

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

dr. Czompa Attila

A hemoxigenáz-1 enzimrendszer szerepe a szívizkémiaában

**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2015**



**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A hemoxigenáz-1 enzimrendszer szerepe a  
szívizkémiában**

**dr. Czompa Attila**

**Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2015**

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	1
Bevezetés.....	3
Irodalmi áttekintés.....	6
Iszkémiás szívbetegség .....	6
Oxidatív stressz .....	7
A hemoxigenáz (HO) biokémiai szerepe és génregulációja .....	9
Hemoxigenáz-1 indukció .....	13
A hemoxigenázok által katalizált reakciók végtermékei és azok lehetséges hatásai .....	14
A HO-1 szerepe a különböző kórfolyamatokban .....	19
A HO-1 szerepe a kardiovaszkuláris kórképekben .....	21
Természetes eredetű HO-1 induktorok .....	24
A meggy-magbél kivonat lehetséges hatóanyagai.....	25
Anyagok és módszerek.....	27
Kísérleti állatok – egerek és patkányok.....	27
Transzgén egér .....	27
Kezelési protokoll meggy-mag-kivonattal patkányokban .....	28
Kezelési protokoll egerekben .....	28
Izolált dolgozó szív preparátum .....	28
Az iszkémia kiváltása.....	29
A patkányszív pumpafunkciójának mérése.....	30
Kamrafibrilláció követése és az egérszív pumpafunkcióinak mérése.....	30
Fehérje izolálás és Western blot.....	31
Infarktusz terület meghatározás.....	32
Immunhisztokémia .....	32
RT-PCR.....	33
HO-1 aktivitásmérés.....	33
Szöveti CO szint meghatározása .....	33
Intracelluláris Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> és Ca <sup>2+</sup> tartalom-mérés .....	34
Statisztikai elemzés .....	34

Eredmények.....	36
A meggy-magbél-kivonat hatása iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben .	36
A meggy-magbél-kivonat hatása a balkamra funkciókra .....	36
A meggy-magbél- kivonat hatása az infarktus által érintett terület nagyságára .....	38
A meggy-magbél-kivonat kezelés hatása túlélési útvonalak aktiválására.....	38
HO-1 fehérje expressziójának változása meggy-magbél-kivonat hatására .....	39
A HO-1 enzim szerepe az I/R károsodások kivédésében transzgén egereken .....	40
Patkány HO-1 expresszió igazolása Tg egerekben .....	40
A HO-1 expresszió hatása az egér bal kamra-funkciókra .....	43
Szöveti CO tartalom változása .....	44
A HO-1 expresszióváltozás hatása a miokardium intracelluláris ionösszetételére .....	45
A HO-1 expresszióváltozás hatása az infarktus által érintett terület nagyságára és a kamrafibrilláció gyakoriságára.....	46
Megbeszélés .....	48
Összefoglalás.....	54
Summary .....	54
Irodalomjegyzék.....	55
Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke .....	55
Saját közlemények jegyzéke .....	69
Tárgyszavak .....	72
Köszönetnyilvánítás .....	73
Függelék .....	75

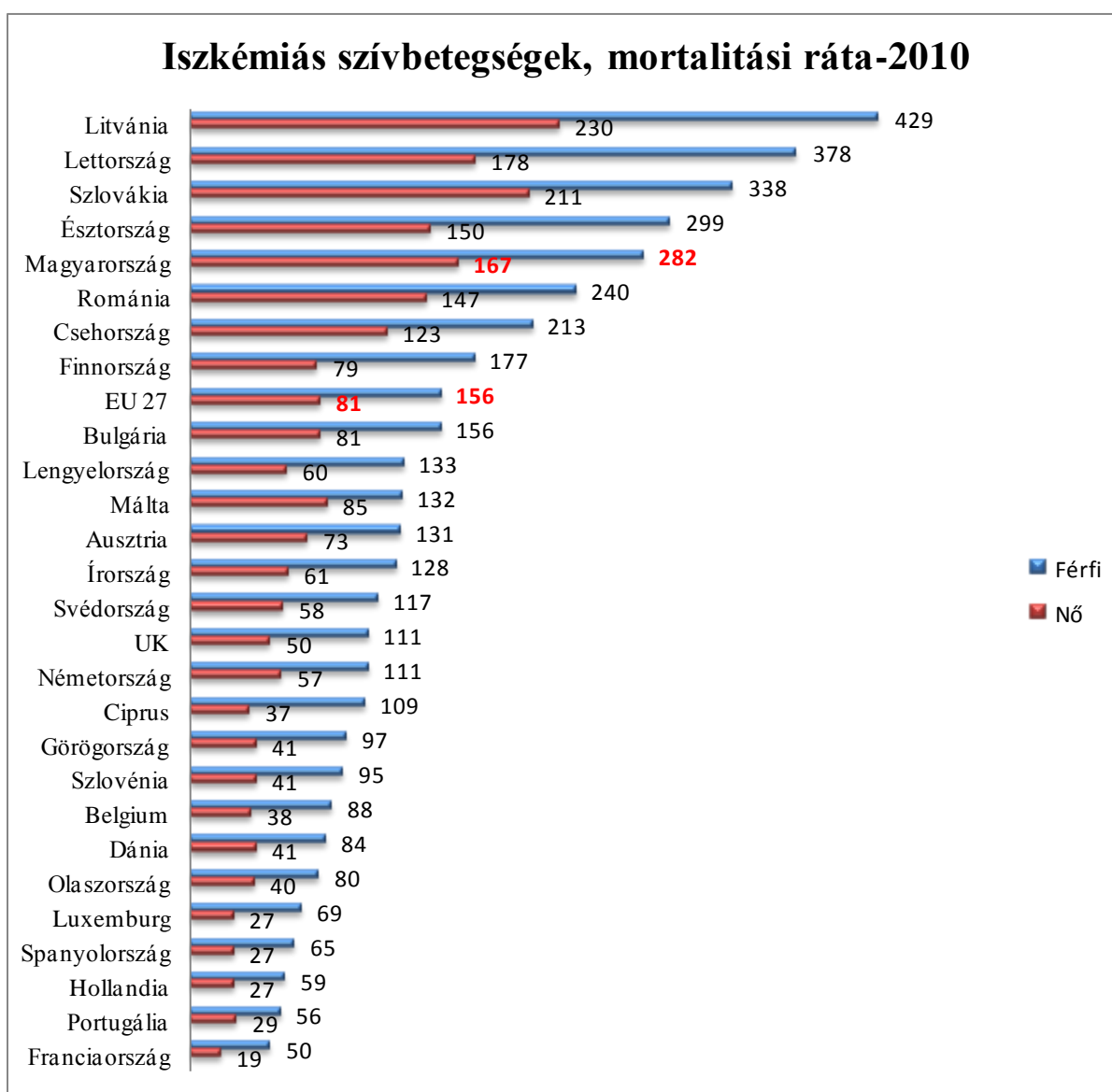
## Rövidítések jegyzéke

AF	aorta kiáramlás (aortic flow)
AODP/dt	kifejlődő aortanyomás idő szerinti első deriváltja (first derivative of aortic pressure)
AOP	kifejlődő aortanyomás (aortic pressure)
b-ZIP	basic-leucine zipper
CF	koronária átáramlás (coronary flow)
CNC-bZIP	Cap'n'collar/basic-leucine zipper
CO	szénmonoxid
CO-RM	szénmonoxid felszabadító molekula
COUT	perctérfogat (cardiac output)
ER	endoplazmatikus retikulum
HO	hemoxigenáz
HO-1	hemoxigenáz-1 izoenzim
HR	szívfrekvencia (heart rate)
HSP-32	hősokk fehérje 32
I/R	iszkémia/reperfúzió
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
IL-6	interleukin-6
ISZB	iszkémiás szívbetegség
KH	Krebs-Henseleit
KO	knock out
LV	bal kamra (left ventricle)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MCP-1	monocita kemotaktikus fehérje-1 (monocyte chemotactic protein-1)
MPTP	mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus
Nrf2	nuclear factor [(erythroid-derived 2) -like 2]
NTg	nem transzgén
ROS	reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species)
RV	jobb kamra (right ventricle)
S	szeptum (septum)
SCSE	szilárd meggyagból-kivonat (sour cherry seed extract)

SEM	számtani középérték standard hibája (standard error of mean)
SnPPIX	ón-protoporfirin-IX
SOD	szuperoxid diszmutáz
StRE	stressz-érzékeny szekvencia elem (stress-response element)
SV	verőtér fogat (stroke volume)
Tg	transzgén
TNF- $\alpha$	tumor nekrozis faktor- $\alpha$
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetát
TTC	trifenil-tetrazólium-klorid
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VF	kamrai fibrilláció (ventricular fibrillation)
VSMCs	vaszkuláris simaizomsejtek (vascular smooth muscle cells)
VT	kamrai tachikardia (ventricular tachycardia)
ZnPPIX	cink-protoporfirin-IX

## Bevezetés

A kardiovaszkuláris megbetegedések következtében elszenvedett halálozások napjainkban is vezetnek a statisztikákat. Az elmúlt évtizedekben jelentős erőfeszítések történtek különböző gyógyító és megelőző eljárások kifejlesztésére, így ez az arány az elhalálozásokat illetően javuló tendenciát mutat. A különféle kardiovaszkuláris megbetegedéseknek manapság így is kétszer annyi áldozata van, mint a daganatos megbetegedéseknek. A leggyakoribb betegségek között is az első három helyen valamilyen kardiovaszkuláris kórkép áll.



**1. ábra: Iszkémiás szívbetegségek következtében elhunyt fő/100000 fő.**

**Magyarország az EU sereghajtói között.**

**(Életkorral standardizált mortalitási ráta. 2010. Eurostat database)**

A koszorúér-betegség előfordulási gyakorisága egyre növekszik, a fejlett ipari országokban a vezető halálok. A fejlődő országokban becslések szerint 2020-ra a lakosság jelentős része lesz érintett. Hazánkban közel 80000 beteg hunyt el keringési betegségben 2005-ben. A kardiovaszkuláris halálesetek száma csökkent; 2012-ben hozzávetőlegesen 60 000 volt. Megjegyzendő azonban, hogy az összes betegség okozta haláleset száma is csökkent [1].

A populáció öregedésével a szív és érrendszeri betegségek előfordulási gyakorisága növekszik, becslések szerint a fejlett és a jelenleg fejlődő országokban a vezető halálok az iszkémiás szívbetegség (ISZB) lesz és ezt a cerebrovaszkuláris betegségek követik majd. Elsősorban a kórházi költségek miatt az ISZB kezelése globálisan is jelentősen növeli az egészségügyi kiadásokat. Mivel a kardiovaszkuláris megbetegedésben szenvedők kezelése egyre jelentősebb terheket ró a nemzetgazdaságra, ezért hatékonyabb (költséghatékonyabb) terápiás lehetőségek és újabb preventív stratégiák kidolgozása egyre fontosabbá válik. Az életmód, a jól ismert kardiovaszkuláris rizikófaktorok és az ISZB morbiditása és mortalitása közötti szoros kapcsolat ma már egyértelmű tény. Számos esetben a teljes vagy részleges életmódváltás azonban nem, vagy csak nagyon nehezen megvalósítható. Egy ötvenes éveiben járó beteget igen nehéz rávenni a teljes vagy részleges életmódváltásra, ezért is fontos olyan növények vagy természetes anyagok vizsgálata, amelyek képesek hozzájárulni a preventív célok megvalósításához.

A kardiovaszkuláris preventív stratégiákban fontosabb szerepe van a szekunder preventív (betegség progressziójának lassítása/megakadályozása) és az ún. „high risk” preventív stratégiának (a magas rizikójú csoportok kiválasztása és a rizikófaktorok csökkentése/eliminálása), mint a primer stratégiának (kardiovaszkuláris megbetegedésben nem szenvedőknél a klinikailag manifest betegség megelőzése). Becslések szerint a manifest kardiovaszkuláris megbetegedésben szenvedőknél a további nemkívánatos történések kialakulásának a valószínűsége hatszor magasabb, mint a hasonló kockázatú egészségeseké. Ennek fényében érthető a szekunder preventív stratégiák kiemelt fontossága egészségmegőrzés és nemzetgazdasági szempontból egyaránt. Ezek mellett fontos megemlíteni az ún. populációs stratégiát, ami a teljes lakosság rizikóstatusát próbálja csökkenteni az életmód, környezeti, szociális és gazdasági tényezők befolyásolásán keresztül. Ennek fontosságát mi sem hangsúlyozza jobban, minthogy a lakosság nagy többsége a közepes rizikójú csoportba tartozik és ebből a csoportból kerül ki a legtöbb kardiovaszkuláris

megbetegedésben szenvedő beteg, ugyanakkor a magas rizikójú csoportba viszonylag kevés ember tartozik, így a teljes lakosságra kivetítve viszonylag csekély számú beteget érint.

Az ISZB prevenciójának három fontos eleme van, amelyek az életmód változtatás és a rizikótényezők csökkentése; profilaktikus gyógyszerek alkalmazása; és a fiatalabb koszorúérbetegek hozzátartozóinak szűrése és oktatása.

Napjainkban egy új irányvonal rajzolódik ki, miszerint a szintetikus gyógyszerek mellett a növényi hatóanyagok gyógyszerként vagy preventív céllal történő alkalmazása egyre fontosabbá válik. Ennek egyik oka sok esetben a növényi derivátumok olcsóbb előállítási költsége, valamint kedvezőbb mellékhatásprofilja. Egyre több tanulmány számol be arról, hogy bizonyos növények vagy természetes hatóanyagok profilaktikus adagolása jelentősen csökkenti az iszkémia/reperfúzió (I/R) következményeit különböző állatmodellekben.

Ilyen természetes eredetű anyag többek között a meggymag, amely Magyarországon nagy mennyiségben áll rendelkezésre, mint ipari hulladék. Kutatócsoportunk korábban már megvizsgálta a meggymagból szilárd fázisának a kardiovaszkuláris rendszerre és a retinára kifejtett hatásait, azonban ezek háttérében álló pontosabb molekuláris hatásmechanizmusok tisztázására ezidáig még nem került sor.

# Irodalmi áttekintés

## Iszkémiás szívbetegség

A nemzetgazdaságilag és a társadalmilag is nyomasztó kardiovaszkuláris megbetegedésekkel kapcsolatos problémákat elsősorban a kórképek megelőzésével, illetve a hajlamosító tényezők korai felismerésével, valamint elhárításával lehet megoldani, vagy mérsékelni. A szívelégtelenség kialakulásában a két legfontosabb kórállapot a magas vérnyomás és az iszkémiás szívbetegség. A két kórfolyamat között szoros kapcsolat áll fenn, hiszen a koronária betegség egyik legfőbb rizikótényezője a hipertónia. A magas vérnyomás legkevesebb három folyamat nyomán okozhatja a miokardium iszkémiáját. Ezek a folyamatok egymással is összefüggésben állnak. Egyrészt a hipertónia közvetlen endotél sérülést hozhat létre, amely ateroszklerózishoz vezethet, ezáltal a hipertónia aterogén tényezőnek tekinthető. Másrészt a hirtelen megnövekedő vérnyomással a falfeszülés is megnő, megnövekszik a végdiasztolés nyomás, növekszik a szívizom oxigénigénye. Ugyanakkor romlik a koronáriakeringés, emiatt a szívizom sejtekben megnövekszik a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció, ami vazokonstrikcióhoz vezet a koronáriaereken. A harmadik mechanizmus a szív hemodinamikai változásaival van összefüggésben, ugyanis a nyomásterhelés következtében bal kamra hipertrófia alakul ki, amely mikrocirkulációs zavarokhoz vezet a miokardiumban [2]. A lecsökkent koronária-véráramlás és az érlemezés együttesen miokardiális iszkémiához vezet, mely endotél sejtek apoptózisát indukálhatja és az így elvesztett sejtek összessége a vérellátást tovább akadályozó trombozist eredményezheti [3]. Iszkémia során az oxigénhiány végett leáll az aerob metabolizmus és a helyét anaerob glikolízis veszi át; lecsökken a kreatin-foszfát szint és anyagcseretermékek felszaporodása figyelhető meg, mint például a tejsav és az alfa-glicerolfoszfát. Ebből adódóan a miokardium kontraktilitása meggyengül, hiszen az anaerob folyamatok nem tudják a kellő mennyiségű ATP-t előállítani. A kreatin-foszfát szint csökkentésével a szövetben kezdetben csak kismértékű az ATP szint-csökkenés, viszont ennek lecsengése után teljesen felborul az egyensúly, s a szövet ATP igényét a sejtek nem képesek fedezni. A tejsav felszaporodása miatt megnövekszik a  $\text{H}^+$ -ok intracelluláris koncentrációja, amely  $\text{Na}^+$ -ra cserélődik ki. Az iszkémia alatt lecsökkent ATP szint miatt szünetel a  $3 \text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$  ATPáz működése, amely tovább növeli az intracelluláris  $\text{Na}^+$  terhelést. A sejt próbálja a felgyülemlett  $\text{Na}^+$  -ot eltávolítani a  $3 \text{Na}^+ / 1 \text{Ca}^{2+}$  ioncserélő segítségével, amivel viszont tovább súlyosbodik az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  túlterhelés [4].

Az iszkémiás miokardium funkcióképes sejtjeinek megmentése érdekében elengedhetetlen az időben történő reperfúzió, ami az okklúzió megszüntetésével, a sztenózis mérséklésével érhető el. A reperfúzió indukálta károsodások, amelyek lehetnek reverzibilisek illetve irreverzibilisek, nagy figyelmet érdemelnek. Reverzibilis károsodás lehet a reperfúzió indukálta kamrai aritmia, amely általában spontán megszűnik és könnyen kezelhető [5], valamint a miokardium hibernációja. Ez utóbbi okai közé sorolható a kontraktilis apparátus oxidatív stressz okozta károsodása és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  túlterheltsége [6]. Irreverzibilis reperfúzió indukált károsodásnak tekinthető egyrészt a mikrovaszkuláris okklúzió. Legfontosabb hozzájáruló tényezői a folyamatnak például a kapilláris károsodás, a hipertrofizáló endotél és miokardiális sejtek miatti kapilláris kompresszió, az ateroszklerotikus plakkból letöredező részek mikroembóliát okozó hatása, a vérlemezkék aggregációja, az iszkémia alatt elkezdődő neutrofil infiltráció fokozódása, szabadgyökök képződése és a komplement rendszer aktivációja [7-11]. Irreverzibilis károsodásnak tekinthetjük továbbá a kardiomiociták elhalását, amelyhez szintén az oxidatív stressz, a kalcium túlterhelés, a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (MPTP) kinyílása és hiperkontraktilitás [12] vezethet. A kardiomiociták apoptózisa már az iszkémia alatt elkezdődik és a reperfúzió alatt nagymértékben súlyosbodik. Ennek következtében várható az, hogy az apoptózis gátlása csökkentheti az I/R okozta károsodást a miokardiumban [13], így javíthatja a sejtek túlélését.

## **Oxidatív stressz**

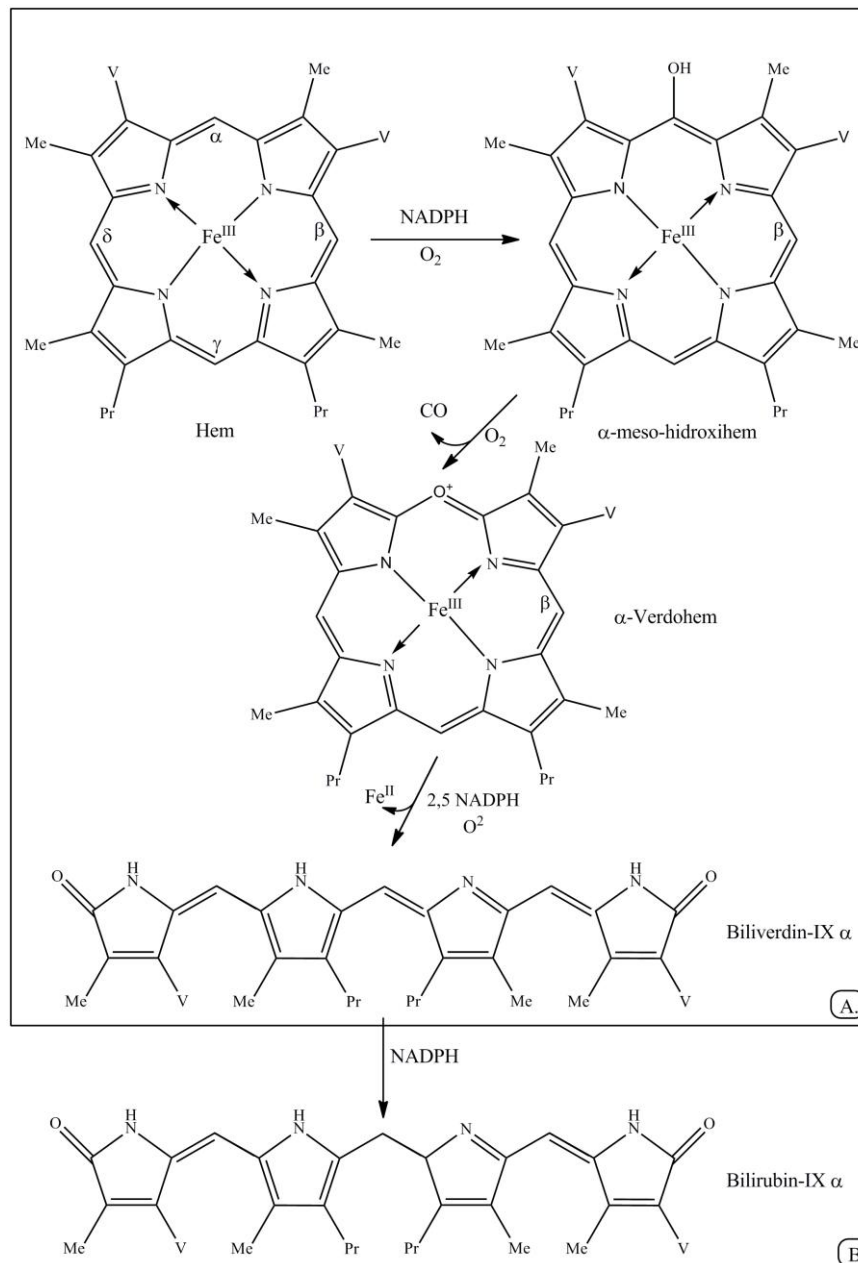
Az oxidatív stressz főként a nagymértékű reaktív oxigén és nitrogén gyökök képződésével jellemezhető. Az oxigén részleges redukciója során képződő anyagok rendkívül instabilak és meglehetősen reaktív vegyületek, mint például a szuperoxid gyök is. A szuperoxid aniont a szuperoxid diszmutázok (SOD-k) enzimatikusan alakítják át hidrogén peroxiddá ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A SOD központi szerepére világít rá az oxidatív stresszel szembeni védekezésben az a tény, miszerint koronáriabetegségben szenvedők esetén a SOD enzimaktivitása jelentősen csökkent [14]. Emellett biológiai rendszerekben a szuperoxid nem-enzimatis módon is átalakulhat  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dá és szinglet oxigénné [15]. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  kifejezetten reaktív tulajdonságainál fogva például a Fenton reakcióként is ismert folyamatban átmenetifémekkel, a biológiai rendszerekben leggyakrabban  $\text{Fe}^{2+}$ -al hidroxilgyököt képez. A reaktív oxigéngyökök (ROS) és a párosítatlan elektronnal nem rendelkező, ám rendkívül reaktív molekulák ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , szerves peroxidok) féléletideje nagyon rövid és kimagaslóan

toxikus hatással bírnak a szövetekre, így a szív miokardiumára is [16]. A ROS-ek hatására a fehérjék szulfhidril csoportjainak oxidációján túl a nukleinsav láncok hasításával a DNS-ben töredeзések is kialakulhatnak [17]. A gyökök átalakíthatják a foszfolipidek szerkezetét, a lipoprotein eredetű többszörösen telítetlen zsírsavak oldalláncáról pedig hidrogént vonhatnak el. A keletkező peroxilgyökök újabb zsírsavval reagálva láncreakciót hoznak létre, azaz elindul a lipidperoxidáció. A reakciók folyamányaként módosul a membrán felépítése és áteresztőképessége, valamint számos celluláris fehérje is változást szenvedhet [18]. Sérülhet a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz és a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPáz működése, emiatt csökken a  $\text{Ca}^{2+}$  efflux, ugyanakkor növekedik a  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Az oxidatív stresszről azt is leírták, hogy a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz működését is hátráltatja, ami miatt ugyancsak gátlódik a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítása a szívizomsejtek citoplazmájából. A folyamat eredményeként egyre nő a  $\text{Ca}^{2+}$  terhelés és a szívizomsejtek elhalása is egyre nagyobb mértékű [19]. A fentebb említett lipidperoxidáció hatására az alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL) is oxidálódhatnak. Az oxidált LDL úgy tűnik fontos szerepet játszik az érlemezés kezdeti lépéseinek kialakulásában és a már kialakult plakk egyik összetevő elemeként nagymértékben fokozza az ateroszklerotikus lézió instabilitását az érpályában. Az érlemezés első lépésében a ROS-ek által előidézett DNS károsodás az erek simaizomzatának hipertrófiáját okozhatja. Az oxidált LDL receptor mediált útvonalon jut be az endotél sejtekbe. Az érfalon belül csökkenti a makrofágok mozgását, növeli azok koleszterin felvételét, ami az ún. habos sejtek képződéséhez vezet. Az oxidált LDL továbbá részben kemotaktikus ingerként elősegítheti a lokálisan jelenlévő monociták számának növekedését, másrészt toxikus hatással bír, így növelheti az endotélsejtek apoptózisát és a vazokonstriktiót [20].

