

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

**AZ OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA GÉNEK SZEREPE ÉS JELENTŐSÉGE A
MIOKARDIÁLIS ISZKÉMIA/REPERFÚZIÓ SORÁN**

Irta:

TURÓCZI TIBOR

Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád

Programvezető: Prof. Dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR

GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK

DEBRECEN

2004

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	1.
2. CÉLKITŰZÉS	5.
3. A HFE mutáció és a diéta vastartalma közötti korreláció	6.
3.1 Anyagok és módszerek I	7.
3.2 Eredmények I	10.
4. A thioredoxin (Trx) védő hatása az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális károsodásokkal szemben.	18.
4.1 Anyagok és módszerek II.	19.
4.2 Eredmények II	23.
5. STAT5A és STAT6 szignáltranszdukciós molekulák szerepe az Iszkémiás prekondícióban.	31.
5.1 Anyagok és módszerek III.	32.
5.2 Eredmények III.	35.
6. Mitokondriális gének (COXB III, ATP5B) és a Hemoxigenáz-I (HO-1) szerepe a ventrikuláris arrhythmiákkal szemben.	
6.1 Anyagok és módszerek IV.	42.
6.1 Eredmények IV.	45.
7. DISZKUSSZIÓ	
6.1 Diszkusszió I	54.
6.2 Diszkusszió II.	56.
6.3 Diszkusszió III	58.
6.4 Diszkusszió IV.	59.
6. ÖSSZEFOGLALÁS	61.
7. SUMMARY	63.
8. IRODALOM JEGYZÉK	65.

RÖVIDÍTÉSEK

AP-1:	Activating protein-1
AF:	Aorta flow
ATPS6:	ATP-áz 6-s alegység
CF:	Koronária flow
CDDP:	Cis-diammine-dichloroplatinum
CO:	Szén monoxid
COXB III:	Citokrom oxidáz B 3-as alegység
dp/dt:	Szív kontraktilitás
GADPH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSHPx-1:	Glutathione peroxidase
HFE:	Hereditary haemokromatózis
HO-1:	Hemoxygenáz-1
KHB:	Krebs-Henselit buffer
HTLV-I:	Human-T cell leukemia virus
ISA/RE:	Iszkémia/reperfúzió
KO:	Knock out
LVDP:	Bal kamrai „develop” nyomás
LVEDP:	Bal kamrai vég-diasztolés nyomás
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
MDA:	Malonaldehyde
NF-κβ:	Nuclear faktor-κβ
NO:	Nitrogén monoxid
PK:	Prekondíció
PPI:	4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)-pyrazolo-3, 4-D-Pyrimidine
ROS:	Reaktív oxigén szabad gyökök
SOD:	Szuperoxid dismutase
STAT5A/STAT6:	Szignál transzdukciós és aktivátor faktor
SZF:	Szívfrekvencia
TTC:	Triphenyl-Tetrazolium-Clorid
Trx:	Thioredoxin
TUNEL:	Terminal-Deoxynucleotidil-Transferase-Deoxyuridine Nick end Labeling
VF:	Kamrai fibrilláció
(+/+):	Homozigóta vad típus
(+/-):	Heterozigóta
(-/-):	Knock out

AZ OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA GÉNEK SZEREPE ÉS JELENTŐSÉGE A MIOKARDIÁLIS ISZKÉMIA/REPERFÚZIÓ SORÁN

Bevezetés:

A szív- és érrendszer kórfolyamatai a világ valamennyi fejlett országában a leggyakoribb megbetegedések, illetve a vezető halálokok közé tartoznak. Magyarországon a halálozások több mint a fele **a keringési betegségeknek** tulajdonítható, melyből a koszorúér-szklerózisa és az elzáródása legfőbb halálok. Amíg a nyugati országokban, a táplálkozási szokásokban bekövetkezett változások, a testmozgás és a korszerű gyógyszeres kezelés hatására a keringési betegségek (koszorúér-betegség, agyérrendszeri történés, perifériás érbetegség, illetve aorta betegség együttevén) mortalitása 1970 óta 20-30 %-kal csökkent, addig Magyarországon a keringési betegségek miatt létrejött halálozás az 1990-es évekig nőtt, majd lassú csökkenése indult meg. Az új évezred kezdetén a keringési rendszer betegségei miatti halálozás Magyarországon duplája az EU-átlagnak, ezen belül a 65 éven aluli lakosság körében a halálozás háromszorosa a megfelelő EU-átlagnak.

	Halálozások arányszám (százezer főre)							
	1949	1960	1970	1980	1990	2000	2001	2002
Fertőző betegségek	128	45	27	14	9	7	6	6
Daganatok	132	174	219	261	301	336	331	330
Keringési rendszer betegségei	305	453	622	718	737	687	662	668
Emésztő- rendszer betegségei	64	36	44	66	87	100	94	90
Légzőrendszer betegségei	122	104	57	94	64	52	43	46
Külső okok	60	60	92	115	128	95	93	94
Egyéb halálokok	333	144	103	90	79	76	69	74
Összesen	1 143	1 017	1 163	1 357	1 405	1 353	1 297	1 308

A halálozások és okaik magyarországi eloszlása 2004-ben.

Az iszkémiás szívbetegségek előfordulása és nagy számú megjelenése napjainkban mindennapos jelenség, emiatt fontos azok hátterében zajló molekuláris és patológiás folyamatok megismerése. A statisztikai is mutatja, hogy a miokardiális infarktus okozta halálozás egyre gyakoribb problémát jelent a lakosság körében, mind végzetes kimenetele illetve a túlélés után jelentkező életet veszélyeztető vezetési zavarok megjelenése miatt.

A szívizom iszkémiája, mely a miokardium oxigén hiányos állapotát, továbbá a reperfúzió, melyre a koronária mikrocirkuláció újbóli megindulását jelenti az utóbb időben kiemelkedő szereppel bír a kardiovaszkuláris kutatások területén. A jelenségnek kitüntetett szerepe van szívsebészeti beavatkozások alkalmával, amikor műtét során a szív anoxiás inzultusnak van kitéve. Az anoxiás periódus elleni miokardiális tolerancia jelentősége emiatt fontos, ugyanis extrakorporális keringés alkalmazása során jelentkező hosszú oxigén hiányos állapotok és azt követő reperfúzió negatívan befolyásolják a későbbi kardiális perctérfogatot, teljesítményt. Klinikai gyakorlat szempontjából e jelenségnek fontos szerepe van thrombolitikus kezelés és koronária bypass és plasztikai műtétek eseteiben. Az utóbbi a károsodott koronária funkció rekonstrukcióját jelenti, ahol is mesterséges anasztomózisok léthozásával igyekeznek a szívet ellátó koszorúserek szűkületét vagy elzáródását megszüntetni.

Az iszkémia/reperfúzió nagymértékben hozzájárul a fiziológiás iónegyensúly megváltozásához, illetve a folyamat során képződő toxikus szabadgyökök megjelenéséhez. Ez utóbbi a mitokondrium membrán struktúrájának károsodása következtében generálódhat, mikor a belső membránon elhelyezkedő elektron-transzport lánc „elektront veszít” és az a molekuláris O_2 -el lép reakcióba. A szabadgyökök kialakulása, pedig olyan molekuláris folyamatok indukálásához vezet (makrofág migráció az infarktusz területre, illetve komplement rendszer aktivációja) ami újabb gyökök (H_2O_2 , $HO^\cdot$, $ONOO^-$) képződését eredményezi. A szabadgyök molekulák kémiai struktúrájuk szempontjából fontosak mivel párosítatlan elektronnal rendelkeznek, emiatt rendkívül reakcióképesek a különféle biológiai struktúrákkal. Ez utóbbi tulajdonságuk teszik őket a figyelem középpontjába, az utóbbi két évtizedben. Az iszkémia során jelentkező és képződő szabadgyökök ellen a természetes antioxidáns enzimek jelentik a védővonalat (SOD, kataláz, peroxidáz, glutathion reduktáz).

A szabadgyökök képződésének többféle lehetősége van az iszkémia/reflow során. Kiváltható a kóros folyamat a leukocitáknak az iszkémiás területre történő „migrációjával” valamint az iszkémiás szívbetegségeket kísérő emelkedett plazmaszintű katecholaminok oxidációjával. A táplálékkal bevitt vas is kiemelt jelentőséggel bír a szabadgyökök generálásában, amely Fe^{2+} által indított Fenton és Haber-Weiss reakciókban nyilvánul meg. Ezek relevanciája olyan kórfolyamatok esetében lényeges, melyekben az úgynevezett vas-„overload” jelenség érvényesül (haemokromatózis, haemosiderózis). Az iszkémiás állapotok esetében szinte minden egyes alkalommal megfigyelhető az endotheliális diszfunkció, mely fiziológiás regulátorként funkcionál a lokális keringésben. Az általa

szabályozott élettani folyamatok súlyos zavara kezdődik az iszkémiát követő „reflow” során magába foglalva az elégtelen NO szintézist, és fokozott ROS termelést.

