

Doktori (Ph.D.) értekezés

Az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások pathológiai szerepe és mechanizmusai

Váradi Judit



Témavezető: Dr. Tószaki Árpád

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR
GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK
DEBRECEN

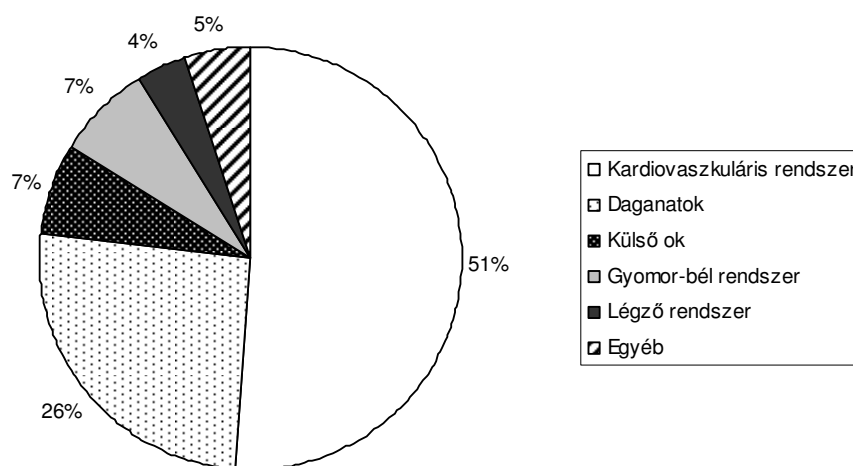
2007

Rövidítések

AF	aortakiáramlás (ml/perc)
CF	kaoronária átfáramlás (ml/perc)
LVDP	balkamrai nyomás (kPa)
VF	kamrafibrilláció
VT	kamrai tachycardia
HR	szívfrekvencia
HO	hemoxigenáz
CO	szénmonoxid
NO	nitrogénmonoxid
NOS	nitrogén oxid szintáz
cGMP	ciklikus GMP
cAMP	ciklikus AMP
TBAHS	tetrabutylammónium hidrogénsulfát
CORM	carbon monoxide releasing molekule
iCORM-3	inaktív CORM-3
AR	α_{1b} -adrenerg receptor
tTG	szöveti trnszglutamináz
TG2	transzglutamináz-2 enzim
TG2 ^{-/-}	transzglutamináz-2 "knock out" homozigóta egér
TG2 ^{+/+}	transzglutamináz-2 vad típusú egér
CrP	kreatin foszfát
PKC	protein kinase C
MAPK	mitogen activated protein kinase
TNF- α	α -tumor necrosis factor

Bevezetés

Napjaink egyik legnagyobb kihívást jelentő betegségcsoportja a kardiovaszkuláris betegségek és azok kezelése. Az utóbbi évtizedben sajnálatos módon megemelkedett a daganatos betegségek gyakorisága, azonban a felnőtt férfiak és nők esetében is még mindig a kardiovaszkuláris betegségek jelentik a vezető halálokat.



1. ábra

A legfontosabb betegségcsoportok okozta halálokok számának megoszlása 2002-ben, Magyarországon. (Az Országos Epidemiológiai Központ szakértői véleménye szerint, 2004)

A legkülönbözőbb halálozási szintű országokban alapvetően ugyanaz az oki struktúra érvényesül. Magyarországon 2002-ben a halálokok 51%-át kardiovaszkuláris betegségek, 26%-át daganatok, 7-7%-át külső okok, illetve gyomorbélrendszeri betegségek, 4%-át pedig légzőszervi kórképek okozták (1. ábra). Az országok között lényegi különbség csak a betegség kifejlődésének és progressziójának idejében, illetve előrehaladásában van, amely az életkortamban mutatkozik meg végül. A vezető halálokok mortalitási szintje nem csak tartósan és jelentősen az EU-átlag felett van már több mint két évtizede, de meghaladja az

Európai Unión belül regisztrált mindenkori maximumot is. A kardiovaszkuláris betegségek diagnosztikus csoportok szerinti számát mutatja az 1. táblázat.

Nők		Férfiak	
<i>Diagnosztikus csoportok (BNO kód)</i>	<i>Betegek száma</i>	<i>Diagnosztikus csoportok (BNO kód)</i>	<i>Betegek száma</i>
Krónikus ischaemiás szívbetegség (125)	378 571	Krónikus ischaemiás szívbetegség (125)	375 655
Magas-vérnyomás betegség (110)	294 908	Atherosclerosis (170)	235 517
Atherosclerosis (170)	291 204	Magas-vérnyomás betegség (110)	182 517
Szívelégtelenség (150)	168 382	Szívelégtelenség (150)	135 272
Agyi infarktus (163)	130 128	Agyi infarktus (163)	130 272
Egyéb cerebrovasculáris betegség (167)	135 035	Angina pectoris (120)	96 432
Angina pectoris (120)	87 270	Egyéb cerebrovasculáris betegség (167)	81 928
Alsó végtagok visszértágulatai (183)	55 426	Heveny szívizomelhalás (121)	57 674
Pitvari fibrilláció (148)	48 667	Cardiomyopathia (142)	46 685
Heveny szívizomelhalás (121)	45 607	Heveny ischaemiás szívbetegség egyéb formái (124)	41 230

1. táblázat

A keringési rendszer betegségek 10 leggyakoribb oka és azok száma 2002-ben, Magyarországon, nemenkénti felosztásban.

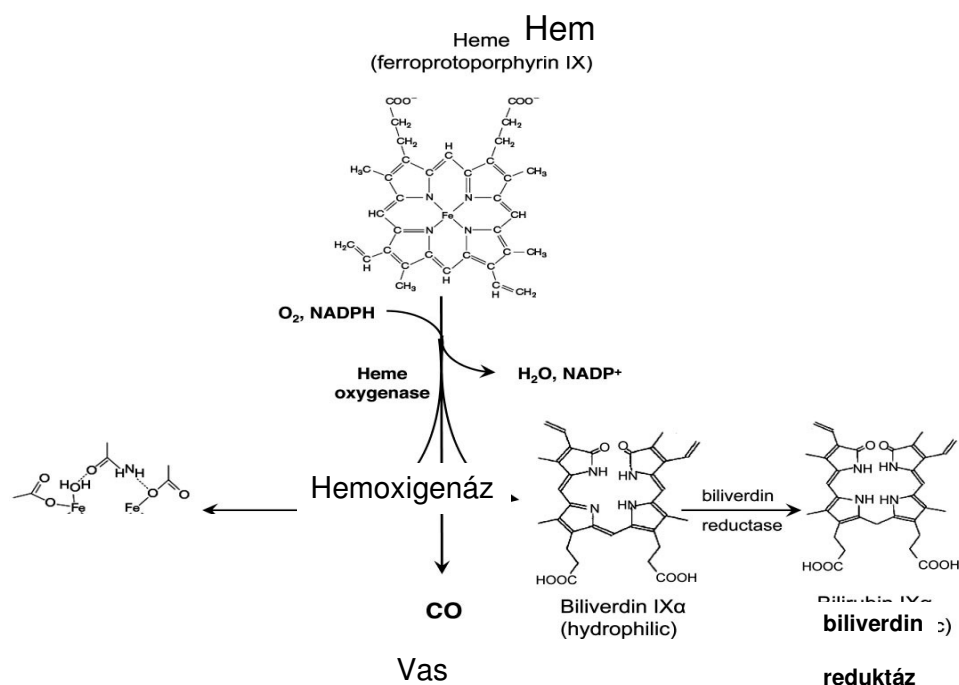
Ma már statisztikai modellekkel mérni tudják egy-egy, vagy több rizikófaktor (pl.: túlsúly, diétahiba, dohányzás) befolyását a mortalitási és morbiditási értékekre. Magyarországon is egyre több gondot fordítanak a betegtájékoztatásra, hogy

csökkentsék a rizikófaktorok befolyását. Mivel a rizikófaktorok teljes eliminálása nem valósulhat meg, így preventív célból nagy szükség van a gyógyszeres kezelésre.

A kardiovaszkuláris megbetegedésekre számos gyógyszeres kezelési lehetőség áll rendelkezésre, de további fejlesztések folynak a hatékonyság növelése érdekében. Ezt segítik azok az alapkutatások, melyek molekuláris mechanizmusokat tárnak fel.

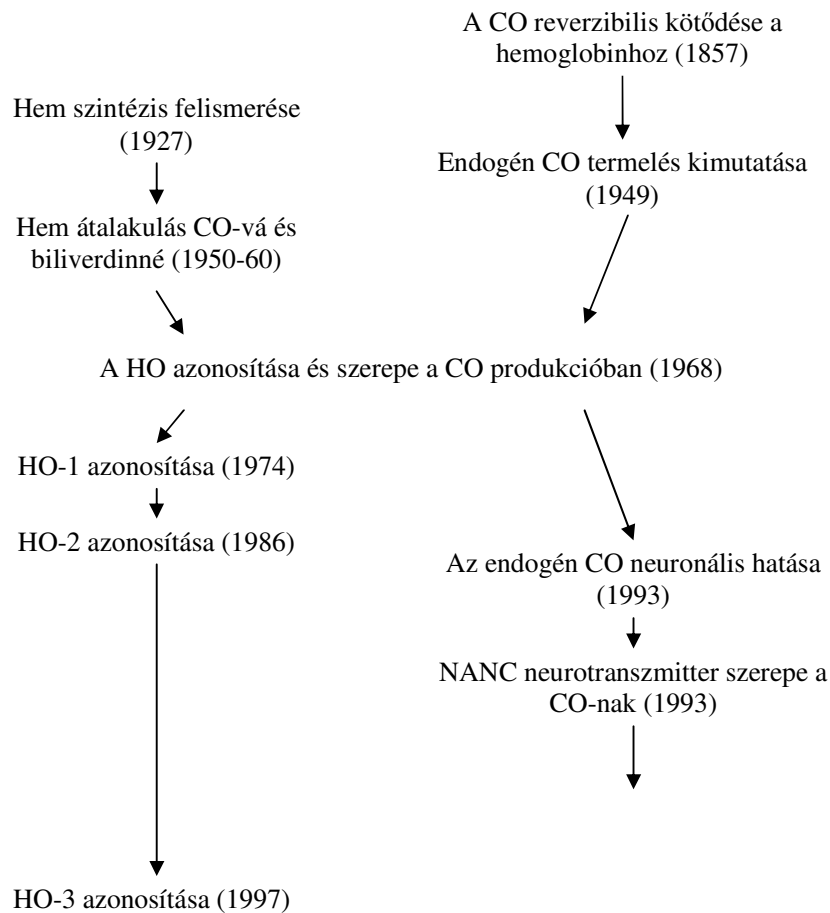
A kardiovaszkuláris betegségek hátterének megismeréséhez és a gyógyszeres terápia fejlődéséhez járulnak hozzá a szén-monoxiddal (CO) kapcsolatos kutatások.

Az endogén CO keletkezésének útját legelőször egy 1968-as közleményben említették Tenhunen és munkatársai. A hemoxigenáz (HO) NADPH és oxigén jelenlétében a hem protoporfirin gyűrűjének α -metén hídjait bontja és oxidálja, melynek eredményeként ekvimoláris CO szabadul fel és vas keletkezik, a hem felhasadt protoporfirin gyűrűje, pedig biliverdinné alakul (2. ábra).



2. ábra

A Hem enzimatisuk átalakulása



3. ábra

A HO-CO rendszer felfedezésének kronológiája

A CO biológiai és fiziológiai szerepének felfedezési kronológiáját a 3. ábra foglalja össze. Legelőször a neurotranszmitter szerepét ismerték fel a CO-nak. A transzmitterekkel foglalkozó kutatók két csoportra osztották a „közvetítő” molekulákat (Wang, 2002). Az első csoportba sorolták az ACh-t, a katekolaminokat, szerotonint, hisztamint, glutamátot, glycint és a GABA-t. A második csoportba, a gázhalmazállapotú transzmitterekhez csoportosították a CO-t akár csak a NO-t és a H₂S-t, amelyet az alábbi okokkal indokoltak:

- A CO kis méretű gáz molekula.
- A CO szabadon permeálódik a membránon.
- Enzimatikusan és endogén módon képződik.
- Az endogén CO biológiai hatása kiváltható exogén CO-dal.

- A CO celluláris hatásai szekunder messengerekkel közvetítődik, vagy nélkülük is kialakulhat.

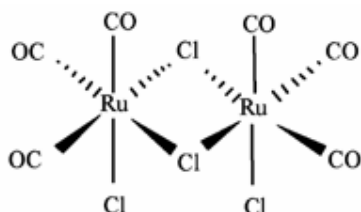
Nemcsak a NO és a CO molekulák, mint gázhalmazállapotú transzmitterek között fedezhető fel strukturális és hatástani hasonlóság, hanem a NOS-NO rendszer és a HO-CO rendszer működésében is. Mind a HO rendszernek és mind a NOS rendszernek létezik indukálható és konstitutív izoformája is. A CO és a NO is a guanil-cikláz aktiválásán keresztül emeli a cGMP szintet, amely szekunder messengerként a kardiovasculáris rendszerben fontos jelátvivőként szerepel. A HO rendszer farmakológiai stimulálásával az endogén CO termelés fokozódását számos kutató kimutatta (Bak és munkatársai 2002). Azt azonban még nem vizsgálták, hogy a különböző koncentrációjú exogén CO kezelés hatására a guanil-cikláz rendszer aktiválásával hogyan módosul a szekunder messengerek koncentrációja az iszkémia/reperfúzió során.

A CO által indukált vasorelaxáció jelenségét 1984-ben figyelték meg, amikor McGrath és Smith (1984) exogén CO hatására bekövetkező koronária relaxációt mutatott ki. A CO terápiás szerepe két lehetséges módon jelenik meg. Egyrészt az előbbieken említett módon a HO rendszer farmakológiai stimulálásával endogén CO képződését érhetjük el, másrészt CO-ot felszabadító molekulákat, az ún. **Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs)** alkalmazása intracelluláris CO-ot produkál. A CORM vegyületek bizonyos átmeneti fém karbonilok, amelyekből CO szabadul fel. A vegyületek több generációját állították már elő, melyek szerkezet-hatás összefüggései alapján Motterlini (2005b) kutatócsoportja ma is további fejlesztéseket végez.

A CORM vegyületek első generációja, a CORM-2 - szerkezetét tekintve trikarbonil-dikloro-ruténium(II) dimer - csak szerves oldószerekben (pl. DMSO) oldódik, így erősen megkérdőjelezte a származékok in vivo történő alkalmazhatóságát. Ráadásul a vegyületekből történő CO felszabadulás csak meghatározott fizikai (hidegfény expozíció) vagy kémiai (pl. erős elektron donor ligand jelenléte – DMSO) hatására következik be (Motterlini és mtsai, 2002a,b). Az oldékonyságbeli probléma további fejlesztésre készítette a kutatókat, melynek eredményeként kialakították a második generáció jellegzetes struktúráját (4. ábra).

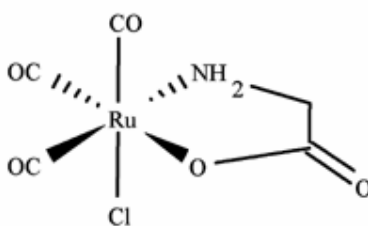
A CORM-3 vegyületekben az átmeneti fémhez egy glicin molekulát kapcsoltak növelve ezzel a CORM vegyület vízoldékonyságát. A CORM-3 további előnyös tulajdonsága, hogy kevésbé toxikus, mint a CORM-2, valamint bizonyították, hogy

mind in vitro, mind in vivo körülmények között bekövetkezik a CO képződése (Clark és mtsai, 2003; Foresti és mtsai, 2004b). A további előrelépést jelentett a CORM-3 esetén, hogy a CO felszabaduláshoz szükséges pH és az erős elektron donor ligand is biztosítva van a biológiai környezetben.