Eukarióta sejtekben normál körülmények között a légzés, metabolikus folyamatok, fagocitózis, növekedési faktorok és citokinek hatására is keletkeznek oxidatív sajátságú anyagok. Az oxidatív specieszek toxikus hatásainak ellensúlyozására a sejtek enzimikus és nem-enzimikus folyamatokat egyaránt felhasználnak. Az utóbbi folyamatokban szerepet játszhat például a glutation, a C-vitamin, az  $\alpha$ -tokoferol, míg az enzimikus antioxidáns folyamatokban nagy szerepet játszik a SOD, a kataláz, a glutation-peroxidáz és a hemoxigenáz is.

## A hemoxigenáz (HO) biokémiai szerepe és génregulációja

A hemoxigenázok (HO) olyan evolúciósan konzervált enzimek, amelyek a hem lebontásának első, sebességmeghatározó lépését katalizálják [21, 22]. A hem, a hemoproteinek – mint pl. a hemoglobin és a mioglobin - prosztetikus csoportja, amely egy porfirinvázból és egy központi vas (II) atomból áll. A porfirinvázat alkotó négy pirrolgyűrűt metinhidak kötik össze. Az oxidáció során a HO a hem  $\alpha$ -metin hídjának hasítását katalizálja. A többlépéses folyamathoz három  $O_2$  molekula és hét elektron szükségeltetik [23]. Emlősökben az elektronokat a NADPH-citokróm-P450-reduktáz szolgáltatja [24], míg alacsonyabb szerveződésű szinteken, mint például növények és baktériumok esetén alternatív elektronforrások is felfedezhetők [25, 26]. In vitro kísérletekben a NADH is megfelelő elektrondonornak bizonyult [27]. A hem-bontás kezdeti lépésében NADPH jelenlétében redukálódik a gyűrűben lévő vas és így egy hidroperoxid ( $Fe\ III-OOH$ ) intermedier keletkezik. Ez a hem gyűrű  $\alpha$ -metin hídjának szénatomját hidroxilálja, így a hem  $\alpha$ -mezo-hidroxihemmé alakul, amely deprotonált állapotában szabadgyök tulajdonsággal bír. Az  $\alpha$ -mezo-hidroxihem könnyen reakcióba lép oxigénnel, így képezve további két oxidációs lépésben a verdohemet és a szén-monoxidot (CO) [28-32]. A verdohem végső soron  $O_2$  és NADPH-citokróm-P450-reduktáz jelenlétében biliverdin-IX $\alpha$ -vá alakul szabad vas keletkezése mellett (2. ábra A panel).



**2. ábra: A hem lebontása.**

**A. panel: a hemoxigenáz által katalizált reakciósor.**

**B. panel: a biliverdin reduktáz által katalizált reakció.**

**(Me: -CH<sub>3</sub>; V: -CH=CH<sub>2</sub>; Pr: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H.)**

A szabad porfirinvázat nem hasítja a hemoxigenáz, Tenhunen és munkatársai ebből kifolyólag 1969-ben azt a megállapítást tették, hogy az enzimreakcióhoz feltétlenül szükség van a központi vas atomra [22]. A keletkezett biliverdin-IX $\alpha$ -t a biliverdin reduktáz redukálja bilirubin-IX $\alpha$ -vá (2. ábra B. panel) [33]. A felszabadult vas-ionokat a sejt egyrészt ferritin molekulákban tárolhatja. A ferritin egy 20-24 alegységből álló fehérje, amely belső,

gömböszzerű üregében hozzávetőlegesen 4500 vas iont képes megkötni vas(III)-oxid-hidrátként mikrokristályos formában, vagy micellákban [34]. A fehérje expresszióját növeli az  $Fe^{2+}$  ionok mennyiségének növekedése. A szabad vasat másrészt ATP függő vas-pumpa transzportálhatja a sejten kívüli térbe [35]. A HO tehát fontos szerepet játszik a vas-homeosztázisban, de kulcsszerepet játszik az oxidánsokkal szembeni védelemben is, mivel a hem a szabadgyökök képződését katalizálja. A humán hemoxigenáz izoformák közül eddig kettőt azonosítottak. A HO-1 egy 32 kDa tömegű fehérje, ami hőshockfehérje 32 néven (hsp-32) is ismert. Oxidatív stressz során a sejtek számos útvonalon keresztül kerülhetik ki a szabad hem pro-oxidáns hatásait. Ezek az útvonalak főként a HO-1 izoenzim gyors indukálhatóságán alapszanak, így gyorsan eliminálhatják a szabad hemet, ezzel pedig a sejt elkerülheti a gyulladáskeltő anyagok hatására kiváltott programozott sejthalált [36].

A HO-2 (~36 kDa) egy konstitutív izoformája a hemoxigenázoknak [37, 38]. Ez az enzim is rendelkezik katalitikus aktivitással, de mivel az oxidatív mechanizmusokra nem tud mennyiségi növekedéssel reagálni, ezért valószínűsíthetően a szabad hem-csoporttal szembeni sejtvédő folyamatokban nincs központi szerepe. Kimutatható mennyiségben van jelen a vaszkulátúrában, az agyban és a herékben, így a feltételezések szerint befolyásolhatja a vazomotoros tónust, a neurotranszmissziót és a reprodukciós sejtek biogenezisét [39]. Egy harmadik hemoxigenáz izoformát (HO-3) is leírtak patkányokban, amiről azóta bizonyítást nyert, hogy valószínűleg a HO-2 transzkriptumának pszeudogén származéka és katalitikus aktivitása sokkal kisebb [40, 41]. A HO-1-t a HMOX1 gén kódolja, amely a 22-es kromoszómán lokalizálódik. A HO-2-t a HMOX2 gén kódolja, ez pedig a 16-os kromoszómán helyezkedik el. A HO-1 és -2 aminosavsorrendje 43% -os homológiát mutat [42].

A HO-1 expressziója alapvetően a transzkripció szintjén szabályozódik, néhány kivétellel, mint például hipoxia, vagy acidózis okozta mRNS stabilizáció [43, 44]. A HMOX1 gén átíródást kiválthatja számos jelátviteli útvonal, amelyek különböző transzkripciós faktorokat aktiválhatnak. A HMOX1 gén promóterén három szabályozó régiót ismerünk, amelyhez a transzkripciós faktorok kötődhetnek: egy proximálisan (0,3 kb távolságra) és kettő disztálisan a transzkripció iniciációs pontjától. A disztális régiók szabályozásban betöltött szerepének fontosságára először egér HO-1 gén deléciós mutagenitási tanulmányok világítottak rá. Ezekben a vizsgálatokban két enhanszer régiót azonosítottak. Az E1 és E2 fragmenteket (268 és 161 bp), amelyek hozzávetőlegesen -4 kb és -10 kb-nyira találhatóak a transzkripció kezdeti pontjától [45-48]. Ezek az enhanszer régiók szabályozzák az egér HO-1 gén aktiválódását különféle anyagok hatására, mint például a 12-O-tetradecanoilforbol-13-

acetát (TPA), nehézfémek, a nátrium-arzenit, a lipopoliszaharid (LPS), elektrofil anyagok, hidrogén-peroxid, antioxidánsok és a hem [46, 48-50]. A további vizsgálatok kiderítették, hogy ezek a régiók elengedhetetlenek a gén aktivációjához [51-53], s az egér-humán HO-1 génregulációbeli különbségek [54] ellenére a disztális régiók szerepe a humán HO-1 gén esetében is hasonló [55-61]. A domináns rész az egér HO-1 gén E1 és E2 enhanszereiben egy 10 bp (T/CGCTGAGTCA) hosszúságú stressz-érzékeny szekvencia elem (stress-response element-StRE), amely tér- és struktúrabeli konzerváltságot mutat mind egér, mind patkány és humán HO-1 génekben. Az StRE struktúráját és funkcionalitását tekintve hasonlóságot mutat több egyéb szekvencia elemmel is (Maf response element-MARE, antioxidant response-ARE, TPA response element-TRE/ AP-1 site [50, 62]), ezért elterjedt összefoglaló elnevezés maradt ezen részegységekre az StRE. Mai ismereteink alapján úgy tűnik, hogy a HO-1 gén aktiválásában fontos szerepet játszik különböző transzkripciós faktorok StRE egységekhez való kötődése. Ilyen faktorok lehetnek például a basic-leucine zipper (b-ZIP) fehérje szupercsalád Cap'n'collar/basic-leucine zipper (CNC-bZIP) -alcsalád tagjai is, amelyek közé a p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1 és Bach2 is tartozik. A Bach1 fehérje (~82 KDa) egy transzkripciós represszor molekulának tekinthető, normál körülmények között a HO-1 promoter StRE-ekhez kötődve gátolja a génátíródást [63, 64]. Hem jelenlétében a gátlás megszűnik, specifikus hem kötő helyekhez [65] kapcsolódva a fehérje konformációváltását idézi elő, emiatt a Bach1-StRE kapcsolat megszűnik, a Bach1 eliminálódik a sejtmagból, végső soron pedig az ubiquitin/26S proteaszóma proteolitikus útvonalon keresztül lebontásra kerül [64]. Oxidatív stressz során a reaktív oxigéngyökök (ROS) a Bach1 szulfhidril csoportjait oxidálhatják, ezáltal gátolva a fehérje kötődését az StRE régiókhoz, amelyet követően a Bach1 szintén kijut a sejtmagból és lebomlik [66]. A Bach1 ledisszociálását követően a transzkripció pozitív regulátorai kötődhetnek az StRE elemekhez, mint például az Nrf2. Az Nrf2 a citoplazmában képződik, a folyamatban a Keap1 nyújt segítséget. Oxidatív stressz hatására a Keap1/Nrf2 komplex cisztein régiói érzékelik a megváltozott redox környezetet, ami miatt a Keap1 szerkezete megváltozik. Ez stabilizálja az Nrf2-t, és elősegíti a transzlokációját a sejtmagba. A nukleáris transzlokációt követően az Nrf2 heterodimerizálódik a Maf és Jun b-Zip transzkripciós faktorokkal, majd kötődik az StRE elemhez, így segítve elő ezután az antioxidáns enzimek génátíródását [67]. Napjaink kutatásai alapján a HO-1 génreguláció tekintetében tehát az StRE-Bach1-2 tengely központi szerepet játszik. Továbbá a HO-1 transzkripciója különböző indukálható faktorok által is szabályozódhat, így például a már említett hipoxiás környezet aktiválhatja a hipoxia-indukált-faktor-1 $\alpha$ -át (HIF-1 $\alpha$ ) [68], a gyulladáskeltő és toxikus anyagok az NF- $\kappa$ B-t [69], a sejtszintű

redox folyamatok megváltozása az aktiváló fehérje 1-et (AP1) [70], valamint a hormonális és metabolikus változások a proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor-1 alfát (PGC1 $\alpha$ ) és peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor deltát (PPAR $\delta$ ) [71].

## Hemoxigenáz-1 indukció

A HO-1 expresszió számos folyamat eredményeként megnövekedhet. Tenhunen és munkatársai röviddel a fentebb említett felfedezésüket követően - 1970-ben - leírták, hogy a szubsztrát, azaz a hem hatására az enzim szintje megnő [72]. 1987-ben Shibahara és munkatársai patkánysejteken végzett kísérleteik alapján azt a megállapítást tették, hogy a HO-1 a hősokkfehérjék családjába tartozhat, mivel a 42 °C-on tartott sejt kultúrában megnőtt az enzim koncentrációja [73]. A '80-as évek végétől több munkacsoport figyelmének középpontjába került a HO-1, s igazolták, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nehézfémek és az UV-A sugárzás is kiváltják az indukcióját [38, 74, 75], de az enzim intracelluláris koncentrációjának emelkedését okozhatják a reaktív oxigén gyökök (ROS) [76, 77] a hipoxia [43, 78], a hiperoxia [79], az iszkémia/reperfúzió [80, 81], a nyírófeszültség [82, 83], különböző citokinek (IL-1 $\alpha$  és TNF- $\alpha$  [84, 85], IL-10 [86], IL-11 [87], TGF- $\beta$  [88]), a lipopoliszaharid (LPS) [70, 89], a nitrogén monoxid [57], a peroxinitrit [90], növekedési faktorok (VEGF [91], PDGF [92]), az adrenokortikotrop hormon [93], prosztaglandinok [94, 95], az angiotenzin-II [96, 97], számos gyógyszer, mint pl. aspirin [98], lipidszint módosító gyógyszerek, mint a simvastatin [99] és probucol [100], továbbá különféle antioxidáns hatású anyagok (kurkumin [101], kávésav [102, 103], rezveratrol [76]). A hemhez hasonló, ám vas helyett különböző centrális fématomokat tartalmazó metalloporfirinek lehetnek HO-1 induktorok és/vagy enzimgátló hatásúak is. A vas mellett számos fémion, mint a kobalt (Co<sup>2+</sup>), cink (Zn<sup>2+</sup>), réz (Cu<sup>2+</sup>) szolgálhat a ferrokelatáz szubsztrátjaként. Ez az enzim építi be a hem szintézis utolsó lépésében a vasat a protoporfirin (PP) gyűrűbe. A CoPPIX, ZnPPIX, CuPPIX és természetesen az FePPIX (azaz a hem) enziminduktor hatásúak, a HO-1 szubsztrátjaként is működhetnek. Az SnPPIX és a ZnPPIX indukálhatják a HO-1 transzkripcióját, ugyanakkor kompetitíven gátolhatják az enzim működését [104]. Molekuláris oxigénnel kapcsolatba nem lépő metalloporfirinek, úgymint a nikkel- (Ni), ón- (Sn), mangán- (Mn) PPIX-ek nem szubsztrátjai az enzimnek, ugyanakkor kompetitíven gátolhatják a működését [27]. További paradoxon, hogy amíg a CoPPIX *in vivo* körülmények között potens HO-1 induktor, *in vitro* enziminhibítornak bizonyult [104, 105]. Önmagában a protoporfirin is képes

indukálni a HO-1-et, habár kizárólag csak meghatározott hullámhosszú fénnel való fotoaktivációt követően [106, 107].

A HO-1 indukció nemcsak azáltal jár jótékony hatással, hogy közvetlenül védi a sejtet az oxidatív stresszel szemben, hanem szabályozza a kedvező hatással bíró molekulák szöveti jelenlétét, mint például egyéb hősokkfehérjék, az interleukin-10 és a prosztaglandin J2, ezért ez az enzim a terápiában is fontos szerepet tölthet be [86, 108, 109].

## **A hemoxigenázok által katalizált reakciók végtermékei és azok lehetséges hatásai**

A hemoxigenázok által katalizált reakciók végterméke a biliverdin és a CO (amelyek a pozitív hatások kialakulásában talán a legnagyobb szerepet játszanak), valamint  $\text{H}_2\text{O}$  és  $\text{Fe}^{2+}$  szabadul fel. Az **antioxidáns** hatásért a biliverdin/bilirubin a felelős, hiszen a biliverdin és a belőle keletkező bilirubin nagyon potens gyökfogyó sajátosságú molekula. Már a '90-es évek előtt bizonyítást nyert, hogy a bilirubin erősen képes megkötni a peroxil gyököket, valamint az, hogy az antioxidáns tulajdonsága fokozódik oxigénhiányos környezetben [110]. Kiderült, hogy hasonlóan képes megkötni szuperoxid aniont, hidroxidokat, hipoklórossavat és szinglet oxigént is [111-113], valamint a nitrogén gyököket, mint például a peroxinitritet [114, 115]. Baranano és munkatársai szerint a bilirubin annyira erős antioxidáns, hogy a 10000-szer nagyobb koncentrációban jelen lévő  $\text{H}_2\text{O}_2$  sejtkárosító hatását is képes ellensúlyozni [116]. Azonban emlékezni kell arra a tényre is, hogy a bilirubin nem áll feltétlenül mindig a „jó oldalon”, mivel ez a molekula okozza a sárgaságot, amely a bilirubin vérplazmában való túlzott felszaporodásaként definiálható. Felnőttek esetén a sárgaság a legtöbb esetben inkább tünetnek nevezhető és a háttérben álló májkárosodással együtt járó megbetegedésekre utalhat. Az újszülöttek hozzávetőlegesen felénél alakul ki sárgaság életük első hetében, a koraszülötteknél pedig ez az arány még magasabb. Az újszülöttkori sárgaság veszélyessége attól függ, hogy milyen magas a bilirubin koncentrációja, valamint, hogy mi okozza a tünetet és hogy milyen gyorsan alakul ki a sárgaság. Legsúlyosabb szövődménye a kernikterusz, amely során a bilirubin lerakódik az agyszövet szürkeállományában és potenciálisan irreverzibilis károsodásokat hozhat létre, ami akár halálhoz is vezethet. A bilirubin lebomlása több útvonalon is végbemehet. A különböző szövetek a képződött bilirubint a vérbe juttatják, ahol a bilirubin az albuminnal 1:1 arányban kötve szállítódik. A máj parenhimája veszi fel a bilirubint a szérumból, az intracelluláris szállításban pedig a glutation-S-transzferáz nyújt

segítségét. A májból a bilirubin glükuronsavas konjugációt követően vízoldható mono- és diglükuronidok formájában ürülhet az epefolyadékkal, vagy a májban tovább bomlik a bilirubin-oxidáz hatására monopirrolokká. Az epével a székletbe kerülő konjugált bilirubint a mikroflóra baktériumai urobilinogénné és ezek oxidált formájává, azaz urobilinné bontják [106]. Ezek a folyamatok azonban nem pillanatszerűen mennek végbe, ezért akut terápiában a bilirubin gyors eltávolítására az újszülötteknél fényterápiával is próbálkoznak. Az elmélet szerint látható fénnel való besugárzás hatására a bilirubin háromféle fotokémiai reakción mehet keresztül: konfigurációs izomerizáció, konformációs izomerizáció és fotooxidáció [117], az így keletkező polárosabb karakterű bilirubin sztereoizomerek feltételezhetően kevésbé képesek áthatolni a vér-agy gáton, így nehezebben alakul ki a kernikterusz. Egyesek szerint a konfigurációs izomerizáció a legfontosabb fotokémiai reakció [118, 119], mások szerint azonban a konformációs változások gyorsabban lezajlanak, így az utóbbiak nagyobb hangsúlyt kapnak fényterápia során a bilirubin eliminációjában [117], egy azonban biztos: a fotoizomerizáció már 15 perccel a megvilágítást követően képes a szérum totál bilirubin szintet ~ 10 %-kal csökkenteni újszülöttekben [120]. Habár a bilirubin apoptózist indukál például idegsejteken [121], vagy csontsejteken [122], a HO-1 indukció eredményeként az **antiapoptotikus** hatás kerül előtérbe főként a szöveti CO termelésnek köszönhetően. Soares és munkatársai írták le először, hogy HO-1 overexpresszió antiapoptotikus hatást fejt ki endotélsejteken és simaizomsejteken. Ez a hatás pedig hozzájárul a xenograft kilökődés ellenes folyamatokhoz [123]. A keletkező CO képes gátolni a TNF- $\alpha$  indukálta apoptózist endotélsejteken a p38 MAPK útvonal aktiválásával [124, 125], bár a CO jelenléte mellett NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktiváció is szükséges a teljes antiapoptotikus hatás kifejlődéséhez. Az NF- $\kappa$ B számos stressz reakcióban szerepet játszó gén aktivációját szabályozza, mint például a citokinekét is. A HO-1 által közvetített apoptózis gátlást számos daganatsejt típus használja a programozott sejthalál elleni védekezésben. Medulloblasztóma DAOY sejtek esetében a hemoxigenáz-1 által katalizált reakcióban keletkező CO nagy valószínűséggel a K<sup>+</sup> csatornák gátlásán keresztül éri el az antiapoptotikus hatást [126]. Sok esetben az előnyös hatások beteg modellen nem korrelálnak az egészséges állatokon végzett kísérletek eredményeivel. Ennek ellenére a HO-1 antiapoptotikus hatása fennáll diabéteszes kardiomiopátiában is. Egerek szívében HO-1 overexpresszió hatására kevesebb TUNEL pozitív sejtet regisztráltak, valamint alacsonyabb p53 és emelkedett Bcl-2 fehérje expressziót határoztak meg a vad típusú egerekhez képest. Érdekes, hogy emellett az autofágiát, mint a sejt túlélésében egy másik központi szerepet játszó folyamatot is elősegítheti a HO-1 szint emelkedése. A HO-1 overexpresszáló diabéteszes egerekben magasabb Beclin-1 és LC3-II

fehérje szintet detektáltak, amely részben legalábbis az AMPK útvonal aktiválásának köszönhető [127].

Az antioxidáns és az antiapoptotikus hatások mellett a HO-1 gyulladáscsökkentő, vazóaktív, antikoagulatív hatásokkal is bír, valamint szerepe van az angiogenezisben és a proliferációban is. A **gyulladáscsökkentő** hatás is főként a CO termelődésén alapszik. A HO-1 aktiváció és a szövetben felszaporodó CO több gyulladáskeltő mediátor molekulának a termelődését csökkentheti, mint például a TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , vagy a kemotaxis kiváltására képes citokinek közül a monocita kemotaktikus fehérje-1 (MCP-1), valamint növeli a gyulladáscsökkentő válasz kialakulását az anti-inflammatórikus hatású IL-10 expressziójának emelésével [128, 129]. Ugyanakkor a HO-1 az NF- $\kappa$ B útvonalon keresztül csökkenti a gyulladáskeltő granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) termelődését, amely bakteriális endotoxinok (LPS) hatására könnyen és gyors ütemben termelődik [130]. További bizonyíték a HO-1 gyulladásellenes hatására, hogy CoPPIX-el kiváltott HO-1 indukció jelentősen csökkenti a citotoxikus T-sejtek differenciálódását és válaszkészségüket [131], továbbá a hemoxigenáz-1 részben csökkenteni tudja bizonyos adhéziós molekulák elválasztását, mint például a P- és E szelektin, vaszkuláris sejt adhéziós molekula 1 (VCAM-1) [132, 133] és intercelluláris adhéziós molekula 1 (ICAM-1) [134]. Ezen molekulák mennyisége aktívan befolyásolja a sérült szövetrészen a leukociták infiltrációját és így a gyulladás mértékét [135].

A HO-1 sejtproliferációra kifejtett hatásai nagymértékben függenek a sejttypustól. A keratinocitákon, endotél- és tumorsejteken kifejtett proliferatív hatással szemben az epitel-, simaizom-, T-sejteken és fibroblasztokon **antiproliferatív** hatást tapasztaltak. A kutatók eme hatás háttérében különféle sejttypuson vizsgálva különböző biokémiai útvonalak érintettségét írták le. A HO-1 szívizmot érintő proliferációt reguláló hatásának megismerését a vaszkuláris simaizomsejteken (VSMCs) történő kísérletek nagyban segítették. Ezen sejtek túlzott növekedése, sejtciklusuk hibás szabályozása vaszkuláris proliferatív betegségekhez vezethet, amelyek magukban foglalják a primer ateroszklerózist, angioplasztikát követő újbóli szűkületkialakulással kapcsolatos szövődeményeket, véna graft okozta szűkületet, valamint a szívtranszplantáció hosszú távú sikerességét befolyásoló vaszkulopátiákat [136]. Eddigi bizonyítékok szerint a HO-1 vaszkuláris simaizomsejtekre kifejtett proliferáció gátló hatásának háttérében nagyrészt szintén az enzim működése során keletkező CO felelős. A felszabaduló endogén CO hatására megnő a guanilát cikláz aktivitás és így a cGMP-szint, amely pedig hozzájárul az E2F-1 sejtciklus specifikus transzkripció faktor szintjének csökkenéséhez [137]. A CO kiváltott cGMP szint növekedés a p38 MAPK útvonalat is

aktiválhatja, valamint megnövekedhet a sejtciklust gátló p21Cip1 fehérje mennyisége [138]. A p21Cip1 fehérje, melynek expresszióját a p53 szabályozza, interakcióba lép a CDK2 és CDK4 ciklinekkel és így képes leállítani a sejtosztódást a G1 fázisban. A HO-1 által termelődő CO jelentősen hozzájárul a T-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák gátlásához, amely pedig a vaszkuláris simaizomsejtek proliferációjának gátlásához vezet. A VSMC-k befolyásolják az értónust, ezáltal pedig nagy hatással bírnak a vér áramlására és eloszlására. Az értónus nagymértékben függ a  $\text{Ca}^{2+}$  intracelluláris térbe jutásától, amelyet főként az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák szabályoznak. A VSMC-k rendelkeznek T-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákkal is, melyek szerepe a kutatások szerint akkor válik fontossá, amint a sejt proliferációs fázisba jut. Ekkor az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák helyett főként a T-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák juttatják a sejtbe a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, amely a proliferáció folyamatához, és így a vaszkuláris károsodást követő neointima képzéséhez elengedhetetlen [139]. A CO mellett egyesek a bilirubinnak/biliverdinnek is tulajdonítanak proliferáció gátló hatást, mely szintén a p38 MAPK útvonal aktiválásával magyarázható, amely nyomán a szerzők csökkent neointima kialakulást tapasztaltak ballon katéterrel kiváltott sérüléssel patkány nyaki artérián [36].