Az oxigén és a fiziológiás körülmények között a szívizom működéséhez szükséges szubsztrátok hiánya (szénhidrátok: glükóz, fehérjék, zsírsavak) az, amely infarktust eredményező koronária okklúzió következtében jön létre, megváltoztatja a miokardium fiziológiai állapotát. A folyamatok energiaszegény körülményeket hoznak létre, hiszen károsodik a mitokondriális oxidatív foszforiláció mellyel, együtt jár az ATP szintézis intenzitásának csökkenése. A citokróm c mitokondriális membránból történő felszabadulása a légzési lánc megszakadását és az ezt követő oxidatív foszforiláció hatékonyságának csökkenését idézi elő. Az utóbbi végett az energia igényes folyamatok súlyos zavara figyelhető meg. Az ADP, mely az energiaforrást biztosító ATP prekursora, pedig bonyolult molekuláris folyamatokon keresztül a xantin oxidáz aktivációjával további szabadgyökök képződését eredményezi. Az energiát felhasználó ionpumpák funkcionális zavara miatt az intracelluláris ionháztartás felborulása jön létre, aminek következménye az $[Ca^{2+}]_i$ gyors emelkedése. A Ca^{2+} központi szerepet játszik a miokardium kontrakciójában és az ingerületvezetés folyamataiban, pedig proteázokat aktiválva súlyos sejtkárosító hatásokat eredményez. Az emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ az egyik legfontosabb faktora az iszkémiás állapot után kialakuló súlyos életet veszélyeztető és eredménnyel járó kamrafibrillációnak és egyéb vezetési zavaroknak. A hypoxiás állapotok ioneqyensúlyt zavaró hatása az intracelluláris pH savas irányba történő elmozdulását eredményezi, mely az Ebert-féle vonalakon elhelyezkedő „gap junctions”-t zárja ezzel rontva a kontraktilitás hatásfokát. Az iszkémiát követő molekuláris és strukturális folyamatok következményeként kialakul az apoptótikus és a nekrotikus sejthalál. Az előbbi indukciójában, számos faktor mellett a TNF-faktor és Fas-ligand, valamint a mitokondriális citokróm „c” vesz részt, aktiválva a kaszpáz 3 nevű enzimet, mint végső effektor elemét az apoptózisnak. Az apoptózist mint fiziológia sejthalált lehet determinálni, melynek nagy szerepet tulajdonítanak a „reflow” utáni állapotokat követő kardiomyociták károsodásában illetve elhalásában. Folyamata genetikusan determinált, gének által regulált, és a géntermékek (bcl-2, bax, bak) expressziós aránya dönti el, hogy a folyamat az elhalás illetve a túlélés irányban végződik.

Az említett kóros molekuláris folyamatok ellen hatásos eszköz lehet a folyamatos ún. graduális valamint az iszkémiás és hypoxiás reperfüzió. Ezek a folyamatok bizonyos protektív gének expressziójával képesek kivédeni a „reflow” okozta hirtelen energia-felszabadulást és annak káros következményeit. Bizonyos antioxidáns sajátossággal rendelkező enzimek, mint a SOD, a kataláz valamint E, és C-vitamin származékok

alkalmazása hatásos lehet a szabadgyökök okozta funkcionális károsodások ellen. Farmakológiai intervenciót tekintve a Ca^{2+} csatorna blokkolók és az angiotenzin-konvertáz enzim gátlók mutathatnak hatékonyságot ezen folyamatok kezelésében. Az előbbi a kedvező értágító tulajdonságaival valamint az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ homeosztázisra kifejtett hatásával lehet eredményes eszköz a következményes életet veszélyeztető kamrai vezetési zavarokkal szemben. Pozitív, előnyös hatása van a szív energiaforgalmára, mivel csökkenti az energiafelhasználást, mérsékli a végdiasztolés nyomást, mely a miokardiális dilatáció legfőbb paramétere. Az ACE gátlók bizonyos képviselői thiol-csoportot hordozó tulajdonságuk miatt kedvezőek az ilyen típusú károsodásokkal szemben. A nem szteroid típusú gyulladásgátló gyógyszerek jó eredménnyel alkalmazhatók e kórfolyamatok kezelésében, mivel gátló hatással bírnak az cyclo-oxigenáz és a lipoxigenáz indukálta mediátor szintézisre, melyek szintén szabadgyökök generálását eredményezik.

A Diabetes mellitus gyakran kapcsolatban van, egyéb károsodások mellett (pl. retinopathia), kardiovaszkuláris komplikációkkal, mint pl. koronária artéria szűkülettel, valamint diabetikus cardiomiopátiával. A diabéteszes miokardiumban a sarcolemmális ion transzport különböző rendellenességei tapasztalhatóak, mely csökkent ATP szintézisen és elektron transzfer lánc aktivitáson keresztül redukált ATP függő Ca^{2+} transzportban és Ca^{2+} szabályozta ATPáz aktivitásban nyilvánul meg. Ebből eredően bizonyos mitokondriális gének [pl. citokróm oxidáz B III alegység (COXBIII), és az ATPáz 6 alegység (ATPS6)] expressziója hatással lehet különböző ioncsatornák és ionpumpák funkciójára, így központi szerepet játszhat az arrhythmogenesisben az iszkémiás/reperfundált szívizomban, mivel közismert az a tény, hogy az arrhythmikiák kialakulásáért többek között az ionháztartás felborulása a felelős. A humán és más emlős sejtek, szövetek, szervek a csökkent oxigén ellátásra fiziológiailag fontos gének, proteinek, enzimek expressziójával válaszolnak. A közelmúltban egy új enzimrendszer is a kutatások előterébe került: a Tenhunen és mtsai által azonosított mikroszómális hemoxigenáz (HO), mely a hem oxidatív lebontását katalizálja. A folyamat során az enzim oxigén és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfiringyűrűjének α -metin hídját, amely így nyíltláncú biliverdinné alakul, s eközben felszabadul a vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid (CO) keletkezik. A biliverdint a biliverdin reduktáz bilirubinná alakítja. Expresszióját indukálhatják nehézfém ionok, olyan stimulusok és anyagok, melyek oxidatív károsodást okoznak, pl. hő-sokk, UV sugárzás, hyperoxia, hypoxia és iszkémia is. Korábbi eredményeink arra engednek következtetni, hogy a kamrafibrilláció és az endogén CO termelés között szoros összefüggés van.

CÉLKITŰZÉS

1. A dolgozat első részében összefüggést kerestünk a diéta vastartalma és az HFE mutáció (autoszómális, recesszív) között, mely hatással lehet infarktusos terület nagyságára, az apoptotikus sejtek számának változására és a miokardium funkcionális paramétereinek időbeli lefolyására. HFE KO és vad típusú egerek különböző vastartalmú speciális állati takarmány etetésével modelleztük a haemokromatózist. A kísérlet második részében a redox-rendszer komponenseit elsősorban az antioxidáns enzimek változását vizsgáltuk, kerestük a választ arra, hogy ezek aktivitása hogyan reagál a hosszan tartó vasterápia következtében. A következményes szabadgyök indukálta membránkárosító folyamatok elemzését HPLC-I vizsgáltuk, és meghatároztuk a lipidperoxidáció hatásfokát, mely az oxidatív károsodás egyik fő markere.
2. A doktori értekezés második része a thioredoxin nevű redox-protein kardioprotektív hatásának elemzésével és feltárásával foglalkozik. Thioredoxin (Trx) transzgenikus és vad típusú egerek használatával bizonyítottuk a protein előnyös hatását az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális károsodásokkal szemben vizsgálva az apoptózis mértékét illetve az infarktusos terület nagyságát, továbbá a szív funkciókat. CDDP alkalmazásával, ami egy daganat terápiában használatos farmakon megpróbáltuk elemezni a thioredoxin okozta előnyös hatások felfüggesztését patkányszív preparátumon végzett kísérleteinkben.
3. A tanulmány utolsó részében a STAT5A és STAT6 szignáltranszdukciós molekulák iszkémiás prekondícióban vélt szerepének meghatározását tűztük ki. STAT5A és STAT6 „knock out” és vad típusú egérszíveket iszkémiás inzultusnak kitéve vizsgáltuk a szív működését jellemző legfőbb kardiális paramétereket. Sprague-Dawley patkányok kísérletben való alkalmazásával és foszforiláz inhibitorok adásával célul tűztük ki, hogy vajon a STAT5A illetve STAT6 rendelkezik tényleges szereppel az iszkémiás prekondíció molekuláris folyamatában.
4. Molekuláris biológiai technikák segítségével vizsgáltuk az egyes mitokondriális gének [(COXBIII és ATP5B) diabeteszes és nem-diabeteszes szívekben], valamint a hemoxigenáz-1 (HO-1) expresszióját és a kamrafibrilláció kialakulásában játszott lehetséges szerepüket, és szívfunkciókra kifejtett hatásukat.

