of Pharmacology* 2006. 149: p. 23-30.
29. A Iwashita, N.T., S Matsuura, S Yamazaki, K Kamijo, J Ishida, H Yamamoto, K Hattori, N Matsuoka, S Mutoh, A Novel and Potent Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitor, FR247304 (5-Chloro-2-[3-(4-phenyl-3,6- dihydro-1(2H)-pyridinyl)propyl]-4(3H)-quinazolinone), Attenuates Neuronal Damage in in Vitro and in Vivo Models of Cerebral Ischemia. *JPET*, 2004. 310: p. 425-436.
30. C. Fiorillo, V.P., L Giannini, C Cecchi, A Celli, N Nassi, L Lanzilao, R Caporale, P Nassi, Protective effects of the PARP-1 inhibitor PJ34 in hypoxic-reoxygenated cardiomyoblasts. *Cell Mol Life Sci*, 2006(63): p. 3061-3071.
31. Sardao, V.A., et al., Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide--characterization of morphological features of cell death. *BMC cell biology*, 2007. 8: p. 11.
32. D Del Rio, A.S., N Pellegrini, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2005. 15: p. 316-328.
33. Palma, P.F., et al., Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 2008. 12(2): p. 108-14.
34. Pankotai, E., et al., The role of mitochondria in direct cell-to-cell connection dependent rescue of postischemic cardiomyoblasts. *Mitochondrion*, 2011.
35. Uemura, R., et al., Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circulation research*, 2006. 98(11): p. 1414-21.

36. Oliveira, N.G., et al., Effect of poly(ADP-ribosyl)ation inhibitors on the genotoxic effects of the boron neutron capture reaction. *Mutat Res*, 2005. 583(1): p. 36-48.
37. Vinod, K.R., S. Chandra, and S.K. Sharma, Evaluation of 5-aminoisoquinoline (5-AIQ), a novel PARP-1 inhibitor for genotoxicity potential in vitro and in vivo. *Toxicol Mech Methods*, 2010. 20(2): p. 90-5.
38. Kimes, B.W. and B.L. Brandt, Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental cell research*, 1976. 98(2): p. 367-81.

Kapcsolat

Dr. Kiss Levente
Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet,
Semmelweis Egyetem,
Tűzoltó utca 37-47.
Budapest, H-1094
Telefon: +36 20 3845753, FAX: +36 1 334 3162,
E-mail: kiss.levente@med.semmelweis-univ.hu