Az előzőekből valószínűsíthető, hogy a HO-1 aktivációja **vazoaktív** hatást is képes közvetíteni, mely szintén főként a CO-nak tulajdonítható. A CO vazodilatatív hatását a '70-es évek végén írták le először, egy évtizeddel később pedig Lin és McGrath arra is rájöttek, hogy ez a tulajdonság, egy másik „gáztranszmitter” molekula, a nitrogén monoxiddal ellentétben (NO) független az endotélium épségétől. Az is kiderült, hogy a CO hatása ugyanakkor lényegesen gyengébb a NO által közvetített vazodilatációtól [140, 141]. A szakirodalom alapján a CO erekre kifejtett relaxáló hatása a szolubilis guanilát cikláz aktiválást követő cGMP szint megemelkedésében keresendő, ám lehetséges mechanizmus még a kalcium függő kálium csatornák aktiválása és az endotelin-1, valamint a vérlemezke eredetű növekedési faktor- $\beta$  expressziójának befolyásolása endotélisejteken [142]. Egyes esetekben vazokonstriktiót is leírtak CO hatására, melynek oka feltehetően részben az endoteliális nitrogén monoxid szintáz működésének csökkentése [143].

Lindenblatt és munkatársai szerint hemmel kiváltott HO-1 indukció egerekben képes a vérrögképződést gátolni, amely egyaránt köszönhető a CO és bilirubin képződésnek is [144]. Johns és munkatársainak egérkísérletei is alátámasztották a HO-1 indukció által kiváltott **antitrombotikus** hatást [145]. HO-1 deficiens állatokban jelentősen megnő a trombózishajlam, melynek hátterében állhat a vérlemezkék aktivációja, a megnövekedett szöveti faktor és Von Willebrand faktor mennyisége és az endotélisejtek apoptózisa is, melyeket CO belélegeztetés és biliverdin adagolás képes kivédeni [146].

A különböző javító vagy kóros folyamatok során termelődő gyulladási mediátorok növelhetik a növekedési faktorok szintézisét, amelyek **angiogenezishez** vezethetnek. Az angiogenezist az érképző őssejtekből differenciálódó endotélsejtek proliferációjának és migrációjának köszönhetően frissen képződő kapillárisok kialakulásaként definiálhatjuk. Jelenkori kutatások arra is rávilágítottak, hogy a ROS és a NO nagyon fontos szerepet töltenek be az egyik legfontosabb ér-újraképződést serkentő molekula, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) szintézisének szabályozásában. Továbbá az is kiderült, hogy a HO-1, amely expresszióját a reaktív oxigénradikálok és a nitrogén monoxid is serkenti, szintén érintett az érképzés szabályozásában. Az ezredfordulót követően megjelent számos publikáció szerzői szerint a HO-1 angiogenezist serkentő tulajdonsága a CO termelés segítségével valósul meg [147]. HO-1-et overexpresszáló endotélsejtekben és VSMCs-ben pedig megnövekedhet a fentebb is említett VEGF szintje [148], míg a HO-1 gátlása csökkenti a VEGF okozta endotélsejt proliferációt és érképződést. Bussolati és munkatársai azt feltételezik, hogy krónikus gyulladás esetén a HO-1-nek két nagyon fontos szerepe van. Egyrészt csökkenti a leukocita-infiltrációt, azaz gyulladáscsökkentő hatása van, másrészt elősegíti a VEGF indukált angiogenezist, így segítve a szövet túlélését [91]. A VEGF termelése szoros összefüggésben van a HO-1 által termelt CO mennyiségével. Egy potens induktor, a PGJ2 hatására overexpresszálódó hemoxigenáz-1-en keresztül növekszik a VEGF szintje tumorsejtekben [149]. A hemmel kiváltott HO-1 overexpresszió, vagy egy CO felszabadító molekula (CO-RM) hatására hozzávetőleg háromszor annyi CO termelődik, mint ami a kontroll endotél sejt kultúra médiumában mérhető. Ezek hatására nagyságrendileg 30%-kal emelkedik a VEGF szintje is. Ugyanakkor a PGJ2 hatására mind a CO termelés, mind a VEGF szintézis drasztikusan megnövekszik, egy HO-1 gátlószert, az SnPPiX-et alkalmazva azonban az említett változások elmaradnak. Továbbá az SnPPiX hatására gátlódik az endotélsejtek proliferációja, migrációja és a kapillárisképződés is [147]. Érdekes megállapítás, hogy a konstitutív izoforma, azaz a HO-2 génjében történő deléción endotél aktivációhoz és gyulladás-vezérelt angiogenezishez vezet. HO-2 KO endotél sejt kultúrához biliverdint adagolva pedig ez a hatás gátlás alá kerül, amely szerint azt feltételezhetjük, hogy a hemoxigenáz rendszer képes ellensúlyozni a gyulladásos folyamatok miatt bekövetkező érképződést [150]. A CO és a HO-1 más hatásmechanizmuson keresztül is képes az angiogenezis serkentésére, például a HIF-1 $\alpha$ -án keresztül. A HIF-1 $\alpha$  növeli a HO-1 expresszióját, a termelődő CO pedig stabilizálja ezt a transzkripciós faktort [151]. A HO-1 szabályozza az angiogenezist serkentő citokint, az IL-8-at, ugyanakkor érképződést gátló

faktorok termelését is képes gátolni. Ilyen például a VEGF receptor-1, valamint a szolubilis endoglin gátlás [152, 153].

## **A HO-1 szerepe a különböző kórfolyamatokban**

Szöveti eloszlását tekintve a HO-1 nagy mennyiségben expresszálódik a lépben és azon szövetekben, ahol az öregedő vörösvérsejtek lebontása zajlik, ide értve a máj és a csontszövet retikuloendoteliális sejtjeit. A csontszövet hemopoietikus sejtjeiben is nagy mennyiségben van jelen, itt valószínűleg differenciációs faktorként játszik szerepet azért, hogy csökkenti az intracelluláris hem szintet, következményesen pedig a sejt differenciációt. A máj parenhimájában, ahol a plazmából való hem, hemoglobin és methemalbumin felvétel és lebontás zajlik, szintén nagy mennyiségben kimutatható. Hemolízis esetén a keringésbe jutó hemoglobin hatására a HO-1 aktivitás rendkívüli mértékben fokozódik a májparenhimában, vesékben és a makrofágokban is. Azon szövetekben ahol nem zajlik eritrocita képzés vagy hemoglobin lebontás, a HO-1 nagyon kicsi, sokszor alig mérhető koncentrációban van csak jelen normál körülmények között, ám külső hatásokra, kémiai impulzusokra vagy transzkripciós aktiváció hatására gyorsan emelkedik a szintje.

A HO-2 számottevő mennyiségben expresszálódik a herékben, de ugyancsak kimutatható többek között a központi idegrendszer számos területén, az érhálózatban, a májban, vesében és a belekben [154]. A HO-2 az indukálható izoformával ellentétben nem reagál a környezeti stressz által előidézett ingerekre, azonban agyban kimutatták, hogy a mellékvese glükokortikoid hormonjainak hatása van a HO-2 expresszióra [155].

Sejten belül a hemoxigenázok helyzetét nagymértékben meghatározza, hogy mind a HO-1, mind a HO-2 tartalmaz egy hidrofób karboxil-csoportot, amely jó membránokhoz való kötődésre enged következtetni [156]. A HO-1 1968-as felfedezése óta úgy vélték, hogy endoplazmatikus retikulumhoz kötött proteinnél van szó, ám az újabb tanulmányok szerint az ER-en kívül más kompartmentekben is előfordulhat. Egér tüdő endoteliális sejt vonalat kezelték különböző ismert HO-1 indukáló anyagokkal, mint pl. a hem, lipopoliszaharid, továbbá a hipoxia hatását is vizsgálták. Sejt lízist követően szukróz gradienssel történő elválasztás után azt a megfigyelést tették, hogy az indukáló ágensek nemcsak a HO-1 expresszióját emelték a sejt kultúrában, hanem az enzim sejten belüli megoszlását is drasztikusan megváltoztatták. Például a hem és az LPS hatására a HO-1 a citokróm-c-t tartalmazó frakcióban dúsult. Kim és munkatársai ezekből arra következtettek, hogy a HO-1 egyes körülmények között a mitokondriumokban is lokalizálódhat. Mindenesetre mindhárom

indukáló módszer hatására megfigyelhető volt a plazmamembránhoz való kötődés is a kaveolákban [157]. Ezenfelül néhány publikáció említést tesz mindkét aktív HO izoforma nukleuszhoz kötött kompartmentalizációjáról is. Megfigyeltek például HO-1 lokalizációt a nukleuszon asztrocitákon [158], valamint HO-2-t majom retinális ganglionsejteken [159]. Továbbá megfigyelték, hogy fej-nyaki többrétegű laphám-eredetű karcinogén tumorok malignus progressziójával nő a HO-1 nukleáris lokalizációja, valamint a tumorsejtekből készített sejtenyészeten a HO-1 expressziója hem kezelés hatására tovább növekszik [160].

A HO-1 rendszer hatásait már majd minden szervrendszeren és számos betegségmodellben tanulmányozták. Ebbe ad betekintést az alábbi összefoglaló táblázat, a teljesség igénye nélkül:

**1. táblázat: Összefoglaló a HO-1 szint változásával kapcsolatban álló fiziológiás- és megbetegedésekkel járó folyamatokról (Morse és munkatársai nyomán [147]).**

Szervek, folyamatok	Referencia
<b>Légzőrendszer:</b>	
Asztma	[161-163]
Hipoxia	[164, 165]
Hiperoxia-indukált ártalmak	[166-170]
Akut tüdőbaj	[171]
Tüdőemfizéma	[163]
Dohányzás	[172]
<b>Vese:</b>	
Tubulus károsodás	[173]
Rabdomiolízis	[174]
<b>Idegrendszer:</b>	
Alzheimer	[175]
Gerincvelő sérülés	[175, 176]
Retinopátia	[177]
Agyvérzés	[178]
Szélütés	[179]
Neurotranszmissziós változás	[180]
<b>Gyomor-bél traktus:</b>	
Akut hasnyálmirigy gyulladás	[181]

<b>Bél motilitás</b>	[182]
<b>Máj perfúzió</b>	[183]
<b>Epeműködés</b>	[184]
<b>Hepatikus sokk</b>	[185, 186]
<b>Immunrendszer:</b>	
<b>Szerzett immunhiányos tünet együttes</b>	[187]
<b>Szepszis</b>	[188, 189]
<b>Leukocita adhézió</b>	[135, 190]
<b>Endokrin rendszer:</b>	
<b>Hipotalamo-hipofizeális működés</b>	[191, 192]
<b>Szigetsejt funkció</b>	[193]
<b>Nőgyógyászat</b>	
<b>Pre-eklampszia</b>	[194]
<b>Méh összehúzódás</b>	[195]
<b>Placenta fejlődés</b>	[196]
<b>Egyéb</b>	
<b>Transzplantáció</b>	[197]
<b>Vas homeosztázis</b>	[198]
<b>Erekció</b>	[199]

## **A HO-1 szerepe a kardiovaszkuláris kórképekben**

Az indukálható hemoxigenáz-1 expressziós szintje normál körülmények között viszonylag alacsony, ám a különböző ágensek, stresszorok hatására gyorsan emelkedik. Amennyiben az állapot állandósul, a sejt számára akár toxikus is lehet a túlzott mértékben megnövekedő enzim mennyiség. A jól szabályozott enzim működés által képződött antioxidáns hatású bilirubin, valamint a gyulladáscsökkentő szénmonoxid azonban rendkívül hasznos lehet az iszkémiás, vagy egyéb patológiai folyamat által károsított szövet túlélésében [200]. A HO-1 szintje indukció hatására a szívben és az erek falát alkotó sejtekben egyaránt megemelkedik, ezért feltehetően fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek kivédésében, kezelésében. A védelem hátterében farmakológiai és genetikai tényezők is szerepet játszhatnak. Számos olyan folyamatot képes antagonizálni a HO-1 rendszer,

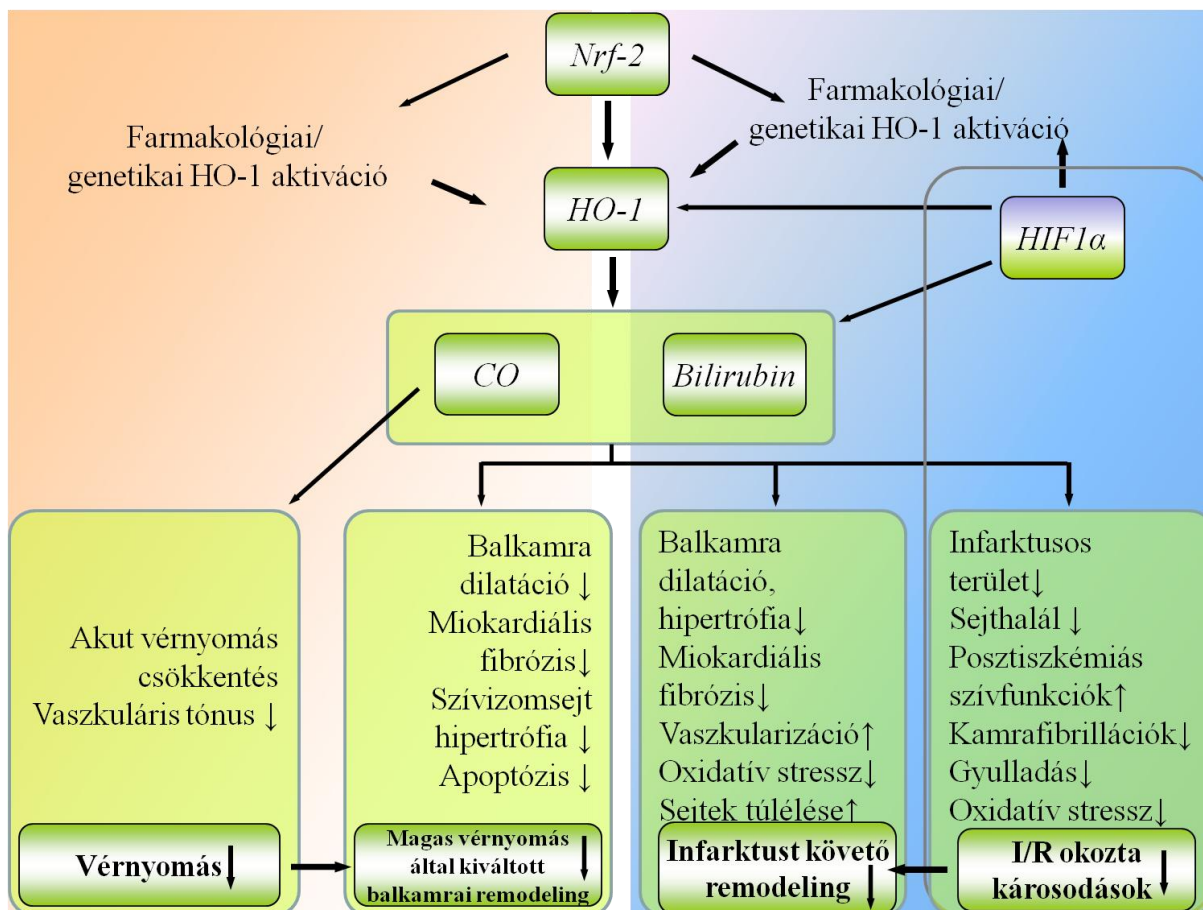
amelyeknek fontos szerepe van a szív-érrendszert érintő megbetegedésekben. Például a koronáriaerek elzáródásának egyenes következménye lehet az iszkémiás szívbetegség. A HO-1 gén promóterének polimorfizmusa miatt ugyanakkor a nagy kockázatnak kitett betegekben a koronária betegség kialakulásának valószínűsége magasabb [201]. A szívszövetre korlátozódó HO-1 overexpresszióval járó kutatások alapján, legyen szó akár *ex vivo*, akár *in vivo* kísérletekről, a HO-1 drasztikusan csökkentette az infarktuszó szívizomelhalást, valamint a lipidperoxidáció mértékét és az immunsejtek infiltrációját, ugyanakkor nagymértékben segítette a posztiszkemiás helyreállító folyamatokat [202], egyúttal csökkentette az apoptózis mértékét [203]. A kísérleti állatmodellektől függetlenül tanulmányok azt igazolták, hogy az iszkémia/reperfúzió okozta károsodások kivédésében fő szerepe van a bilirubinnak és a szénmonoxidnak [204, 205]. Az iszkémia mellett az infarktust követő helyreállító folyamatokban is segítséget nyújthat a szövetben a HO-1 aktivitás. Transzgen egereken végzett kísérletekben Wang és munkatársai permanens koronária leköttést követően HO-1 transzgen egerekben kedvezőbb sejtülélést, csökkent bal kamra dilatációt és hipertrófiát, valamint csökkent fibrotikus átépülést és lipidperoxidációt észleltek a nem transzgenikus egerekhez viszonyítva [206]. Emellett azt tapasztalták, hogy a HO-1 késlelteti az MPTP kinyílását és csökkenti az apoptózist, valamint növeli az új erek képződését a szívizomban.

Kutatócsoportunkkal szintén transzgen egereket felhasználva szándékoztuk a laboratóriumunkban már-már klasszikusnak számító izolált szív készüléken kivitelezni a kísérleteket, mely során kizárható a hormonális- és vegetatív rendszer hatása I/R alatt, így feltételezhetően tisztán a HO-1 overexpresszió lokális protektív hatását voltunk képesek modellezni. Wang és munkatársai a protekció hátterében álló HO-1 overexpressziót azzal igazolták, hogy a nem transzgenikus állatok CO-RM-3-al való kezelésével utánózható volt a HO-1 overexpresszió előnyös hatása az infarktust követő helyreállító miokardiális folyamatokra [206].

A megemelkedett szisztémás vérnyomás következményei, úgymint az endotél-diszfunkció, vazokonstriktio, simaizomsejt-proliferáció, mind-mind komoly hatással bírnak a szövetekben lévő erek patológiás működésére. A magas vérnyomás kóroki tényezői között nagyon gyakran szerepel az ateroszklerózis, amely során a gyulladáskeltő sejtek infiltrációja, az oxidatív stressz és a simaizomsejtek kontrollálatlan növekedése még jobban elősegíti a betegség manifesztációját [207]. A HO vérnyomáscsökkentő hatását először Johnson és munkatársai vizsgálták 1996-ban. Több magas vérnyomásos modellben is sikerült bizonyítaniuk patkányokon, hogy az általuk használt hemoxigenáz szubsztrátok (L-arginát és

L-lizinát) képesek akut vérnyomáscsökkenést okozni, míg a normál vérnyomású állatokon ezek a szubsztrátok nem okoztak vérnyomáscsökkenést, valamint HO inhibitorral történő előkezelés a szubsztrátok vérnyomáscsökkentő hatását teljesen megakadályozta. Kísérleteiket véghezvitték biliverdinnel, egy vas-kelátorral és CO-al is, melyeket követően azt a megállapítást tették, hogy a HO szubsztrátok fetételezhetően egy CO mediált útvonalon érik el akut vérnyomáscsökkentő hatásukat [208]. A CO az NO-hoz hasonlóan az érösszehúzóadás szabályozásával befolyásolhatja a vérnyomást, ugyanakkor úgy tűnik képes egyes esetekben bizonyos mértékű NO hiányt is kompenzálni [209].

Amíg az iszkémia a szívszövet egy meghatározott részét károsítja, addig a magas nyomás okozta túlterhelés az egész miokardiumra hatással bír. A nyomás okozta túlterhelés komplex folyamatot indít el, melynek része egy teljes metabolikus- illetve szerkezeti változás a miokardiumban. Ezek a folyamatok kamrai hipertrófiához, végső soron pedig szívelégtelenség kialakulásához vezetnek [210]. A HO-1 hipertrófia gátló hatását primer patkány- és HL-1 kardiomiocitákon figyelték meg. Az endotelinnel és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val kiváltott hipertrófia kialakulását gátolni tudták biliverdinnel és CO-RM-3-al is, melynek hátterében a MAPK és calcineurin/NFAT útvonalak gátlását feltételezik [211, 212]. A jól ismert antioxidáns hatás nagy szerepet játszik az angiotenzin-II okozta hipertrófia kivédésében is, mivel a HO-1 gátolja az angiotenzin-II által okozott ROS-ek képződését [213], de sikerrel ellensúlyozható az izoproterenol-indukált hipertrófia [214], valamint a HO/CO rendszer képes a doxorubicin indukált hipertrófiát is gátolni. A doxorubicin a miokardium mitokondriális DNS-ében depléciót okoz, valamint apoptózist indukál. Ezt a HO-1 overexpresszió az Akt1/PKB és a guanilát cikláz aktiválásával meg tudja előzni, valamint génszinten is mérsékli [215]. A 3. ábra ad betekintést a HO-1 szerepébe a kardiovaszkuláris kórfolyamatokban.



3. ábra. A HO-1 enzim és végtermékeinek hatása a kardiovaszkuláris kórfolyamatokra

### Természetes eredetű HO-1 induktorok

A természet számos olyan antioxidáns hatású anyagot szolgáltat számunkra, amelyek alkalmasak indukálni a HO-1-et. Sokféle ilyen anyag növényekben fordul elő, melyeket széles körben alkalmaz az emberiség ételkészítés alapanyagként, fűszerként, vagy gyógyító céllal. Ezen hatóanyagok legtöbbje antioxidáns hatással rendelkezik, mely a polifenolos struktúrának köszönhető.

A sárga gyömbérgyökér (*Curcuma longa*) fő tartalomanyagai a kurkuminoidok, melyek közé tartozik a kurkumin is [216]. Kedvelt ételízesítő, valamint a gyulladáscsökkentő [217, 218], daganatellenes [219] és antioxidáns [218] sajátosságai miatt széles körben alkalmazott gyógynövény. HO-1 indukáló hatását számos publikációban leírták, mely háttérben valószínűleg a p38/MAPK útvonal aktiválása áll [52, 220], de ez a különböző kurkuminoidok esetén eltérő lehet.

A resveratrol, egy természetes polifenolos stilbén, jelentős mennyiségben fordul elő többek között a borszőlő (*Vitis vinifera*) héjában, szederben (*Morus rubra*), fekete áfonyában

(*Vaccinium myrtillus*) és földimogyoróban (*Arachis hypogea*). Először Takaoka izolálta a fehér zászpa (*Veratrum album*) gyökeréből 1940-ben, majd 1963-ban a hibrid keserűfű (*Polygonum cuspidatum*) gyökeréből is kinyerte. Hatékonyan csökkenti az LDL oxidációját és a koleszterinürítést [221], gátolja a vérlemezkék aggregációját [222], és szabályozza a VSMC proliferációt [223], ezáltal csökkenti az ateroszklerózist, ugyanakkor csökkenti a hipertrófia kialakulását és mérsékli a vérnyomást [224, 225]. Kardioprotektív hatásaiban szerepet játszik az Akt, eNOS, Trx-1, VEGF és HO-1 fehérjék aktiválása [226]. Utóbbi indukálásában érintett lehet a kurkumin esetében is leírt p38/MAPK útvonal, az NFκB aktiváció és az Akt foszforilációja, melyek az Nrf2-n keresztül stimulálhatják a HO-1 transzkripcióját [227].

A flavonoidok természetes antioxidáns sajátosságú polifenol származékok. Ebbe csoportba tartozó vegyületek például a flavonolok, izoflavonok, flavononok, flaván-3-olok (katehinek). Egyik leggyakoribb flavonoid a quercetin, mely potens ateroszklerózis elleni molekula. ApoE KO egerekből származó plakkokban növelte a HO-1 expressziót és csökkentette a gyulladást, valamint az endotél diszfunkciót [228]. Az epigallocatechin-3-gallátról, amely a zöld tea (*Camellia sinensis*) egyik hatóanyagának tekinthető, szintén leírták a HO-1 expressziót fokozó hatását [229]. Az antocianidinek olyan vízdoldékony növényi pigmentek, amelyek szintén erős antioxidáns tulajdonságokkal bírnak. Egyik képviselőjük, a delphinidin hozzávetőleg 50% -kal emelte a HO-1 expresszióját humán endotél sejtekben [230].

A kávésav fenetil-észter a propolisz egyik fő összetevője gyulladáscsökkentő, vírusellenes és szintén antioxidáns hatásokkal rendelkezik. HO-1 expresszió növelő hatását szerkezeti összefüggések vizsgálatával is elvégezték, amely során azt figyelték meg, hogy a katekol gyűrűn legalább egy hidroxil csoport és a fenetil- észter rész mindenképpen szükséges a molekula HO-1 expresszió növeléső hatása céljából [227].