A HFE mutáció és a diéta vastartalma közötti korreláció

Számos szívbetegség előfordulása és prognózisa szoros korrelációt mutat a szabadgyökök indukálta kóros folyamatok kialakulásával. A haemokromatózis egy autoszomális recesszív megbetegedés, amelyre jellemző a nem heme-hez kötött vas depozíció a parenchymás szervekben, mint pl. szív, máj, vese (1;2). A folyamatért felelős az HFE gén, amely szerkezetileg hasonlít a MHC-I csoportba tartozó fehérjéhez, génlokalizációját tekintve a 6 kromoszóma rövid karján helyezkedik el (3;4;7). Expresszióját illetően a vékonybél el nem szarusodó laphámjaiban található és a $\beta 2$ microglobulinnal képez szerkezeti egységet, fontos szerepet betöltve az intesztinális vastraszport folyamatában. Az HFE gén mutációja, mely elsősorban a DNS-t alkotó bázis cseréjéből adódik, kétféle lehet: 1. guanin→adenin csere a 875-s helyzetű nukleotidon, amely egy tyrozin→cisztein szubsztitúciót eredményez a 282-es helyzetű aminosavon, 2. citozin→guanin csere→aszpartát→hisztidin aminosav csere a 63-s aminosavon. Ez utóbbi mutációból eredő HFE mutáció a β -thalasszémiával történő együttes előfordulása eredményez egy súlyosabb vas depozíciót. Az így létrejött mutációk a vastraszport teljes zavarát és fokozott vas depozíciót eredményezhet a szívben, mely megfelelő kezelés hiányában fibrózist és az előbbi okból kifolyólag vezetési zavarokat idézhet elő, hiszen megváltoztatja az ingerületvezetésben résztvevő struktúrák szerkezetét (12). A vas transzportot fiziológiás körülmények között szigorúan regulált, és szabályozásában az élettani folyamatok Fe^{2+} -igénye, illetve vasraktárak (lép, máj, enterocyták, csontvelő) telítettsége játszik fontos szerepet. Ez utóbbi folyamatban, a szérumban transferrinhez kötött vas szaturációnak van szerepe, ami mint szignálként funkcionál az enterocyták számára. Ez az információ, pedig a HFE gén által kódolt génterméken keresztül közvetítődik az enterocyták számára, amelyek a szervezet szükségleteinek megfelelően „migrációt” végeznek az apikális felszín felé. E folyamat tehát a vékonybelet alkotó bélhámsejtek differenciálódásának szabályozásával regulálják a vastraszportot, kiegészülve bizonyos kation-carrierek (divalent-metál transzporter) expressziójának módosulásával. Számos egyéb enterocytában lokalizált carrier fehérje (ferroportin1) és redox enzim (ferric reduktáz) „overexpresszióját” dokumentálták korábbi kísérleti megfigyelések HFE mutáció következtében igazolva a regulálatlan vas abszorpciót (19;26). Mindezek a zavarok egy fokozott Fe^{2+} -„overload”-hoz vezetnek, amely Fenton reakción keresztül toxikus szabad gyökök termelődését

indukálják (5;6;18;20). A folyamatok hosszú távon szívgyengeség kialakulását eredményezhetik abban az esetben, amikor a beteg nem részesül megfelelő terápiában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK I.

A HFE „knock out” egerek létrehozása:

A génmanipulált egerek generálása az HFE gén célzott „diszrupciójával” valósult meg. A HFE mRNA Northern blot analízis a HFE „knock out” egerekből a teljes messenger RNS hiányát erősítette meg. A kísérleteink végrehajtásához az állatokat 4 csoportra osztottuk. A HFE „knock out” és vad típusú egyedek (utóbbi C57 vonalból származtak) két féle diétát kaptak 4 héttel születésüket követően, amelyek 30 és 300 ppm vassal voltak kiegészítve (8). A vas terápia, a diéta megkezdését követő 3. hónapig tartott, majd az állatok a kísérleti tervnek megfelelően lettek felhasználva.

A dolgozó egérszív preparátum:

Valamennyi állat a kísérlet során megfelelő „humánus” bánásmódban részesült a Laboratóriumi Állatok Kísérleti Felhasználására vonatkozó előírások szerint. Az állatok anesztéziáját 200 mg/kg sodium pentobarbitállal végeztük intraperitoneálisan, heparinnal (500 IU/kg testsúly) kiegészítve. A sebészeti beavatkozás után az állatok szívet kimetszettük, azt hideg perfúziós oldatba helyeztük, majd 2 percen belül az aortát kanuláltuk, és szíveket retrográd módon perfundáltuk Langerndorff módon 60 Hgmm perfúziós nyomáson. A perfúzióra egy módosított Krebs-Henseleit bikarbonát oldatot használtunk, amely összetétele hasonló a vér elektrolit-komponenseinek arányához (118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO₄, 25 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L Glükóz, és 1.7 mmol/L CaCl₂). Az oldatot az egész kísérlet időtartama alatt 95% O₂ és 5% CO₂-t tartalmazó gázeleggyel telítettük biztosítva a szövetek számára szükséges optimális O₂ mennyiséget, valamint a pH konstans fenntartásához nélkülözhetetlen CO₂-t.

Az oldatot egy 5 mm porusú filteren keresztül folyamatosan áramoltattuk a perfúzió alatt, távoltartva ezzel az olyan apró komponenseket, amelyek elzárhatják a dolgozó szívrendszer kis átmérőjű koronáriáit. A konstans hőmérséklet biztosítása céljából az oldatot az egész kísérlet időszaka alatt 37 C°-n termosztáltuk. A 10 perc retrográd perfúzió alatt a bal pitvart kanuláltuk a vena pulmonalison keresztül, majd ezt követően a szíveket ortográd módon perfundáltuk. Az ortográd perfúzió során a konstans hőmérsékletű oldat a kanulált bal pitvarba jutott 1 KPa-nak megfelelő nyomással (preload), majd onnan a pitvar kontrakció hatására a bal kamrába. A bal kamra spontán összehúzódásával a KHB oldat

továbbítódott az aorta kanülön keresztül egy olyan folyadékoszlopba, amelynek nyomása 5 KPa-l (afterload) volt egyenértékű.

A kontroll szívfunkciókat, szívfrekvenciát, aorta és koronária flow-t, bal kamrai develop és bal kamrai végdiasztolés nyomást, valamint a kontraktilitási paramétert (dp/dt) mértük és regisztráltuk az aerob perfúzió során egy erre megfelelő softwear (Micromed) segítségével. Az aorta flow mérése esetén flowmétert alkalmaztunk, a koronária flowt pedig a szívből lecsöpögő oldat mennyiségével határoztuk meg. Ezt követően az ortográd perfúziót megszüntettük, és a szíveket 30 perc globál iszkémiának vetettük alá. Az iszkémiát befejezve, 2 óráig reperfundáltuk a szíveket ortográd módon mérve a funkciókat a repéfúzió 15., 30., 60., és 120 perceiben. A reperfúziót követően a szíveket eltávolítottuk a készülékről, majd a pitvarokat lemeteszve, a kamrákat meghagyva azokat 10% pufferolt formalinba helyeztük. Az infarktusos terület meghatározása céljából a szíveket 10 % TTC (Triphenyl-Tetrazolium-Clorid) oldattal perfundáltattuk 10 percig 37 C°-on. A szövetek másik csoportját paraffinba ágyaztuk és 1 mm-es vastagságú harántmetszeteket készítettük, melyekből TUNEL festéssel az apoptózist mértékét határoztunk meg.

A MDA, a szöveti vastartalom és az antioxidáns enzimek meghatározása:

A szövetek nem hemoglobinhoz kötött vastartalmának meghatározásához a szíveket 3 mol/l HCl és 10% triclórecetsav elegyével 24 órán keresztül 65 C°-on kezeltük, majd 500 ml savas extraktumhoz 1.6 ml bathophenanthroline chromogén reagenst adtunk és az abszorbanciát 535 nm-en mértük Beckman DU-100000 spectrophotométerrel (10). Az MDA koncentrációt HPLC segítségével határoztuk meg. Az antioxidáns enzimek mennyiségét (szuperoxid diszmutáz, kataláz, és glutation-peroxidáz) hagyományos enzim „assay” módszerrel végeztük.

Az apoptótikus sejtek detektálása:

Az apoptótikus sejtek számát TUNEL módszer segítségével határoztuk meg (11;22). A festés során anti-miokardiális nehéz myozin lánc ellen termeltetett egér-antitestet használtunk, melyhez TRIC- konjugált, nyúlban termeltetett egér antitestet adtunk (1 : 200 hígításban). Az infarktusos terület meghatározását TTC módszer alkalmazásával végeztünk, majd az 1 mm-es vastagságú haránt metszeteket NIH Image 1. 6. 1 nevű képkalkoló és analizáló softwear segítségével értékeltük.