Tricarbonyldichloro ruthenium(II) dimer
 $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$

CORM-2



Tricarbonylchloro(glycinato)ruthenium(II)
 $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})]$

CORM-3

4. ábra

A CORM-2 és a CORM-3 szerkezete.(Sawle és mtsai, 2005)

A CORM-3 effektív dózisa alacsony, mikromoláris tartományban alkalmazása viszonylag biztonságos, amelyből felszabaduló CO az endogén CO koncentrációjával egyezik (Clark és mtsai, 2003; Guo és mtsai, 2004). Bízató kísérleti eredményeket kaptak a CORM-3-mal kapcsolatos vizsgálatok során. Motterlini és munkatársai (2002a,b; 2005 a,b) igazolták, hogy a CORM-3-ból keletkező CO vasodilatációt eredményez, szabályozni képes az artériás nyomást, meghosszabbítja a transzplantált graftok túlélését, mely által gyulladáscsökkentő hatást fejt ki és fokozza a vesefunkciót a gyógyszer indukálta toxicitás esetén. A közelmúltban újabb CORM

vegyületet dolgoztak ki, melynek a CORM-3-hoz viszonyított előnyösebb fiziológiás tulajdonságait már közölték (Motterlini, 2005a). Szerkezetét tekintve, a CORM-A1 molekula $\text{Na}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ már központi, átmeneti fém atomot nem tartalmaz.

A biztató eredmények ismeretében remélhetjük, hogy a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében a CORM molekulák további fejlesztése új terápiás lehetőséget fog adni a közeljövőben.

Az iszkémiás szívbetegségek kezelésének további fejlődéséhez járulnak hozzá a napjainkban fellendült apoptózis kutatások. Csak az utóbbi évtizedben alakult ki az az új kutatási irány, amely az apoptózis szemszögéből is vizsgálja a szív- és érrendszeri megbetegedéseket. Bár az apoptózisráta a szívelégtelenségben viszonylag alacsony, de még mindig nagyobb mértékű, mint a normális szívben, ahol ez elhanyagolható. A szívizomsejtekben bekövetkező apoptózist számos induktor molekula katalizálja. A myocardiumban a legerőteljesebbek a szabad gyökök, a citokinek (αTNF , FAS), autokoidok (angiotenzin II) és a NO. Az indukciót követően számos útvonalon indulhat meg a sejtelhalás folyamata. Ezen jelátvivő folyamatok mechanizmusának feltárása történik ma is.

Az apoptózishoz vezető egyik jelátviteli út a mitokondriumban zajlik. A sejtelhalás mindkét mechanizmusa, a nekrozis és az apoptózis során is megnyílik az MPTP (mitochondrial permeability transition pore), viszont az apoptózis során hamar bezárul, így biztosítva a szívizomsejtek ATP-háztartásának egyensúlyát (Fisher és mtsai, 2000). Mivel a szívizomsejtek tartalmazzák a térfogategységre vonatkoztatott legtöbb mitokondriumot, így kiemelkedő szerepe van mitokondriális apoptotikus útvonalnak.

Az elhaló sejtekben indukálódó apoptózis-specifikus fehérjéket mutattak ki, amelyeket funkciójuk alapján transzglutaminázoknak neveztek el (tTG). Ezek az enzimek a sejtek legkülönbözőbb helyein lokalizáltak és a sejtfehérjék keresztkötésével stabilizálják az apoptotikus sejt szerkezetét, melyhez Ca^{2+} -t igényelnek. A transzglutamináz családhoz tartozó TG2 enzim abban különbözik a többi tTG-től, hogy a G proteinhez hasonlóan a transzmembrán szignál folyamatokban játszik szerepet és sejtfelszíni adhézis mediátorként is viselkedik. Számos betegségben igazolták a TG2 patológiai szerepét (Fesus és Piacentini, 2002), így a Huntington kórban, a diabetes mellitusban és a malabszorpciós szindrómában. Ezen ismeretek alapján feltételeztük, hogy a myocardiumban nagy "térfogati"

arányban jelen lévő mitokondriumok energiaellátottságára befolyással lehet a TG2 jelenléte, vagy hiánya az iszkémia/reperfúzió során.

Célkitűzések

Munkánk során az ischemia/reperfúzió során bekövetkező patológiás folyamatok mechanizmusának vizsgálatát és farmakológiai befolyásolását tűztük ki célul. Vizsgálataink középpontjában a szén-monoxid molekula állt, melynek „endogén” formájának citoprotektív hatása ismert.

- Kísérleteink egyik célja az volt, hogy az exogén CO védő hatását vizsgáljuk a cGMP/guanilát cikláz rendszer szemszögéből. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a különböző koncentrációjú exogén CO kezelés hogyan befolyásolja a guanilát cikláz rendszerben jelenlévő szignálmolekulák keletkezését. Fontosnak tartottuk továbbá, hogy a 0,001%, 0,01% és 0,1% CO kezelés mellett, *in vitro* körülmények között izolált patkányszív modellen kövessük a kardiális funkciókat (szívfrekvencia, koronária átfolyás, aorta átfolyás, bal kamrai nyomás). Vizsgáltuk továbbá az infarktusos terület nagyságát és a reperfúzió indukálta ventrikuláris fibrilláció előfordulását a cGMP, cAMP szintek és a guanilát cikláz aktivitásának tükrében, hogy összefüggést találjunk a szignálmechanizmusok és a fiziológiai paraméterek között az exogén CO kezelés függvényében.
- Vizsgálni kívántuk a CORM-3-ként elnevezett, egyik szén-monoxidot felszabadító molekula ischemia/reperfúzió okozta ventricularis fibrillációra, és ventricularis tachycardiára, valamint a myocardialis infarctusra gyakorolt hatását. Célkitűzéseink közé tartozott továbbá, hogy a különböző koncentrációjú CORM-3 kezelés során felszabaduló CO hogyan befolyásolja az ioncsatornák működését, valamint a CORM-3 feltételezett védő hatása tükröződik-e az iszkémiás területek csökkenésében.
- Munkánk harmadik részében az apoptózisban szerepet játszó transzglutamináz-2 enzim myocardiumban betöltött szerepét tanulmányoztuk. Kísérleteinkkel választ kerestünk arra, érinti-e a légzési láncot a TG2 jelenléte, vagy hiánya az iszkémia/reperfúzió alatt, mennyiben módosul a nagyenergiájú foszfátok produkciója a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egerek myocardiumában. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy a szívizomsejteken is expresszálandó α_{1b} -adrenerg receptor (AR) - amelyen keresztül a TG2 intracelluláris szignálfolyamatot mediál - jelenlétének van -e szerepe az iszkémia/reperfúzió következtében kialakuló kóros folyamatokban.

Kísérleti állatok

Kísérleteink első és második részében hím Sprague-Dawley patkányokat a harmadik részben hím vad típusú (TG2^{+/+}) és TG2 „knock out” homozigóta (-/-), AR^{-/-} egereket használtunk. Az állatokat a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Animals” előírásainak megfelelően tartottuk és a kísérletek során is így jártunk el (NIH publication no. 86-23, 1985).

Módszerek és anyagok

Az exogén CO vizsgálatához kapcsolódó módszerek és anyagok

Izolált „dolgozó-szív” preparátum

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat (270-340 g) használtunk. Az állatokat intraperitoneálisan adott nátrium-pentobarbitállal (60 mg/tts kg) érzéstelenítettük, majd a trombusképződés kivédésére iv. heparint (500 IU/kg) adtunk. A heparin injektálást követően a mellkast megnyitottuk és a szívet kimetszettük, melyet hideg perfúziós oldatba helyeztünk. A preparálást követően a szívet az aortán és a vena pulmonaris-on keresztül ún. „dolgozó-perfúziós” készülékkel perfundáltuk. Perfúziós oldatként módosított Krebs-Hanseleit bikarbonát puffert használtunk, amelynek összetétele a következő (mM-ban kifejezve): 118 NaCl, 5,8 KCl, 1,8 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 0,36 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 5 glükóz. A perfúziós oldatot előzőleg 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével telítettük (pH: 7,4, 37 °C). A szíveket 5 percig Langendorff- módszer szerint perfundáltuk 37 °C-on és konstans perfúziós nyomáson, mely 100 cm-es vízoszlop nyomásával egyenértékű (10 kPa). Az atmosféri periódust (vér és alakos elemeinek eltávolítása) követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk és regisztráltuk a szívfunkciókat. Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a koronária átáramlást, pedig a szívből kicsöpögő folyadék 1 percen keresztül történő gyűjtésével mértük.

Ischemia/reperfúzió kiváltása és a CO kezelés

Tíz perc aerob perfúziót követően elzártuk mind a bal pitvarba történő beáramlás mind a bal kamrából történő kiáramlás útját, majd 30 percig így teljes (globális) iszkémiát hoztunk létre. A reperfúzió megindításához megszüntettük az elzárásokat. A 120 perces reperfúzió első 10 percében a perfúziót Langendorff módban végeztük, hogy elkerüljük az irreverzibilis kamra fibrillációt (VF) gyakori előfordulását. A szíveket különböző koncentrációjú CO kezelésnek vetettük alá. Az iszkémia kiváltása előtti 10 percen és a Langendorff reperfúzió alatt CO-t tartalmazó perfúziós folyadékot áramoltattunk át. A CO koncentrációját az egyes csoportoknál 0,001, 0,01, 0,1 (v/v)% -ra állítottuk be. Az iszkémia ideje alatt a

myocardium kiszáradástól való védelméért a szívet körülvevő üvegedényt lefedtük és így a páratartalmat konstans értéken (90-100%) tartottuk.

Mért paraméterek

A kísérletek alatt komputeres regisztrációs berendezés (AD Instruments, Australia) segítségével regisztráltuk az epikardiális elektrokardiogramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el. Az EKG-kat elemeztük a kamrafibrilláció (VF) és a kamrai tachycardia (VT) előfordulásának meghatározásához. Az EKG segítségével ellenőriztük, hogy a VF reverzibilis (mely során a szív spontán visszatért a normális ritmusba), vagy irreverzibilis (a reperfúzió első 3 percében folyamatosan fennállt) volt-e. Iszkémia előtt és a reperfúzió alatt regisztráltuk a szívfrekvencia (HR), a koronária átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét. A bal kamrai nyomást (LVDP) a bal pitvaron és a mitrális billentyűn keresztül a bal kamrába vezetett katéter segítségével regisztráltuk.

Az infarktusos terület meghatározása

Az infarktusos terület meghatározásához a preparátumokat a kísérlet végén 15 ml 1%-os trifeniltetrazolium-klorid oldattal perfundáltuk az aorta kanül egyik oldalsó ágán keresztül, majd a mintákat -70 °C-on tároltuk a további analízisig. A fagyasztott szíveket az apico-bazális axisra merőlegesen transzverzálisan szeleteltük és 2-3 mm vastag metszeteket készítettünk. A metszetekről eltávolítottuk a nedvességet, majd lemértük a tömegét és tárgylemezek közé helyezve szkenneltük. Az infarktusos területet minden kísérlet végén meghatároztuk, majd a területeket pixelben megadva számoltuk ki. Az ép kamrai szövetet a TTC élénk vörös színűre festi, míg az infarktusos terület nem veszi fel a festéket, így az fehérén marad. A területeket planimetriás software alkalmazásával határoztuk meg, majd a metszetek tömegével felszoroztuk és összegeztük, hogy megkapjuk a veszélyeztetett („risk”), illetve az infarktusos terület tömegét (teljes balkamrai tömeg milligrammban kifejezve). Az infarktusos terület nagyságát, a veszélyeztetett területre („risk area”) vonatkozó %-os arányban fejeztük ki.

cAMP és cGMP szintek meghatározása a szívizomban

Az iszkémiás, nem iszkémiás és az iszkémiás/reperfundált szívizomból a cAMP és a cGMP koncentrációkat radioimmunoassay kiték segítségével mértük (Du Toit és mtsai, 2001). A cGMP meghatározáshoz a lefagyasztott szívizom mintákat fagyasztva szárítottuk és a 12-20 mg-nyi szárított mintákat 5%-os triklórecetsavban extraháltuk. Az extraktumokat háromszor 5-6 perces ciklusokban éterrel mosattuk, majd a mintákat a tízszeresére hígítottuk és acetileztük a ^{125}I cGMP meghatározáshoz. Az cGMP vizsgálat során az IC_{50} minden csőben 30 pmol-nak adódott. A cAMP meghatározásához 15-25 mg fagyasztva szárított mintákat perklórsavval extraháltunk, majd semlegesítettük és mértük. Az cAMP vizsgálat során az IC_{50} minden csőben 1,79 nmol-nak adódott.

A guanilát cikláz aktivitás meghatározása

A guanilát cikláz aktivitás meghatározására szívizom preparátumot használtunk. A szöveti preparátumokat (50 mg tömegű minták) 4 °C-os homogenizációs pufferben üveg homogenizátorral roncsoltuk. A homogenizátumokat 100000 g-n 60 percen keresztül 4 °C-on centrifugáltuk, melyeknek felülúszója tartalmazta a citoszol frakciót. Az üledéket 1% triton X-100-at tartalmazó homogenizációs pufferben reszuspendáltuk és 15 percig 4 °C-on inkubáltuk. A mintákat 100000 g-n 60 percen keresztül 4 °C-on centrifugáltuk és a felülúszót kinyertük. A guanilát cikláz aktivitást aliquotonként 15 µg proteint tartalmazó mintákból mértük és fmol-ban fejeztük ki.

A CORM-3 vizsgálatával kapcsolatos módszerek és anyagok

Izolált „dolgozó-szív” preparátum készítése

A szív izolálását, perfundálását, az iszkémia kiváltását és a reperfúziót az előbbi fejezetben leírtak szerint végeztük az alábbi kezelések közbeiktatásával.

A kísérlet menete a CORM-3 vizsgálatban

A kísérlet során három CORM-3-mal kezelt csoportot és egy nem kezelt, kontroll csoportot tanulmányoztunk. A kezeletlen csoport esetén 10 perces aerob perfúzió előzte meg a 30 perces iszkémiás periódust. A kezelendő csoportnál a vér myocardiumból való kimosását követően a CORM-3 tartalmú infúziós oldatot egy infúziós pumpa segítségével 10 percig az aortakanül oldalágába infundáltuk. A kezelés során a perfúziós folyadékban egyenként 10, 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációt alkalmaztunk a vizsgált anyagból. Ezt az eljárást azért alkalmaztuk, hogy megvédjük a CORM-3-at az infundálás előtt bekövetkező oxidációtól. Így a hatóanyag tartalmú infúziót az iszkémia előtt 10 perccel indítottuk és csak az iszkémia kezdetéig tartottuk fenn. A 30 perc iszkémiát 120 perc reperfúzió követte, amely során a szív funkciókat, az arrhythmia előfordulását, az infarktusz területét, valamint az alábbiakban leírt celluláris Na^+ , K^+ és Ca^{2+} meghatározásokat végeztük el.