HO-1 szint növelő hatást írtak még le a lignánokról, és ezek származékairól; a fraxetinről, mely egy kínai, tradicionálisan gyógyászati célra szánt kőriscsücs (*Fraxinus rhynchophylla*) hatóanyagai közé tartozik és a kínai zsálya (*Salvia miltiorrhiza*) kivonatában előforduló magnézium- litospermat- B-ről is [227]. E két utóbbi növény az olajfafélék családjába tartozik.

## **A meggyagból kivonat lehetséges hatóanyagai**

A meggyag Magyarországon a meggyfeldolgozó ipar melléktermékeként évente több tonna hulladékot jelent. Kutatócsoportunk az elmúlt években behatóan vizsgálta a meggy (*Prunus Cerasus*) csonthéjas magjának belsejében található lágy magrész összetételét. A meggyag szárítását és megtörését követően a csonthéj eltávolítása után a porrá őrölt

meggymagbelet n-hexánnal Soxhlet-extrakcióval frakcionáltuk. Az olajos fázisból (32-36 %) a maradék oldószert rotációs vákuumbepárlással távolítottuk el, a szilárd fázist (64-68 %) levegőn szárítottuk, majd további extrakciós műveleteknek vetettük alá víz-metanol és metanol-sósav elegyével. Ezt követően megvizsgáltuk az olajos- és szilárd frakció összetételét. Az olajos fázist gáz-kromatográffal kapcsolt tömeg-spektrométerrel (GC-MS) és infravörös spektrofotométerrel (IR) vizsgáltuk napraforgóolajjal összehasonlítva. A meggymagolaj legjelentősebb összetevői a következők; palmitinsav, linolénsav, olajsav, szkvalén, béta-tokoferol, gamma-szitoszterol, E-vitamin. Az IR spektrum elemzés is alátámasztotta azt, hogy a meggymag olaj sokkal nagyobb mennyiségben tartalmaz szabad zsírsavakat, mint a napraforgóolaj. A szilárd frakció tartalomanyagainak meghatározásához szintén IR-t, ultraibolya-látható spektrofotométert, valamint folyadék-kromatográffal kapcsolt tömeg-spektrométert (LC-MS) használtunk. A szilárd frakció legjelentősebb összetevői: kumarinsav, ferulasav, kávéssav, pro- és antocianidinek, peonidin, flavon-származékok (pinocembrin és tangeretin) [231].

Kutatócsoportunk korábban már tanulmányozta a meggymag-kivonat hatását a szív iszkémia/reperfúziós károsodásaival szemben is. Tapasztalataink alapján a meggymagból dóziszfüggő módon csökkenti a kamra fibrillációk kialakulásának a valószínűségét, valamint az infarktusz terület nagyságát és javítja a posztisztkémiás szívfunkciókat. Ezek mellett csökkentette a kaszpáz-3 expressziót [232].

A pontosabb molekuláris mechanizmusok tisztázására azonban még nem került sor, így célkitűzéseink között szerepelt részben annak a vizsgálata, hogy a meggymagból szilárd frakciója képes-e indukálni a HO-1 szintjét a szívszövetben is, ahogyan azt az I/R okozta retinakárosodási kísérleteinkben tapasztaltuk. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy a HO-1 rendszer vajon milyen módon érintett a miokardiális infarktus okozta károsodások kivédésében, valamint hogy az esetleges HO-1 overexpresszió hogyan járul hozzá a meggymagból-kivonat lehetséges kardioprotektív hatásaihoz.

# Anyagok és módszerek

## Kísérleti állatok – egerek és patkányok

Kísérleteink egy részében hím Sprague Dawley típusú patkányokat, valamint hím vad típusú (NTg), HO-1 transzgén (Tg) és HO-1 knock-out ( $KO^{-/-}$ ) egereket is felhasználtunk (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Németország). Minden állat esetében a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt a vonatkozó Európai Uniós- és a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (NIH 85-23, revised 1996) összhangban. Az állatoknak a standard rágcslótáphoz és vízhez szabad hozzáférésük volt, az egerek testsúlya 25-35 g volt, a patkányoké pedig 220-300 g.

## Transzgén egér

A transzgén állatok létrehozása az Araujo és mtsai által leírt módon történt [233]. Röviden: CFY egér megtermékenyített petesejtjébe pronukleáris mikroinjekcióval juttaták be az 52 kb hosszúságú patkány HO-1-et kódoló konstruktot, amely 27 kb 5' upstream régióból, 16 kb 3' downstream régióból és a 8,3 kb HO-1 gént tartalmazó régióból állt. A klónozás a patkány P1 genom könyvtár alapján PCR segítségével történt két olyan primer felhasználásával, amelyek megegyeztek a patkány HO-1 gén első (5'-GCT-TCG-GTGGGT-TAT-CTG-CCG-TTA-T-3' és 5'-CAG-TCT-TAC-AGG-CGG-GGA-ATGTGA-G-3'), és ötödik exonjával (5'-GAG-ACG-CCC-CGAGGA-AAA-TCC-CAG-AT-3' és 5'-CCC-AAG-AAA-AGA-GAG-CCA-GGCAAG-AT-3'). Két pozitív klónt azonosítottak és a restrikciós térképezés szerint mindkét klón tartalmazta ugyanazt az inzertet. Az 52 kb hosszúságú rész megegyezett a HO-1 génnel és a hozzá tartozó szomszédos régiókkal. Ezt követően a natív HO-1 gént a promotérével együtt kivágták,  $\beta$ -agarázzal emésztették, ezt követően pedig mikroinjektálták. Az egerek genotipizálása PCR technikával történt a patkány HO-1 5-ös exonjára specifikus primerek segítségével.

A kísérletek második részében HO-1 knock out (KO) egereket is használtunk. A KO egerek létrehozása irányított HMOX1 génmutációval történt. Az általunk felhasznált KO egereket heterozigóta (+/-) egyedek keresztezésével kaptuk, a HO-1 KO homozigóta (-/-) egereket pedig szintén genotipizálással igazoltuk.

## **Kezelési protokoll meggy-mag-kivonattal patkányokban**

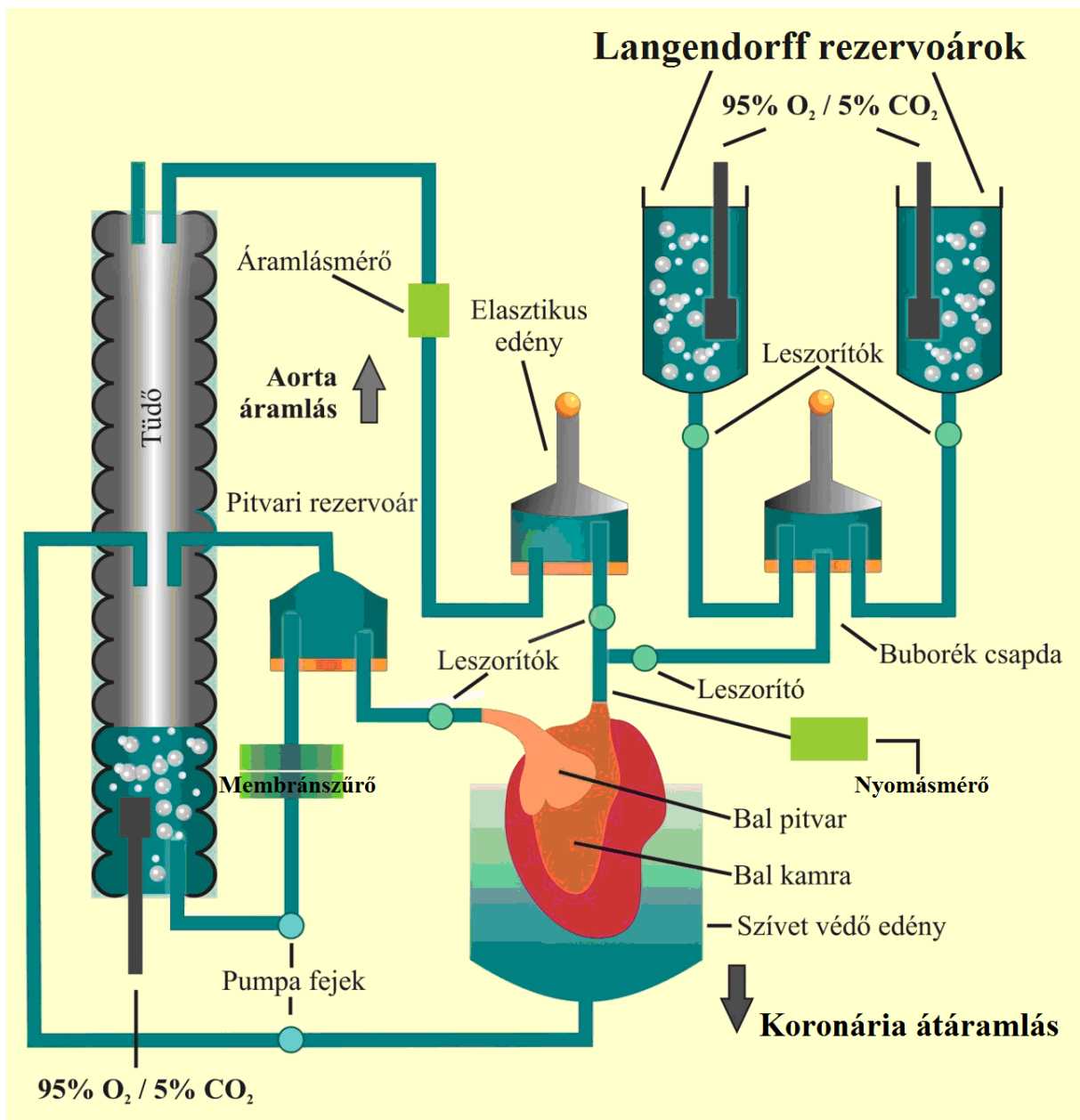
A kísérletek kezdetén a 220-300 g tömegű hím Sprague Dawley patkányokat két csoportba osztottuk. Az első csoport állatait 8 héten keresztül orálisan kezeltük 30 mg/ttkg/nap SCSE szuszpenzióval naponta egyszer, míg a második csoport állatai vivőanyagot kaptak ugyanennyi ideig. A szuszpenzió vivőanyagaként 2 %-os (m/m %) hidroxietil-cellulóz oldatot használtunk.

## **Kezelési protokoll egerekben**

A transzgén állatokat szintén két csoportba osztottuk, melyek közül az egyik csoportot 24 órával az izolált dolgozó szív kísérletek előtt 50  $\mu\text{mol/kg}$  dózisú ón-protoporfirin-IX-el (SnPPIX), a HO-1 specifikus gátlószerével oltottunk intraperitoneálisan.

## **Izolált dolgozó szív preparátum**

Testsúlymérést követően a patkányokat intraperitoneálisan adott ketamin/xylazine (50/10 mg/ttkg) injekcióval, míg az egereket intraperitoneálisan adott nátrium-pentobarbitál (60 mg/ttkg) injekcióval altattuk el. Véralvadásgátlóként intravénás vagy intraperitoneális heparint alkalmaztunk 1000 IU/ttkg dózisban. A heparin injekció után torakotómiát végeztünk és a szíveket jéghideg módosított Krebs-Henseleit (KH) pufferbe helyeztük, melynek összetétele 118 mM NaCl, 5,8 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,36 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, és 5 mM glükóz volt. Ezt követően az aortán keresztül kanuláltuk a szíveket és 10 percig perfundáltuk 100 vízcentiméteres nyomás mellett módosított KH pufferrel nem dolgozó „Langendorff”-módban (4. ábra jobb panel), hogy a vaszkulaturából kimossuk a vért. A 10 perc „mosási” periódus alatt a pulmonáris vénát kanuláltuk és a készüléket átkapcsoltuk „dolgozó” módba (4. ábra bal panel). A dolgozó módba történő kapcsoláskor elzártuk az aortás beáramlást és a pulmonáris véna felől perfundáltuk a szíveket 17 vízcentiméteres nyomással (előterhelés). A puffert minden esetben előzetesen telítettük és a kísérletek teljes időtartamán át 37 °C-on buborékoltattuk karbogén gázzal (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, pH=7,4).



4. ábra. Az izolált dolgozó szív készülék sematikus ábrája.

Az ábra jobb oldalán látható a készülék „Langendorff” módban használt része, amely az aortakanülön keresztül a szívszövet tápanyagellátását biztosítja. A baloldalon ábrázolt dolgozó mód működtetéséhez a tüdővenát is kanülálni kell, így a fiziológiához hasonló folyadékáramlás érhető el a bal szívfélben és a pumpafunkció követhetővé válik. A két mód között a különböző leszorítók segítségével lehet átváltani a készüléket. Dolgozó módban az előterhelés 12,5 Hgmm, az utóterhelés pedig 73,5 Hgmm.

### Az iszkémia kiváltása

Az aerob perfúziót követően patkányszívek esetén 30, míg egérszíveknél 20 perc globál iszkémiát váltottunk ki a pulmonáris véna és az aorta felőli kanülok elzárásával. Annak érdekében, hogy a szívizmot megvédjük a kiszáradástól az üvegedényt a kísérlet teljes ideje

alatt befedtük, így tartva kb. 90-100 %-os páratartalmat. Az iszkémia után a reperfúzió első 10 percét Langendorff perfúzióval indítottuk azért, hogy elkerüljük a fatális kimenetelű kamrai fibrillációkat [234]. Amennyiben iszkémia után nem tért vissza spontán szinusz ritmus, a szíveket elektromosan defibrilláltuk egy 1 másodperces 15 V-os négyszög impulzus segítségével.

## **A patkányszív pumpafunkciójának mérése**

Kísérleteink során az alapértékeket 10 perc dolgozó módban történt perfúzió végén mértük, majd a reperfúzió 30., 60. és 120. percében is regisztráltuk a szívfunkciós paramétereket. A kísérletek teljes időtartama alatt regisztráltuk az aortanyomást (AOP) egy számítógépes szoftverhez kapcsolt nyomásmérő segítségével (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Australia). A szívfrekvenciát (HR) és az aortanyomás idő szerinti első deriváltját (AOdP/dt) a folyamatosan rögzített AOP-ből kalkulálta a szoftver. A koronária átáramlást (CF) a koronáriákból kiáramló folyadék egy percig történő összegyűjtésével mértük, míg az aorta kiáramlást (AF) az utóterhelés után mért visszacsepegő puffer egy időegység (1perc) alatt összegyűjtött mennyiségeként adtuk meg. A perctérfogatot (COUT) az AF és a CF összegeként fejeztük ki, míg a verőtérfogat (SV) a COUT és a HR hányadosaként számszerűsítettük. A verőtérfogat változást úgy kaptuk meg, hogy a reperfúzió utáni SV értékét elosztottuk a hozzá tartozó alapértékkel, ezután pedig szoroztuk 100-zal.

## **Kamrafibrilláció követése és az egérszív pumpafunkcióinak mérése**

A kísérletek ideje alatt epikardiális elektrokardiogram (EKG) segítségével figyeltük a kamrafibrillációk megjelenését az egérszíveken. A készülék két ezüstelektrodon keresztül érintkezett a szívszövettel, az elektromos jelet pedig egy adatgyűjtő rendszeren keresztül szoftveresen értékeltük (ADInstruments, Powerlab, Castle Hill, Australia). Kamrafibrilláción átesettnek (VF) értékeltük azon szíveket, amelyek esetében az EKG alapvonalán több mint 2 percig tartó irreguláris hullámszakasz volt látható. Amennyiben iszkémia után VF-et figyeltünk meg és nem tért vissza a spontán szinusz ritmus, a szíveket elektromosan defibrilláltuk egy 1 másodperces 15 V-os négyszög impulzussal. Ahogyan a patkányszívek esetén, iszkémia előtt és a reperfúzió teljes időtartama alatt regisztráltuk az AF-t és a CF-t, továbbá a HR, AOP és AOdP/dt értékeit szoftveresen dolgoztuk fel (ADInstruments).

## Fehérje izolálás és Western blot

Az izolált szív kísérleteket követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk a bal kamra és szeptum részeket, majd  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további analízisek elvégzéséig. A fehérjék izolálásához mintánként 300 mg-ot elektromos diszpergáló eszköz segítségével (T 10 basic Ultra-Turrax, IKA, Németország) az alábbi pufferben homogenizáltunk; Tris (25 mM), NaCl (25 mM), Na-ortovanadát (1 mM), NaF (10 mM), Na-pirofoszfát (10 mM), okadánsav (10 nM), EDTA (0,5 mM), PMSF (1 mM), proteáz inhibitor koktél, desztillált víz. A homogenizáló puffer valamennyi összetevőjét a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől rendeltük. A fehérje izolálást követően azonos tömegű protein mintákat, valamint előfestett protein standardokat (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Németország) frakcionáltunk Tris-SDS-poliakrilamid gél elektroforézis segítségével. A Western blot eljárás során a szétválasztott fehérjéket elektroforetikusán transzferáltuk nitrocellulóz membránra (Whatman Protran Nitrocellulóz Membrán; Whatman, Egyesült Királyság) transzfer-készülék segítségével (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories Ltd.). A membránok blokkolása (1,5 óra) frissen készített 5 %-os (m/V %) zsírszegény tejpör szuszpenziójával történt. A primer antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, loading kontrollként minden esetben GAPDH antitestet használtunk. A következő napon 3x5 perc mosás után a blotokat 1,5 órán át tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Végül, 3x10 perc mosást követően a membránokat enhanced chemiluminescence reagens (ECL) segítségével kék Röntgen-filmekre exponáltuk (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). A filmeket síkágys szkenner segítségével digitalizáltuk és a képfájlokat ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) szoftverrel elemeztük.

Egér szívek esetében a bal-, jobb kamrai és szeptális részéből vett mintákat  $\beta$ -merkaptóetanol, glicerin (5,5 %) és SDS (0,44 %) tartalmú Tris-HCl (13,2 mM/l) oldatban homogenizáltuk. A fehérje izolálást követően azonos mennyiségű protein mintákat és protein standardot választottunk szét 12 %-os Tris-glicin-SDS-poliakrilamid gél elektroforézis segítségével, majd a blotolást Pellacani és munkatársai által leírt módon [235] végeztük el rekombináns patkány HO-1 protein ellenes antitest használatával.

## **Infarktusos terület meghatározás**

A 30 perc teljes iszkémia és a 120 perc reperfüzió után 40 ml 1 %-os trifeniltetrazólium klorid (TTC) oldatot injektáltunk a patkányszívekbe az aortakanül mellékágán keresztül, melyeket ezt követően fagyasztottunk és -70 °C-on tároltunk az analízis elvégzéséig. A mintákat merőlegesen [236] az apiko-bazális tengelyre hozzávetőlegesen 1 mm vastag szeletekre vágunk. A metszést követően azonnal beszikkentük a szívseleteket, amelyeket ezután szűrőpapíron szárítottunk, majd súlyukat egyenként lemértük. A szeletek digitális képét szintén ImageJ szoftverrel elemeztük, mely során a szeletek tömegéhez pixelszámot társítottunk [237], majd az infarktus által érintett területeket is kijelölve arányosan kiszámoltuk az infarktusos szívszövet tömegét. Összesítve a szeletekből kapott eredményeket, az infarktusos területet egy szív esetében a teljes szívtömeg és az infarktusos szívtömeg hányadosaként kaptuk meg. Az egérszívek esetében ugyanezt a módszert alkalmaztuk annyi különbséggel, hogy a szövet méreténél fogva elegendő volt 10 ml 1 %-os TTC oldat használata.

## **Immunhisztokémia**

A reperfüzió végén a patkányszívek apikális részét 4 %-os pufferolt formalinban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk, majd 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A tárgylemezeken lévő metszeteket ezt követően xyloolban paraffin-mentesítettük, majd leszálló alkohol sorban, végül PBS-ben rehidráltuk. Az antigénekhez való hozzáférhetőséget 0,05 % Tween 20 tartalmú 10 mM-os nátrium-citrát (pH=6,0) pufferben történő feltárással biztosítottuk. A feltáráshoz a metszeteket 25 percig főztük egy erre a célra alkalmazott nagy nyomáson működő edényben. Ezután a szöveti peroxidázokat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmú metanollal hatástalanítottuk, majd a metszeteket 5 % FBS tartalmú TBST oldattal blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Blokkolást és mosást követően a PBST-vel hígított (1/100) elsődleges antitesttel (Covalab, Franciaország) egész éjszakán át inkubáltuk a metszeteket 4 °C-on. A következő napon mosást követően a tormaperoxidázzal konjugált szekunder antitestet 1/300-as hígításban 1 óráig tartottuk a metszeteken szobahőmérsékleten. A reakció láthatóságát DAB oldattal (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle, UK) biztosítottuk, ezután a metszeteket mostuk, majd a fedőlemezeket rögzítő médiummal fixáltuk a tárgylemezekre. A fénymikroszkópos képeket Zeiss Axioscope mikroszkóp segítségével készítettük.

## **RT-PCR**

A bal kamrából, szeptumból és jobb kamrából mintánként hozzávetőlegesen 50 mg-ot használtunk RNS izolálásra, amelyet a guanidin izotiocianidsav/fenol módszerrel végeztünk [238]. Az első cDNS átírásához 5 µg RNS-t használtunk (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR- Invitrogen, San Diego, CA, USA). A kapott cDNS-t specifikus patkány HO-1 exon 5 primerek segítségével sokszorosítottuk (CCC-TTC-CTG-TGT-CTT-CCT-TTG és ACA-GCC-GCC-TCT-ACC-GAC-CAC-A). Az RT-PCR végtermékét 1,5 %-os agaróz gélen választottuk szét és ethidium bromiddal festettük.

## **HO-1 aktivitásmérés**

Ötven mg egér szívsvövetet homogenizáltunk 10 ml 200 mM-os foszfát pufferben, majd 19000 g-vel 4 °C-on 10 percen keresztül centrifugáltunk. A felülúszót tovább centrifugáltuk 100000 g-vel 4 °C-on 1 órán át, majd az alsó frakciót 2 ml 100 mM koncentrációjú K-foszfát pufferben szuszpendáltuk. A biliverdin reduktázt a Tenhunen és mtsai által leírt módon tisztítottuk [33]. Ezt követően sor került a HO-1 aktivitásmérésre a Yoshida és mtsai által közölt metodika alapján [239]. A 2 ml végtérfogatú reakcióelegy összetétele 100 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 15 nM hem, 300 µM BSA, 1 mg biliverdin reduktáz és 1 mg mikroszómális frakció minden egyes szívsvetéből. A reakcióelegyet 37 °C-os vízfürdőn ráztattuk, majd 60 perc sötétben történő inkubáció után a reakciót a minták jégre helyezésével állítottuk le. A HO-1 aktivitást a bilirubin reakcióegyben való képződésének spektrofotometriás mérése alapján számoltuk ki 464 és 530 nm-en mért optikai denzitások különbségét alapul véve [142]. A fehérjekoncentrációt Lowry módszer szerint határoztuk meg [240].

## **Szöveti CO szint meghatározása**

A szöveti szénmonoxid tartalom mérését a Cook és mtsai által leírt protokoll szerint végeztük gázkromatográfiás (GC) módszerrel [241]. Az egérszív mintákat 0,1 M-os foszfát-pufferben (pH=7,4) homogenizáltuk (Ingenieurburo CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen, Németország). Ezt követően a szövetsuszpenziót 4 °C-on 15 percen keresztül centrifugáltuk 12800 g-vel, majd a felülúszót használtuk a szöveti CO mennyiség mérésére. A reakcióelegy a következőket tartalmazta; 150 µl felülúszó, 60 µl NADPH (4,5 mM) és 50 µl 3.5/0.35 mM-

os methemalbumin. A méréshez használt „vak” reakcióelegye NADPH helyett 60 µl foszfát-puffert tartalmazott. A reakcióelegyet ezt követően 5 percig tartottuk 37 °C –on. A gőztér átöblítését követően folytatódott az inkubáció 37 °C –on 60 percig fénytől elzárt helyen, majd a reakciót leállítottuk a minták jégre helyezésével. Ezután a gőztérből 1000 µl mintát gáztömör fecskendővel (Hamilton Co., Reno, NV, USA) injektáltunk a gázkromatográfba 30 ml/perc áramlási sebességű hidrogén vivőgáz mellett. A készülékben a méréshez 200 cm hosszú 0,3 mm belső átmérőjű, Molselect 5 Å bevonatú kolonnát használtunk, amelyet 30 °C-on termosztáltuk. Az injektor és a detektor hőmérsékletét pedig kontrolláltan 50 °C-on tartottuk.

### **Intracelluláris Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> tartalom-mérés**

A sejtekben jelenlévő kationokat egy korábban már leírt módszer szerint mértük [242]. Ehhez az egérszíveket hirtelen 0-5 °C-ra hűtöttük le és 5 percen keresztül jéghideg, ionmentes 100 mM trishidroximetil-amino-metán, valamint 220 mM szukróz pufferrel perfundáltuk, hogy az ionokat eltávolítsuk az extracelluláris térből s, hogy az enzimek működését gátoljuk. Öt percig tartó átmosás a hideg oldattal elegendő ahhoz, hogy az ionok 90 %-át kimossuk az extracelluláris térből [243]. A kimosást követően a bal kamrát 48 órán keresztül szárítottuk 100 °C-on, majd 20 óra alatt 550 °C-on elhamvasztottuk. A hamut 5 ml 3 M-os salétromsavban felvettük, majd 10-szeresére hígítottuk ionmentesített vízzel. Ezután a szöveti Na<sup>+</sup> tartalmat 330,3 nm-en, K<sup>+</sup>-ot 404,4 nm-en és a Ca<sup>2+</sup>-ot 422,7 nm-en mértük levegő-acetilén lángban atomabszorpciós spektrofotométer segítségével (Perkin-Elmer 1100-B, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Ezt a mérési technikát az intracelluláris iontartalom meghatározására korábban leírták a miokardium [243, 244], és a központi idegrendszer esetén is [245].