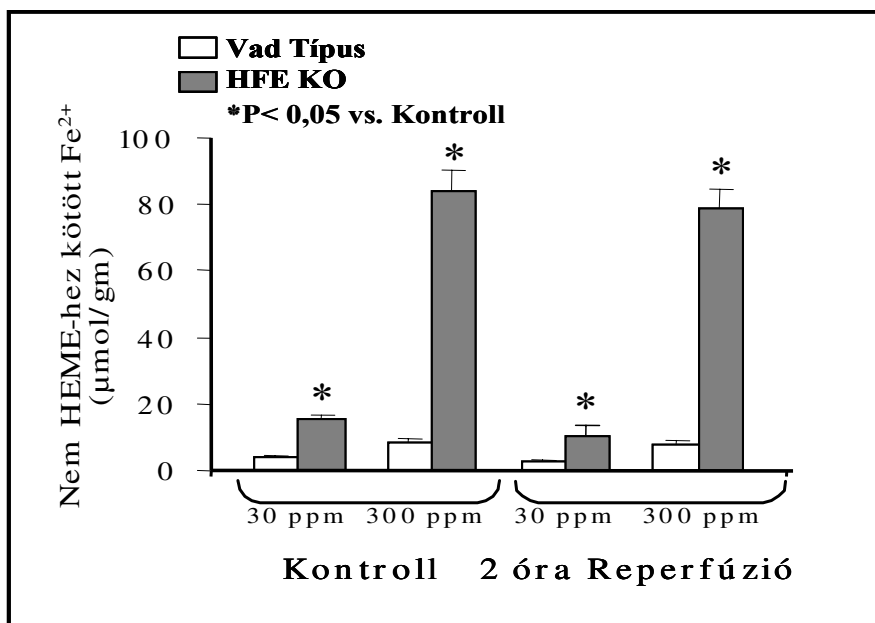
Statisztikai:

A szívfunkciós paramétereket és az MDA tartalmát valamint az infarktusos terület mérését a számtani átlag és az átlagtól való eltérés hibája alapján számítottuk ki. Az adatok közlésekor a különbségek megállapítására ANOVA variancia analízist majd Scheffe-tesztet alkalmaztunk a statisztikai szignifikancia elemzésére. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $*p < 0,05$.

EREDMÉNYEK I.

I. A szövetek nem heme-hez kötött vastartalma:

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a HFE KO egerek nem heme-hez kötött vastartalma nagyságrendekkel magasabb volt, mint a vad típusú egerek szívszövetében. Statisztikai szempontból az HFE KO mindkét csoportja (30 ppm illetve 300 ppm) szignifikánsan magas vastartalmat mutatott a kontroll csoportok értékeihez képest. Elsősorban a 300 ppm HFE KO egerek miokardiális szövete igen magas eltérést mutatott a vastartalomra vonatkozóan. Ugyanakkor nem figyeltünk meg lényegesen eltérő különbséget a kísérleti csoportok esetében, az iszkémiát követő reperfúzió során az alapértékekhez viszonyítva.

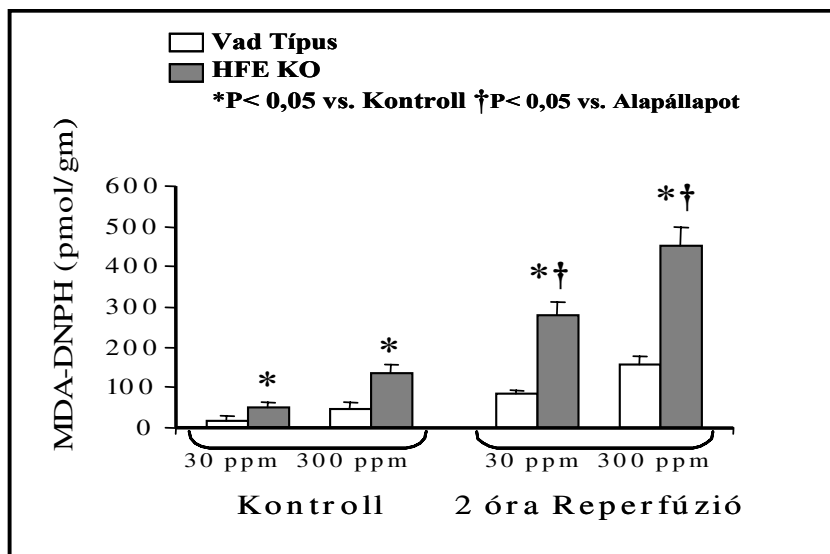


1. ábra A vad és HFE homozigóta egerek alacsony és magas vastartalmú diétában részesültek, majd szíveket 30 perc globál iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vetették alá. A vastartalom meghatározása alapállapotban valamint a reperfúziót követően történt meg. Az eredmények a számtani átlagot, valamint a szórást mutatják (n=6) *p<0,05 vs. Kontroll.

II. Szabadgyökök indukálta oxidatív stressz meghatározása:

Az MDA produkció, amely mint markerként szolgál, mintegy minőségi paraméter a zsírsavak oxidációjának, illetve az oxidatív stressz mértékének meghatározásához. Megfigyeltük, hogy a vad típusú szívek esetén az oxidatív károsodás minimális volt, viszont a HFE KO egerek szövetéből emelkedett MDA mennyiséget sikerült kimutatni, ami viszont nem volt szignifikáns. A vad típusú egerekben, 30 perc iszkémiát követő 2 órás reperfúzió alatt a MDA tartalom statisztikailag magas volt az alapértékekhez viszonyítva. A HFE KO állatokban emelkedést tapasztaltunk az MDA tartalomban

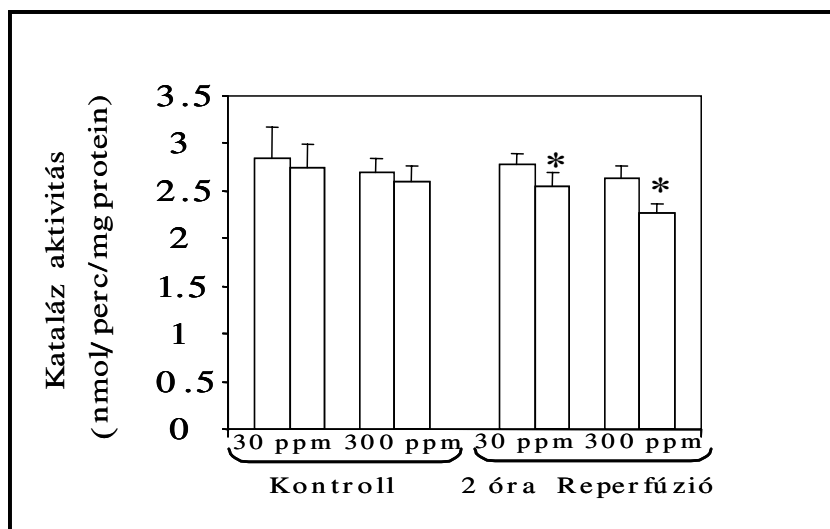
mindkét csoportban mind alapállapotban mind, pedig az iszkémiát követő periódusban. Ez utóbbi szakaszban a MDA tartalom 5X-ös emelkedést mutatott.



2. ábra A szöveti MDA tartalom változása oxidatív stressz következtében vad és a HFE KO homozigóta egérszívekben (n=6). Az eredmények a számtani átlagot és a szórást mutatják. *p<0,05 vs. Vad típus, †p<0,05 vs. Kontroll.

Az antioxidáns enzimszintek változása:

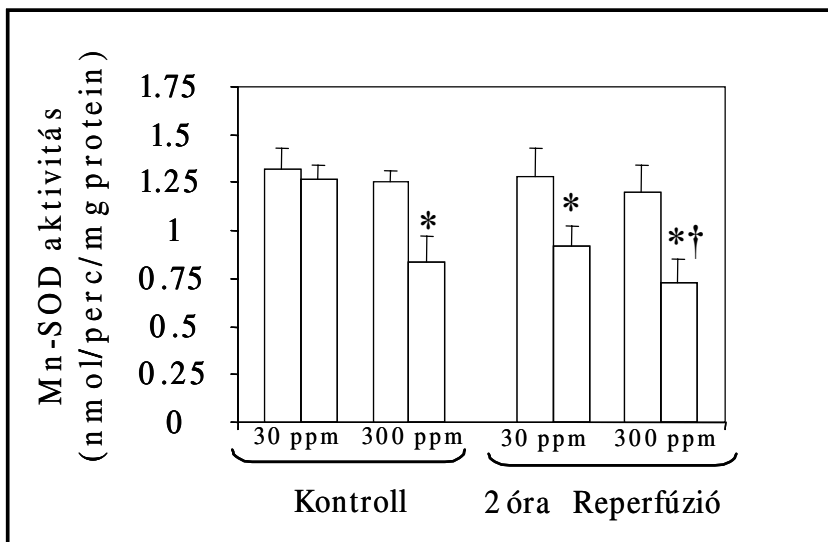
A Mn SOD és GSHPx-1 enzimszint csökkenést mutatott alapállapotban továbbá valamint 2 órás reperfúzió után azokból a szív szövetmintákból, amelyek az HFE KO-300 ppm egerekből származtak.