A szöveti Na^+ , K^+ és Ca^{2+} mérése

A reperfúziót követően a szíveket 0-5 °C-ra azonnal lehűtöttük és 5 percre 100 mmol/l triszhidroxi-amino-metánt (Tris puffert) és 220 mmol/l szacharózt tartalmazó oldatba merítettük. Ezzel a perfúzióval az volt a célunk, hogy kimossuk az ionokat az extracelluláris térből és leállítsuk a sejtmembrán iontranszportjaiért felelős enzimaktivitást. A myocardium 5 perces hideg pufferrel történő mosásával így az ionok több, mint 90%-át távolítjuk el az extracelluláris térből (Pridijan és mtsai, 1987). A kimosást követően a szíveket 48 órán keresztül 100 °C-on szárítottuk és 20 órán át 550 °C-on hamvasztottuk. A hamut 5 ml 3M salétromsavval oldottuk és ionmentesített vízzel tízszeresére hígítottuk. A myocardális Na^+ -ot 330,3 nm-en a

K^+ -ot 404,4 nm-en, a Ca^{2+} -ot pedig 422,7 nm-en mértük levegő-acetilén lángban atomabszorpciós spektrofotométerrel (Perkin-Elmer 1100-B).

A TG2^{-/-} egereken végzett kísérletre vonatkozó módszerek és anyagok

A preparátumok feldolgozása, a meghatározandó komponensek extrahálása

A kísérletet követően a mintákat folyékony nitrogénnel azonnal lefagyasztottuk hogy megvédjük a nagy energiájú foszfátokat az enzimatis bomlástól, majd a myocardium-kamra preparátumokat -80 C°-on tartottuk. A meghatározáshoz a szívizom preparátumot mozsárban, folyékony nitrogénben elporítottuk és milligrammonként - nedves tömegre vonatkoztatva - 50 µl, 60%-os metanollal extraháltuk. Az adenzin és kreatin foszfát extrahálása -80 C°-on történt. Másnap 12000 g-n, 4 C°-on, 20 percen keresztül centrifugáltuk, a felülúszókat a meghatározásig -80 C°-on tároltuk. A mintákat közvetlenül a mérés előtt felolvadni hagytuk és a megfelelő eluenssel 1:1 arányban hígítottuk.

Az ATP, ADP, AMP, CrP meghatározása folyadék kromatográfiás módszerrel

Az adenzin foszfátok meghatározása 215 mmol/l KH_2PO_4 , 2,3 mmol/l TBAHS és 5% metanolt tartalmazó eluenssel történt, melynek pH-ját 6,5-re állítottuk be 8 M KOH-dal. A kreatin-foszfát meghatározásához 14,7 mmol/l KH_2PO_4 , 1,15 mmol/l TBAHS összetételű mozgó fázist alkalmaztunk, melynek pH-ját 8 M KOH-dal 5,3-ra állítottuk be. Az eluensek áramlási sebessége 1,0 ml/perc volt. Az álló fázisként mindkét esetben egy reverz fázisú, C_{18} -as töltetet tartalmazó oszlopot választottunk (LiChrosorb 5 RP 18, 150×4,5 mm×1/4" Valco, Varian co.). A csúcsok azonosítását UV detektorral végeztük, az adenzin-foszfátok esetén 254 nm-en, a kreatin foszfátnál 210 nm-en. A mérések Kauer típusú kromatográfiás készülékkel történtek, melynek részei: Knauer WellChrom HPLC pumpa K-1001, Knauer degasser, Knauer WellChrom UV detektor K-2600. A mintákat 20 µl-es hurkon keresztül manuálisan injektáltuk egy Rheodyne típusú injektoron át. A mérési adatokat a Eurochrom 2000 szoftver (Knauer) segítségével gyűjtöttük össze és értékeltük.

Statisztika

A szívfunkciókat (HR, CF, AF, LVDP), az infarktusos területet, a cAMP, cGMP, ATP, ADP, AMP és CrP szinteket, a myocardialis ionok mennyiségét az arrhythmiákat és az arrhythmiák időtartamát, a sinus ritmust számtani középpel adtuk meg. Hasonlóképpen jártunk el az adenozin foszfátok és a kreatin foszfát mérési eredményei esetén is. Először kétutas variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk van-e szignifikáns különbség a különböző csoportok értékei között. Amennyiben különbség volt, úgy a CO-val és a CORM-3-mal kezelt csoportok értékeit, a kezelést nem kapott kontroll csoport értékeivel Dunnett próbával hasonlítottuk össze. Mivel a kamrafibrilláció (VF) és a kamrai tachycardia (VT) nem parametrikus eloszlást mutat, az egyes csoportokat a szignifikancia meghatározása végett χ^2 teszttel hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $p < 0,05$.

Eredmények

A CO-val kapcsolatos eredmények

A CO hatása a szöveti cAMP, cGMP szintekre és a guanilát cikláz aktivitásra

Eredményeink szerint, az iszkémia kiváltása az azt követő 10. és 30. percben kis mértékű, de szignifikáns növekedést eredményezett a cAMP és cGMP szintekben. (2. táblázat). A szöveti nukleotid koncentrációk azonban a 40. percet követően a normál értékre csökkentek vissza. A 0,001% CO tartalmú perfúziós folyadék alkalmazása szignifikánsan emelte a szöveti cAMP és cGMP tartalmát a kontroll csoport adataihoz képest. A cAMP koncentrációját $0,30 \pm 0,03$ nmol/g-ról $0,52 \pm 0,05$ nmol/g-ra, a cGMP koncentrációját $25,8 \pm 3,0$ pmol/g-ról $111,5 \pm 11,2$ pmol/g-ra növelte. A nukleotid koncentrációkat nmol/g és pmol/g nedves tömegre vonatkoztattuk. Hasonló tendenciát figyeltünk meg a 0,01% CO kezelést követően. Eredményeink azt mutatják, hogy nincs jelentős különbség a 0,001% és a 0,01% CO-val kezelt csoportok cAMP és cGMP szintjeiben. A kísérletek során kapott cGMP eredmények jól tükröződnek a megfelelő guanilát cikláz aktivitási értékekben. A kezeletlen csoport adataihoz képest - 184 ± 25 fmol/mg protein - a guanilát cikláz aktivitási értékek a 0,001% CO-val kezelt csoport esetén 442 ± 38 fmol/mg proteinre, a 0,01% CO-val kezelt csoport esetén 463 ± 44 fmol/mg proteinre emelkedtek.

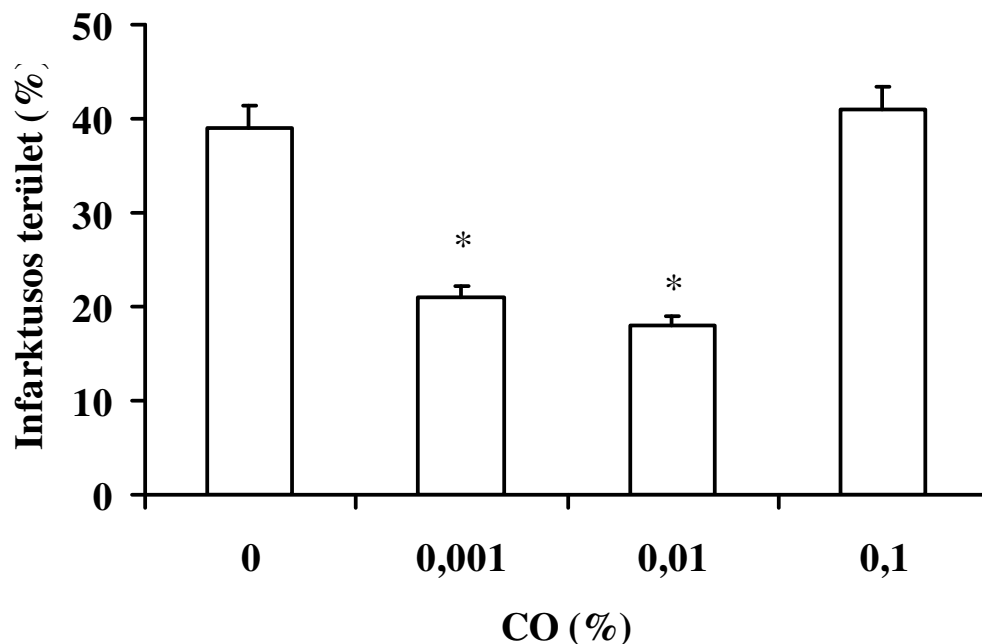
	Aerob perfúzió, kontrol	10 perc iszkémia után	30 perc iszkémia után	30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió után	30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió után. Az exogén CO tartalom 0,001%.	30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió után. Az exogén CO tartalom 0,01%.
cAMP nmol/g nedves tömeg	0.28 ± 0.02	0.46 ± 0.03*	0.38 ± 0.03*	0.30 ± 0.03	0.52 ± 0.05*#	0.54 ± 0.05*#
cGMP pmol/g nedves tömeg	26.4 ± 2.3	36.1 ± 2.8*	33.7 ± 2.6*	25.8 ± 3.0	111.5 ± 11.2*#	120.8 ± 13,6*#
Guanilát cikláz fmol/mg protein	181 ± 15	240 ± 26*	233 ± 26*	184 ± 25	442 ± 38*#	463 ± 44*#

2. táblázat

A cAMP, cGMP koncentrációkat és guanilát cikláz aktivitást 10 perc iszkémia, 30 perc iszkémia és 30 perc iszkémia/120 perc reperfúzió után határoztuk meg. Az egyes csoportokban n = 6 szívet vizsgáltunk, s az összehasonlításokat a *p<0,05 és #p<0,05 a kezeletlen csoportokhoz végeztük el.

A CO hatása az infarktusos terület nagyságára és a reperfúzió indukálta VF előfordulására

A reperfúziót követően meghatároztuk az infarktusos területek nagyságát mind a kezeletlen, mind pedig a CO-val kezelt kísérleti csoportoknál (5. ábra). A 0,001% és 0,01% CO jelenlétében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az infarktusos terület méretében. Számszerűen, az iszkémia/reperfúzió után átesett és nem kezelt szívek infarktusos területének aránya 39%±5%-ról 21%±3%-ra csökkent a 0,001% CO-val kezelt csoportban, a 0,01% CO-val kezelt csoport esetén 18%±4%-ra redukálódott. Lényeges eltérést tehát nem tapasztaltunk az infarktusos terület arányaiban a 0,001% és 0,01% CO kezelést követően. A CO koncentrációját 0,1%-ra tovább növelve, azonban a kontroll csoport értékeihez közeli eredményt kaptunk (5. ábra).

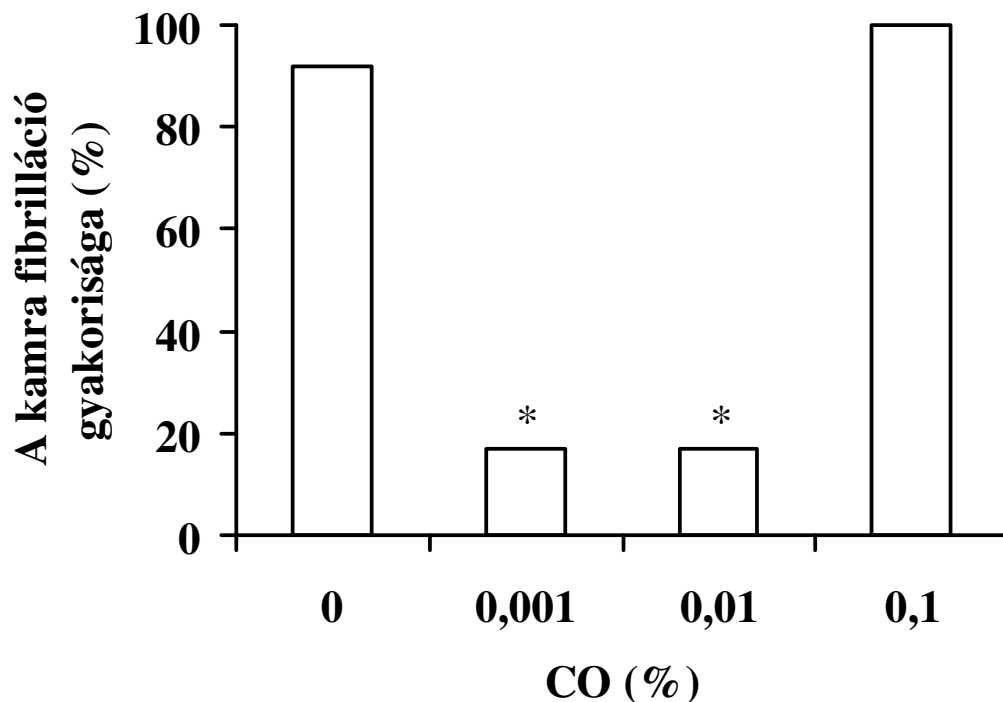


5. ábra

A CO kezelés hatása az infarktusos terület nagyságára.* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A 6. ábra az iszkémia/reperfúzió átesett kontroll és a 0,001%, 0,01%, 0,1% CO-val kezelt szívekben a kamrafibrilláció előfordulási százalékos arányát mutatja. Az ábráról leolvasható, hogy a 0,001%-os és a 0,01%-os CO kezelés jelentős mértékben 92%-ról ($p < 0,05$) 17%-ra ($p < 0,05$) csökkentette a reperfúzió indukálta VF előfordulását a kontroll csoporthoz képest. Ha a CO koncentrációját viszont 0,1%-ra megnöveltük, a reperfúzió indukálta VF a vizsgált minták mindegyikében kamrai tachycardiával, vagy bradycardiával és különböző ritmusos áramlási zavarokkal együtt jelentkezett.

A reperfúzió indukálta VF előfordulásának vizsgálati eredményei és az infarktusos területek összehasonlított adatai alapján azt állapítottuk meg, hogy az exogén CO kezelés esetén a 0,1% CO koncentráció egyértelműen kardiotoxikus hatást eredményezett (6. ábra).



6. ábra

A különböző koncentrációjú CO kezelés hatása a kamra fibrilláció gyakoriságára.

* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A CO hatása a szívfunkciókra

A CO kezelést nem kapott kontroll csoport és a 0,001%, valamint 0,01% CO kezelésben részesült csoportok szívfunkcióit mutatja a 3. táblázat. A kísérlet során a következő paramétereket követtük: szívfrekvencia (HR), koronária átfolyás (CF), aortakiáramlás (AF) és balkamrai nyomás (LVDP). Az iszkémia indukálása előtt a szívfunkciók lényegesen nem változtak a 0,001% és 0,01% CO kezelésben részesült csoportokban. A 30 percig fenntartott iszkémiát követő 60. és 120. percben leolvasott CF, AF és LVDP értékek azonban jelentős növekedést mutattak a kezelésben nem részesült kontroll csoport értékeihez képest. Nem tapasztaltunk viszont változást a HR értékeiben a CO-val kezelt csoportok esetében sem az iszkémia indukálása előtt, sem az iszkémiát követő reperfúzió során.

A 0,1% CO kezelés alatt igen gyakori VF-t és kamrai tachycardiát, bradycardiát, valamint ectopiás ütések figyeltünk meg az EKG-n, melyek lehetetlenné tették a szívfunkciók regisztrálását (HR, CF, AF, LVDP), ezért nem

tartalmaz adatokat a 3. táblázat a 0,1% CO kezelésben részesült csoportra vonatkozóan.

csoport	Iszkémia előtt	60 perc reperfúzió után	120 perc reperfúzió után
Kezeletlen kontroll			
HR (ütés/min)	315±6	288±5	281±6
CF (ml/min)	26,5±1,3	17,8±1,1	17,4±1,3
AF (ml/min)	52,3±3,1	10,6±1,0	9,5±0,7
LVDP (Hgmm)	113±6	40±4	35±4
CO (0,001%)			
HR (ütés/min)	309±7	280±7	276±6
CF (ml/min)	27,4±1,2	23,9±1,6*	23,0±0,8*
AF (ml/min)	51,2±2,8	22,4±1,7*	23,6±1,5*
LVDP (Hgmm)	109±8	80±5*	85±6*
CO (0,01%)			
HR (ütés/min)	303±8	278±8	275±11
CF (ml/min)	28,6±2,1	25,7±1,9*	24,8±1,4*
AF (ml/min)	50,8±1,9	24,2±2,0*	23,1±1,2*
LVDP (Hgmm)	104±6	86±6*	85±7*

3. táblázat

A perfúziós folyadékban áramoltatott CO hatása a szívfunkciókra az iszkémai/reperfúzió után átesett, izolált szívekben. Az értékek átlagot jelölnek, melyek után megadtuk az átlag standard hibáját. Az átlagot n = 6 számú mintára számítottuk.