### **Statisztikai elemzés**

Az infarktusos terület, a HR, CF, AF, AOP, AOdp/dt, COUT, SV, intracelluláris Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> szint és az infarktusos terület értékeinél a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg, majd student t tesztet és variancia analízist végeztünk. A Western blot kiértékelése során szintén a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg, majd ANOVA tesztet és Tukey-féle poszttesztet végeztünk. A Ntg, HO-1 Tg és HO-1 KO<sup>-/-</sup> csoportokat ezután többszörös t-teszttel, majd Bonferroni féle posztteszttel elemeztük tovább.

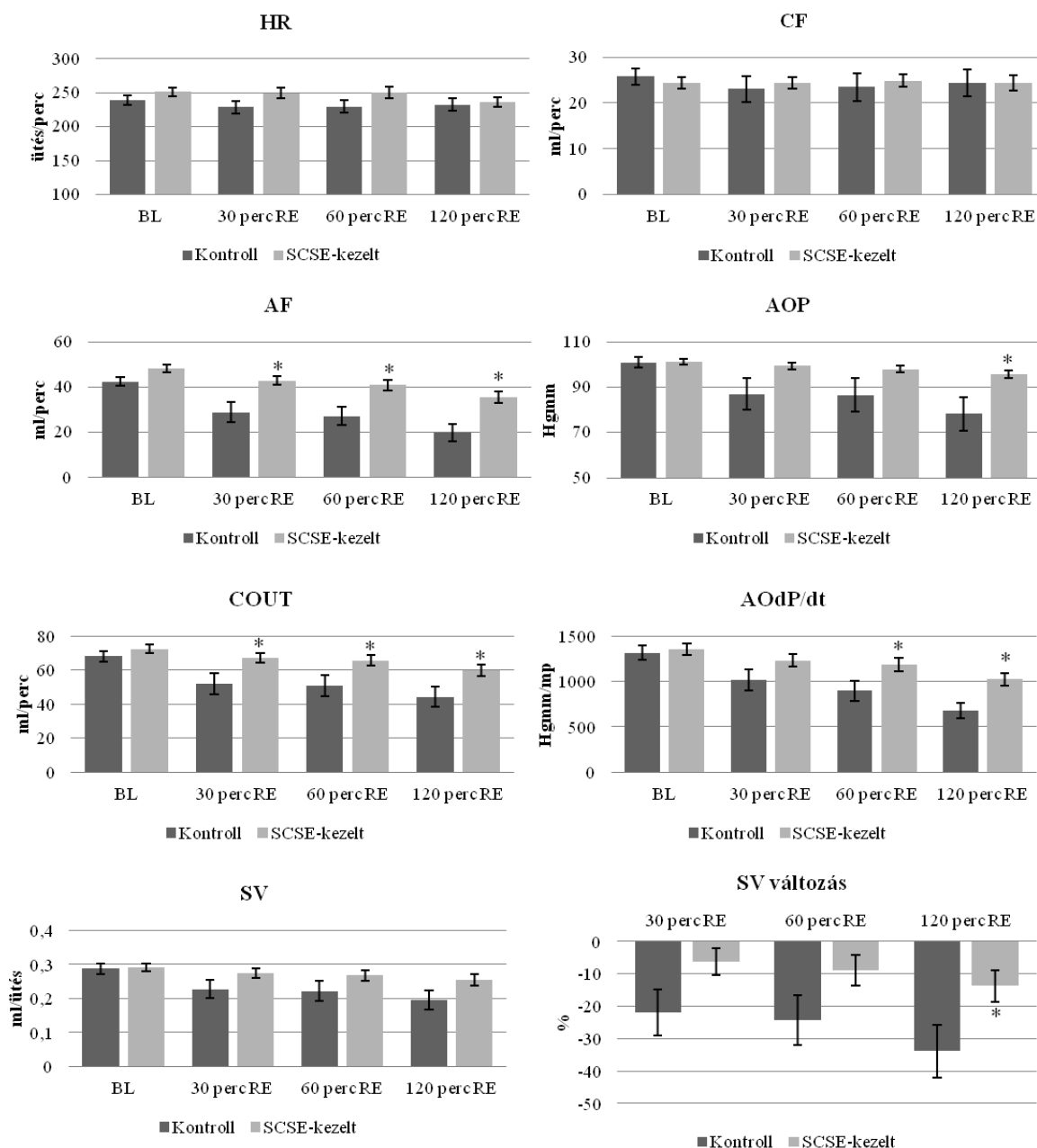
Nem parametrikus eloszlás esetén a kamrafibrilláció átesett, ill. nem-átesett csoportokban az individuális eredmények közötti különbségeket  $\chi^2$  teszttel vizsgáltuk meg. A változásokat minden esetben akkor tekintettük szignifikánsnak, ha  $p < 0,05$  volt. A statisztikai analízishez GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

# Eredmények

## **A meggymagbél-kivonat hatása iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben**

### **A meggymagbél-kivonat hatása a balkamra funkciókra**

Az állatok 8 hetes meggymagbél-kivonat kezelésben részesültek, ezt követően a szíveket izoláltuk és 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfúzióknak vetettük alá a fentebb leírt módon. A kísérletek folyamán meghatároztuk a szívfunkciós paramétereket, úgymint a HR, AF, CF, AOP, AOdp/dt, CO<sub>out</sub>, SV és SV változást. Iszkémiát követően jobb szívfunkciókat regisztráltunk a meggymag-kivonattal kezelt állatok szíveiben (5. ábra). Ahogyan az ábrán is látható (5. ábra) a 120 perces reperfúziós fázis végén mért CO<sub>out</sub> érték a meggymagbél-kivonattal kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt, szám szerint  $59,9 \pm 3,4$  ml, mint a vivőanyaggal kezelt kontroll csoportban, ahol ez az érték  $44,2 \pm 6,0$  ml volt. Hasonlóan magasabb értékeket regisztráltunk, illetve számoltunk az AF, AOP, AOdp/dt és az SV változás értékeinek esetén is a meggymagbél-kivonattal kezelt csoportban, továbbá az SV is egy kevésbé romló tendenciát mutat a kontroll csoporthoz képest, igaz a különbség nem szignifikáns. A CF és a HR értékeiben szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

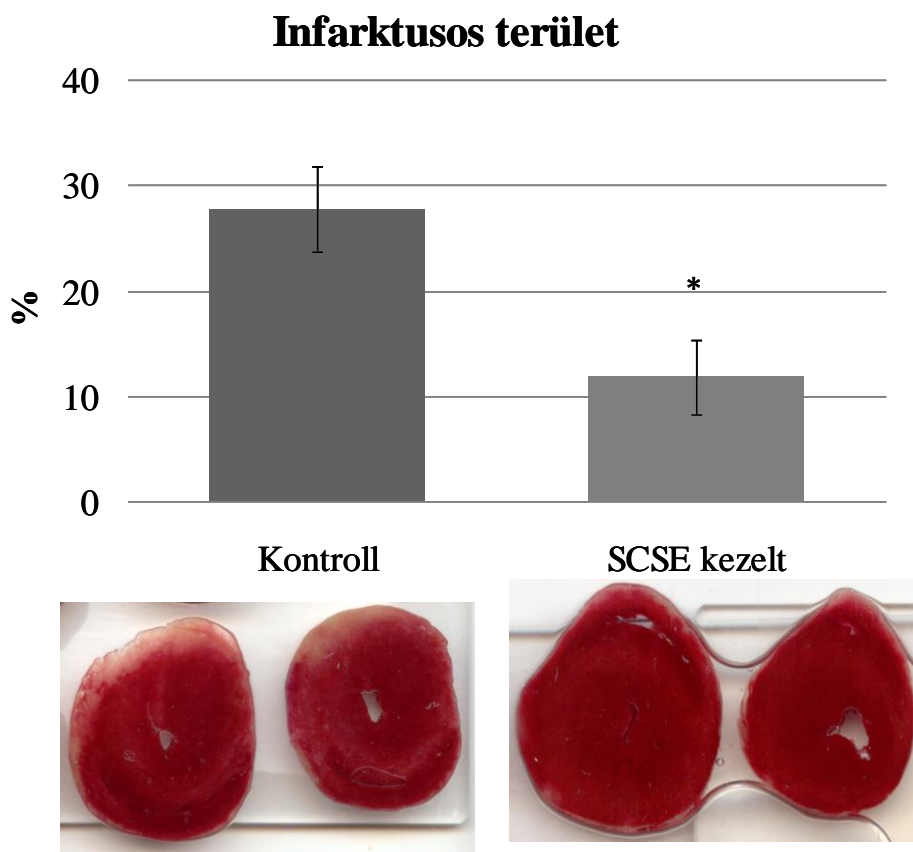


**5. ábra. Szívfunkciók alakulása iszkémia előtt (BL) és a reperfúzió 30., 60. és 120. percében. Kontroll csoportban n=10, a meggyagbéllel kezelt csoportban n=14. \*p < 0,05.**

**A pumpafunkciók a kezelt állatokban jobb posztisztkémiás paramétereket mutatnak. (HR=szívfrekvencia, AF=aortakiáramlás, CF= koronária átáramlás, AOP= aortanyomás, AODP/dt= kifejlődő aortanyomás idő szerinti első deriváltja COUT= perctérfogat, SV= verőtérfogat)**

### A meggyماغbél- kivonat hatása az infarktus által érintett terület nagyságára

A meggyماغbél-kivonat kardioprotektív hatásainak igazolására TTC módszerrel elemeztük az infarktusos területek arányát. Ahogyan azt az 5. ábra mutatja a meggyماغbél-kivonattal kezelt állatok szívében az infarktus következtében elhalt szívizomszövet aránya  $11,8 \pm 3,6 \%$  volt, ami szignifikánsan alacsonyabb érték a vivőanyaggal kezelt kontroll csoportban mért  $27,7 \pm 4,1 \%$ -nál.



**6. ábra. Az SCSE hatása az infarktusos terület nagyságára I/R-nak kitett izolált patkányszívekben.**

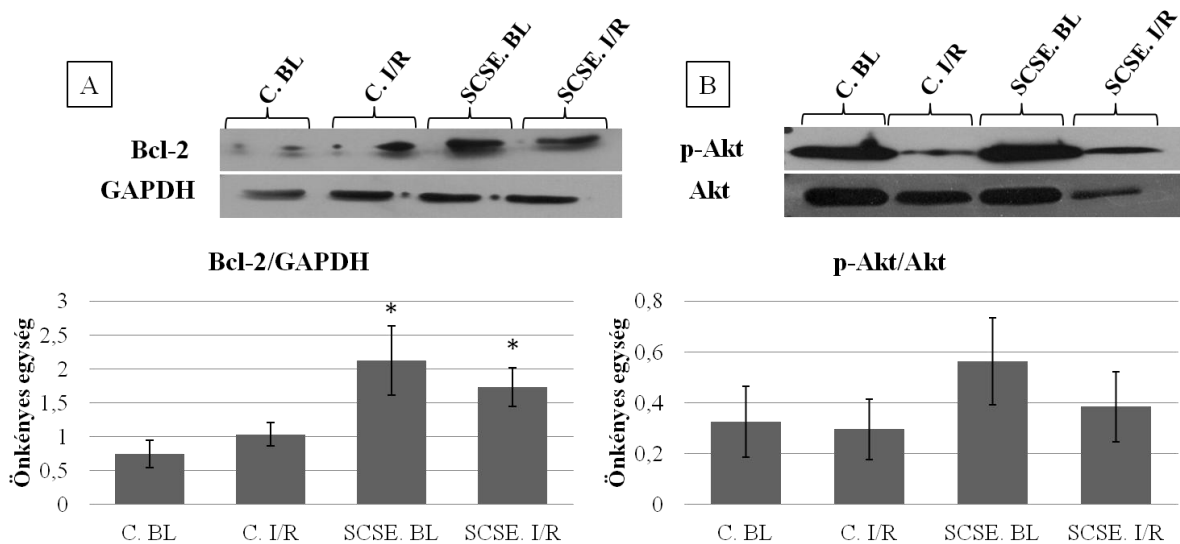
**A kezelt állatok szívében szignifikánsan kisebb mértékű az elhalt szívizomterület.**

**n=4 mindkét csoportban, \*p <0,05.**

### A meggyماغbél-kivonat kezelés hatása túlélési útvonalak aktiválására

A szívizomszövetben aktiválódó túlélési útvonalak vizsgálatához az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szintjét, valamint a foszforilált kontra nem foszforilált Akt (p-Akt/Akt) fehérjék arányát vizsgáltuk. Ezekkel a kísérletekkel egy ezt megelőző vizsgálatban feltételezett hatását támasztottuk alá a meggyماغbél- kivonatnak, miszerint a kezelés módosíthatja az itt említett

és az ezekhez a jelátviteli útvonalakhoz kapcsolódó folyamatokat [190]. Jelen kísérletben bizonyítást nyert az a tény, hogy a meggy-magbél-kivonattal történő kezelés képes a Bcl-2 fehérje expresszióját növelni (7. ábra), így csökkenteni az apoptózist és egyúttal a szívszövet túlélését segíteni I/R-t követően. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelés hatására emelkedő tendenciát mutatott a p-(473) Akt/Akt aránya is a kezelt szívszövetekben (7. ábra), bár ez az eltérés nem volt szignifikáns mértékű. Az I/R okozta károsodások miatt bekövetkező sejtelhalás nekrotikus és apoptotikus folyamatok megindulása miatt is létrejöhet. Korábbi kísérletek bizonyítják, hogy az apoptózis és az infarktusz terület csökkentésében nagyon kedvező tulajdonsággal bírnak a növényi eredetű polifenolok [191]. Vizsgálataink mellett ez a tény is arra enged következtetni, hogy a meggy-magbél-kivonatnak kardioprotektív hatásai vannak.

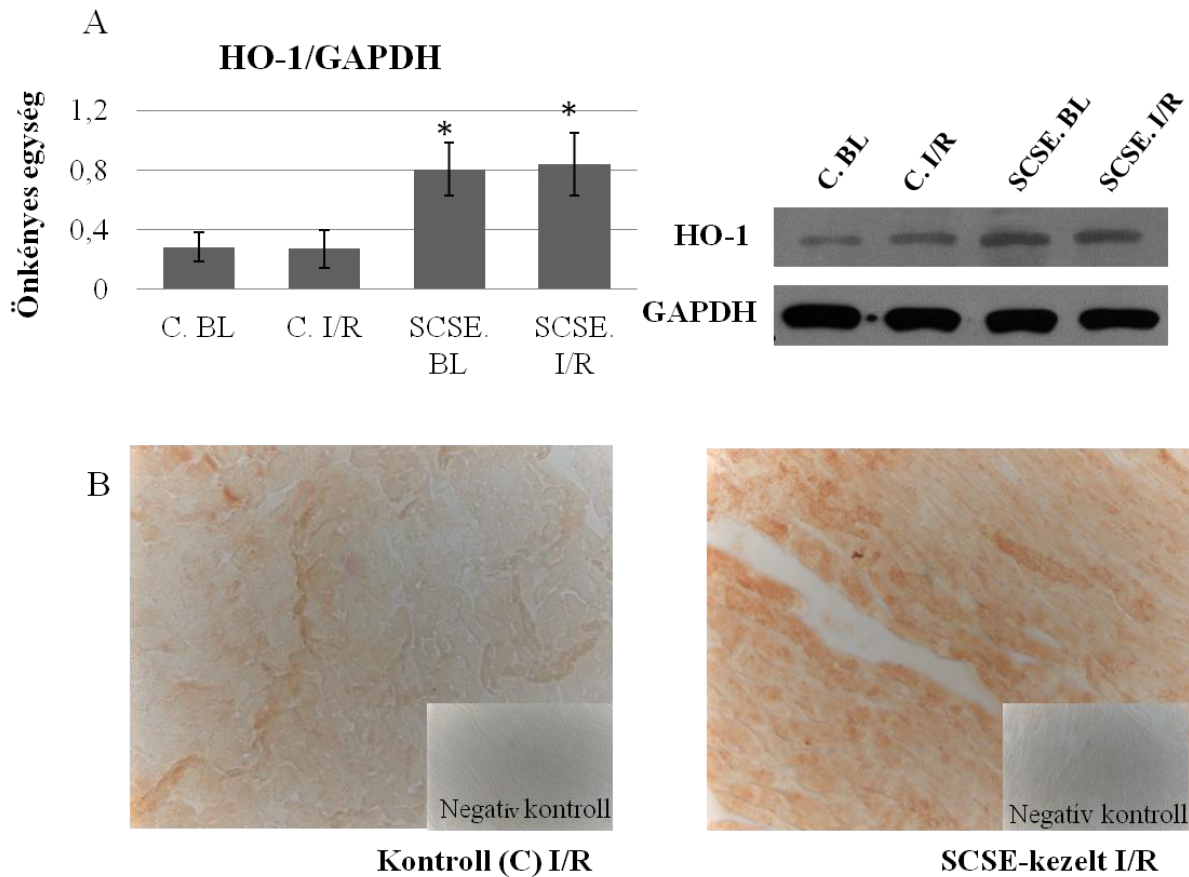


**7. ábra. Antiapoptotikus és túlélési fehérjék expressziós változása.**  
**A Bcl-2 expressziója szignifikáns mértékben megemelkedett a kezelt szívszövetekben, a p-Akt/Akt aránya azonban nem mutat számottevő különbséget a kontroll mintákhoz képest.**  
**n= 5-6, \*p < 0,05 SCSE vs. C.**  
**(C= kontroll, SCSE= meggy-magbéllel kezelt, BL= iszkémia előtt, I/R= iszkémia/reperfúziót követően)**

### HO-1 fehérje expressziójának változása meggy-magbél-kivonat hatására

Kutatócsoportunk korábban vizsgálta a meggy-magbél-kivonat hatását a szem iszkémia/reperfúziós károsodásaira is, mely során azt az eredményt kaptuk, hogy a HO-1 fehérje lényeges hatásokkal bír a retina károsodásainak kivédésében [189]. Itt bemutatott Western blot eredményeink azt mutatják, hogy a meggy-magbél-kivonattal kezelt patkány

szívszövetben jelentősen megemelkedett a HO-1 protein expresszió iszkémiát nem szenvedett és I/R-n átesett miokardiumban egyaránt. Ezzel összhangban immunhisztokémiai módszer segítségével szintén magasabb HO-1 expressziót detektáltunk a kezelt csoportban a vivőanyaggal kezelt kontroll állatokhoz képest (8. ábra).



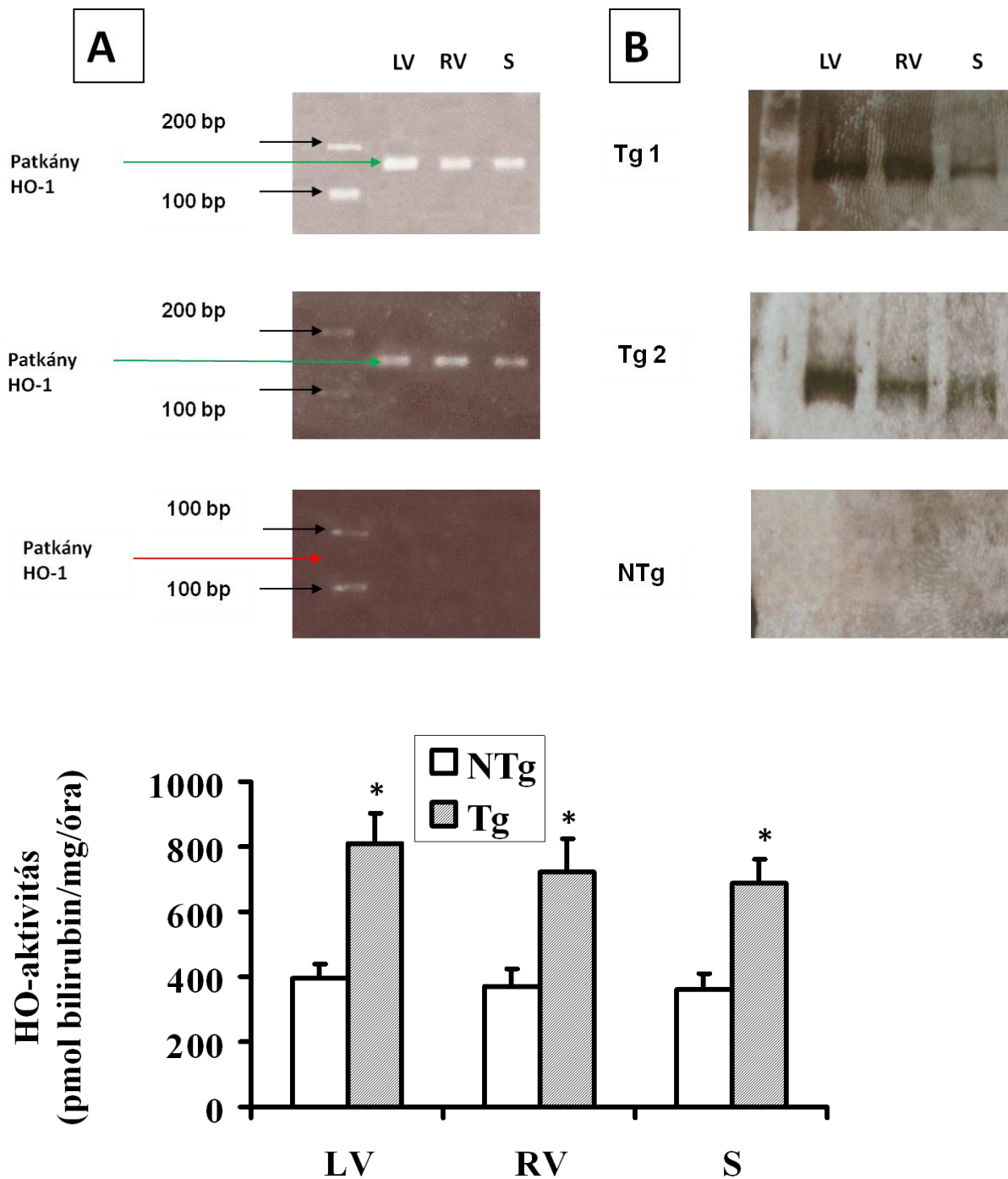
**8. ábra. A HO-1 enzim mennyiségének vizsgálata Western- blot (A panel) és immunhisztokémia segítségével (B panel). Az ábra mindkét paneljén jól látható, hogy a HO-1 expressziója szignifikáns mértékben emelkedik a patkányok szívszövetében meggyماغbél-kivonat kezelés hatására. n= 5-6, \*p <0,05 SCSE vs. C. (C= kontroll, SCSE= meggyماغbéllel kezelt, BL= iszkémia előtt, I/R= iszkémia/reperfúziót követően)**

## **A HO-1 enzim szerepe az I/R károsodások kivédésében transzgén egereken**

### **Patkány HO-1 expresszió igazolása Tg egerekben**

A Tg és NTg bal kamra (LV), jobb kamra (RV) és szeptum (S) mintákból RT-PCR segítségével igazoltuk a patkány HO-1 expressziót mRNS szinten. A Tg egér-mintákból

kapott PCR termék patkány HO-1 specifikus volt RT-PCR- (8/A ábra) és Western blot alapján (8/B ábra) is.



9. ábra. HO-1 expresszió változásának nyomonkövetése PCR-ral (A panel), Western blottal (B panel), és enzim-aktivitásméréssel (C panel). n=6 minden csoportban, \* p < 0,05.

Az ábra paneljein látható, hogy a Tg állatok szívszövetében emelkedett a HO-1 mRNS és fehérje szintje, valamint az enzimaktivitás is nagyobb mértékű.

(Tg= transzgén, NTg= nem transzgén, LV= bal kamra, RV= jobb kamra, S= szeptum)

Az általunk alkalmazott kísérletes elrendezésben két klónt választottunk ki, majd a géndarabokat, a promotert és a HO-1 gén Sfil-t. primerek segítségével vágtuk ki, melyeket patkány eredetű 166 bp hosszúságú HO-1 exon 5 amplifikálásával nyertünk. A genomi eredetű DNS sokszorozódás elkerülése végett az első cDNS kópia szintetizálása előtt mindegyik mintát DNázssal kezeltük. A Tg egér különböző RNS mintáiból a specifikus sávok láthatóak voltak (8/A ábra felső és középső része), míg a NTg mintákból ez a sáv hiányzott (8/A ábra alsó része). Ezt támasztja alá, hogy Western blot alapján a transzgén állatok LV, RV, S mintáiban a patkány HO-1 fehérje láthatóan kifejeződött (8/B ábra felső és középső része), míg NTg egerek miokardiumában a patkány hemoxigenáz-1 nem expresszáldott (8/B ábra alsó része).