3. ábra Az antioxidáns enzimszint (kataláz) változása 30 és 300 ppm vastartalmú diéta következtében az iszkémiát megelőzően és a 2 órás reperfúzió végén. Az izolált dolgozó egérszívek 30 perc globál iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vetették alá (n=6), *p<0,05 vs. Kontroll.

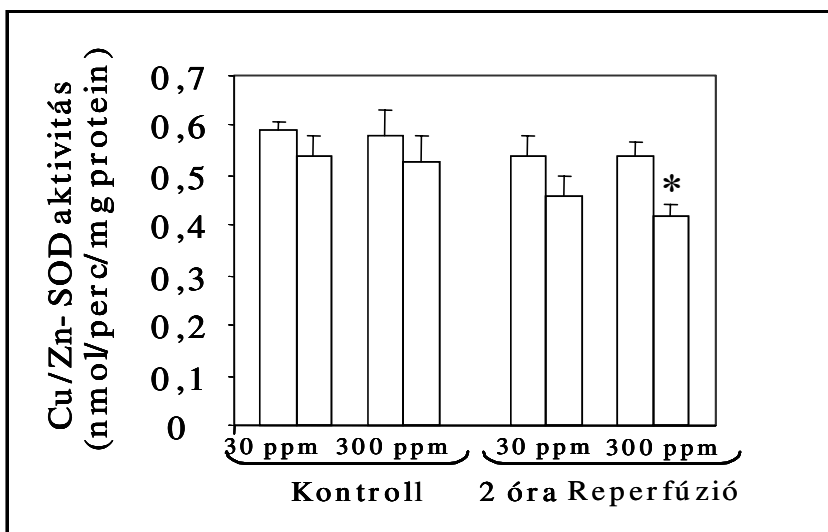
Elsősorban 300 ppm-s HFE KO egérszívek mutattak csökkent kataláz aktivitást az iszkémiát követő 2 órás reperfúzió után. Ugyanez a tendencia volt megfigyelhető Mn-SOD

esetében is azzal a kivétellel, hogy itt már alapállapotban is csökkent enzimaktivitást figyeltünk meg 300 ppm HFE KO csoportnál, amely szignifikáns volt. A Cu/Zn-SOD esetében hasonló enzimaktivitást mértünk azzal a különbséggel, hogy statisztikai differencia csupán a 300 ppm HFE KO egérszív enzimértékeknél volt megfigyelhető a reperfúzió során.

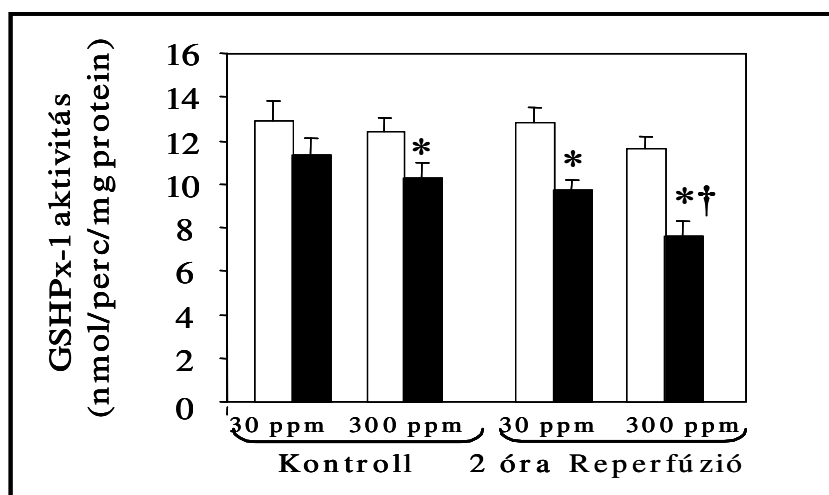


4. ábra Az antioxidáns enzimstátusz (Mn-SOD) változása 30 és 300 ppm vastartalmú diéta következtében az iszkémiát megelőzően és a 2 órás reperfúzió végén. Az izolált dolgozó egérszívek 30 perc globál iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vetették alá (n=6), *p<0,05 vs. Kontroll, † p<0,05 vs. 30 ppm.

GSHPx-1 aktivitásban szignifikáns eltérés mutatkozott mind 30 ppm és 300 ppm HFE KO csoportokban összehasonlítva a vad típus értékeivel egyaránt az iszkémiát megelőzően és a reperfúzió során.



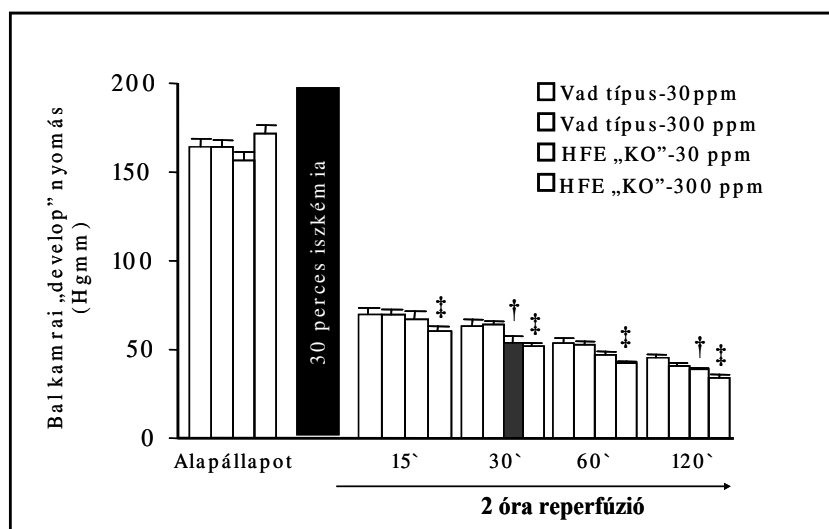
5. ábra Az antioxidáns enzimstátusz (Cu/Zn-SOD) változása 30 és 300 ppm vastartalmú diéta következtében az iszkémiát megelőzően és a 2 órás reperfúzió végén. Az izolált dolgozó egérszíveket 30 perc globál iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vetették alá (n=6) *p<0.05 vs. Vad típus; †p<0.05 vs. 30 ppm.



6. ábra Az antioxidáns enzimstátusz (GSHPx-1) változása 30 és 300 ppm vastartalmú diéta következtében az iszkémiát megelőzően és a 2 órás reperfúzió végén. Az izolált dolgozó egérszívek 30 perc globál iszkémiának és 2 óra reperfúciónak vetették alá (n=6) *p<0.05 vs. Vad típus.

A szív kontraktilitása és az infarktusos terület:

A kardiális arrhythmiák és fibrilláció előfordulásai gyakorisága miatt 2-2 szívet kizártunk az HFE KO-30 ppm és 300 ppm csoportból. Csoportonként 8-8 szívfunkciós paramétert mértünk és analizáltuk melyek nem mutattak semmiféle kóros arrhythmia típust. A bal kamrai kifejlődő nyomás mérésekor azt tapasztaltuk, hogy ez az érték jelentős csökkenést mutatott az HFE KO-300 ppm szívekben (7. ábra).

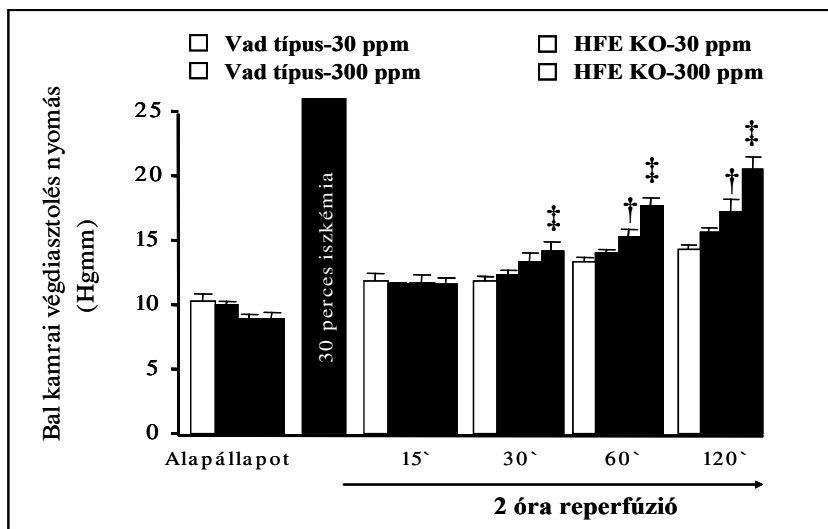


7. ábra A bal kamrai kifejlődő nyomás változása 30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót követően a vad és az HFE „knock out” egérszívekben 30 és 300 ppm vastartalmú diéta alkalmazása után (n=8). †p<0.05 vs. Vad típus; ‡p<0.05 vs. 30 ppm.