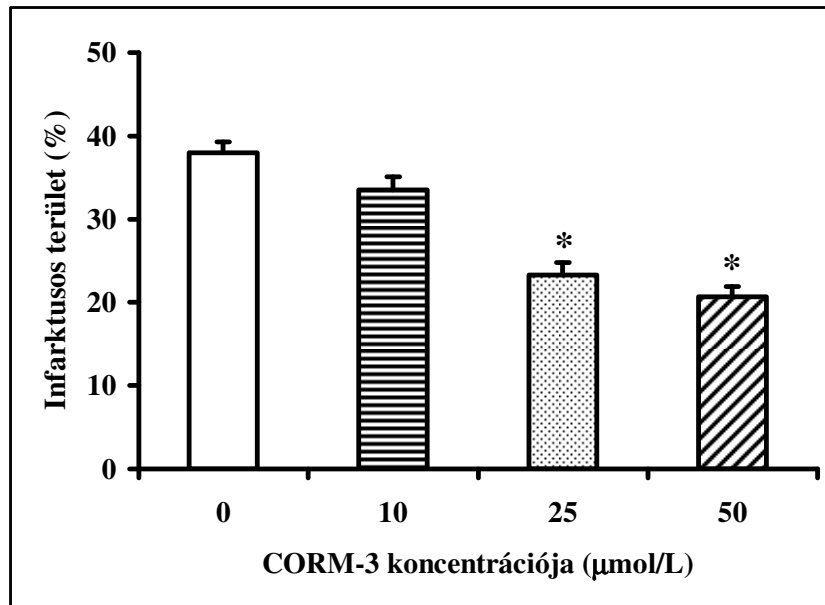
Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $*p < 0,05$. Az összehasonlításokat a kezeletlen kontroll csoport értékeihez végeztük.

A CORM-3-mal kapott eredmények

Az infarktusos terület és az arrhythmia

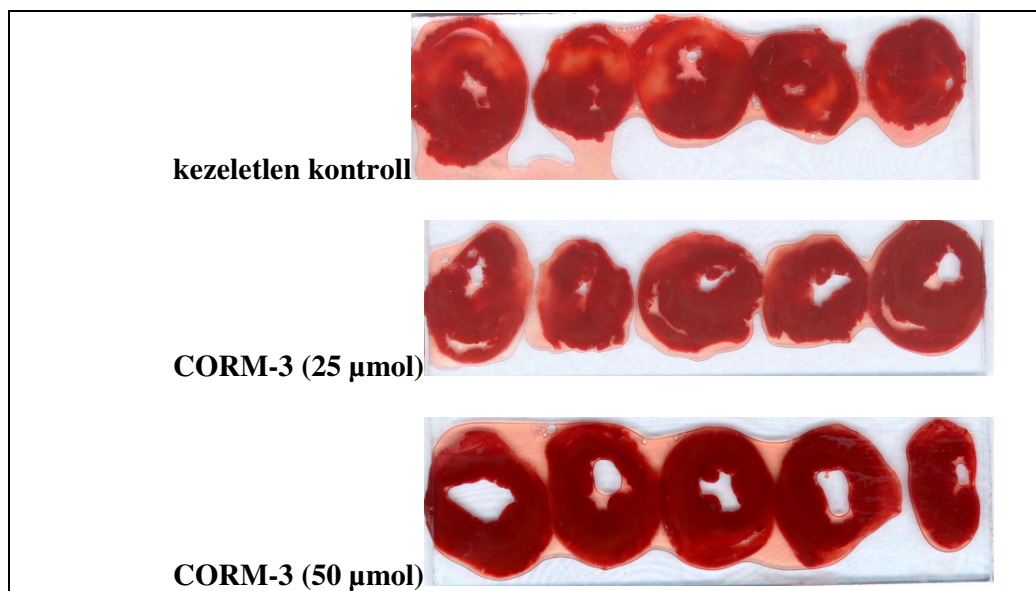
Az 7. ábra mutatja az infarktusos terület százalékos arányát a 30 perc iszkémia, majd 120 perc reperfúzió után kitett izolált patkányszívekben. Az iszkémiát elszenvedett, kezeletlen szívizomban az infarktusos terület mértéke $38 \pm 1,3$ %, amely a különböző koncentrációjú CORM-3 kezelés hatására $33,5 \pm 1,6$ %-ra ($p < 0,05$, 10 μM CORM-3), $23,3 \pm 1,5$ %-ra ($p < 0,05$, 25 μM CORM-3) és $20,7 \pm 1,2$ %-ra ($p < 0,05$, 50 μM CORM-3) csökkent. A 8. ábra a CORM-3-mal kezelt (25 μM , 50 μM) és a

kezeletlen iszkémia/reperfúzió átesett szöveti metszeteket mutatja be. Az infarktusos terület fehér, az életképes szöveti rész piros színű a TTC festést követően.



7. ábra

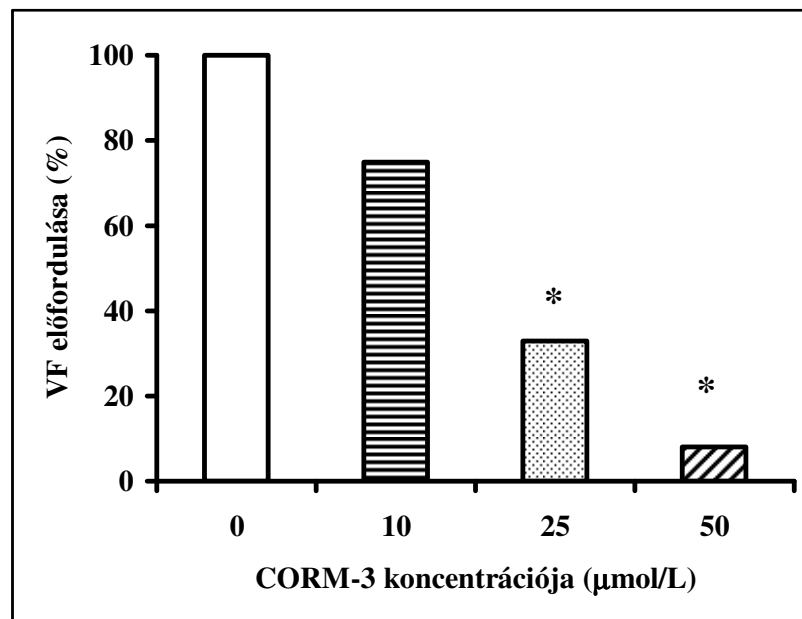
A CORM-3 kezelés hatása az infarktusos terület nagyságára. * $p < 0,05$ a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva.



8. ábra

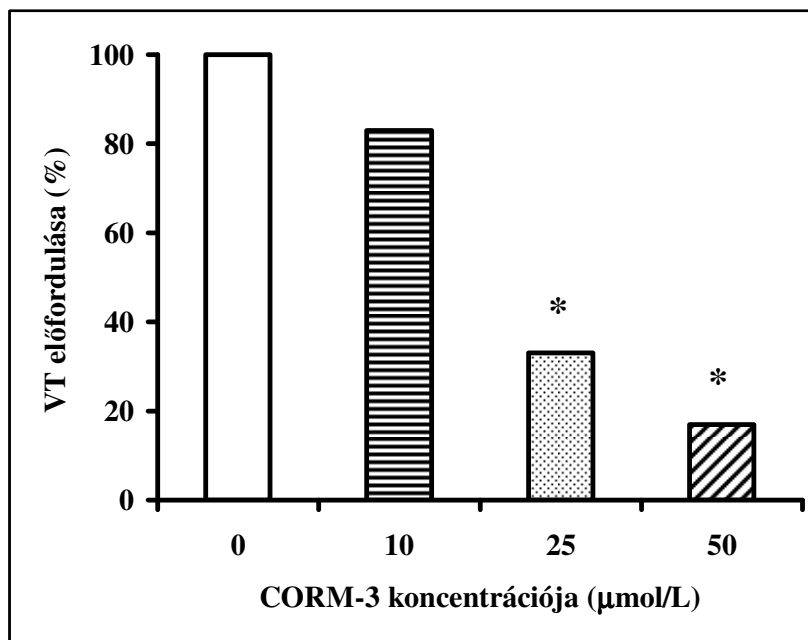
Az infarktusos terület reprezentációs fényképe a kezeletlen szívek, a 25 μM és az 50 μM CORM-3 kezelést követően.

Az infarktusos területhez hasonlóan a reperfúzió indukálta VF gyakorisága szintén csökkent a CORM-3-mal történő kezelés hatására. Az 9. ábrán látható, hogy a kezelésben nem részesült csoport esetén a reperfúzió indukálta VF 100 %-ról 33 %-ra ($p<0,05$, 25 μM CORM-3) és 8 %-ra ($p<0,05$, 50 μM CORM-3) csökkent. A reperfúzió indukálta VT (kamrai tachycardia) gyakorisága a 10. ábrán látható, mely a VF-hoz hasonló tendenciát mutat. A reperfúzió indukálta VF, VT időtartamát és szinusz ritmust a Langendorff módban végzett perfúzió első 2 percében regisztráltuk és amennyiben szükségesnek találtuk defibrilláltuk, hogy mérni tudjuk a szívfunkciókat. A VF, VT időtartama 5 ± 2 sec-ra és 26 ± 8 sec-ra csökkent ($p<0,05$) az 50 μM CORM-3-mal kezelt csoportnál a kezeletlen szívek 14 ± 4 sec és 93 ± 12 sec értékeihez képest. Következésképpen a szinusz ritmus időtartama 13 ± 4 sec-ról 89 ± 15 sec-ra nőtt ($p<0,05$) az 50 μM CORM-3-mal történő kezelés hatására.



9. ábra

A kamra fibrilláció (VF) előfordulási gyakorisága a kezeletlen szívek, a 25 μM és az 50 μM CORM-3 kezelés esetén. * $p<0,05$ a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva.



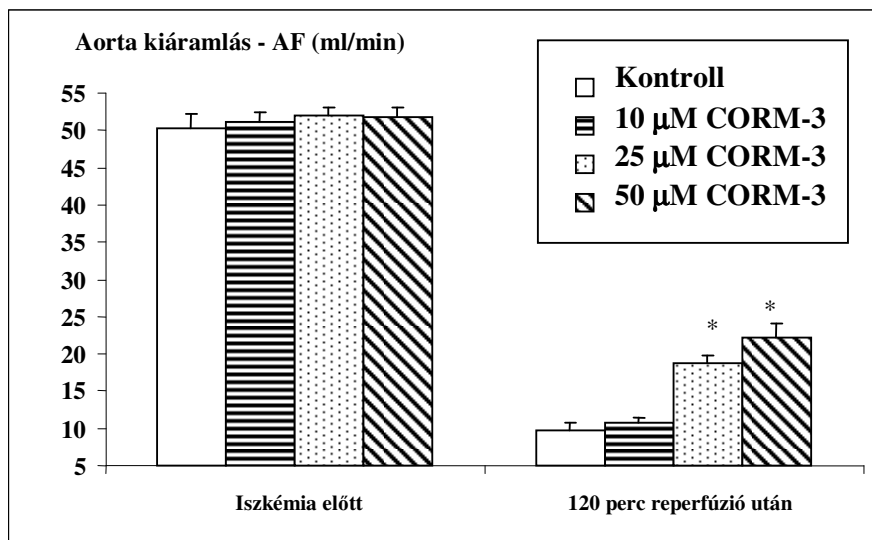
10. ábra

A kamrai tachycardia (VT) előfordulási gyakorisága a kezeletlen szívek, a 25 μM és az 50 μM CORM-3 kezelés esetén. * $p < 0,05$ a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva.

A szívfunkciókra gyakorolt hatás eredményei

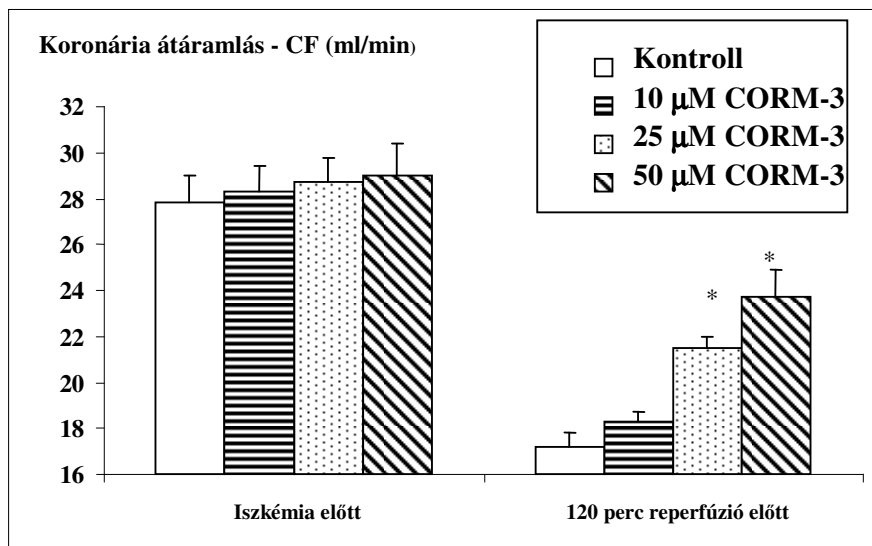
Az infarktusos terület csökkenésével és a reperfúzió indukálta VT és VF gyakoriságával összefüggésben a CORM-3-mal történő kezelés a szívfunkciók kifejezett javulását eredményezte az iszkémiás periódust követően. A 25 és 50 μM CORM-3 kezelés után jelentős növekedést figyeltünk meg a coronária átfolyásban (CF), aortakiáramlásban (AF) és balkamrai nyomásban (LVDP) a nem kezelt csoporthoz viszonyítva. Amint a 11. ábra is mutatja az AF 30 perc iszkémia/120 perc reperfúziót követően a kezeletlen csoportnál mért $9,8 \pm 0,9$ ml/percről $18,7 \pm 1,2$ ml/percre ($p < 0,05$, 25 μM CORM-3), $22,2 \pm 1,9$ ml/percre ($p < 0,05$, 50 μM CORM-3) emelkedett. Hasonló javuló tendenciát figyeltünk meg a CF és LVDP értékeiben a kezelések után (ld. 12., 13. ábra). Az előbbiekhez hasonló javulást a szívfrekvenciában a kontroll csoport értékeihez képest viszont nem figyeltünk meg (14. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a HR, CF, AF és LVDP iszkémia előtti értékei

a kezeletlen csoportban statisztikailag nem különböztek a CORM-3-mal kezelt csoportok értékeitől.