Hemoxigenáz enzimaktivitást is mértünk a Tg és NTg egerek mindkét kamrai és szeptális mintáiból egyaránt. Az eredmények alapján a HO enzimaktivitás szignifikánsan magasabb volt a transzgén egerek mindegyik típusú mintájában a NTg mintákban mért értékeknél, ezzel is bizonyítva azt, hogy a Tg1- és Tg2-gén működőképes volt. Fontos megjegyezni, hogy bár a HO-1 mRNS és fehérje nem volt detektálható a NTg egerek szívszövetében PCR és Western blot segítségével, ennek ellenére HO enzimaktivitás mérhető volt ezen mintákban is. Eszerint a hemoxigenáz aktivitás mérés az összes enzim izoforma aktivitásából tevődik össze, úgymint a HO-1, HO-2, HO-3 (8/C ábra). Ebből arra lehet következtetni, hogy a NTg és Tg szövetmintákban mérhető HO enzimaktivitásbeli különbségek tisztán a patkány transzgenikus HO-1 kifejeződésének tulajdonítható az egér miokardiumban.

## A HO-1 expresszió hatása az egér bal kamra-funkciókra

Az 2. táblázat mutatja a 20 perc globál iszkémia előtti- és az azt követő 120 perc alatti szívfunkciók alakulását a NTg és a HO-1 Tg egérszívekben.

**2. táblázat. Szívfunkciók alakulása a HO-1 expresszió változásának függvényében 20 perc iszkémia előtt valamint a reperfúzió 30. és 120. percében.**

	Iszkémia előtt					Reperfúzió									
						30 perc					120 perc				
	HR	CF	AF	AOP	AOPdp/dt	HR	CF	AF	AOP	AOPdp/dt	HR	CF	AF	AOP	AOPdp/dt
<b>NTg</b>	288 ± 9	3,0 ± 0,2	3,5 ± 0,2	157 ± 7	3794 ± 73	255 ± 9	2,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	72 ± 6	945 ± 44	262 ± 9	2,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	67 ± 4	930 ± 51
<b>HO-1 Tg</b>	292 ± 8	3,2 ± 0,3	3,4 ± 0,2	149 ± 6	3834 ± 85	261 ± 7	2,8 ± 0,1*	2,3 ± 0,2*	95 ± 7*	2000 ± 63*	269 ± 8	2,9 ± 0,2*	2,2 ± 0,2*	91 ± 6*	1880 ± 80*
<b>HO-1 Tg + SnPPIX</b>	294 ± 9	3,1 ± 0,2	3,2 ± 0,3	152 ± 9	3815 ± 94	265 ± 8	2,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	78 ± 7	1018 ± 80	270 ± 9	2,0 ± 0,3	1,1 ± 0,2	72 ± 8	1000 ± 77

**A posztiszkémiás szívfunkciók a HO-1 Tg állatokban mutatták a legjobb paramétereket, az I/R okozta károsodások kivédésében ezért ez a fehérje döntő fontosságú.**

**n=6 minden csoportban, \*p <0,05.**

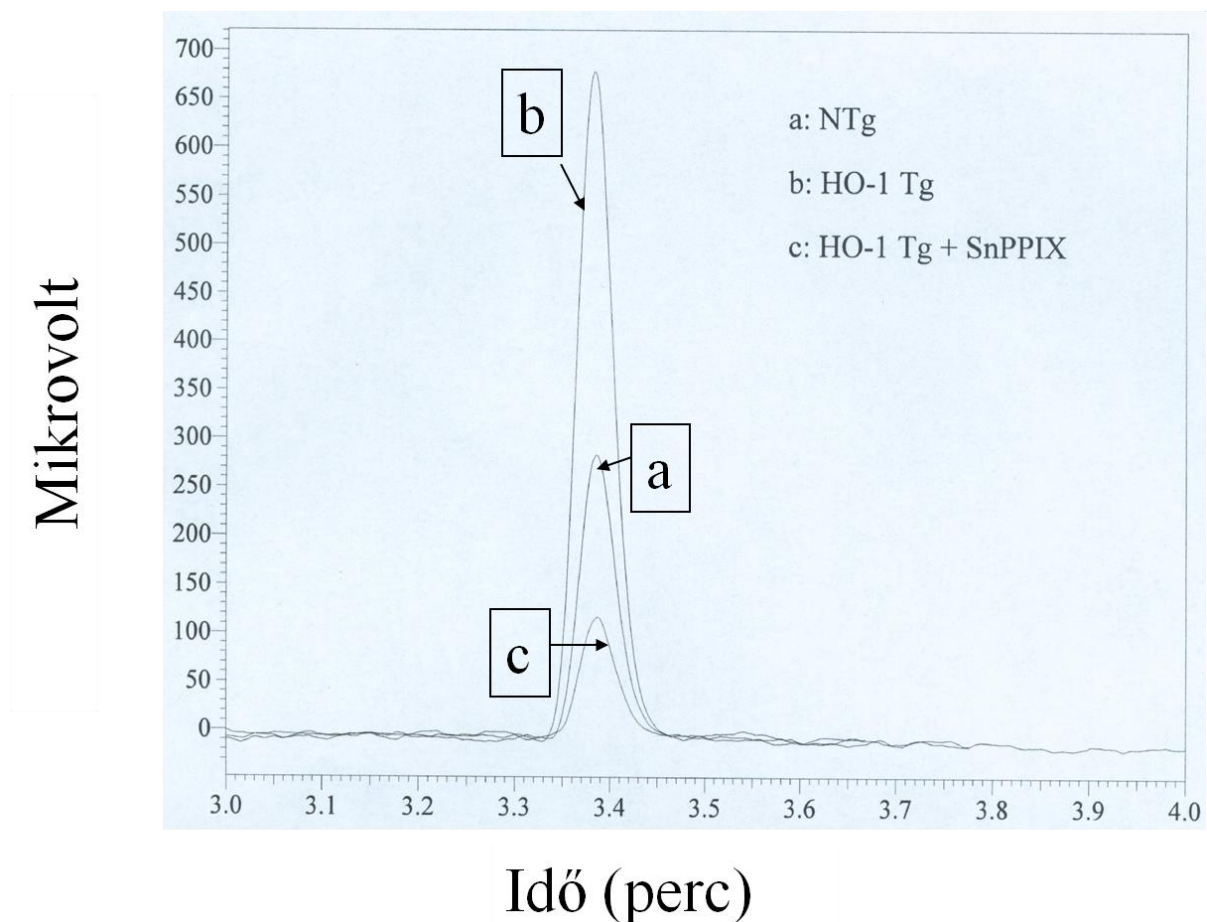
[Tg= transzgén, NTg= nem transzgén, HR=szívfrekvencia, AF=aortakiáramlás (ml/perc), CF= koronária átáramlás (ml/perc), AOP= aortanyomás (Hgmm), AODP/dt= kifejlődő aortanyomás idő szerinti első deriváltja (Hgmm/mp)]

Iszkémia kiváltása előtt a NTg és HO-1 Tg csoportokban a HR, AF, CF, AOP és AODP/dt értékeiben nem, míg a reperfúzió alatt a CF, AF, AOP, és AODP/dt esetén is szignifikáns különbség volt mérhető. A szívfrekvencia a reperfúzió alatt sem tért el számottevően a két csoportban. Például a reperfúzió 30. percében mért aortakiáramlás a NTg csoportban  $0,9 \pm 0,1$  ml/perc volt, amely a 120. percre  $0,8 \pm 0,1$  ml/perc lett. Ehhez képest a Tg csoportban ez az érték szignifikánsan magasabb  $2,3 \pm 0,2$  ml/perc ( $p < 0,05$ ) és  $2,2 \pm 0,2$  ml/perc ( $p < 0,05$ ). Ugyanez a tendencia volt megfigyelhető a CF, AOP és AODP/dt esetén is (2. táblázat). Elmondható továbbá, hogy az 50  $\mu$ mol/kg SnPPIX HO-1 inhibitor hatására a Tg

csoportban tapasztalt protektív hatás megszűnt. A HO-1 Tg + SnPPIX csoport és NTg csoport értékei között eközben nem találtunk szignifikáns különbséget (2. táblázat).

### Szöveti CO tartalom változása

A 10. ábra a GC-vel kapott reprezentatív kromatogramokat mutatja a szöveti CO képződésről a különböző csoportokban (NTg, Tg és SnPPIX kezelt HO-1Tg) 20 perc iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően.



**10. ábra. Szöveti CO tartalom (Tg= transzgén, NTg= nem transzgén)**  
Az endogén CO tartalom szintén a HO-1 Tg állatokban a legmagasabb (b), ugyanakkor HO-1 enzimgátlóval történő előkezelés (c) esetén kismértékű CO tartalom csökkenés volt tapasztalható a NTg csoporthoz (a) viszonyítva.

Megfigyelhető, hogy 20 perc iszkémián, majd 120 perc reperfúzió után az HO-1 Tg szívekben lényegesen nagyobb volt a CO tartalom (10. ábra b kromatogram) a NTg csoporthoz viszonyítva (10. ábra a kromatogram). Mindemellett a SnPPIX-el kezelt HO-1Tg miokardiumban az endogén CO tartalom relatíve kevés volt (10. ábra c kromatogram).

## A HO-1 expresszióváltozás hatása a miokardium intracelluláris ionösszetételére

A 3. táblázat hivatott összefoglalni a miokardiumban mért intracelluláris ionkoncentrációbeli különbségeket a különböző állatokból származó mintákban.

**3. táblázat. Intracelluláris Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> koncentrációk a bal kamrában (μmol/g száraz szövet).**

	Iszkémia előtt			20 perc iszkémiát, majd 120 perc reperfúziót követően		
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
<b>NTg</b>	31 ± 3	282 ± 6	1,6 ± 0,1	84 ± 5	229 ± 5	4,1 ± 0,3
<b>HO-1 Tg</b>	27 ± 4	277 ± 7	1,7 ± 0,2	58 ± 7*	261 ± 8*	2,5 ± 0,5*
<b>HO-1 Tg + SnPPIX</b>	35 ± 5	286 ± 9	1,9 ± 0,3	90 ± 9	219 ± 9	4,5 ± 0,7

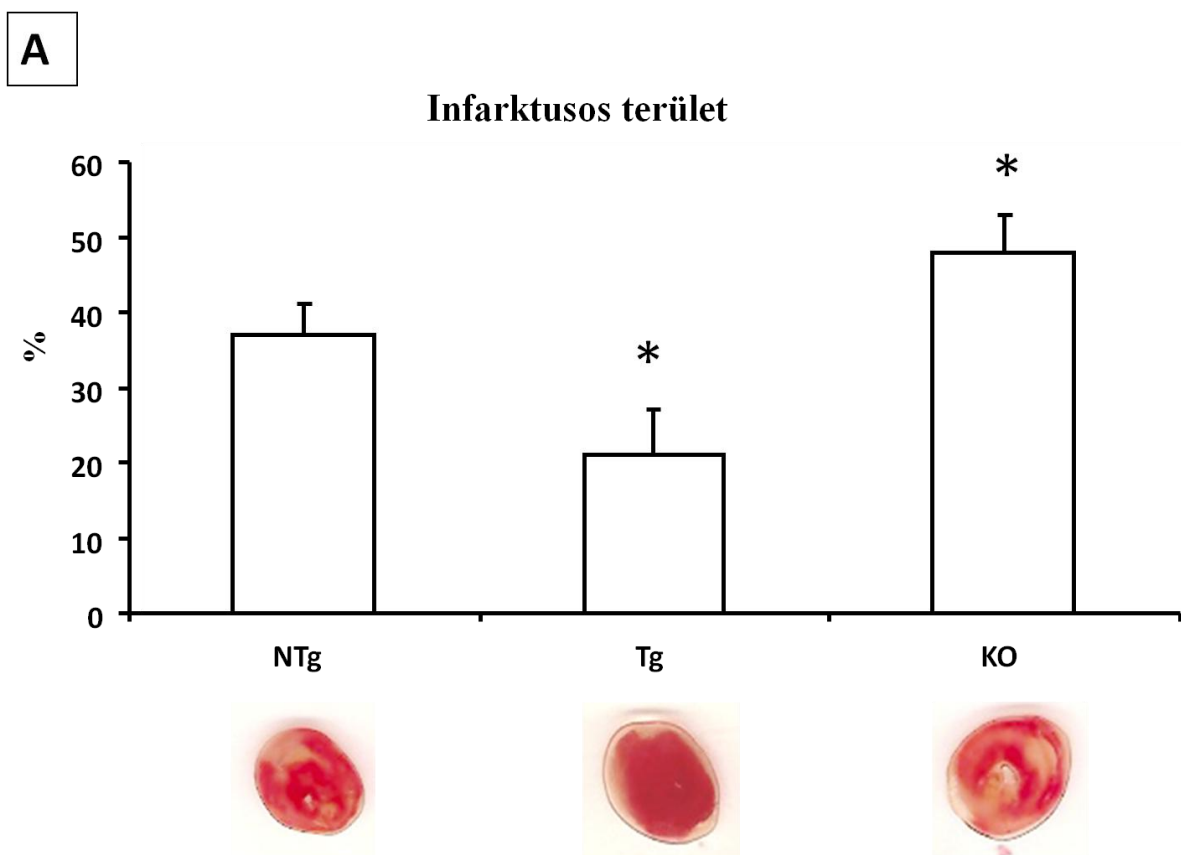
**A HO-1 Tg állatok szívszövetében szenvednek a legkisebb változást az i.c. ionkoncentrációk.**

**n=6 minden csoportban, ábrázolva a középérték ±SEM. \*, ha p<0,05 a NTg csoport értékeihez viszonyítva.**

Látható, hogy a bal kamrában az intracellulárisan mért Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> tartalom nem tért el számottevően a NTg, Tg és HO-1 Tg + SnPPIX csoportokban az iszkémiát megelőzően. Azonban a 3.táblázat azt is mutatja, hogy a Na<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> tartalom szignifikánsan alacsonyabb volt I/R-t követően a Tg csoportban a NTg és HO-1 Tg+SnPPIX csoportokhoz viszonyítva. Továbbá, a bal kamrai munkaizomzat K<sup>+</sup> tartalma szignifikánsan magasabb (261 ± 8 μmol/g, p<0,05) volt a HO-1 transzgén csoportban ahhoz a K<sup>+</sup> veszteséshöz képest ami a kontroll csoportban volt tapasztalható (229 ± 5 μmol/g). Az SnPPIX-el kezelt szívekben mérhető intracelluláris ionkoncentráció I/R-t követően a NTg csoport értékeihez hasonlóan változott. Másképpen fogalmazva az SnPPIX teljes mértékben eltüntette azt a protektív hatást az ionösszetétel tekintetében, ami a HO-1 Tg szívszövetben látható.

## A HO-1 expresszióváltozás hatása az infarktus által érintett terület nagyságára és a kamrafibrilláció gyakoriságára

A 11/A. ábra az izolált, iszkémián és reperfúzió után átesett egérszívek infarktusos területeit mutatja reprezentatív képeken és oszlopdiagramon. A meggyipiros régió a funkcióképes terület, a halvány, már-már fehéres részek pedig az elhalt miokardiumot jelölik. Az infarktusos terület a NTg csoport  $37 \pm 4\%$ -ához képest szignifikánsan kisebb,  $20 \pm 6\%$  ( $p < 0,05$ ) volt a HO-1 Tg csoportban (11/A. ábra), míg a HO-1 KO csoportban pedig szignifikánsan magasabb,  $47 \pm 5\%$ -nak ( $p < 0,05$ ) adódott (11/A. ábra).

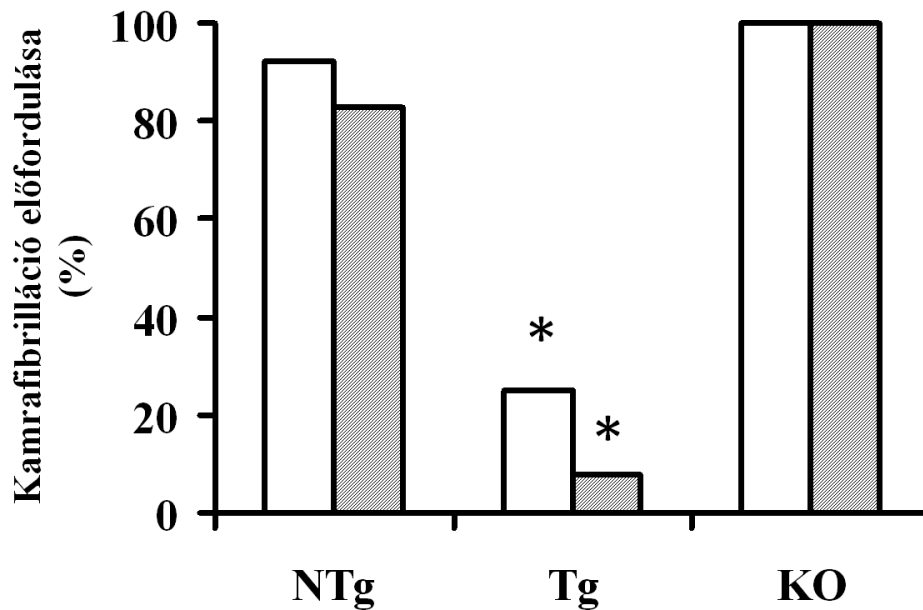


**11/A. ábra. Infarktusos terület nagysága az egérszívekben 20 perc iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően.**

**A HO-1 Tg állatok szívében a legkisebb az elhalt szívizomterület, ugyanakkor a KO állatok szív szövete halt el a legnagyobb mértékben.**

**n=6 minden csoportban, \*  $p < 0,05$ .**

**(Tg= transzgén, NTg= nem transzgén, KO= knock out)**

**B**

**11/B. ábra. Kamrafibrilláció előfordulása. A fehér oszlopok jelölik az összes fibrillációs eseményt, a szürke oszlopok pedig a kamrafibrillációnak ítélt eseményeket. A HO-1 Tg állatok izolált szívéen észleltük a legkevesebb fibrillációs eseményt, míg a KO állatok közül sz összes szív fibrillált. n=6 minden csoportban, \* p <0,05. (Tg= transzgén, NTg= nem transzgén, KO= knock out).**

Szintén látható a 11. ábrán a reperfúzió indukálta összes kamrai fibrillációk %-os előfordulási arányát azon fibrillációk mellett, amelyek legalább 2 percig tartottak (11/B. ábra). A HO-1 Tg csoportban szignifikánsan kisebb volt ( $p < 0,05$ ) az összes fibrillációs epizódok száma (25 %) és a tényleges kamrafibrilláción átesett (8 %) szívek aránya a NTg csoport hasonló értékeihez képest (92 % és 83 %). A KO csoportban a reperfúzió indukálta totál és tényleges fibrillációk aránya 100 % és 100 % volt, ami a HO-1 aritmogenezisben betöltött szerepét hangsúlyozza.

## Megbeszélés

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte milliókat érintenek. Habár az orvostudomány fejlődésével a betegségek patogenezisééről és a lehetséges rizikótényezőkről ismeretanyagunk egyre csak bővül, a halálozási statisztikai adatok az elmúlt évtizedekben csak rendkívül kismértékben mutatnak pozitív irányú változást. Az elmúlt időszakban egy kimondatlan, de jelentős igény merült fel a szintetikus gyógyszerek mellett a természetes eredetű gyógyhatású készítményekkel történő terápiára, illetve ún. funkcionális élelmiszerekkel, vagy étrendkiegészítők révén történő betegség megelőzésre, különös tekintettel a kardiovaszkuláris megbetegedésekre. Kutatócsoportunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy a meggy-mag-kivonat kezelés hatására a kísérleti állatok renehártyája ellenállóbb volt az iszkémia/reperfúziós károsodásokkal szemben, s a retinakárosodás jelentősen kisebb mértékű volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az eredmények arra utalnak, hogy ez a protektív hatás részben legalábbis a hemoxigenáz-1 (HO-1) fehérje indukciójának volt köszönhető. Ez a fehérje fontos szerepet tölt be a sejtek stressz válaszában, segíti a sejtek túlélését például oxidatív stressz során a szabadgyökök károsító hatásaival szemben. Az oxidatív stressz egy olyan biokémiai folyamat, amelyben az oxidatív sajátosságú anyagok és az antioxidánsok közötti egyensúly felborul. Ez a folyamat szinte megszámlálhatatlan megbetegedéssel függ össze, melyek között előkelő helyen állnak a szív- és érrendszer megbetegedései. Fiziológias körülmények között a különböző szövetek sejtjei a ROS-ek előállításával és eliminálásával tartják fent a redukzív és oxidatív folyamatok közötti kényes egyensúlyt. A ROS-ek alacsony koncentrációban jelátviteli útvonalak modulálásában vesznek részt, viszont, ha a ROS-ek termelődése nagyobb mértékű, mint amivel az antioxidáns arzenál meg tud birkózni, az sejt-károsodással jár, végső soron pedig patológiás elváltozásokhoz vezet [246]. Az oxidatív stresszel szembeni védekezésben az endogén antioxidánsok mellett nagy szerep jut a szervezetbe külső forrásból bejuttatott antioxidánsoknak, amelyek számos biokémiai útvonalon keresztül csökkenthetik többek között az iszkémia/reperfúzió okozta kardiovaszkuláris károsodásokat is. A kardiovaszkuláris betegségek, mint például a hipertenzió, szívelégtelenség és aritmiák ugyanakkor génszinten is szabályozhatóak.

A természetes eredetű antioxidáns molekulák között egyes vitaminokat, polifenol-származékokat, pro- és antocianidineket fedezhetünk fel, melyek kimutatható mennyiségben fordulnak elő a hazánkban ipari melléktermékként kezelt meggy-mag csonthéját feltárva nyert

meggyماغbélben is. Kutatócsoportunk korábban már tanulmányozta a meggyماغbél-kivonat hatását a szív iszkémia/reperfúziós károsodásaival szemben is. Tapasztalataink alapján a meggyماغbél-kivonat dóziszfüggő módon csökkenti a kamrafibrillációk kialakulásának a valószínűségét, valamint az infarktusz terület nagyságát és javítja a posztisztkémias szívfunkciókat. Ezek mellett csökkentette a kaszpáz-3 expressziót [232]. Kutatócsoportunk nyulakon is végzett korábban vizsgálatokat a meggyماغbél-kivonattal, mely alapján elmondható, hogy a meggyماغbél-kezelés szignifikánsan csökkentette a koleszterindús diétán tartott állatok infarktusz területét I/R-t követően, valamint csökkent plakképződést, emelkedett HO-1 és citokróm c oxidáz III fehérje expressziót detektáltunk [247].

A pontosabb molekuláris mechanizmusok tisztázására jelen kísérleteinkben a meggyماغbél szilárd őrleményét felhasználva szuszpenzióval kezeltünk Sprague Dawley patkányokat 8 héten keresztül, míg a kontroll csoport állatai az őrlemény-suszpenzió elkészítéséhez használt vivőanyagot kapták gyomorszondán keresztül naponta egyszer 30 mg/ttkg dózisban. A kezelést követően a hím Sprague Dawley patkányok mellkasát elaltatást követően feltártuk, szívüket izoláltuk és 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfúziónak vetettük alá. Az izolált dolgozó szív kísérletek alatt a szívfunkciókat, úgymint az aorta kiáramlást, koronária átáramlást, aortanyomást és szívfrekvenciát, folyamatosan monitoroztuk. A vizsgálatokat követően meghatároztuk a perctérfogatot, a verőtérfogatot és annak változását az iszkémia előtti állapotokhoz képest (4. ábra). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a meggyماغbéllel kezelt állatok szívein az izolált dolgozó szív készüléken jobb posztisztkémias bal kamrai funkciókat regisztráltunk, mint a kontroll csoportban. Az aorta kiáramlás (AF) és a koronária átáramlás (CF) értékei már az iszkémiát követő első, 30 perces értékeiktől egészen a reperfúzió végéig javuló paramétereket mutattak a meggyماغbél kivonattal kezelt állatok szívei esetén, mint a kontroll állatoknál. Az AF és CF eredményeit összeadva kiszámoltuk a perctérfogatot (COUT), amely esetében a különbség az előzőekkel korrelált. A COUT és a szívfrekvencia értékeinek ismeretében kifejeztük a verőtérfogatot és annak változását, amely a reperfúzió végén szignifikánsan magasabb értékeket mutatott a meggyماغbél-kivonattal kezelt állatoknál, mint a kontroll csoportban. Az izolált dolgozó szív készülékre jellemző, hogy a szívre nehezedő elő- és utóterhelés konstans a kísérlet folyamán, így a mért paraméterek szinte kizárólag a miokardium kontrakciós erejétől függenek, azaz a kezelt állatok szívében a kontrakciós erő I/R-t követően jobban megtartott, mint a kontroll csoportban. Tehát, a kezelt állatok szívei ellenállóbbak voltak a kontroll állatokéhoz képest, amely azt támasztja alá, hogy az ilyen és ehhez hasonló növényi kivonatoknak komoly szerep juthat az endotél-funkció megtartásában és a miokardium túlélésében. Ezt az eredményt

támasztja alá a kisebb mértékű infarktusos terület, amely csekélyebb számú szívizomsejt elhalására utal a kezelt állatokban. Eredményeink összhangban állnak korábbi vizsgálatainkkal, ahol 3 hetes meggymagbél-kivonat kezelést követően vizsgáltuk az állatok szívét I/R okozta károsodásokkal szemben. Korábbi eredményeink alapján a meggymagbél dóziszfüggő módon védi a szívszövetet I/R-indukálta károsodásokkal szemben, részben az apoptózis gátlásán keresztül [232].