Jelentős eltérés figyeltünk meg a repfúzió 15. (63.40 ± 2.77 v. 69.7 ± 34.0 Hgmm), a 30. (51.68 ± 1.88 v. 63.18 ± 3.44 Hgmm), a 60. (42.13 ± 1.55 v. 54.13 ± 2.64 Hgmm) valamint a 120. (34.25 ± 1.25 v. 45.50 ± 1.72 Hgmm) percében a kontroll csoporthoz viszonyítva.

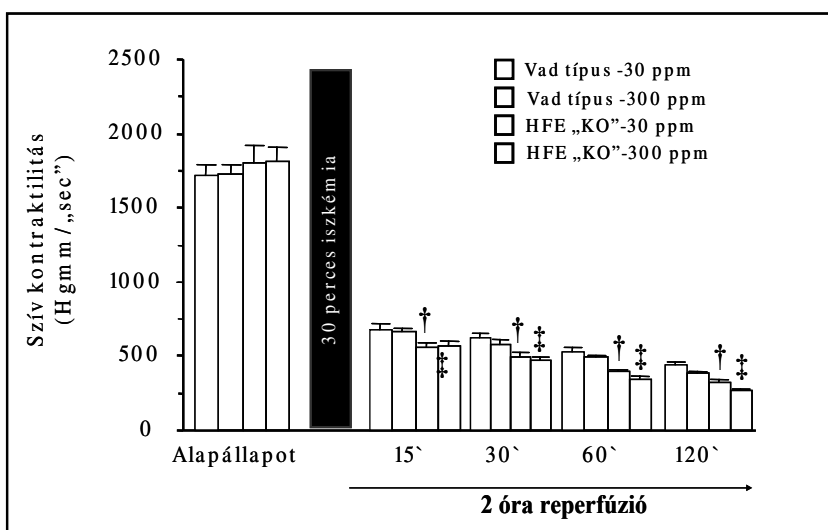
Csupán a reperfúzió 30. és 120 percében figyeltünk meg statisztikai különbséget az HFE-30 ppm csoport kardiális paraméterei esetén összehasonlítva a vad típusú csoporttal.

A bal kamrai végdiasztolés nyomás a HFE-300 ppm kísérleti csoportban folyamatos emelkedést mutatott a reperfúzió 30. (14.13 ± 0.72 v. 11.77 ± 0.43 Hgmm), 60. (17.66 ± 0.67 v. 13.28 ± 0.32 Hgmm), és 120. percében (20.53 ± 0.97 v. 14.270 ± 40 Hgmm) összehasonlítva a vad típusú csoporttal (8. ábra). Az itt tapasztalható különbségek szignifikáns változást mutattak.



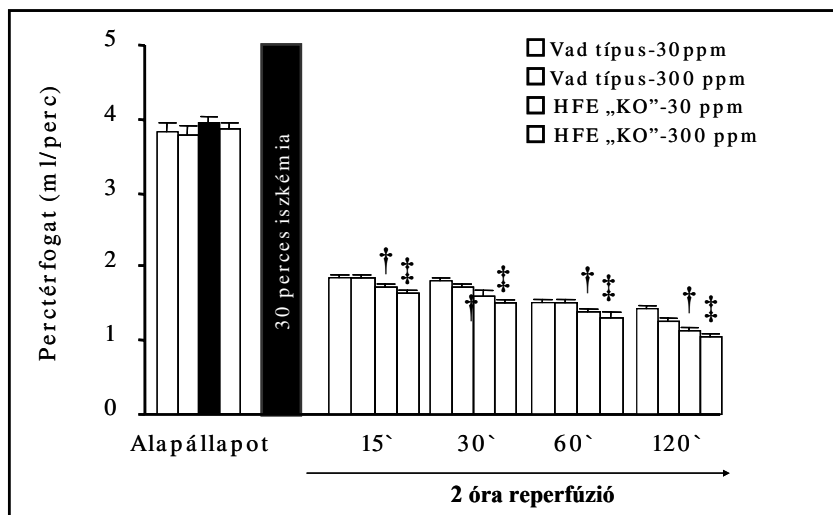
8. ábra A bal kamrai végdiasztolés nyomás változása 30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót követően a vad és HFE „knock out” egérszívekben a 30 és 300 ppm vastartalmú diéta alkalmazása után (n=8). †p<0.05 vs. Vad típus; ‡p<0.05 vs. 30 ppm.

A dp/dt értékek változásánál azt tapasztaltuk, hogy jelentős esés következett be reperfúzió során mindkét „knock out” csoportban (9. ábra).



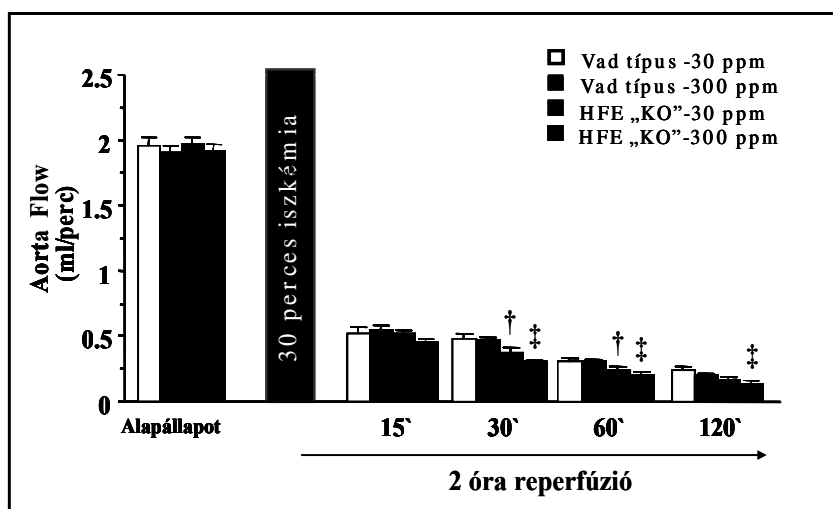
9. ábra A dp/dt változás 30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót követően vad és HFE „knock out” egérszívnél 30 és 300 ppm vastartalmú diéta alkalmazása után (n=8). †p<0.05 vs. Vad típus; ‡p<0.05 vs. 30 ppm.

A szívfrekvenciában jelentős változást nem figyeltünk meg sem alapállapotban, sem a reperfúzió során. A szív perctérfogata, amely a koronária és azt aorta flow együttes összegéből származtatható, szintén csökkenő tendenciát mutatott az iszkémiát követő reperfúzió alatt (10. ábra).

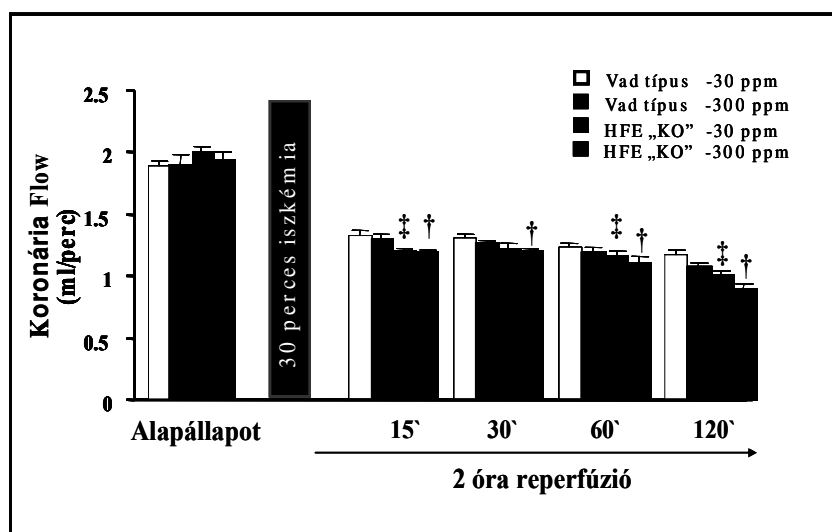


10. ábra A perctérfogat változása 30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót követően a vad és HFE „knock out” egérszívekben 30 és 300 ppm vastartalmú diéta alkalmazása után (n=8). †p<0.05 vs. Vad típus; ‡p<0.05 vs. 30 ppm.

Az aorta flow mérése során csökkent paramétereket regisztráltunk összehasonlítva a kontroll értékekkel. Elsősorban az HFE-300 ppm csoport mutatott statisztikai csökkenést az aorta flow esetében a reperfúzió 30. (0.30 ± 0.01 v. 0.47 ± 0.04 ml/min), 60. (0.2 ± 0.02 v. 0.30 ± 0.02 ml/min), és 120. (0.13 ± 0.01 v. 0.23 ± 0.03 ml/min) percében a kontroll állatok értékeihez hasonlítva (11. ábra).