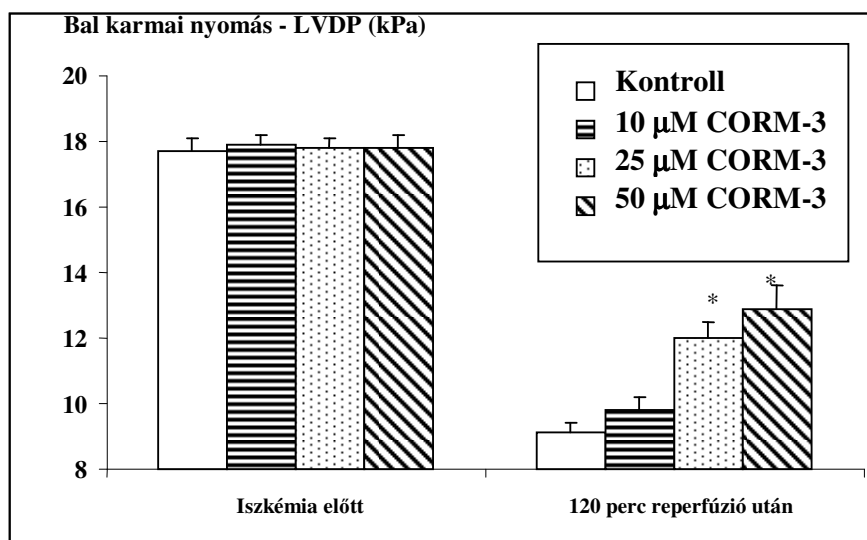
11. ábra

Az aorta kiáramlások (AF) iszkémia/reperfúzió alatti csökkenésének változása a 10 μ M, 25 μ M és az 50 μ M CORM-3 kezelés esetén a kezeletlen ($\square$) kontroll csoporthoz viszonyítva. * $p < 0,05$ összehasonlítva a kezeletlen kontroll csoport értékeivel.



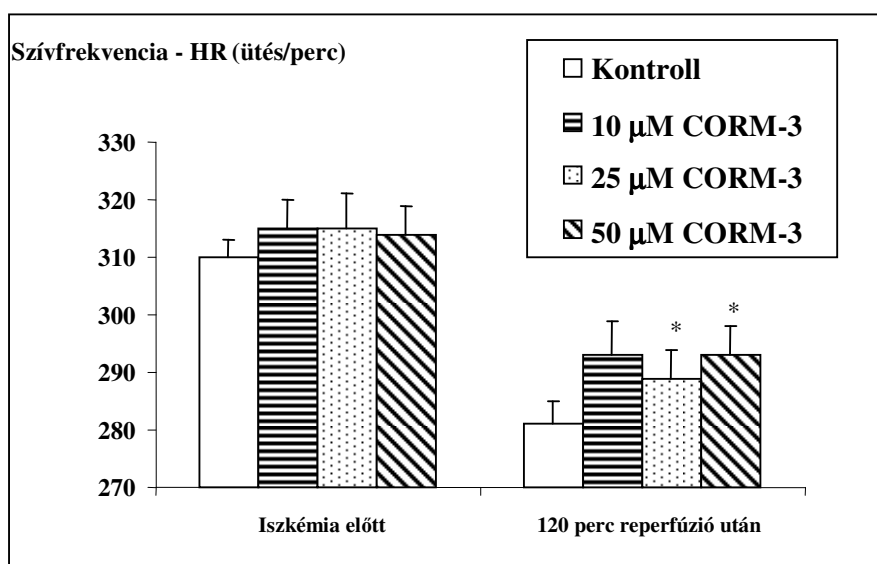
12. ábra

Az koronári átáramlások (CF) iszkémia/reperfúzió alatti csökkenésének változása a 10 μ M, 25 μ M és az 50 μ M CORM-3 kezelés esetén a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. * $p < 0,05$ összehasonlítva a kezeletlen ($\square$) kontroll csoport értékeivel.



13. ábra

Az bal kamrai nyomás (LVDP) iszkémia/reperfúzió alatti csökkenésének változása a 10 μM, 25 μM és az 50 μM CORM-3 kezelés esetén a kezeletlen (□) kontroll csoporthoz viszonyítva. * $p < 0,05$ összehasonlítva a kezeletlen (□) kontroll csoport értékeivel.



14. ábra

A szívfrekvencia (HR) iszkémia/reperfúzió alatti csökkenésének változása a 10 μM, 25 μM és az 50 μM CORM-3 kezelés esetén a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. * $p < 0,05$ összehasonlítva a kezeletlen (□) kontroll csoport értékeivel.

A CORM-3 hatása a myocardium ionösszetételére

A myocardium elektrofiziológiai állapotát elsősorban a különböző ioncsatornák aktivitása határozza meg. Ezen ioncsatornák a transzmembrán ionáramokat szabályozzák, amelyek különösen fontosak az akciós potenciál és a kardiális kontraktilitás létrehozásában. Joggal feltételezhetjük, hogy a kóros elváltozások megváltoztatják az intersticiális és intracelluláris milliő ionösszetételét, vagy az ioncsatornák jellegét, vagy pedig mindkettőt. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a CORM-3 szignifikáns mértékben nem változtatja meg a szívizom Na^+ , K^+ és Ca^{2+} összetételét a nem iszkémiás szívizomban. A 30 perc iszkémia/ 120 perc reperfúziót követően a celluláris Na^+ és Ca^{2+} koncentráció jelentősen megnövekedett $85 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ra és $4.1 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ra (száraz súlyra vonatkoztatva) az iszkémiát megelőző állapot $30 \pm 3 \text{ } \mu\text{mol/g}$ és $1.5 \pm 0.2 \text{ } \mu\text{mol/g}$ koncentrációihoz képest (4. táblázat). Az ionok koncentrációit mindig száraz tömegre vonatkoztattuk. A kontrol csoport esetén iszkémia/reperfúzió indukálta K^+ veszteséget tapasztaltunk $300 \pm 9 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ról $238 \pm 8 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ra (4. táblázat). A 25 és 50 μM CORM-3 kezelés után szignifikánsan kisebb mértékű növekedést figyeltünk meg az iszkémiát követő Na^+ és Ca^{2+} tartalomban (4. táblázat). A kezelés hatására a celluláris Na^+ és Ca^{2+} koncentráció poszt-iszkémiás növekedése $85 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ról és $4.1 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ról jelentősen mérséklődött a 25 μM CORM-3 kezelés után $57 \pm 6 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ra és $2.8 \pm 0.5 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ra, az 50 μM CORM-3 kezelés után $49 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ra és $2.3 \pm 0.2 \text{ } \mu\text{mol/g}$ -ra.

Csoport	Iszkémián át nem esett kontroll	30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió	30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió	30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió
Ionok		Gyógyszer mentes	CORM-3 25 (μmol/L)	CORM-3 50 (μmol/L)
Nátrium [μmol/g száraz tömeg]	30±3	85±5	57±6*	49±5*
Kálium [μmol/g száraz tömeg]	300±9	238±8	265±9*	273±10*
Kalcium [μmol/g száraz tömeg]	1.5±0.2	4.1±0.3	2.8±0.5*	2.3±0.2*

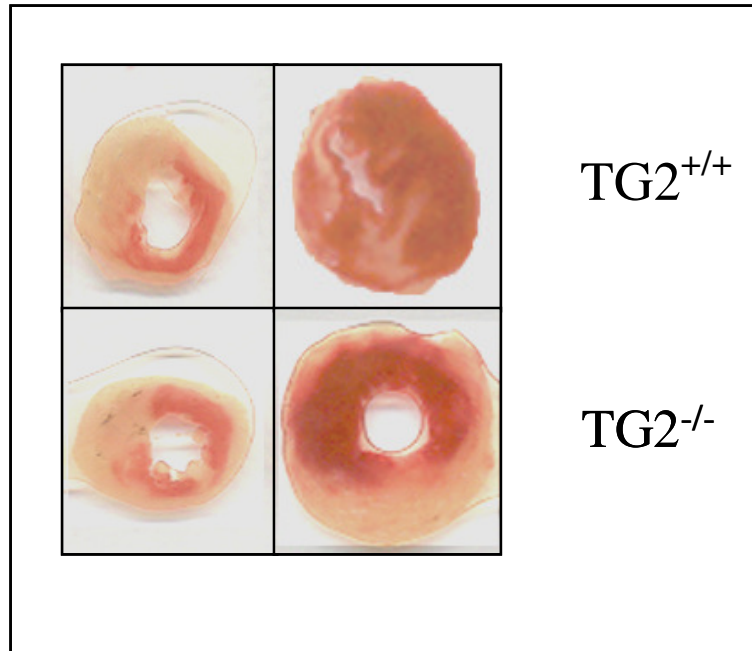
4. táblázat

A CORM-3 kezelés (25 μM, és 50 μM) hatása a myocardiális Na⁺, K⁺ és Ca²⁺ tartalomra (μmol/gramm száraz tömeg) izolált dolgozó szív modellen. *p<0,05 összehasonlítva a kezeletlen kontroll csoport értékeivel.

A TG2^{-/-} egereken végzett kísérletre vonatkozó eredmények

Az infarktusos terület mérete és a szívfunkciók változása a TG2^{-/-} és a vad típusú egerekben

A reperfúziót követően a Módszereknél leírtak szerint megfestettük a preparátumokat és mindkét csoportnál meghatároztuk az infarktusos területek nagyságát. Ahogyan a 15. ábrán látható a TG2^{-/-} egerekben az infarktusos terület nagysága 47,2±3,3 %-ra növekedett a vad típusú csoport 37,2±2,1 % értékéhez képest (5. táblázat).



15. ábra

Az infarktos terület reprezentációs fényképe a vad típusú (C57BI6) és a $TG2^{-/-}$ egerekben.

Az infarktos területhez hasonlóan a reperfúzió indukálta VF aránya is jelentősen - 83 %-ra - megemelkedett a $TG2^{-/-}$ egerekben, a vad típusúakban mért 33 %-hoz képest (5. táblázat). A szívfunkciók rosszabbodását mutatta az AF értékének csökkenése is. Az iszkémiát követő reperfúzió után az aorta kiáramlás a vad típusú egerek esetén $2,6 \pm 0,4$ ml/perc volt, a $TG2^{-/-}$ egerekben csak $0,8 \pm 0,1$ ml/percet mértünk. Fontos megjegyezni, hogy a $TG2^{-/-}$ egerekben már az iszkémiát megelőzően kisebb HR, CF, AF és AOP értékeket kaptunk, mint a vad típus esetén. A változást minden esetben szignifikánsnak vettük, ha a $*p < 0,05$.

Vizsgált paraméter	Vad típusú egerek (C57Bl6)	TG2 ^{-/-} egerek
Infarktusos terület	37,2±2,1 %	47,2±3,3 % [*]
Kamra fibrilláció (VF)	33 %	83 % [*]
Aorta kiáramlás (AF)	2,6±0,4 ml/perc	0,8±0,1 ml/perc [*]

5. táblázat

Az aorta kiáramlás (AF) és az infarktusos terület nagyságának változása a TG2^{-/-} egerekben a vad típusú egerekhez képest. Szignifikánsnak vettük a változásokat, ha a ^{*}p<0,05 változásokat. ^{*}Az összehasonlításokat a vad típusú egerekhez (TG2^{+/+}) viszonyítottuk.

A nagyenergiájú foszfáttartalom változása az iszkémia/reperfúzió kiváltása után

A 6. táblázat az ATP, ADP, AMP és CrP értékeket mutatja. Már az iszkémiát megelőzően jelentős különbség mutatkozott a két vizsgált csoport nagyenergiájú foszfát tartalmában. A vad típusú egerekben mért 6,18±2,52 µmol/g nedves tömegre vonatkoztatott ATP tartalom a TG2^{-/-} egyedekben 3,37±1,32 µmol/g-ra csökkent. A µmol/g koncentráció egységet minden esetben nedves tömegre vonatkoztattuk. Hasonló mértékű különbséget mértünk az ADP esetében (0,34±0,09 µmol/g a vad típusnál, 0,17±0,05 µmol/g a TG2^{-/-} egyedekben) és az AMP esetében is (0,073±0,027 µmol/g a vad típusnál, 0,039±0,011 µmol/g a TG2^{-/-} egyedekben). A kreatin-foszfát tartalom az előbbiekhöz hasonlóan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} egerekben (4,55±1,07 µmol/g), mint a vad típusban (6,48±0,51 µmol/g). Az iszkémia/reperfúzió kiváltása után az ATP tartalom a vad típusú egyedek esetén 3,81±2,41 µmol/g-ra a TG2^{-/-} egyedekben 2,00±1,20 µmol/g-ra csökkent. Az ADP tartalomban szignifikáns változás nem következett be sem a vad sem a TG2^{-/-} egyedekben. Az AMP értékekben további csökkenést figyeltünk meg. A vad típus

esetén $0,024 \pm 0,011$ $\mu\text{mol/g}$, a $\text{TG2}^{-/-}$ egyedekben $0,029 \pm 0,011$ $\mu\text{mol/g}$ adódott. A CrP tartalom jelentősen nem, de csökkent a vad típusú egyedek esetén $5,20 \pm 1,43$ $\mu\text{mol/g}$, a $\text{TG2}^{-/-}$ egerekben $3,36 \pm 1,11$ $\mu\text{mol/g}$.

Iszkémia előtt				
	ATP	ADP	AMP	CrP
Vad típus C57BL/6	$6,18 \pm 2,52$	$0,34 \pm 0,09$	$0,073 \pm 0,027$	$6,48 \pm 0,51$
$\text{TG2}^{-/-}$	$3,37 \pm 1,32^*$	$0,17 \pm 0,05^*$	$0,039 \pm 0,011^*$	$4,55 \pm 1,07^*$
120 perc reperfúzió után				
	ATP	ADP	AMP	CrP
Vad típus C57BL/6	$3,81 \pm 2,41$	$0,36 \pm 0,12$	$0,024 \pm 0,011$	$5,20 \pm 1,43$
$\text{TG2}^{-/-}$	$2,00 \pm 1,20^*$	$0,13 \pm 0,04^*$	$0,029 \pm 0,011^*$	$3,36 \pm 1,11^*$

6. táblázat

Az iszkémia/reperfúzió hatása a nagyenergiájú foszfát tartalomra a vad típusú és a $\text{TG2}^{-/-}$ egerekben. Szignifikánsnak vettük a változásokat, ha a $^*p < 0,05$. * Az összehasonlításokat a vad típusú egereknél ($\text{TG2}^{+/+}$) nyert értékekhez viszonyítottuk.

Diszkusszió

1. A CO szerepe

A szívizomban bekövetkező hirtelen iszkémiás események patológiás elváltozások sorozatát indítják el. Ezek a folyamatok az okklúziót követően másodperceken belül elkezdődnek és oxigén ellátási zavart okoznak, melyek a szívizomsejtekben zajló oxidatív foszforilációs folyamatok elégtelenségéhez vezetnek.

A hemoxigenáz rendszer (HO), valamint a HO mediálta CO fontos szerepet tölt be a sejtek homeosztázisának fenntartásában. A CO-ot korábban csupán „halálos” toxikus gáznak tekintették, majd a 90-es évektől kezdődően egyes eredmények azt mutatták, hogy az endogén eredetű CO citoprotektív hatással rendelkezik. A NO-hoz hasonlóan neuronális transzmitter szerepét ismerték fel először (Maines és mtsai, 1997) később, pedig a haemodinamikai szabályozó funkcióját (Verma és mtsai, 1993), valamint az apoptotikus és a sejtosztódásban betöltött gátló szerepét is (Katori és mtsai, 2002) bizonyították.