Jelen disszertáció alapját érintő molekuláris biológiai kísérletek során kiderítettük azt, hogy az apoptózis gátlás molekuláris hátterében állhat a Bcl-2 fehérje expressziójának megemelkedése. A Bcl-2 fehérje gátolja a mitokondriumokból a citokróm-c felszabadulását, mely utóbbi egy kaszpázaktivátor, így védve a szívszövetet és segítve a szövet túlélését az I/R okozta károsodások során illetve azt követően. A szakirodalomban több növényi kivonat kardio- és citoprotektív hatásának hátterében azonosították a Bcl-2/Bax útvonal modulálását, így Gu és munkatársai a resveratrol szívhatásait kutatva azt találták, hogy e természetes sejtprotektív polifenol képes gátolni a doxorubicin indukálta apoptózist egerekben. A doxorubicin kezelés mellett adagolt resveratrol megemelte a Bcl-2 expresszióját, valamint csökkentette a Bax szintjét, azonban a HO-1 gátló ZnPPIX a protektív hatást eltörölte, ill. a fehérjék arányát megfordította [248]. Ezen eredményekkel összhangban immunhisztokémiai- és Western blot vizsgálataink során arra derítettünk fényt, hogy a meggymagbél-kivonattal történő előkezelés szignifikánsan megemelte a szívszövetben a HO-1 fehérje és a Bcl-2 intracelluláris mennyiségét.

Egy másik növényi kivonat, a gyulladáscsökkentő genipin is képes a HO-1 expresszió megemelésére, ezzel együtt pedig protektív hatás közlésére, mely hátterében a foszfatidilinozitol-trifoszfát (PI3)-kináz-JNK1/2-Nrf2 kaszkád működése állhat [249]. A PI3-nak fontos szerepe van az oleanolsav indukált HO-1 expresszió növelésének mediálásában is, amely így hozzájárul az oxidatív stresszel szemben fellépő sejtvédő folyamatokhoz patkány VSMC-kben [250]. Ez utóbbi tanulmány az Akt aktivációját és az Nrf-2 nukleáris lokalizációját is kapcsolatba hozta a HO-1 indukációjával. Az Nrf-2 ugyanakkor a *Ginkgo biloba* levél-kivonatának HO-1 indukáló hatásával is szoros összefüggésben áll, így téve a páfrányfenyő kivonatát potens ateroszklerózist gátló hatásúvá [251]. Ezzel összhangban kismértékű, nem szignifikáns mértékű változást észleltünk a p-Akt/Akt arányában a meggymagbél-kivonattal kezelt patkányok szívszövetében, amely a kaszpáz-9 gátlásával lehetséges, hogy hozzájárul a sejtek túléléséhez. A meggymagbél-kivonat hatásai között tehát nem zárhatjuk ki az Akt fehérje foszforilációt követően megvalósuló aktivációját sem, jelen eredményeink azonban ezt nem bizonyítják. A már említett korábbi vizsgálatainkban [232]

három hét kezelést követően nem tapasztaltunk semmilyen negatív hatást a meggy-magbél-kivonattal kezelt állatokban. Jelen vizsgálatainkban nyolc hét kezelés után sem találtunk káros elváltozást, vagy mellékhatást; a kezelt állatok napirendjében nem volt eltérés a kontroll állatokhoz képest.

Fontosnak tartjuk megemlíteni azonban azt, hogy elvégeztük a meggy-magbél-kivonat hosszú távú (6 hónap) toxikológiai vizsgálatát is, amelyek alapján megállapíthatjuk, hogy a kezelés toxikológiai szempontból nem járt semmilyen külső tüneti elváltozással az állatok esetében (nem publikált eredmények). A szövettani toxikológiai vizsgálat leírta, hogy a máj lebonyolított szerkezete megtartott, kötőszövet-, illetve lipidfelhalmozódás nem volt megfigyelhető. A szívizom rostos szerkezete megtartott, rostfragmentáció, kopási pigment, illetve kötőszövet felhalmozódás, vagy lobsejtes infiltráció egyik mintában sem volt látható. Az aorta fala szabályos elrendeződést mutatott, az érfalat infiltráló habos makrofágokat, intra-, vagy extracelluláris lipid lerakódást, ateroszklerotikus léziót, kalcifikációt egyik vizsgált metszeten sem találtunk. Szokványos volt a hasnyálmirigy exokrin és endokrin állománya. A tüdő felépítése szintén szabályos elrendeződést mutatott. A vesékben a kéreg- és a velőállomány jól elkülönült, a glomerulusok szabályos strukturális elrendeződést mutattak, sem intersticiális fibrózist, sem limfociták beszűrődését, sem beszűkült lumenű ereket nem figyeltünk meg. A lép állományában gyulladásra utaló jelek szintén nem voltak detektálhatóak. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy az általunk alkalmazott dózisban meggy-magbél-kivonat hosszú távon semmilyen káros szervi elváltozást nem okoz.

Összeségében tehát megállapítható, hogy a meggy-mag-kivonat az alkalmazott dózisban biztonságos, és a Bcl-2/HO-1 útvonal modulálásán keresztül védi a szív-szövetet az I/R-indukálta károsodásokkal szemben.

A HO enzimrendszer, különösen a HO-1 '60-as évekbeli felfedezését követően egy igen intenzíven és töretlenül fejlődő kutatási területet nyitott számos tudományos műhely számára. A HO-1 enzim fontos sejtvédő celluláris fehérje, mely az oxidatív stresszel és a gyulladással szembeni védekezés egyik központi molekulája. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a HO-1 rendszer milyen szerepet játszik a kardioprotektív hatásokban. Korábban több kutatócsoport leírta, hogy a HO-1 mRNS [252] és fehérje szintje lecsökken fibrillált, I/R-n átesett patkány miokardiumban [253], valamint HO-1 KO egerekben csökkent baltamra funkciót regisztráltak [254]. Úgy tűnik, a HO-1 nemcsak a károsodások elleni védekezésben betöltött központi szerepe miatt fontos az élő szervezetnek, hanem hiánya az étellel összeegyeztethetetlen folyamatok sorozatát indítja el. Humán HO-1 génhányt először 1999-ben írtak le. A páciens egy kisfiú volt, a szakirodalom később egy

kislányról is említést tesz. Szervezetükben nagymértékű krónikus gyulladás, koagulopátia, nephritis és ateroszklerózis alakult ki, melyek miatt sajnos mindketten nagyon fiatalon elhunytak [200].

A fentebb leírtak alapján feltételeztük, hogy a HO-1 „overexpresszió” nagymértékben segíthet a működőképes szövetek túlélésében. Ennek modellezésére HO-1 transzgén egereken végeztünk izolált szív és molekuláris biológiai kísérleteket. A Tg egerekben a hozzávetőleg 50 %-al emelkedett az alap HO-1 expressziós szint, a megemelkedett enzimszintet PCR-ral, Western blottal, HO-1 aktivitásméréssel és a szöveti CO tartalom GC-vel történő mérésével is igazoltuk. Érdekes eredmény, hogy a NTg állatok mintáiban komoly endogén CO szint mérhető, amelyet a HO-1 overexpresszió markánsan képes megnövelni, ugyanakkor a SnPPIX-al, a HO-1 egyik gátlószerével való enzimgátlás a CO tartalom csökkenésében is megmutatkozik. A CO, mint hírvivő molekula, szintén hozzájárulhat az apoptózis folyamatának a mérsékléséhez [197], valamint gyulladásgátló hatással is bír [128]. A CO hatásmechanizmusa továbbá szoros kapcsolatban állhat a cGMP szinttel, valamint a cAMP/cGMP aránnyal [255]. Az alacsony koncentrációban adagolt exogén CO segítheti az I/R-n átesett izolált szív miokardiumának túlélését, amelyhez hozzásegít a cGMP intracelluláris koncentrációjának emelkedése [256]. A magasabb cAMP szint arritmogén hatással bír az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növelése miatt, ez azonban úgy tűnik a cGMP szint emelésével ellensúlyozható, hiszen a cGMP csökkenti a reperfüzió indukálta kamrafibrillációk kialakulását. Ennél fogva e nukleotidok esetén az arány mértékére célszerű nagyobb hangsúlyt fektetni a CO által közvetített protektív folyamatok háttérének kutatása során, mint önállóan egy-egy nukleotid koncentráció meghatározását. A HO-1/CO rendszer továbbá elősegítheti a mitokondriális biogenezist az Akt aktivációjával, a GSK-3 $\beta$  gátlás csökkentésével, valamint az Nrf-2 expresszió növelésével és nukleáris transzlokációjának serkentésével, aminek következtében megemelkedik a nukleáris légzési faktor-1 (NRF-1) transzkripciója [257]. Manapság, amikor oly sok molekuláris biológiai technika áll a kutatók rendelkezésére, az intracelluláris ionkoncentrációbeli változások követése némileg háttérbe szorult. Azonban nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy az akut károsodásokban az ionegyensúly felborulása fontos szerepet játszik. Így a kísérleti állatok szívében a miokardiális funkció és a HO-1 expresszió mellett tanulmányoztuk az intracelluláris ionkoncentrációkat is. A Tg állatok szívében a  $K^+$  koncentráció szignifikánsan alacsonyabb mértékben csökkent a NTg állatokhoz képest, és a  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$  terhelés is szignifikáns mértékben kisebb volt. Azonban az arány a NTg állatokéhoz hasonló az SnPPIX-el kezelt állatok szívében, azaz a HO-1 segíthet a normál ionhomeosztázis fenntartásában, amely

elengedhetetlen a kardiomiociták túléléséhez valamint az egészséges szívműködéshez. Szintén nagymértékben hozzájárult a HO-1 overexpresszió az infarktusos terület csökkentéséhez, mivel a Tg szívekben 20 % körüli volt a szívizomelhalás, míg a NTg kontroll csoportban majd 40 %, ezzel szemben a megvizsgált HO-1 KO állatok szívében drámai, 50 % körüli volt az infarktusos terület kiterjedtsége. Kardioprotektív hatásban továbbá komoly szerepet játszik a HO-1 által közvetített antiaritmiás és ateroszklerózist csökkentő hatás is.

Számos kutatás támasztotta alá a növényi kivonatok HO-1 emelő hatásának következtében kialakuló szövetvédő hatást [227], ezt vizsgálataink is alátámasztották. Eredményeink alapján elmondható, hogy a meggy-magbél-kivonat kardioprotektív hatásaiban ez a fehérje fontos szerepet játszik. Jogosan merül fel az igény, miszerint ezt a fontos proteint terápiás célra is felhasználhatnánk, mivel számos betegség patológiai folyamatában érintett. A CO a kilélegzett levegőben mérhető, így koncentrációjának változása számos elváltozás markere lehet. A HO-1 működése során keletkező CO szintjének követése nyomán elképzelhető, hogy az enzimaktivitás is követhető lesz, ami egyes megbetegedések diagnosztizálásában nagy segítséget nyújthatna. A kívülről adagolt CO elképzelhető, hogy hatékony lehet bizonyos kórállapotok javítására, hiszen alacsony koncentrációban adagolva a tüdő diffúziós kapacitásának meghatározására használják ezt a mérgező gázt, emellett pedig ígéretes kísérletek zajlanak a szén-monoxid felszabadító molekulákkal is [147].

Eredményeink alapján jól látszik, hogy a HO-1/CO rendszer modulálása fontos szerepet tölthet be a kardiovaszkuláris megbetegedések patogenezisének befolyásolásában, illetve a manifeszt megbetegedések kezelésében.

## Összefoglalás

A kardiovaszkuláris betegségeket a statisztikai adatok halvány javulásának ellenére még mindig a Világ vezető halálteki tényezőiként tartjuk számon. A magyarországi mortalitási mutatószámok sajnos az EU átlaga fölött járnak, ezért a betegségek megelőzésére és a lehető legkorábbi diagnosztizálásra szükséges az erőforrásokat koncentrálni.

A sejt túlélésében segítséget nyújtó antioxidáns hősokk protein, a HO-1 számos megbetegedés mellett a kardiovaszkuláris rendszer betegségeiben is központi szereppel bír. Transzgén egér kísérleteinkben kiderítettük, hogy HO-1 overexpresszió hatására I/R-t követően az állatok jobb balkamra funkcióval bírnak.

Az elmúlt időszakban egy kimondatlanul is jelentős igény merült fel a szintetikus gyógyszerek mellett a természetes eredetű anyagokkal való gyógyításra, illetve a funkcionális élelmiszerekkel, étrendkiegészítőkkel történő betegség megelőzésre, különös tekintettel a kardiovaszkuláris megbetegedésekre. Az általunk kipróbált meggy-magból emelte a HO-1 szintjét a szívszövetben, ezáltal pedig kardioprotektív hatást közvetít.

## Summary

Despite a slight improvement on statistical data, cardiovascular diseases are still among the highest risk factors of mortality rates all over the world. Hungarian mortality indexes are far above than in the EU, therefore our resources should be focused on the prevention and diagnosis at the exact time.

HO-1, a cytoprotective, antioxidant heat shock protein plays a crucial role in the pathogenesis of several human disorders, especially cardiovascular diseases. Based on our experiments carried out on HO-1 transgenic mice model HO-1 overexpression leads the restoration of functioning state of left ventricles after I/R injury.

An unspoken but considerable call has appeared recently for treating diseases not only with synthetic, but natural compounds and to prevent disorders by functional foods and dietary supplements, especially in cardiovascular cases. Sour cherry seed extract experimented by our team induced the intracellular level of HO-1, therefore it can mediate cardioprotection.

## Irodalomjegyzék

### Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. WHO, W.H.O. *Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles*. 2012 [cited 2014 11.04.]; Available from: [http://www.who.int/nmh/countries/hun\\_en.pdf](http://www.who.int/nmh/countries/hun_en.pdf).
2. Farsang, C., ed. *A Hypertónia Kézikönyve 2002*, Medintel Könyvkiadó: Budapest.
3. Shah, K.A., S. Shurey, and C.J. Green, *Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study*. *Transplantation*, 1997. **64**(10): p. 1393-7.
4. Avkiran, M. and M.S. Marber, *Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(5): p. 747-53.
5. Hearse, D.J. and A. Tosaki, *Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart*. *Circ Res*, 1987. **60**(3): p. 375-83.
6. Kloner, R.A., et al., *Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop*. *Circulation*, 1998. **97**(18): p. 1848-67.
7. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* *J Clin Invest*, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
8. Ito, H., *No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006. **3**(9): p. 499-506.
9. Luo, A.K. and K.C. Wu, *Imaging microvascular obstruction and its clinical significance following acute myocardial infarction*. *Heart Fail Rev*, 2006. **11**(4): p. 305-12.
10. Heusch, G., et al., *Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside*. *Circulation*, 2009. **120**(18): p. 1822-36.
11. Kleinbongard, P., et al., *Vasoconstrictor potential of coronary aspirate from patients undergoing stenting of saphenous vein aortocoronary bypass grafts and its pharmacological attenuation*. *Circ Res*, 2011. **108**(3): p. 344-52.
12. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
13. Krijnen, P.A., et al., *Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction*. *J Clin Pathol*, 2002. **55**(11): p. 801-11.
14. Landmesser, U., et al., *Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation*. *Circulation*, 2000. **101**(19): p. 2264-70.
15. Steinbeck, M.J., A.U. Khan, and M.J. Karnovsky, *Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(21): p. 15649-54.
16. Kaul, N., et al., *Free radicals and the heart*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1993. **30**(2): p. 55-67.
17. Singal, P.K., et al., *Free radicals in health and disease*. *Mol Cell Biochem*, 1988. **84**(2): p. 121-2.
18. Ceconi, C., et al., *Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury*. *Am J Physiol*, 1991. **260**(4 Pt 2): p. H1057-61.
19. Harman, A.W. and M.J. Maxwell, *An evaluation of the role of calcium in cell injury*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995. **35**: p. 129-44.
20. Császár, A., *Atherosclerosis*. 2004, Budapest.

21. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(2): p. 748-55.
22. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme*. J Biol Chem, 1969. **244**(23): p. 6388-94.
23. Liu, Y. and P.R. Ortiz de Montellano, *Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5297-307.
24. Schacter, B.A., et al., *Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system*. J Biol Chem, 1972. **247**(11): p. 3601-7.
25. Beale, S., *Biosynthesis of Phycobilins*. Chem Rev, 1993(93): p. 785-802.
26. Wilks, A. and M.P. Schmitt, *Expression and characterization of a heme oxygenase (Hmu O) from Corynebacterium diphtheriae. Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 837-41.
27. Maines, M.D. and A. Kappas, *Enzymatic oxidation of cobalt protoporphyrin IX: observations on the mechanism of heme oxygenase action*. Biochemistry, 1977. **16**(3): p. 419-23.
28. Ortiz, P.R.D.M., *Heme oxygenase structure and mechanism*, in *The Porphyrin Handbook: The iron and cobalt pigments : biosynthesis, structure, and degradation*, K.M.S. Karl M. Kadish, Roger Guilard, Editor. 2003, Elsevier.
29. Liu, Y., et al., *Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 6909-17.
30. Matera, K.M., et al., *Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of alpha-hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6618-24.
31. Sano, S., et al., *On the mechanism of the chemical and enzymic oxygenations of alpha-oxyprotohemin IX to Fe.biliverdin IX alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(3): p. 531-5.
32. Sakamoto, H., et al., *Ferric alpha-hydroxyheme bound to heme oxygenase can be converted to verdoheme by dioxygen in the absence of added reducing equivalents*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18196-200.
33. Tenhunen, R., et al., *Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization*. Biochemistry, 1970. **9**(2): p. 298-303.
34. Macara, I.G., T.G. Hoy, and P.M. Harrison, *The formation of ferritin from apoferritin. Kinetics and mechanism of iron uptake*. Biochem J, 1972. **126**(1): p. 151-62.
35. Baranano, D.E., et al., *A mammalian iron ATPase induced by iron*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15166-73.
36. Ollinger, R., et al., *Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1030-9.
37. Maines, M.D., G.M. Trakshel, and R.K. Kutty, *Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible*. J Biol Chem, 1986. **261**(1): p. 411-9.
38. Keyse, S.M. and R.M. Tyrrell, *Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(1): p. 99-103.
39. Abraham, N.G. and A. Kappas, *Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(1): p. 79-127.

40. McCoubrey, W.K., Jr., T.J. Huang, and M.D. Maines, *Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3*. Eur J Biochem, 1997. **247**(2): p. 725-32.
41. Hayashi, S., et al., *Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene*. Gene, 2004. **336**(2): p. 241-50.
42. Rotenberg, M.O. and M.D. Maines, *Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2*. J Biol Chem, 1990. **265**(13): p. 7501-6.
43. Panchenko, M.V., H.W. Farber, and J.H. Korn, *Induction of heme oxygenase-1 by hypoxia and free radicals in human dermal fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(1): p. C92-C101.
44. Christou, H., et al., *Extracellular acidosis induces heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2647-52.
45. Alam, J., J. Cai, and A. Smith, *Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1001-9.
46. Alam, J., S. Camhi, and A.M. Choi, *Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11977-84.
47. Alam, J. and J.L. Cook, *How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(2): p. 166-74.
48. Alam, J., *Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 25049-56.
49. Camhi, S.L., et al., *Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(2): p. 226-34.
50. Inamdar, N.M., Y.I. Ahn, and J. Alam, *The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(3): p. 570-6.
51. Alam, J., et al., *Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27694-702.
52. Balogun, E., et al., *Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 3): p. 887-95.
53. Gong, P., et al., *Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) is mediated by the stress response elements and transcription factor Nrf2*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(2): p. 249-57.
54. Shibahara, S., *The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism*. Tohoku J Exp Med, 2003. **200**(4): p. 167-86.
55. Chen, X.L., et al., *Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 703-11.
56. Hill-Kapturczak, N., et al., *An internal enhancer regulates heme- and cadmium-mediated induction of human heme oxygenase-1*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(3): p. F515-23.

57. Hill-Kapturczak, N., et al., *A cis-acting region regulates oxidized lipid-mediated induction of the human heme oxygenase-1 gene in endothelial cells.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(8): p. 1416-22.
58. Kataoka, K., H. Handa, and M. Nishizawa, *Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds.* *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 34074-81.
59. Kitamuro, T., et al., *Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 9125-33.
60. Kronke, G., et al., *Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(51): p. 51006-14.
61. Takeda, K., et al., *Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene.* *J Biol Chem*, 1994. **269**(36): p. 22858-67.
62. Alam, J. and Z. Den, *Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene.* *J Biol Chem*, 1992. **267**(30): p. 21894-900.
63. Ogawa, K., et al., *Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1.* *EMBO J*, 2001. **20**(11): p. 2835-43.
64. Zenke-Kawasaki, Y., et al., *Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1.* *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(19): p. 6962-71.
65. Hira, S., et al., *Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure.* *IUBMB Life*, 2007. **59**(8-9): p. 542-51.
66. Ishikawa, M., S. Numazawa, and T. Yoshida, *Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1.* *Free Radic Biol Med*, 2005. **38**(10): p. 1344-52.
67. Hayes, J.D. and M. McMahon, *Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention.* *Cancer Lett*, 2001. **174**(2): p. 103-13.
68. Lee, P.J., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia.* *J Biol Chem*, 1997. **272**(9): p. 5375-81.
69. Lavrovsky, Y., et al., *Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(13): p. 5987-91.
70. Camhi, S.L., et al., *Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995. **13**(4): p. 387-98.
71. Ali, F., et al., *PPARdelta and PGC1alpha act cooperatively to induce haem oxygenase-1 and enhance vascular endothelial cell resistance to stress.* *Cardiovasc Res*, 2010. **85**(4): p. 701-10.
72. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin.* *J Lab Clin Med*, 1970. **75**(3): p. 410-21.
73. Shibahara, S., R.M. Muller, and H. Taguchi, *Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock.* *J Biol Chem*, 1987. **262**(27): p. 12889-92.
74. Keyse, S.M. and R.M. Tyrrell, *Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts.* *J Biol Chem*, 1987. **262**(30): p. 14821-5.
75. Taketani, S., et al., *The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase.* *FEBS Lett*, 1989. **245**(1-2): p. 173-6.

76. Keyse, S.M., et al., *Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(9): p. 4967-9.
77. Ohlmann, A., et al., *Regulation of heme oxygenase-1 gene expression by anoxia and reoxygenation in primary rat hepatocyte cultures*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(5): p. 584-9.
78. Borger, D.R. and D.A. Essig, *Induction of HSP 32 gene in hypoxic cardiomyocytes is attenuated by treatment with N-acetyl-L-cysteine*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H965-73.
79. Lee, P.J., et al., *AP-1 and STAT mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(1): p. L175-82.
80. Raju, V.S. and M.D. Maines, *Renal ischemia/reperfusion up-regulates heme oxygenase-1 (HSP32) expression and increases cGMP in rat heart*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **277**(3): p. 1814-22.
81. Maulik, N., H.S. Sharma, and D.K. Das, *Induction of the haem oxygenase gene expression during the reperfusion of ischemic rat myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(6): p. 1261-70.
82. Wagner, C.T., et al., *Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(3): p. 589-96.
83. De Keulenaer, G.W., et al., *Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase*. Circ Res, 1998. **82**(10): p. 1094-101.
84. Terry, C.M., et al., *Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H883-91.
85. Terry, C.M., et al., *TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca<sup>2+</sup>, and phospholipase A2 in endothelial cells*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1493-501.
86. Lee, T.S. and L.Y. Chau, *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 240-6.
87. Fukuda, Y. and S. Sassa, *Effect of interleukin-11 on the levels of mRNAs encoding heme oxygenase and haptoglobin in human HepG2 hepatoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(1): p. 297-302.
88. Ning, W., et al., *TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(5): p. L1094-102.
89. Rizzardini, M., et al., *Mechanisms of endotoxin-induced haem oxygenase mRNA accumulation in mouse liver: synergism by glutathione depletion and protection by N-acetylcysteine*. Biochem J, 1994. **304** ( Pt 2): p. 477-83.
90. Foresti, R., et al., *Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis*. Biochem J, 1999. **339** ( Pt 3): p. 729-36.
91. Bussolati, B., et al., *Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration*. Blood, 2004. **103**(3): p. 761-6.
92. Durante, W., K.J. Peyton, and A.I. Schafer, *Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2666-72.
93. Pomeranic, Y., et al., *Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells*. J Endocrinol, 2004. **180**(1): p. 113-24.