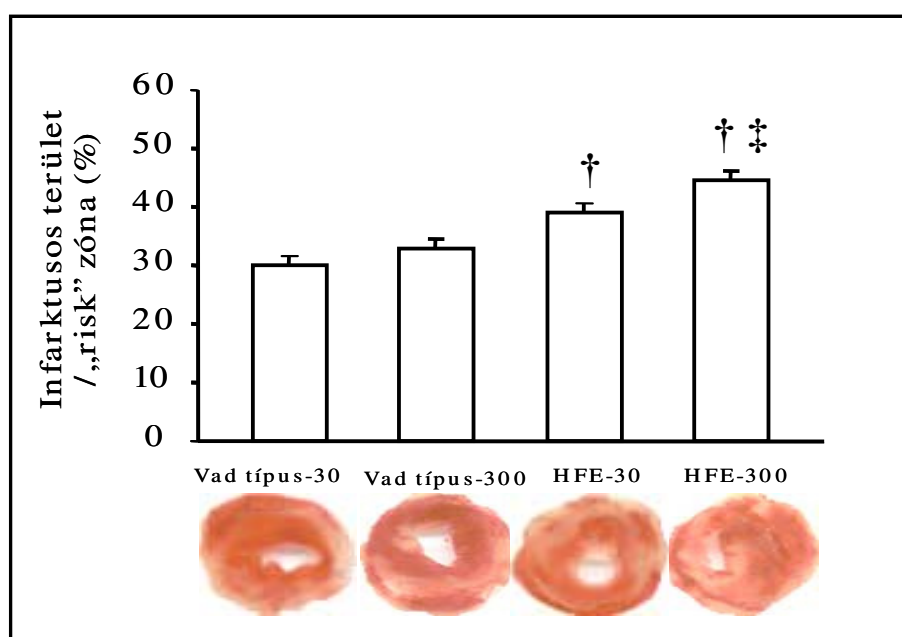
11. ábra Az aorta flow változása 30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót követően a vad és HFE „knock out” egérszívekben 30 és 300 ppm vastartalmú diéta alkalmazása után (n=8). †p<0.05 vs. Vad típus; ‡p<0.05 vs. 30 ppm.



12. ábra A koronária flow változása 30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót követően a vad és HFE „knock out” egérszívekben 30 és 300 ppm vastartalmú diéta alkalmazása után (n=8). †p<0.05 vs. Vad típus; ‡p<0.05 vs. 30 ppm.

A koronária flow mérése során, amit a szívből lecsöpögő oldat mennyisége jellemez, hasonló tendenciát mértünk, mint az aorta kiáramlásnál (12. ábra).

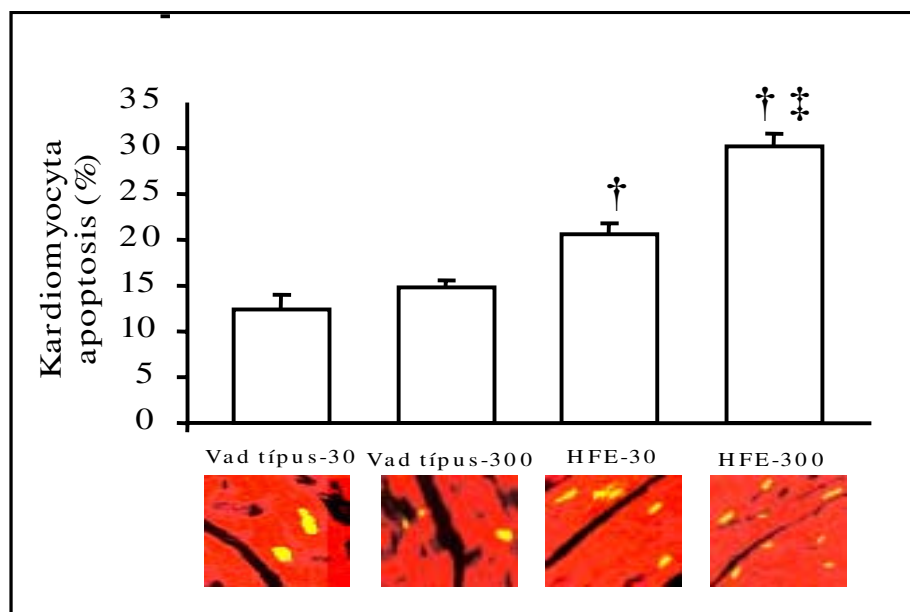
Az infarktusos terület, amelyet az elhalt szívterület egészéhez viszonyított és százalékos arányával jellemeztünk szignifikáns mértékben nagyobb volt a HFE-300 ppm csoportnál a kontroll szívekhez képest ($44.65 \pm 1.37\%$ HFE KO-300 ppm, $38.90 \pm 1.93\%$ HFE KO-30 ppm v. $32.75 \pm 1.85\%$ vad típus-300 ppm, $30.00 \pm 1.45\%$ vad típus-30 ppm).



13. ábra Az infarktusos terület nagyságának változása 30 és 300 ppm vastartalmú diéta következtében vad és HFE KO egerek esetén. †p<0.05 vs. 30 ppm Vad típus; ‡p<0.05 vs. 300 ppm Vad típus; n=6.

Kardiomyocita apoptózis:

Az eredmények értékelésénél mind a vad és a HFE KO egér csoportok szívszöveve jelentős számú apoptotikus sejtet tartalmaztak.



14. ábra A vasterápia hatása az apoptotikus kardiomyocyták számának változására 30 perc iszkémia és 2 óra reperfúzió után. † $p < 0.05$ vs. 30 ppm Vad típus; ‡ $p < 0.05$ vs. 300 ppm Vad típus; $n = 6$.

A kísérlethez, kettős antitesthez kötött módszert használtunk. Az alkalmazott antitestek egyike jellegére nézve egy monoklonális antitest volt, amit myozin nehéz lánc ellen termeltettek egérben. A második antitest, pedig egy TRIC-hez kötött egér IgG volt, amit nyúlban termeltettek. A protokoll végrehajtását követően szignifikánsan nagyobb számú apoptotikus sejtet detektáltunk az HFE KO egerek miokardiális szövetében. Általában a magas vastartalmú diétával etetett állatok miokardiális szövetében az apoptotikus sejtek száma nagyobb volt.

II. A thioredoxin (Trx) védő hatása az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális károsodásokkal szemben.

A már említett károsító hatású patológiás mechanizmusokkal szemben védelmet nyújthatnak a redox-rendszer fontos komponensei, mint a glutaredoxin illetve a thioredoxin. Az előbb felsorolt úgynevezett redox molekulák fontos jellemzője, hogy thiol csoportjai révén redukáló tulajdonsággal rendelkeznek és képesek semlegesíteni az iszkémia során képződött szabadgyököket és az általuk indukálta patológiás folyamatokat (28;29). A thioredoxin (Trx), akut T limfocita okozta leukémia faktorként vált ismertté, ami változásában IL-2 receptor α / γ induktor, melyet a vírus (HTLV-I)–által transzformált T sejtek termelnek (30;36). Számos publikáció már korábban utalt ennek a proteint kódoló génnek a fokozott expressziójára koronária bypass műtét esetén, amikor a szív műtéti beavatkozásból kifolyólag oxidatív stressznek van kitéve (37). A Trx fokozott expressziója volt megfigyelhető virális fertőzések, röntgen és UV besugárzás, valamint phorbol észterek és posztiszkémiás reperfúzió kiváltotta folyamatokban (39). Kromoszómális lokalizációját tekintve az emberi Trx gén a 9-s kromoszómán helyezkedik el (51). A terhesség időszakában is kedvező hatással van a placentát alkotó trophoblast sejtek normál funkciójának megőrzésében, valamint a petesejt implantációjában. A daganatterápia során már korábban megfigyelték, hogy bizonyos rosszindulatú folyamatok gyógyszeres kezelése kapcsán gyógyszer-rezisztencia lép fel, olyan farmakon alkalmazásakor, melyek szabad gyökök indukciójával igyekeznek a tumorsejtek növekedését gátolni (27). Az oxidatív stressz indukálta molekuláris folyamatokban bizonyos transzkripciós faktorok (NF- κ B, AP-1) aktivációja fokozódik ez által indirekt módon különböző gének expresszálódnak illetve represszálódnak. Ez a szabályozás úgy jön létre, hogy a transzkripciós faktorok redox-állapotainak megváltoztatásával azok DNS-kötő képessége módosul, befolyásolva ezzel a gének működését (31). Elsősorban ez a transzkripciós faktorok cisztein oldalláncain valósul meg Trx segítségével, mely a sejtmagba való transzlokációját eredményezi az oxidatív inzultust követően (60;61). A Trx továbbá részt vesz bizonyos immunfolyamatok regulálásában azáltal, hogy számos citokin, mint az immunrendszer modulátorai szintézisét génexpressziós szinten szabályozza (28). Számos tanulmány korábban beszámolt arról, hogy szerzett immunhiányos állapotokban a Trx fokozott expressziója volt megfigyelhető, a HIV fertőzésből adódó fokozott oxidatív stressz következtében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK II.