A CO toxikus hatását kutató vizsgálatok igazolták, hogy a CO nemcsak a hemoglobinhoz kapcsolódva idéz elő hipoxiát, hanem nagy affinitással kötődik a myoglobinhoz is, melynek következtében számos szövetben az oxigén hasznosítás gátlásával a citokrom-c oxidáz rendszer működését blokkolja (Coburn, 1979). Vizsgálták a HO és a HO mediálta CO védő szerepét az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásokban, számos szervben és szövetben, így a miokardiumban is (Clark és mtsai, 2003; Csonka és mtsai, 1999; Maines és mtsai, 1999; Szabo és mtsai, 2004; Yet és mtsai, 2001). Korábbi vizsgálatainkkal celluláris CO termelés mérésével igazoltuk, hogy a HO rendszer védekezési mechanizmusa a HO-1 mRNS indukcióján keresztül az emelkedett CO termelésnek tulajdonítható (Bak és mtsai, 2002).

Az exogén eredetű CO direkt kardiovaszkuláris hatását *in vivo* (DeBias és mtsai, 1976) és *in vitro* (Patel és mtsai, 2004) körülmények között is tanulmányozták. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az exogén CO kezelés következtében a toxikus hatás kifejeződésének két, egymástól független útja van. A toxikus hatások egyrészt a keletkező hidrogén-peroxidnak, másrészt a peroxinitritnek tulajdonítható. A kutatók feltevéseiket a kreatin kináz szintek perfuzátumban történő növekedésével és a glutation tartalom myocardialis csökkenésével magyarázták.

Az iszkémiát követő reperfúzió során a hirtelen reoxigenizáció hatására reaktív szabadgyökök képződnek, melyek kaszkádfolyamatot indítanak be. A reperfúzió során keletkező szabadgyökök következtében kialakuló fokozott oxidatív stresszt tekintik a reperfúzió indukálta károsodások alapvető és fő okának.

Kísérleteink során *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a CO függő cGMP és cAMP szinteket, a guanilát cikláz aktivitást, a VF gyakoriságát és mértük a szívfunkciókat, valamint meghatároztuk az infarktusz terület nagyságát. Az izolált dolgozó szív modell ideális kísérleti körülményt biztosított az exogén CO myocardiális hatásának tanulmányozásához, mivel a vér/hemoglobin/CO rendszer kizárásával követni tudtuk az oxigén transzport zavarát. Az eredményeink azt mutatták, hogy a CO alacsony koncentrációban való jelenléte a perfúziós folyadékban védelmet nyújtott az iszkémia/reperfúzió során fellépő kedvezőtlen behatások ellen, amely az emelkedett cGMP és cAMP szöveti koncentrációkban tükröződött vissza. A cAMP szint kis mértékű növekedése - közvetlenül intracelluláris Ca szint emelkedése- különféle arrhythmiákhoz vezethet mind az iszkémia során, mind az iszkémiát követő szakaszban (Du Toit, Opie, 1992). A cGMP koncentrációja azonban a többszörösére emelkedett, mely a cAMP arrhythmogén hatását tudta ellensúlyozni, amely az iszkémia/reperfúzió indukálta VF gyakoriságát csökkentette, kifejlődését megakadályozta. A cGMP szintek növekedése és az ezzel összefüggő guanilát cikláz aktivitás emelkedése azt mutatja, hogy a CO indukálta aktivitás fokozódása alapvető fontosságú az iszkémia/reperfúzió átesett myocardium védelmében. A cAMP és cGMP koncentrációk konkrét értékein kívül fontos paraméternek tekintik a cAMP/cGMP arányát. Du Toit és mtsai (1992) izolált szívmodellen kimutatták, hogy minél alacsonyabb a cAMP/cGMP hányados az iszkémia alatt, annál jobb az iszkémiát követő felépülés a szívizomban.

Az iszkémia/reperfúzió során bekövetkező oxidatív sejtkárosodást bizonyított módon antioxidánsok adásával lehet csökkenteni. Ezen exogén antioxidánsok hatásukat leginkább az intersticiumban fejtik ki és kevésbé a sejten belüli térben. A szabadgyök-reakciók elleni védelem másik lehetősége az endogén védelmi folyamatok indukálása és működésük fokozása (Tosaki és Das, 2002). A CO terápiás szerepe két lehetséges módon jelenik meg: egyrészt a CO-ot felszabadító molekulák alkalmazásával, vagy a HO rendszer farmakológiai stimulálásával, mely során endogén CO szabadul fel. Ezeknek a lehetőségeknek az előnye az, hogy az

intracelluláris CO szint emelés mellett kiküszöböljük a CO toxikus interakcióját a hemoglobinnal és a vér alakos elemeivel és ezen keresztül megakadályozzuk a hypoxia okozta sejtkárosodásokat is. A terápiás alkalmazás másik módja az exogén CO inhalációja és a túlélő szövetek, szervek exogén CO-dal történő kezelése. A CO in vivo körülmények között történő inhalációja toxikus hatású, a vér és szövetek közötti oxigén transzport gátlásával sejthalálhoz, halálhoz vezet (Turner és mtsai, 1999). Így a CO belélegeztetése csak szigorúan kontrollált körülmények között történhet (DeBias és mtsai, 1976). A CO in vitro körülmények közötti alkalmazása a bypass műtétek során lehetséges, mely alatt a vért a keringésből kiiktatják, s a CO-ot tartalmazó „krisztalloid” kardioplégias oldatot perfundálnak át a szíven.

Kísérleteink célja az volt, hogy az exogén CO védő hatását vizsgáljuk a cGMP/guanilát cikláz rendszer szemszögéből és egy lehetséges magyarázatot adjunk a háttérben zajló molekuláris mechanizmusokra. A reperfúzió hatására kialakuló hypoxia következtében szignálfolyamatok indulnak meg, melyek fontos szabályozója a CO. Tapasztalataink azt mutatják, hogy az exogén CO ezen moduláló, kardioprotektív hatása szigorúan koncentrációfüggő. Összefoglalásként elmondhadjuk, hogy a CO preventív szerepére irányuló vizsgálatok adatait az adott kísérleti körülmények tükrében kell elemezni és a következtetéseket levonni. Fontos paraméternek tekinthető az alkalmazott CO koncentráció, a kezelés időtartama, az hogy in vivo, vagy in vitro körülmények között történt-e a kísérlet, és nem utolsósorban tartalmazott-e az alkalmazott modell vért és sejtes elemeket, vagy sem. Így eredményeinket és az irodalomban megjelenő más tanulmányokat is a CO klinikai alkalmazása előtt ezen körülmények figyelembevételével kell értékelni.

2. A CORM-3 jelentősége

Az évtizedek óta folyó kutatások és az iszkémia/reperfúzió alatt bekövetkező molekuláris és celluláris változások jellemzése ellenére megállapítható, hogy a reperfúziót elősegítő eljárások fejlesztésén túl viszonylag kis mértékű fejlődés történt a kardiális iszkémia és/vagy annak következményeinek hatásos farmakológiai kezelésében. Az iszkémia/reperfúzió indukálta elváltozások mechanizmusainak tanulmányozása során sok potenciális gyógyszerjelölt molekulát azonosítottak, amelyek befolyásolni tudják ezeket a patológiás folyamatokat (Opie 1980., Opie 1989a, Manning és Hearse, 1984). Számos beavatkozás és terápiás ágens képes az iszkémiás elváltozások kifejlődésének arányát lassítani, amelynek eredményeként a

posztisztkémiás felépülés javulhat (Hearse és Bolli, 1992, Das és mtsai, 1999). Széles körben úgy gondolják, hogy ezek az anyagok a sejtekben bekövetkező károsodások alapját szolgáló mechanizmusok befolyásolásával módosíthatják az iszkémia/reperfúzió átesett szívek kardiális funkcióinak romlását és mértékét is. A rendelkezésre álló bőséges adat azt mutatja, hogy a szívelégtelenséghez és arrhythmiához vezető iszkémia/reperfúzió által indukált elváltozásokban különféle mechanizmusok működnek közre. Így joggal gondolhatjuk azt, hogy a sejt-károsodások kialakulásáért sokkal inkább az egymástól eltérő és összetett mechanizmusok a felelősek, mintsem egyetlen faktor (Bolli és mtsai, 2004). Azonban az egyik valósnak vélt szignáltranszdukciós folyamat aktiválása, vagy gátlása automatikusan hatással lehet egy másikra, mely egyértelműen a posztisztkémiás állapot javulását eredményezheti. Az arrhythmiák és az iszkémia és/vagy reperfúzió által okozott sejt-elhaláshoz vezető mechanizmusok magyarázatoként a következő mechanizmusok emelhetők ki:

- Ca^{2+} , Na^{+} és K^{+} ionok egyensúlyának megbomlása (Opie, 1989b; Shivkumar és mtsai, 1997; Avkiran és Haworth, 2003).
- Szabadgyök képződése (McCord, 1985; Myers és mtsai, 1985).
- Energia csökkenése, kulcsfontosságú intermedierek és kofaktorok elvesztése (Imahashi és mtsai, 2004)
- Különböző gének expressziója és repressziója a fehérjékhez kapcsolatosan (Imahashi és mtsai, 2004; Szendrei és mtsai, 2002; Fisher és mtsai, 2005).

Vizsgálataink során megkíséreltük felderíteni, hogy a CORM-3 molekulából a sejtekben felszabaduló CO kapcsolatban van-e a szívfunkciók posztisztkémiás javulásával, az alatta bekövetkező kamrai arrhythmiák gyakoriságának csökkenésével valamint az iszkémia/reperfúzió átesett myocardium infarktusos területének csökkenésével. Eredményeink betekintést adnak a CORM-3-nak a myocardialis ionösszetételre gyakorolt hatására, ezen kívül az iszkémiát követő szívfunkciók visszanyerése és a CORM-3-ból felszabaduló CO lehetséges kapcsolatára. A sejtek K^{+} vesztesége és az ioncsatornák myocardialis iszkémia során bekövetkező károsodása olyan kritikus faktorok, melyek letális iszkémia/reperfúziós károsodást és arrhythmiákat eredményeznek (Shivkumar és mtsai, 1997). Az

iszkémiás és reperfundált szívizomban az intracelluláris Na^+ tartalom növekedése és a depolarizált membránpotenciál a Ca^{2+} ionok szívizomsejtekbe történő áramlásához vezet. A Ca^{2+} ionok beáramlása a Na^+ ionok helyére a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ioncsatornán keresztül történik (Imahashi és mtsai, 2005). Mindemellett a Ca^{2+} , K^+ , Na^+ csatornák aktiválása, vagy deprimálása fontos szabályozó szerepet tölt be a posztiszkémiás szívfunkciók felépülésében (Tósaki és Hearse, 1987). Egy korábbi tanulmány azt mutatta, hogy a mitokondriális ATP függő K^+ csatornák a CORM-3-ból felszabaduló CO hatására bekövetkező aktivációja hozzájárul az iszkémia/reperfúzió átesett szívek kardioprotekciójához (Clark és mtsai, 2003). Ennek ellenére az a tény, hogy a sejtben felszabaduló CO módosíthatja a celluláris kation egyensúlyt a myocardális iszkémia/reperfúzió folyamán, új irányt adott a kutatásoknak.

A nettó K^+ veszteséért felelős elsődleges faktor a megváltozott Na^+ áram, amely a Na^+ sejtekben történő akkumulációját és a K^+ sejtekből történő kicserélését eredményezi. Annak érdekében, hogy meghatározzuk azt, hogyan befolyásolja a szívek CORM-3-mal történő kezelése a reperfúzió indukálta elváltozásokra gyakorolt hatását, összehasonlítottuk a CORM-3-mal kezelt és nem kezelt szívekben bekövetkező arrhythmákat, szívfunkciókat, az infarktusos terület nagyságát és az ionáramok megváltozását. Kísérleteink során azokhoz az eredményekhez jutottunk, hogy az iszkémia/reperfúzió indukálta intracelluláris Na^+ akkumulációt és egy nettó K^+ veszteséget eredményezett, hiszen az iszkémiát követően az ionmozgások elektroneutralitását és az ionegyensúlyt biztosítani kell. A legvalószínűbb az, hogy a K^+ tartja fenn a töltésegyensúlyt, mivel a K^+ egy „ubiquiter” intracelluláris kation, amely nagy membránpermeabilitással rendelkezik (Shivkumar és mtsai, 1997). Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a 25 és 50 μM CORM-3 kezelés jelentős mértékben csökkentette a szívizomsejtek K^+ vesztesét és megvédte az izomsejteket a Na^+ és Ca^{2+} tartalom gyarapodásától. A CORM-3-mal kezelt szívek kevésbé voltak fogékonyak az életet veszélyeztető arrhythmákra, amelyet a 30 perc iszkémiát követő, reperfúzió alatt bekövetkező VF és VT előfordulási gyakoriságának csökkenése igazol. Munkánk a sejtmembrán két oldalán kialakuló ionegyensúlyok fontosságának kiemelkedő szerepét emeli ki, mivel a különböző klinikai kórképeket gyakran komplikálják a szív ionegyensúly zavaraiából eredő arrhythmák. Az arrhythmák előfordulási gyakoriságának CORM-3 kezelés hatására történő csökkenését tükrözi az infarktusos terület jelentős mértékű csökkenése és a poszt-iszkémiás szívfunkciók javulása.

A hem-oxigenáz-1 rendszer „melléktermékeként” ismert CO és az exogén módon alkalmazott CO kardioprotektív hatását már számos kutató korábban leírta (Vulapalli és mtsai, 2002; Fujimoto és mtsai, 2004), újabban pedig a CORM-3 myocardialis infarktussal és a transzplantációs kilökődési reakciókkal szembeni védő hatását igazolták (Clark és mtsai, 2003; Motterlini és mtsai, 2005a, b). A már korábban említettek szerint a szívizomban a CO az ATP függő K^+ csatornák egy jó célpontjának tűnik (Clark és mtsai, 2003), és ami még meggyőzőbb, bizonyíték támasztja alá a K^+ csatornák részvételét a CO szignál transzdukciójában a szisztémás vaszkulatúrában (Foresti és mtsai, 2004a, b), az agyi erekben (Jaggar és mtsai, 2002) és a simaizomsejtekben (Jaggar és mtsai, 2005) egyaránt. Egészen mostanáig kételkedéssel fogadták azt a feltevést, hogy a CO célpontjai az ioncsatornák lehetnek, mivel ismert volt, hogy a csatorna-proteinekről hiányzik egy olyan molekuláris domén, amely közvetlen kapcsolatot biztosítana a CO-val. Valójában a hem, vagy a proteinben lévő fém a preferált célpontja a CO-nak, amely egy lehetséges molekuláris „kapcsolóvá” válik a sejtek számára és a CO szignáltranszdukciójának kiváltásához szükséges (Motterlini és mtsai, 2003). Újabban a Ca^{2+} szenzitív K^+ csatornákról írták le, hogy kovalensen kötődnek a vas protopfirin IX-el, ezen kívül bizonyítékkal támasztották alá azt is, hogy a hem egy erős, de finom allosztérikus regulátora a K^+ csatornáknak (Lopez-Barneo és Castellano, 2005).