94. Lee, T.S., H.L. Tsai, and L.Y. Chau, *Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19325-30.
95. Alvarez-Maqueda, M., et al., *15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 21929-37.
96. Ishizaka, N. and K.K. Griendling, *Heme oxygenase-1 is regulated by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 1997. **29**(3): p. 790-5.
97. Ishizaka, N., et al., *Heme oxygenase-1 is upregulated in the rat heart in response to chronic administration of angiotensin II*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(2): p. H672-8.
98. Grosser, N., et al., *Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 956-60.
99. Lee, T.S., et al., *Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection*. Circulation, 2004. **110**(10): p. 1296-302.
100. Deng, Y.M., et al., *Probucol protects against smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1*. Circulation, 2004. **110**(13): p. 1855-60.
101. Motterlini, R., et al., *Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(8): p. 1303-12.
102. Scapagnini, G., et al., *Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers*. Mol Pharmacol, 2002. **61**(3): p. 554-61.
103. Chen, S.M., Y.G. Li, and D.M. Wang, *Study on changes of heme oxygenase-1 expression in patients with coronary heart disease*. Clin Cardiol, 2005. **28**(4): p. 197-201.
104. Sardana, M.K. and A. Kappas, *Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(8): p. 2464-8.
105. Drummond, G.S. and A. Kappas, *The cytochrome P-450-depleted animal: an experimental model for in vivo studies in chemical biology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(7): p. 2384-8.
106. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(2): p. 289-309.
107. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, *Singlet molecular oxygen ((1)O2): a possible effector of eukaryotic gene expression*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(9): p. 1520-34.
108. Redaelli, C.A., et al., *Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1082-92.
109. Otterbein, L.E., et al., *Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme*. Trends Immunol, 2003. **24**(8): p. 449-55.
110. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
111. Stocker, R. and E. Peterhans, *Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid*. Free Radic Res Commun, 1989. **6**(1): p. 57-66.
112. Nakamura, H., et al., *Inhibitory action of bilirubin on superoxide production by polymorphonuclear leukocytes*. Biol Neonate, 1987. **52**(5): p. 273-8.
113. Stocker, R., *Antioxidant activities of bile pigments*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(5): p. 841-9.

114. Kaur, H., et al., *Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species*. FEBS Lett, 2003. **543**(1-3): p. 113-9.
115. Mancuso, C., et al., *Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(12): p. 2355-63.
116. Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
117. Ennever, J.F., et al., *Rapid clearance of a structural isomer of bilirubin during phototherapy*. J Clin Invest, 1987. **79**(6): p. 1674-8.
118. Stoll, M.S., et al., *Preparation and properties of bilirubin photoisomers*. Biochem J, 1979. **183**(1): p. 139-46.
119. Onishi, S., et al., *Demonstration of a geometric isomer of bilirubin-IX alpha in the serum of a hyperbilirubinaemic newborn infant and the mechanism of jaundice phototherapy*. Biochem J, 1980. **190**(3): p. 533-6.
120. Mreihil, K., et al., *Early isomerization of bilirubin in phototherapy of neonatal jaundice*. Pediatr Res, 2010. **67**(6): p. 656-9.
121. Rodrigues, C.M., S. Sola, and D. Brites, *Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1186-95.
122. Ruiz-Gaspa, S., et al., *Ursodeoxycholic acid decreases bilirubin-induced osteoblast apoptosis*. Eur J Clin Invest, 2014. **44**(12): p. 1206-14.
123. Soares, M.P., et al., *Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1073-7.
124. Silva, G., et al., *The antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 in endothelial cells involves the degradation of p38 alpha MAPK isoform*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1894-903.
125. Brouard, S., et al., *Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1015-26.
126. Al-Owais, M.M., et al., *Carbon monoxide mediates the anti-apoptotic effects of heme oxygenase-1 in medulloblastoma DAOY cells via K<sup>+</sup> channel inhibition*. J Biol Chem, 2012. **287**(29): p. 24754-64.
127. Zhao, Y., et al., *Heme oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75927.
128. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 422-8.
129. Morse, D., et al., *Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 36993-8.
130. Sarady, J.K., et al., *Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(6): p. 739-45.
131. Woo, J., et al., *Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32)*. Transpl Immunol, 1998. **6**(2): p. 84-93.
132. Song, H., et al., *The carbon monoxide releasing molecule (CORM-3) inhibits expression of vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin independently of haem oxygenase-1 expression*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(5): p. 769-80.

133. Soares, M.P., et al., *Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3553-63.
134. Rucker, M., et al., *Reduction of inflammatory response in composite flap transfer by local stress conditioning-induced heat-shock protein 32*. Surgery, 2001. **129**(3): p. 292-301.
135. Hayashi, S., et al., *Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. 663-71.
136. Braun-Dullaeus, R.C., M.J. Mann, and V.J. Dzau, *Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease*. Circulation, 1998. **98**(1): p. 82-9.
137. Morita, T., et al., *Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32804-9.
138. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 183-90.
139. Duckles, H., et al., *Heme oxygenase-1 regulates cell proliferation via carbon monoxide-mediated inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channels*. Pflugers Arch, 2015. **467**(2): p. 415-27.
140. Lin, H. and J.J. McGrath, *Vasodilating effects of carbon monoxide*. Drug Chem Toxicol, 1988. **11**(4): p. 371-85.
141. Furchgott, R.F. and D. Jothianandan, *Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light*. Blood Vessels, 1991. **28**(1-3): p. 52-61.
142. Morita, T., et al., *Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1475-9.
143. Thorup, C., et al., *Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. F882-9.
144. Lindenblatt, N., et al., *Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(3): p. 601-6.
145. Johns, D.G., et al., *Heme-oxygenase induction inhibits arteriolar thrombosis in vivo: effect of the non-substrate inducer cobalt protoporphyrin*. Eur J Pharmacol, 2009. **606**(1-3): p. 109-14.
146. True, A.L., et al., *Heme oxygenase-1 deficiency accelerates formation of arterial thrombosis through oxidative damage to the endothelium, which is rescued by inhaled carbon monoxide*. Circ Res, 2007. **101**(9): p. 893-901.
147. Jozkowicz, A., et al., *Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(2): p. 155-62.
148. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(2): p. 229-40.
149. Kim, E.H., H.K. Na, and Y.J. Surh, *Upregulation of VEGF by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 via heme oxygenase-1 and ERK1/2 signaling in MCF-7 cells*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1090**: p. 375-84.
150. Bellner, L., et al., *Heme oxygenase-2 deletion causes endothelial cell activation marked by oxidative stress, inflammation, and angiogenesis*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(3): p. 925-32.

151. Faleo, G., et al., *Carbon monoxide ameliorates renal cold ischemia-reperfusion injury with an upregulation of vascular endothelial growth factor by activation of hypoxia-inducible factor*. *Transplantation*, 2008. **85**(12): p. 1833-40.
152. Pae, H.O., et al., *A molecular cascade showing nitric oxide-heme oxygenase-1-vascular endothelial growth factor-interleukin-8 sequence in human endothelial cells*. *Endocrinology*, 2005. **146**(5): p. 2229-38.
153. Cudmore, M., et al., *Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1*. *Circulation*, 2007. **115**(13): p. 1789-97.
154. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 583-650.
155. Raju, V.S., W.K. McCoubrey, Jr., and M.D. Maines, *Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1351**(1-2): p. 89-104.
156. Ishikawa, K., M. Sato, and T. Yoshida, *Expression of rat heme oxygenase in Escherichia coli as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes*. *Eur J Biochem*, 1991. **202**(1): p. 161-5.
157. Kim, H.P., et al., *Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells*. *FASEB J*, 2004. **18**(10): p. 1080-9.
158. Li Volti, G., et al., *Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **315**(2): p. 517-24.
159. Ma, N., et al., *Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina*. *J Neurocytol*, 2004. **33**(4): p. 407-15.
160. Gandini, N.A., et al., *Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas*. *Exp Mol Pathol*, 2012. **93**(2): p. 237-45.
161. Zayasu, K., et al., *Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **156**(4 Pt 1): p. 1140-3.
162. Horvath, I., et al., *Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress*. *Thorax*, 1998. **53**(8): p. 668-72.
163. Kitada, O., et al., *Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in a mouse model of asthma*. *Clin Exp Allergy*, 2001. **31**(9): p. 1470-7.
164. Christou, H., et al., *Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat*. *Circ Res*, 2000. **86**(12): p. 1224-9.
165. Minamino, T., et al., *Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8798-803.
166. Lee, P.J., et al., *Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **14**(6): p. 556-68.
167. Suttner, D.M., et al., *Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(3 Pt 1): p. L443-51.
168. Otterbein, L.E., et al., *Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(7): p. 1047-54.
169. Otterbein, L.E., L.L. Mantell, and A.M. Choi, *Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(4 Pt 1): p. L688-94.

170. Clayton, C.E., et al., *Inhaled carbon monoxide and hyperoxic lung injury in rats*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(4): p. L949-57.
171. Inoue, S., et al., *Transfer of heme oxygenase 1 cDNA by a replication-deficient adenovirus enhances interleukin 10 production from alveolar macrophages that attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(8): p. 967-79.
172. Maestrelli, P., et al., *Increased expression of heme oxygenase (HO)-1 in alveolar spaces and HO-2 in alveolar walls of smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1508-13.
173. Ohta, K., et al., *Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency*. Am J Kidney Dis, 2000. **35**(5): p. 863-70.
174. Nath, K.A., et al., *Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 267-70.
175. Smith, M.A., et al., *Ultrastructural localization of heme oxygenase-1 to the neurofibrillary pathology of Alzheimer disease*. Mol Chem Neuropathol, 1995. **24**(2-3): p. 227-30.
176. Mautes, A.E., et al., *Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in the contused spinal cord of the rat*. Brain Res, 1998. **795**(1-2): p. 17-24.
177. Chen, W., et al., *Expression of antioxidant protective proteins in the rat retina during prenatal and postnatal development*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(3): p. 744-51.
178. Matz, P.G., P.R. Weinstein, and F.R. Sharp, *Heme oxygenase-1 and heat shock protein 70 induction in glia and neurons throughout rat brain after experimental intracerebral hemorrhage*. Neurosurgery, 1997. **40**(1): p. 152-60; discussion 160-2.
179. Montecot, C., J. Seylaz, and E. Pinard, *Carbon monoxide regulates cerebral blood flow in epileptic seizures but not in hypercapnia*. Neuroreport, 1998. **9**(10): p. 2341-6.
180. Verma, A., et al., *Carbon monoxide: a putative neural messenger*. Science, 1993. **259**(5093): p. 381-4.
181. Sato, H., et al., *Expression of stress proteins heme oxygenase-1 and -2 in acute pancreatitis and pancreatic islet betaTC3 and acinar AR42J cells*. FEBS Lett, 1997. **405**(2): p. 219-23.
182. Donat, M.E., et al., *Heme oxygenase immunoreactive neurons in the rat intestine and their relationship to nitrergic neurons*. J Auton Nerv Syst, 1999. **77**(1): p. 4-12.
183. Suematsu, M., et al., *Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2431-7.
184. Suematsu, M. and Y. Ishimura, *The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 3-6.
185. Kyokane, T., et al., *Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1227-40.
186. Rensing, H., et al., *Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation*. Crit Care Med, 1999. **27**(12): p. 2766-75.
187. Levere, R.D., et al., *Elevated levels of heme oxygenase-1 activity and mRNA in peripheral blood adherent cells of acquired immunodeficiency syndrome patients*. Am J Hematol, 1993. **43**(1): p. 19-23.
188. Otterbein, L., et al., *Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 1): p. L268-75.

189. Downard, P.J., et al., *Heme oxygenase-dependent carbon monoxide production is a hepatic adaptive response to sepsis*. J Surg Res, 1997. **71**(1): p. 7-12.
190. VanUffelen, B.E., et al., *Carbon monoxide enhances human neutrophil migration in a cyclic GMP-dependent way*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(1): p. 21-6.
191. Mancuso, C., et al., *The role of carbon monoxide in the regulation of neuroendocrine function*. Neuroimmunomodulation, 1997. **4**(5-6): p. 225-9.
192. Kim, C.K. and C.L. Rivier, *Nitric oxide and carbon monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to physico-emotional stressors in rats*. Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 2244-53.
193. Henningsson, R., P. Alm, and I. Lundquist, *Occurrence and putative hormone regulatory function of a constitutive heme oxygenase in rat pancreatic islets*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. C703-9.
194. Baum, M., et al., *End-tidal carbon monoxide measurements in women with pregnancy-induced hypertension and preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(4): p. 900-3.
195. Acevedo, C.H. and A. Ahmed, *Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 949-55.
196. Lyall, F., et al., *Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 208-19.
197. Sato, K., et al., *Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4185-94.
198. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10919-24.
199. Hedlund, P., et al., *Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase*. J Urol, 2000. **164**(3 Pt 1): p. 868-75.
200. Wu, M.L., Y.C. Ho, and S.F. Yet, *A central role of heme oxygenase-1 in cardiovascular protection*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 1835-46.
201. Kaneda, H., et al., *Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1680-5.
202. Yet, S.F., et al., *Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice*. Circ Res, 2001. **89**(2): p. 168-73.
203. Vulapalli, S.R., et al., *Cardioselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(2): p. H688-94.
204. Clark, J.E., et al., *Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(2): p. H643-51.
205. Fujimoto, H., et al., *Carbon monoxide protects against cardiac ischemia--reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt--eNOS pathways*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(10): p. 1848-53.
206. Wang, G., et al., *Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart*. Circulation, 2010. **121**(17): p. 1912-25.
207. Libby, P., A.H. Lichtman, and G.K. Hansson, *Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1092-104.
208. Johnson, R.A., et al., *Heme oxygenase substrates acutely lower blood pressure in hypertensive rats*. Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 2): p. H1132-8.

209. Czibik, G., et al., *Heme oxygenase-1: an emerging therapeutic target to curb cardiac pathology*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(6): p. 450.
210. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
211. Tongers, J., et al., *Heme oxygenase-1 inhibition of MAP kinases, calcineurin/NFAT signaling, and hypertrophy in cardiac myocytes*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 545-52.
212. Brunt, K.R., et al., *Heme oxygenase-1 inhibits pro-oxidant induced hypertrophy in HL-1 cardiomyocytes*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(5): p. 582-94.
213. Hu, C.M., et al., *Heme oxygenase-1 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro and in vivo*. Circulation, 2004. **110**(3): p. 309-16.
214. Allwood, M.A., et al., *Heme oxygenase-1 overexpression exacerbates heart failure with aging and pressure overload but is protective against isoproterenol-induced cardiomyopathy in mice*. Cardiovasc Pathol, 2014. **23**(4): p. 231-7.
215. Suliman, H.B., et al., *The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3730-41.
216. Chainani-Wu, N., *Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa)*. J Altern Complement Med, 2003. **9**(1): p. 161-8.
217. Selvam, C., et al., *Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(7): p. 1793-7.
218. Menon, V.P. and A.R. Sudheer, *Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin*. Adv Exp Med Biol, 2007. **595**: p. 105-25.
219. Chen, J., et al., *Trichostatin A improves the anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells*. Pharmazie, 2006. **61**(8): p. 710-6.
220. Ma, J., et al., *Curcumin activates the p38MPAK-HSP25 pathway in vitro but fails to attenuate diabetic nephropathy in DBA2J mice despite urinary clearance documented by HPLC*. BMC Complement Altern Med, 2010. **10**: p. 67.
221. Berrougui, H., et al., *A new insight into resveratrol as an atheroprotective compound: inhibition of lipid peroxidation and enhancement of cholesterol efflux*. Atherosclerosis, 2009. **207**(2): p. 420-7.
222. Yang, Y., et al., *Inhibitory effects of resveratrol on platelet activation induced by thromboxane a(2) receptor agonist in human platelets*. Am J Chin Med, 2011. **39**(1): p. 145-59.
223. Guo, R., et al., *Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro*. Med Sci Monit Basic Res, 2014. **20**: p. 82-92.
224. Chan, A.Y., et al., *Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt*. J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 24194-201.
225. Mizutani, K., et al., *Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2000. **46**(2): p. 78-83.
226. Thirunavukkarasu, M., et al., *Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(5): p. 720-9.
227. Barbagallo, I., et al., *Potential therapeutic effects of natural heme oxygenase-1 inducers in cardiovascular diseases*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(5): p. 507-21.

228. Loke, W.M., et al., *Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 749-57.
229. Zheng, Y., et al., *Epigallocatechin-gallate stimulates NF-E2-related factor and heme oxygenase-1 via caveolin-1 displacement*. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(2): p. 163-8.
230. Lazze, M.C., et al., *Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells*. *Mol Nutr Food Res*, 2006. **50**(1): p. 44-51.
231. Bak, I., et al., *Isolation and analysis of bioactive constituents of sour cherry (*Prunus cerasus*) seed kernel: an emerging functional food*. *J Med Food*, 2010. **13**(4): p. 905-10.
232. Bak, I., et al., *Cardioprotective mechanisms of *Prunus cerasus* (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(3): p. H1329-36.
233. Araujo, J.A., et al., *Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse*. *J Immunol*, 2003. **171**(3): p. 1572-80.
234. Yamamoto, F., et al., *Cardioplegia and slow calcium-channel blockers. Studies with verapamil*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1983. **86**(2): p. 252-61.
235. Pellacani, A., et al., *Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1*. *Circ Res*, 1998. **83**(4): p. 396-403.
236. Schultz, J.E., et al., *Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2607-15.
237. Dickson, E.W., et al., *Naloxone blocks transferred preconditioning in isolated rabbit hearts*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(9): p. 1751-6.
238. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
239. Yoshida, T., S. Takahashi, and G. Kikuchi, *Partial purification and reconstitution of the heme oxygenase system from pig spleen microsomes*. *J Biochem*, 1974. **75**(5): p. 1187-91.
240. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
241. Cook, M.N., et al., *Heme oxygenase activity in the adult rat aorta and liver as measured by carbon monoxide formation*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1995. **73**(4): p. 515-8.
242. Tosaki, A., S. Balint, and L. Szekeres, *Protective effect of lidocaine against ischemia and reperfusion-induced arrhythmias and shifts of myocardial sodium, potassium, and calcium content*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1988. **12**(6): p. 621-8.
243. Pridjian, A.K., et al., *Developmental changes in reperfusion injury. A comparison of intracellular cation accumulation in the newborn, neonatal, and adult heart*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1987. **93**(3): p. 428-33.
244. Alto, L.E. and N.S. Dhalla, *Myocardial cation contents during induction of calcium paradox*. *Am J Physiol*, 1979. **237**(6): p. H713-9.
245. Szabo, M.E., et al., *Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. **45**(10): p. 3727-32.
246. Singal, P.K., et al., *The role of oxidative stress in the genesis of heart disease*. *Cardiovasc Res*, 1998. **40**(3): p. 426-32.

247. Juhasz, B., et al., *Cardioprotective effects of sour cherry seed extract (SCSE) on the hypercholesterolemic rabbit heart*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(39): p. 6896-905.
248. Gu, J., et al., *Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in lymphoma nude mice by heme oxygenase-1 induction*. *Cardiovasc Toxicol*, 2012. **12**(4): p. 341-9.
249. Jeon, W.K., H.Y. Hong, and B.C. Kim, *Genipin up-regulates heme oxygenase-1 via PI3-kinase-JNK1/2-Nrf2 signaling pathway to enhance the anti-inflammatory capacity in RAW264.7 macrophages*. *Arch Biochem Biophys*, 2011. **512**(2): p. 119-25.
250. Feng, J., et al., *PI3K and ERK/Nrf2 pathways are involved in oleanolic acid-induced heme oxygenase-1 expression in rat vascular smooth muscle cells*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(6): p. 1524-31.
251. Chen, J.S., et al., *Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression, an antioxidant-independent mechanism, contributes to anti-atherogenesis and vascular protective effects of Ginkgo biloba extract*. *Atherosclerosis*, 2011. **214**(2): p. 301-9.
252. Csonka, C., et al., *Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(1-2): p. 119-26.
253. Bak, I., et al., *The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(5): p. 639-48.
254. Bak, I., et al., *Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium*. *FASEB J*, 2003. **17**(14): p. 2133-5.
255. Du Toit, E.F., J. Meiring, and L.H. Opie, *Relation of cyclic nucleotide ratios to ischemic and reperfusion injury in nitric oxide-donor treated rat hearts*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001. **38**(4): p. 529-38.
256. Bak, I., et al., *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)*, 2005. **51**(5): p. 453-9.
257. Suliman, H.B., et al., *A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 2): p. 299-308.

## Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/152/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Czompa Attila  
Neptun kód: ZJFTHO  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10032869

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Czompa, A.**, Gyöngyösi, A., Czeglédi, A., Csépanyi, E., Bak, I., Haines, D.D., Tósaki, Á., Lekli, I.:  
Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: The role of heme oxygenase-1.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 64 (5), 412-419, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000132>  
IF:2.135
2. Juhász, B., Varga, B., **Czompa, A.**, Bak, I., Lekli, I., Gesztelyi, R., Zsuga, J., Kemény-Beke, Á.,  
Antal, M., Szendrei, L., Tósaki, Á.: Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1  
transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium.  
*J. Cell. Mol. Med.* 15 (9), 1973-1982, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01153.x>  
IF:4.125





---

További Közlemények

3. , Csépanyi, E., **Czompa, A.**, Haines, D., Lekli, I., Bakondi, E., Balla, G., Tósaki, Á., Bak, I.:  
Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model.  
*Pharmacol. Res. Article In Press*, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.021>  
IF:4.408 (2014)
4. Csiki, Z., Papp-Bata, Á., **Czompa, A.**, Nagy, A., Bak, I., Lekli, I., Jávor, A., Haines, D.D., Balla, G.,  
Tósaki, Á.: Orally Delivered Sour Cherry Seed Extract (SCSE) Affects Cardiovascular and  
Hematological Parameters in Humans.  
*Phytother. Res.* 29 (3), 444-449, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5273>  
IF:2.66 (2014)
5. Meyer, G., **Czompa, A.**, Reboul, C., Csépanyi, E., Czeglédi, A., Bak, I., Balla, G., Balla, J., Tósaki,  
Á., Lekli, I.: The Cellular Autophagy Markers Beclin-1 and LC3B-II are Increased during  
Reperfusion in Fibrillated Mouse Hearts.  
*Curr. Pharm. Des.* 19 (39), 6912-6918, 2013.  
IF:3.288
6. Bak, I., **Czompa, A.**, Csépanyi, E., Juhász, B., Kalantari, H., Najm, K., Aghel, N., Varga, B.,  
Haines, D.D., Tósaki, Á.: Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal  
photoprotection by sour cherry kernels.  
*Phytother. Res.* 25 (11), 1714-1720, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3580>  
IF:2.086
7. Haines, D.D., Varga, B., Bak, I., Juhász, B., Mahmoud, F.F., Kalantari, H., Gesztelyi, R., Lekli, I.,  
**Czompa, A.**, Tósaki, Á.: Summative interaction between astaxanthin, Ginkgo biloba extract  
(EGb761) and vitamin C in Suppression of respiratory inflammation: A comparison with  
ibuprofen.  
*Phytother. Res.* 25 (1), 128-136, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3160>  
IF:2.086





8. Bak, I., **Czompa, A.**, Juhász, B., Lekli, I., Tószaki, Á.: Reduction of reperfusion-induced ventricular fibrillation and infarct size via heme oxygenase-1 overexpression in isolated mouse hearts. *J. Cell. Mol. Med.* 14 (9), 2268-2272, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01142.x>  
IF:4.608

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,396**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,26**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.08.11.



## Tárgyszavak

Iszkémia/reperfúzió

Izolált dolgozó szív

Meggy mag kivonat

Apoptózis

Infarktusos terület

Ischemia/reperfusion

Isolated working heart

Sour cherry seed extract

Apoptosis

Infarct size

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban Prof. Dr. Tósaki Árpádnak, hogy a doktori éveket az általa vezetett tudományos műhelyben, a Gyógyszerhatástani Tanszéken úgy tölthettem el, hogy közben Ő minden feltételt biztosított számomra a kísérletek elvégzéséhez és a disszertációm elkészítéséhez.

Köszönöm továbbá Dr. Lekli Istvánnak, hogy a kezdetektől mellettem állt, és szakmai kérdésekben mindvégig segítséget nyújtott. Megtiszteltetés, hogy ez idő alatt munkakapcsolatunk barátsággá fejlődött és mindig számíthattam rá.

Köszönettel tartozom Dr. Bak Istvánnak, hogy sokszor aprónak tűnő, de fontos részletben segítséget nyújtott és tapasztalatait megosztotta velem és dr. Csépanyi Evelinnek, hogy már az egyetemi évek kezdetétől egy hajóban evezve nyújtott nekem sok esetben segítséget. Gyöngyösi Alexandrának köszönöm a kitartását, valamint dr. Szőke Kittinek, Czeglédi Andrásnak, Irinyi-Barta Tündének, Berczi-Kun Enikőnek és Füzesi Tibornak, hogy az utóbbi években velük dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Juhász Bélának és a Gyógyszerhatástani Tanszék további munkatársainak és hallgatóinak, akik közül sokan segítettek kisebb- nagyobb ügyekben, beleértve a volt munkatársakat is.

Végül köszönöm legfontosabb támaszomnak, Mariettának a szeretetét és a sok-sok türelmet, amellyel irántam viseltetik, és köszönöm a Családom minden tagjának az odaadó gondoskodást, támogatást.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg, valamint a Richter Gedeon Centenárium Alapítvány, OTKA K-104017, PD-11794, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0007, TÁMOP-4.2.6-15/1-2015-0001 támogatásával valósult meg.



## Függelék

A dolgozatban bemutatott társszerzői eredmények felsorolása:

- 8. ábra B panel
- 9. ábra A. és B. panel (PCR és Western blot eredmények)
- 2. és 3. táblázatban bemutatott eredmények
- 11. ábra B. panel