A CO K^+ csatornákra kifejtett közvetlen hatása és a háttérben lezajló mechanizmusok teljes megismeréséhez még további vizsgálatokra van szükség. Munkánk során azonban sikerült bizonyítani, hogy a CORM-3-ból felszabaduló CO-nak egyértelműen hatása van az alapvetően fontos ionok egyensúly viszonyaira, mely által a szívizom védelmét biztosítja az iszkémia/reperfúzió következtében kialakuló myocardialis szöveti és működésbeli elváltozásokkal szemben. A CORM-3 iszkémiás myocardiumban kifejtett hatása a molekulából felszabaduló CO-nak köszönhető, mivel a korábbi vizsgálatok már igazolták, hogy az inaktív CORM-3-ból (iCORM-3) nem szabadul fel CO és így az nem is hatásos (Clark és mtsai, 2003; Guo és mtsai, 2004; Stein és mtsai, 2005). Érdeemes megjegyezni, hogy a CO -hoz hasonlóan egy másik gáz molekula, a NO - így a NO-donor molekulák is - képes javítani az iszkémia/reperfúzió indukálta elváltozásokat (Ferdinándy és Schulz, 2003). Mindkét gáz halmazállapotú mediátor hasonló mechanizmussal a guanilát-cikláz rendszer aktiválásán keresztül intracelluláris cGMP növekedést eredményez (Giannini és mtsai, 2005; Bak és mtsai, 2005). A CORM-3-mal kapcsolatos

eredményeket munkacsoportunk korábbi tapasztalatai is alátámasztják, mely szerint a HO-1-ből felszabaduló endogén CO-nak döntő szerepe van az iszkémizált/reperfundált szívekben kialakuló VF megelőzésében (Bak és mtsai 2002, 2003). A legelső tanulmányok egyike (Sharma és mtsai, 1999) pedig arra mutat rá, hogy mind a HO-1 mRNS, mind a protein szintek jelentős emelkedése az iszkémia/reperfúzió átesett szívek védelmét eredményezte. Egy másik vizsgálat szerint a vektorokkal történő szöveti transzfekció, vagy a HO-1 expressziójának stimulációja - mely endogén CO-ot generált - az előbbiekhöz hasonló myocardiális védő hatást ért el.

Néhány évtizeddel ezelőtt a hemoxigenáz rendszert csupán a sejten belüli hem homeosztázisának fenntartásának összefüggésében említették, és az általa termelt produktumokat (bilirubin, CO) csak fölösleges, toxikus termékeknek tekintették (Motterlini és mtsai, 2003). Az utóbbi években drámaian megváltozott a CO megítélése a folyamatosan megjelenő meggyőző közlemények következtében, melyek arról számolnak be, hogy a CO egy fontos jelkövetítő mediátor és egy sokoldalú - kardiovaszkuláris, ideg- és immunrendszerben lezajló - biokémiai útvonalak effektor molekulája (Motterlini és mtsai, 2005 a, b). A biológiai rendszerekben alkalmazható, kémiaiilag CO hordozónak tervezett CORM molekulák megjelenése igazolta azt a fontos feltevést, hogy a CO kis mennyiségei alkalmazhatók arra, hogy megvizsgálják ennek a kétatomos gáz még specifikusabb hatását, és további vizsgálatok irányulnak majd a CO kardiális elváltozások és más elváltozásokban betöltött kedvező hatásának optimalizálására.

3. Az apoptózis jelentősége

Már a hetvenes években kísérletekkel igazolták, hogy az iszkémia/reperfúzióknak kitett szívmusclek elhalása két mechanizmussal történik: nekrozissal és apoptózissal (Reimer és mtsai, 1977). A patológiás szívmuscleban a sejtelhalás legnagyobb részt nekrozis útján következik be, amelyet dinamikus patológiás folyamatként jellemezték, mivel a nekrotikus folyamatot csak a reperfúzió kezdeti és legvégső szakaszában mutatták ki (Zhao és mtsai, 2000). A teljes iszkémia alatt az elsődlegesen kifejlődő sejtelhalási mechanizmus viszont az apoptózis (Gottlieb és mtsai, 1994; Fliss és Gattinger, 1996). Bár e két folyamat számos útvonalban különbözik, mégis átfedések, kapcsolatok léteznek a sejtelhalás

két formája között. Ezek a megfigyelések új lehetőséget adtak az iszkémia/reperfúzió során károsult szívizomban lejátszódó kóros sejtelhalási folyamatok befolyásolására.

Napjainkban megnövekedett az érdeklődés az apoptózis mechanizmusának vizsgálata iránt és ennek kapcsán a kóros állapotokban betöltött szerepe után. Az apoptózis teljes mechanizmusát és kiváltó okait még nem teljesen tisztázták, de számos kaszkádfolyamatot írtak le az utóbbi évtizedben, melyek közül az egyik legjobban ismert a kaszpáz rendszer (De Moissac és mtsai, 2000; Mocanu és mtsai, 2000). Gyakran vizsgált mechanizmusok között szerepel a protein kinase C (PKC) (Takashi és mtsai, 1999), a p53 (Gottlieb és mtsai, 1994), a MAPK (mitogen activated protein kinase) (Mackay K. és Mochly-Rosen D, 1999), a TNF- α kaszkádja is (Kurrelmeyer K. A. és mtsai, 2000).

Munkacsoportunk korábbi kísérletei szorosan kapcsolódnak a kaszpáz rendszer vizsgálatához. Kovács és mtsai (2001) a szelektív és nem szelektív kaszpáz inhibitoroknak az iszkémia/reperfúzió következtében kialakuló sérülések elleni védelmében betöltött szerepét vizsgálták. Eredményeik szerint a nem szelektív kaszpáz inhibitorok amennyiben jelen vannak a reperfúzió indításakor, jelentős védelmet nyújtanak a myocardium számára. A specifikus kaszpáz inhibitorok esetén viszont nem mutatattak ki hasonló védő funkciót, jelentős mértékben nem csökkentette az infarktusos területet.

Az apoptózis során szöveti transzglutaminázok (tTG) aktiválódnak, melyek izopeptid kötések hoznak létre az apoptotikus sejtben. A szöveti transzglutaminázok közül a TG2 abban különböztethető meg a többi tTG-től, hogy sejtfelszín adhéziós mediátorként és a G proteinhez hasonlóan viselkedik. A keresztkötések létrehozásán kívül GTP kötő proteinként is működik, amely az α_{1b} -adrenerg receptoron (AR) keresztül intracelluláris szignálfolyamatot mediál. Jelenleg viszonylag már jól ismert a TG2 protein-diszulfid izomeráz és kináz aktivitása az apoptotikus folyamatokban.

A TG2 biológiai szerepének vizsgálatához TG2 knockout (TG2^{-/-}) egereket alaklamztunk. Ezeknél az egereknél a glükóz stimulusra bekövetkező inzulin szekréció károsult és glükóz intoleranciát figyeltek meg. A fent említett genetikai módosítás olyan fenotípust eredményezett, amely hasonlított a korai diabéteszes rohamokat produkáló egyedekre. Ez arra engedett következtetni, hogy a TG2 fiziológiai szerepet tölthet be a glükóz intoleranciában (Bernassola és mtsai, 2002). A glükóz indukálta inzulin felszabadulás sérülése erősen összefügg a légzési lánc tökéletlen aktivációjával és az ATP termelés csökkenésével (Maechler P and

Wollheim C. B., 2001). Ezt, azonban még soha nem vizsgálták a TG2 viszonylatában annak ellenére, hogy a TG2 kolokalizált a mitokondriummal és az expressziója a mitokondrium hiperpolarizációjához vezet (Piacentini és mtsai, 2002). Ezen kívül, a TG2^{-/-} egereket vizsgálva azt is kiderítették, hogy a TG2 a G proteinhez hasonlóan az AR szignálfolyamatban védelmet nyújt a hepatocitáknak a Fas mediálta sejtelhalással szemben (Sarang és mtsai, 2005). Mivel az α_{1b} -adrenerg receptor a szív sejteiben is expresszálódik és a Fas szignál közreműködik a szív kóros elváltozásaiban, ezért úgy határoztunk, hogy megvizsgáljuk a TG2 hatását az iszkémia/reperfúzió során bekövetkező sérülésekben. Azért, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az α_{1b} -adrenerg receptort nem produkáló szívpreparátumban (AR⁻) a sérült AR szignál a felelős-e a TG2^{-/-} szívek iszkémia iránti érzékenységeinek fokozódásában, elvégeztük az AR⁻ egyedeken is az iszkémia/reperfúziós vizsgálatokat. Kísérletünk eredményeit nem tartalmazza az „Eredmények” című fejezet, mivel nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az AR⁻ és AR⁺ egyedek esetén. Sem az infarktusos terület nagyságában, sem a VF gyakoriságában és a további posztiszkémiás szívfunkciókban sem volt szignifikáns különbség. Tehát vizsgálatainkkal kizártuk annak lehetőségét, hogy az α_{1b} -adrenerg receptor által közvetített szignál szerepet játszana a TG2^{-/-} szívek iszkémia iránti érzékenységeinek fokozódásában.

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint - összhangban más kutatók megállapításaival - az iszkémia/reperfúzió előtti és utáni szívfunkciós értékek jelentősen különböznek a nem génmódosított egyedek esetén. Hasonló szignifikáns eltérést figyeltünk meg a TG2^{-/-} egerek egyes szívfunkciós paraméterei és a vad típusú egerek ugyanazon paraméterei között. Külön kiemelendő, hogy a TG2^{-/-} egerek szívfunkciós paraméterei az iszkémia előtt is gyengébbek voltak a vad típus értékeihez viszonyítva. Okamura és mtsai (2000) megállapították, hogy a nagyenergiájú foszfát tartalom jelzi a kardiális funkciókat az iszkémia/reperfúzió előtt és után. Tekintettel arra, hogy iszkémia/reperfúzió előtt és után is szignifikánsan rosszabb szívfunkciót mutattunk ki a TG2 knockout egerekben a vad típushoz képest, kísérleteink másik részében arra kerestük a választ, hogy a TG2 enzim hiánya hogyan befolyásolja a nagyenergiájú foszfát tartalmat az iszkémia/reperfúziót követően. Adataink egyértelműen tükrözik, hogy a nagyenergiájú foszfát tartalom fenntartása sérült az iszkémia/reperfúzió alatt a vad típusnál és még inkább a TG2^{-/-}

egerek esetén, amely arra enged következtetni, hogy a mitokondriális ATP termelés jelentős mértékben sérült az iszkémia/reperfúzió során.

Eredményeink bizonyítékul szolgálnak a TG2 enzim egy újszerű szerepére, mely szerint hozzájárul a sértetlen mitokondriális légzési funkció fenntartásához, hiánya pedig az ATP termelés folyamatának súlyos sérüléséhez vezet. A TG2^{-/-} egereknél megfigyelt defektusok a TG2 mitokondriális szubsztrát proteineken megvalósuló közvetlen hatás hiányának, valamint számos mitokondriális szabályzó fehérje TG2 által katalizált poszttranszlációs módosítása hiányának köszönhetők.

Végezetül, vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a TG2-nek fiziológias körülmények között szerepe van abban, hogy a szívműködés mitokondriumában a légzési lánc megfelelő szinten zajlik. További célul tűztük ki, hogy munkacsoportunk következő lépésként választ találjon, hogy a TG2 már jól ismert, számos enzimaktivitása közül (transzamidáz, kináz és protein diszulfid izomeráz aktivitás) mely(ek) felelősek a fent leírt fiziológias funkcióért.

Összegzés

A szívizom iszkémiás megbetegedések az egyik leggyakoribb halálokot jelentik Magyarországon. Az iszkémia során kialakuló oxigén ellátási zavar különböző elváltozásokat eredményez. Munkánk során az ischemia/reperfúzió után bekövetkező patológias folyamatok mechanizmusának vizsgálatát és farmakológiai befolyásolását tűztük ki célul.

Kísérleteink első részében a CO védő hatását vizsgáltuk különböző koncentrációjú exogén CO kezelés esetén. Az eredményeink azt mutatták, hogy a CO alacsony koncentrációban való jelenléte a perfúziós folyadékban védelmet nyújtott az iszkémia/reperfúzió során fellépő kedvezőtlen behatások ellen, amely az emelkedett cGMP és cAMP szöveti koncentrációkban tükröződött vissza. A cGMP szintek növekedése és az ezzel összefüggő guanilát cikláz aktivitás emelkedése is azt mutatja, hogy a CO indukálta aktivitás fokozódása alapvető fontosságú az iszkémia/reperfúzió átesett myocardium védelmében.

A napjainkban kifejlesztett CO hordozó molekulák (CORM) farmakológiai eszközként képesek az endogén CO hatását kiváltani. A vizsgálandó szíveket különböző koncentrációjú CORM-3-mal kezeltük. A kezelt szívek kevésbé voltak fogékonyak az életet veszélyeztető arrythmiákra, amelyet a VF és VT előfordulási gyakoriságának csökkenése igazol. Eredményeinkkel sikerült bizonyítani, hogy a CORM-3-ból felszabaduló CO-nak egyértelműen hatása van az alapvetően fontos ionok egyensúlyi viszonyaira, mely által a szívizom védelmét biztosítja az iszkémia/reperfúzió következtében kialakuló myocardialis elváltozásokkal szemben. Az arrythmiák előfordulási gyakoriságának CORM-3 kezelés hatására történő csökkenését igazolta az infarktusos terület jelentős mértékű csökkenése és a poszt-iszkémiás szívfunkciók javulása.

Kísérleteink harmadik részében a TG2 enzim iszkémia/reperfúzióban betöltött szerepét vizsgáltuk. Adataink egyértelműen tükrözik, hogy a nagyenergiájú foszfát tartalom fenntartása sérült az iszkémia/reperfúzió alatt mind a TG2^{-/-} egerek, mind a vad típusnál is, amely arra enged következtetni, hogy a mitokondriális ATP termelés jelentős mértékben romlott az iszkémia/reperfúzió során. Vizsgálatainkkal kizártuk annak lehetőségét, hogy az α_{1b} -adrenerg receptor által közvetített szignál szerepet játszana a TG2^{-/-} szívek iszkémia iránti érzékenységének fokozódásában. A nagyenergiájú foszfát tartalom nagyobb mértékű csökkenése a TG2^{-/-} szívek esetén bizonyítékul szolgál a TG2 enzim egy újszerű szerepére, mely szerint hozzájárul a sértetlen mitokondriális légzési funkció fenntartásához, hiánya pedig az ATP termelés folyamatának súlyos sérüléséhez vezet.

Summary

Cardiac ischemia is one of the most frequent causes of death in Hungary. In case of impaired oxygen supply can cause serious injuries. The aims of our studies were to investigate the pathological mechanism forming in consequence of ischemia/reperfusion and pharmacological approaches.

In the first part of our experiments we examined the protective effect of CO applying different concentration CO treatment. Our results show that low concentrations of exogenous CO protect the isolated ischemic/reperfused heart and act by increasing cAMP and cGMP levels in the myocardium. The significant increase in cGMP levels related to guanylate cyclase activities in CO-treated hearts, suggests that CO-induced elevation by the guanylate cyclase-cGMP system is essential for cardioprotection.

Carbon monoxide (CO) carriers have been recently developed as a pharmacological tool to simulate the effect of heme oxygenase-1-derived CO. Hearts were treated with different doses of CORM-3, which is a third generic CO releasing molecule. The results demonstrate that CO liberated from CORM-3 markedly influences the balance of important ions and, as a consequence of its effect, provides cardiac protection against tissue damage and myocardial dysfunction inflicted by ischemia-reperfusion. Indeed, hearts treated with CORM-3 were less susceptible to potentially life-threatening arrhythmias, as evidenced by the reduced incidence of VF and VT during reperfusion. The observed protection against the incidence of arrhythmias by CORM-3 was proved by a significant reduction in infarct size and improvement in post-ischemic cardiac function.

In the third part of our experiments we investigated the role of TG2 enzyme in the ischemia/reperfusion. Our datas imply that in TG2^{-/-} hearts the maintenance of the high energy-phosphate content is impaired during ischemia/reperfusion. This defect could reflect a failure in mitochondrial ATP production. We precluded the possibility that signal mediated by alpha-1b-adrenergic receptor (AR) would take in part the increasing of sensitivity regarding ischemia/reperfusion. Decreasing of high energy phosphates concentration in TG2^{-/-} hearts provide evidence for a novel function of TG2 participating in the maintenance of the intact mitochondrial respiratory function, the absence of which leads to a serious failure in ATP production.

Irodalomjegyzék

Avkiran M. and Haworth R. S., (2003) Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity: signalling and significance. *Cardiovasc Res* **57(4)**: 942-952.

Bak I., Papp G., Turoczi T., Varga E., Szendrei L., Vecsernyes M., Joo F., Tosaki A., (2002) The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Rad Biol Med* **33(5)**: 639-648.

Bak I., Szendrei L., Turoczi T., Papp G., Joo F., Das D. K., de Leiris J., Der P., Juhasz B., Varga E., Bacskey I., Balla J., Kovacs P., Tosaki A., (2003) Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* **17(14)**: 2133-2135.

Bak I., Varadi J., Nagy N., Vecsernyes M., Tosaki A., (2005) The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand, France)* **51(5)**: 453-459.

Bernassola F., Federici M., Corrazzari M., Terrinoni A., Hribal M.L., De Laurenzi V., Ranalli M., Massa O., Sesti G., McLean W.H., Citro G., Barbetti F., Melino G., (2002) Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB J* **16(11)**:1371-8

Bolli R., Becker L., Gross G., Mentzer R. Jr., Balshaw D., Lathrop D. A., (2004) Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res* **95(2)**: 125-134.

Clark J. E., Naughton P., Shurey S., Green C. J., Johnson T. R., Mann B. E., Foresti R., Motterlini R. (2003) Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res* **93(2)**: e2-e8.

Coburn R. F. (1979) Mechanisms of carbon monoxide toxicity. *Prev Med* **8**: 312-322

Csonka C., Varga E., Kovacs P., Ferdinandy P., Blasig I. E., Szilvassy Z. and Tosaki A. (1999) Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat heart. *Free Rad Biol Med* **27**: 119-126

Das D. K., Engelman R. M., Maulik N., Rousou J. A., Flack J. E. III., Deaton D. W., (1999) Molecular targets of gene therapy. *Ann Thorac Surg* **68**(5): 1929-1933

De Bias D. A., Banerjee C. M., Birkhead N. C., Greene C. H., Scott S. D. and Harrer W. V. (1976) Effects of carbon monoxide inhalation on ventricular fibrillation. *Arch Environment Health* **31**: 38-42

De Moissac D., Gurevich R M., Zheng H., Singal P.K., Kirshenbaun L.A., (2000) Caspase activation and mitochondrial cytochrome C release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **32**(1):53-63

DuToit E.F. and Opie L.H. (1992) Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by altering calcium flux at the onset of reperfusion. *Circ Res* **70**: 960-967

DuToit E.F., Meiring J. and Opie L.H., (2001) Relation of cyclic nucleotide ratios to ischemic and reperfusion injury in nitric oxide-donor treated rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* **38**: 529-538

Ferdinandy P., Schulz R., (2003) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* **138**(4): 532-543

Fesus L. And Piacentini M (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse function *Trends Biochem Sci* **27**: 534-539

Fisher P. W., Salloum F., Das A., Hyder H., Kukreja R. C., (2005) Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* **111**(13): 1601-1610

Fisher S.A., Langille L.B. Deepak S., (2000) Apoptosis during cardiovascular development. *Circulation Res* **86**: 1107-1113

Fliss H., Gattinger D, (1996) Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* **79(5)**:949-56

Foresti R., Green C. J., Motterlini R., (2004a) Generation of bile pigments by heme oxygenase: a refined cellular stratagem in response to stressful insults. *Biochem Soc Symp* **71**: 177-192

Foresti R., Hammad J., Clark J. E., Johnson R. A., Mann B. E., Friebe A., Green C. J., Motterlini R., (2004b) Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* **142(3)**: 453-460

Fujimoto H., Ohno M., Ayabe S., Kobayashi H., Ishizaka N., Kimura H., Yoshida K. I., Nagai R., (2004) Carbon monoxide protects against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt-eNOS pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24(10)**: 1848-1853

Giannini L., Vannacci A., Fabrizi F., Uliva C., Bani D., Masini E., Mannaioni P. F., (2005) Protection from cardiac injury by induction of heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase in a focal ischemia-reperfusion model. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand, France)* **51(4)**: 393-401

Gottlieb E., Haffner R., Rudin T von, Wagner E.F., Oren M., (1994) Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *EMBO J* **13(6)**:1368-74

Guo Y., Stein A. B., Wu W. J., Tan W., Zhu X., Li Q. H., Dawn B., Motterlini R., Bolli R., (2004) Administration of a CO-releasing molecule at the time of reperfusion reduces infarct size in vivo. *Am J Physiol Heart and Circ Physiol* **286(5)**: H1649-H1653

Hearse D. J., Bolli R., (1992) Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* **26(2)**: 101-108

Imahashi K., Schneider M. D., Steenbergen C., Murphy E., (2004) Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* **95(7)**: 734-741

Imahashi K., Pott C., Goldhaber J. I., Steenbergen C., Philipson K. D., Murphy E., (2005) Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* **97(9)**: 916-921

Jaggar J. H., Leffler C. W., Cheranov S. Y., Tcheranova D. E. S., Cheng X., (2002) Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca²⁺ sparks to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* **91(7)**: 610-617

Jaggar J. H., Li A., Parfenova H., Liu J., Umstot E. S., Dopico A. M., Leffler C. W., (2005) Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* **97(8)**: 805-812

Dr Karlócai Kristóf: Az ischaemiás szívbetegség népegészségügyi jelentősége. *Orvosi Hetilap*, **146(20)**: Suppl. 2 1045-1046

Katori M., Buelow R., Ke B., Ma J., Coito A. J., Iyer S., Southard D., Busuttil R. W. and Kupiec-Weglinski J. W. (2002) Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* **73**: 287-292

Kovács P., Bak I., Szendresi L., Vecsernyes M., Vatga E., Blasig I.E., Tosaki A., (2001) Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **364(6)**:501-7

Kurrelmeyer K. A. és mtsai, 2000 Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci* **97(10)**:5456-61

Lopez-Barneo J., Castellano A., (2005). Multiple facets of maxi-K⁺ channels: the heme connection. *J Gen Physiol* **126(1)**: 1-5

Maechler P and Wollheim C. B., (2001) Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* **414(6865)**:807-12.

Mackay K., Mochly-Rosen D, (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia *J Biol Chem.* **274(10)**:6272-9

Maines M. D., (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annl Rev of Pharmacol and Toxicol* **37**: 517-554

Maines M. D., Raju V. S., and Panahian N. (1999) Spin trap (N-t-butyl-alpha-phenylnitron)-mediated suprainduction of heme oxygenase in kidney ischemia/reperfusion model: role of the oxygenase in protection against oxidative injury. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 911-919

Manning A. S., Hearse D. J., (1984). Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* **16(6)**: 497-518

McCord J. M., (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* **312(3)**: 159-163

McGrath J.J. and Smith D.L., (1984) Response of rat coronary circulation to carbon monoxide and nitrogen hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* **177**: 132-136

Mocanu M.M., Baxter G.F., Yellon D.M., (2000). Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* **130(2)**:197-200

Motterlini R., Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B. E., Green C. J., (2002a.) Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* **90(2)**: E17-E24

Motterlini R., Green C. J., Foresti R., (2002b). Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxidants & Redox Signaling* 4(4), 615-624.

Motterlini R., Mann B. E., Johnson T. R., Clark J. E., Foresti R., Green C. J., (2003) Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Curr Pharm Des* **9(30)**: 2525-2539

Motterlini R., Mann B. E., Foresti R., (2005a.) Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs). *Expert Opin Investig Drugs* **14(11)**: 1305-1318

Motterlini R., Sawle P., Bains S., Hammad J., Alberto R., Foresti R., Green C. J. (2005b) CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *FASEB J* **19(2)**: 284-286

Myers M. L., Bolli R., Lekich R. F., Hartley C. J., Roberts R., (1985) Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* **72(4)**: 915-921

Népegésségügyi Jelentés, (2004) Országos Epidemiológiai Központ, www.oek.hu

Okamura T., Miura T., Take mura G.,Fujiwara H., Iwamoto H., Kawamura S., Kimura M, Ikeda Y., Iwatate M., Matsuzaki M., (2000) Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* **45(3)**:642-50

Opie L. H., (1980) Drugs and the heart. IV. Antiarrhythmic agents. *Lancet* **1(8173)**: 861-868.

Opie L. H., (1989a) Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* **80(4)**: 1049-1062

Opie L. H., (1989b) Proposed role of calcium in reperfusion injury. *Int J Cardiol* **23(2)**: 159-164

Patel A. P., Moody A. J., Snyder J. R. and Handy R. D. (2004) Carbon monoxide exposure in rat heart: evidence of two models of toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **321**: 241-246

Piacentini M., Farrace M.G., Piredda L., Mataresse P., Ciccocanti F., Falasca L., Rodolfo C., Giammarioli A.M., Verderino E., Griffin M., C., Malomi V., (2002) Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress. *J Neurochem* **81(5)**:1061-72

Pridjian A. K., Levitsky S., Krukenkamp I., Silverman N. A., Feinberg H., (1987) Developmental changes in reperfusion injury: a comparison of intracellular cation accumulation in the newborn, neonatal, and adult heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* **93(3)**: 428-433

Reimer K.A., Lowe J.E., Rasmussen M.M., Jennings R.B.,(1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*.**56(5)**:786-94

Sarang Z., Molnar P., Nemeth T., Gomba S., Kardon T., Melino G., Cotecchia S., Fesus L., Szondy Z., (2005) Tissue transglutaminase (TG2) acting as G protein protects hepatocytes against Fas-mediated cell death in mice. *Hepatology* **42(3)**: 578-87

Sawle P., Foresti R., Mann B. E., Johnson T. R., Green C. J., Motterlini R., (2005) Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *B J Pharmacol* **145(6)**: 800-810

Schultz J. E., Yao Z., Cavero I., Gross G. J., (1997) Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *A J Physiol Heart and Circ Physiol* **272(6)**: H2607-H2615

Sharma V.S., Magde D., (1999) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: mechanistic model. *Methods* **19**: 495-505

Shivkumar K., Deutsch N. A., Lamp S. T., Khuu K., Goldhaber J. I., Weiss J. N., (1997) Mechanism of hypoxic K loss in rabbit ventricle. *J Clin Invest* **100(7)**: 1782-1788

Stein A. B., Guo Y., Tan W., Wu W. J., Zhu X., Li Q., Luo C., Dawn B., Johnson T. R., Motterlin, R., Bolli R., (2005) Administration of a CO-releasing molecule induces late preconditioning against myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **38(1)**: 127-134

Szabo M. E., Gallyas E., Bak I., Rakotova A., Boucher F., de Leiris J., Nagy N., Varga E. and Tosaki A. (2004) Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 3727-3732

Szendrei L., Turoczi T., Kovacs P., Vecsernyes M., Das D. K., Tosaki A., (2002) Mitochondrial gene expression and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused nondiabetic and diabetic myocardium. *Biochem Pharmacol* **63(3)**: 543-552

Takashi E., Wang Y., Ashraf M., (1999) Activation of mitochondrial K(ATP) channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* **85(12)**: 1146-53

Tenhunen R., Marver H.S. and Schid R., (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci* **68**: 748-755

Tosaki A., Hearse D. J., (1987) Protective effect of transient calcium reduction against reperfusion-induced arrhythmias in rat hearts. *A J Physiol* **253(2 Pt 2)**: H225-H233

Tosaki A., Das D. K., (2002) The role of heme oxygenase signaling in various disorders. *Moll Cell Biochem* **232**: 149-157

Turner M., Hamilton-Farrell M. R. és Clark R. J. (1999) Carbon monoxide poisoning: an update *J Accid Emerg Med* **16**: 92-96

Verma A., Hirsch D. J., Glatt C. E., Ronnett G. V., Snyder S. H. (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* **259**: 381-384

Vulapalli S. R., Chen, Z., Chua, B. H., Wang, T., Liang C. S., (2002) Cardiospecific overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *A J Physiol Heart and Circ Physiol* **283(2)**: H688-H694.

Wang R., (2002) Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* **16**: 1792-1798

Yet S. F., Tian R., Layne M. D., Wang Z. Y., Maemura K., Solovyeva M., Ith B., Melo L. G., Zhang L., Ingwall J. S., Dzau V. J., Lee M. E. and Perrella M. A. (2001) Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* **89**: 168-173

Zhao Z.Q., Nakamura M., Wang N.P., Wilcox J.N., Shearer S., Ronson R.S., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. (2000) Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* **45(3)**: 651-660

Tárgyszavak

Szén-monoxid, izolált szív, iszkémia, reperfúzió, arrythmiák, cAMP, cGMP, CORM, apoptózis, transzglutamináz-2

Keywords

Carbon monoxide, isolated heart, ischemia, reperfusion, arrhythmias, cAMP, cGMP, CORM, apoptosis, transglutaminase-2

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

1. Bak I., **Varadi J.**, Nagy N., Vecsernyes M., Tosaki A., (2005) The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol* **51**: 453-459. **IF: 1.018**
2. **Varadi J.**, Lekli I., Juhasz B., Bacskay I., Szabo G., Gesztelyi R., Szendrei L., Varga E., Bak I., Foresti R., Motterlini R., Tosaki A., (2007) Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecules on post-ischemic myocardial recovery. *Life Sciences* **80**: 1619-1626. **IF: 2.512**
3. Szondy Zs., Mastroberardino P.G., **Varadi J.**, Farrace M.G., Nagy N., Viti I., Wieckowski M.R., Melino G., Rizzuto R., Tosaki A., Fesüs L. and Piacentini M., Tissue transglutaminase (TG2) protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by relating ATP synthesis *Cell Death Differ* **13**: 1827-1829. **IF: 7,785**

Az értekezéshez fel nem használt közlemények

1. Bak I., Lekli I., Juhasz B., Nagy N., Varga E., **Varadi J.**, Gesztelyi R., Szabo G., Szendrei L., Bacskay I., Vecsernyes M., Antal M., Fesus L., Boucher F., Joel de Leiris, Tosaki A., (2006) Cardioprotective mechanisms of Prunus cerasus (sour cherry) seed extract against ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart and Circ Physiol* **291** (3): H1329-36 **IF: 3.56**
2. Szilagyi A., Fenyvesi F., Majercsik O., Pelyvas F.I., Bacskay I., Feher P., **Varadi J.**, Vecsernyes M., Herczegh P., (2006) Synthesis and cytotoxicity of leinamycin antibiotic analogs *J Med Chem* **49**: 5626-5630 **IF: 5.104**
3. Kiss T., Fenyvesi F., Pasztor N., Feher P., **Varadi J.**, Kocsan R., Sente L., Fenyvesi E., Szabo G., Vecsernyes M., Bacskay I., (2007) Cytotoxicity of different types of methylated β -cyclodextrins and ionic derivatives *Die Farmazie* (Közlésre elfogadva) **IF: 0,677**

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Tósaki Árpádnak a Ph.D. munkám során nyújtott segítségéért és útmutató tanácsaiért. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Vecsernyés Miklós tanszékvezető Úrnak hogy munkám elvégzésében támogatott. Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Fésűs Lászlónak és Prof. Dr. Szondy Zsuzsának, hogy támogatták munkacsoportunk kollaborációját.

Köszönettel tartozom Dr. Bak Istvánnak értékes tanácsaiért és Lekli Istvánnak a munkám során nyújtott segítségéért, valamint a Gyógyszerhatástani Tanszék minden munkatársának, köztük Dr. Gesztelyi Rudolfnak és Dr. Juhász Bélának.

Köszönöm a Gyógyszertechnológiai Tanszék minden munkatársának türelmét és segítségét.

Végül és nem utolsósorban szeretném megköszönni Szüleim és férjem szerető támogatását, aki nélkül ez a dolgozat nem született volna meg.