A transzgén egerek létrehozása:

Az emberi thioredoxin gén cDNA klónt az Incite Genomics (St. Louis, MO) biztosította. EcoRI-NotI cDNA fragmentet ezután insertáltuk egy EcoRI és SpeI által emésztet humán β -aktin expressziós vektorba (11). A teljes expressziós szekvencia tartalmazta a humán β -aktin promótert, a humán Trx-t valamint SV40-s késői poliadenilációs helyet. Az expresszált szekvenciát majd KpnI és SalI enzimmal emésztve kinyertük az expressziós vektorból és agar gélen tisztítottuk. A kinyert DNS-t mikroinjekciós technikával bejutattuk fertilizált egér petesejtbe (B6D2 (C57BL/6 $\times$ DBA/2) F1) (40;41). A transzgén egerek azonosítása során Southern blot technikát alkalmaztunk, mellyel az állatok farkából kinyert DNS-t azonosítottuk. Az ily módon nyert transzgenikus egereket, (amelyek extra Trx génnel rendelkeztek) kereszteztük B6D2 hibrid állatok első generációjából származó utódaikkal.

A humán Trx gén expressziós analízise:

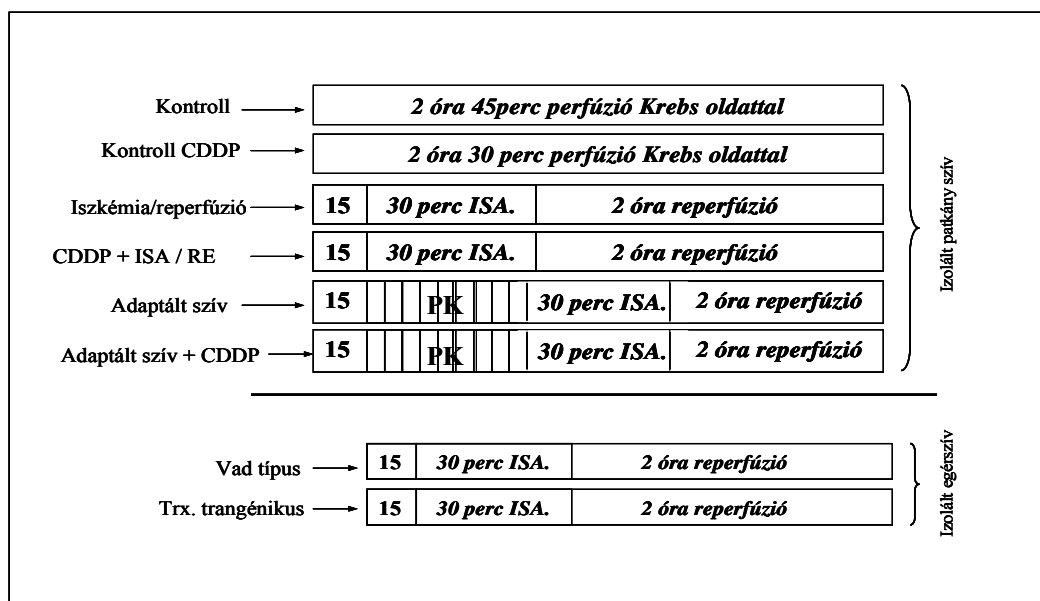
A teljes RNS izolálását transzgenikus, és vad típusú egyedek különböző szöveteikből végeztük Chirwing módszere szerint. Az RNS blot filtert Thomas és munkatársai ajánlása alapján készítettük elő a hibridizációs módszernek megfelelően (42). Hibridizáció során humán Trx cDNA-t használtunk. A szívek fehérje tartalmának meghatározása céljából, a szöveteket homogenizáltuk 7,8 pH-jú 50 mM-s kálium foszfát pufferban, ami 0,1% triton X-100-t és 1 mM penylmethyl-sulfonyl fluoride-t tartalmazott (43). A fehérje mérésnél bicinchoninic savas protein assay kitet használtunk (Pierce, Rockford, IL). A protein 25 μ g-ját 12,5% SDS poliakrilamid gélen futtatunk a proteinek méret szerinti elválasztása céljából, majd ezeket egy nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell, Keene, NH) transzferáltuk. A blottot először kecskében termeltetett anti-Trx antitesttel (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT) reagáltattuk, majd második antitestként tormaperoxidáz jelölt, nyúlban termeltetett anti kecske IgG-t használtunk. A második antitest detektálásához SuperSignal kemilumineszcens (Rockford, IL) reagenst használva vizualizáltuk az antitest kötődést.

Kísérleti terv:

A kísérlethez két állatmodellt alkalmaztunk: Izolált dolgozó patkányszív perfúziós és izolált dolgozó egérszív rendszert. A dolgozó patkányszíves preparátum esetén az állatokat 6 csoportra osztottuk.

1. A perfúziót KHB oldattal 2 óra 45 percig végeztük.
2. A perfúziót 1 mM CDDP oldattal (Trx gátló, daganat ellenes szer) 15 percig, majd 2 óra 30 perces perfúzióval folytattuk azt KHB oldattal.
3. Perfúzió 30 perc globál iszkémiával és 2 óra reperfúzióval.
4. CDDP alkalmazása 1 mM-s koncentrációban 15 percig, majd 30 perc globál iszkémiát követően, 2 óra reperfúziót alkalmaztunk.
5. Prekondíció: 5 perc rövid iszkémia és 10 perc reperfúzió 4 ciklusban, melyet 30perc iszkémia és 2 óra reperfúzió követett.
6. CDDP adása 1 mM koncentrációban 15 percig Langerdorff módban, majd prekondíció 4 ciklusban és 30 perc globál iszkémia, majd 2 óra reperfúzió.

A vad típusú és transzgenikus egerek (Trx) eseténben 30 perc globál iszkémiát és 2 óra reperfúziót alkalmaztunk.



15. ábra A kísérleti terv vázlata: **Patkány:** Kontroll, Kontroll+CDDP, ISA/RE (30 perc ISA + 2 óra reperfúzió), PK (4 PK + 30perc ISA + 2 óra Reperfúzió), PK+CDDP. **Egér:** Vad és Trx transzgenikus (30 perc ISA+2 óra RE).

A Dolgozó egér és patkány szív preparátum:

Az experimentális folyamat során valamennyi állatot a „Laboratóriumi Állatok Kísérleti Felhasználására” vonatkozó előírások szerint tartottuk. Az anesztéziát pentobarbitállal végeztük intraperitoneálisan, a következő dózisban: egér (25-34 g): (100 mg/ttkg); patkány (250-300 g): 80 mg/ttkg. Ezzel egyidőben heparint adtunk ugyancsak intraperitoneális módon, (500 IU/ttkg) a véralvadás gátlás megakadályozása céljából. A szíveket kimetszve,

az aorta megkanulálását követően megindítottuk a perfúziót Langerdorff módon. A kísérlet során alkalmazott perfúziós oldat egy módosított Henseilat–Krebs oldat volt, melynek komponensei a vér fiziológias ionkoncentrációjával azonos volt (118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO₄, 25 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L Glükóz, és 1.7 mmol/L CaCl₂). A konstans hőmérséklet biztosítása végett az oldatot 37 °C-on termosztáltuk, egy vízcirkulációs zárt rendszer segítségével (45;46). A miokardium számára szükséges O₂-t az oldat átáramoltatásával biztosítottuk (95 % O₂ és 5% CO₂) a kísérlet teljes időtartama alatt. A perfúziós nyomás 71 Hgmm (10 kPa) volt patkányszív esetében, míg az egereknél 35 Hgmm (5 kPa). A 10 perces retrográd áramlási módban, a szíveket megkanuláltuk a bal tüdővénaon keresztül, majd perfúziós részt elzárva megindítottuk az ortográd áramlást, amelynek során a Krebs oldat a kanulált bal pitvarba kerül, majd onnan a bal kamrába, ahonnan spontán ejekcióval egy 10 kPa-al szembeni „afterload”-dal a tüdőrésszebe jut. Az áramlási rendszerünkben alkalmazott nyomás, amit preloaddal és afterloaddal jellemezzünk a következő volt: Patkány- preload: 17 Hgmm (1,2 kPa) , afterload: 71 Hgmm, (10 kPa); Egér: preload: 10 Hgmm (0,7 kPa), afterload: 35 Hgmm (5 kPa). Kísérleteinkben az alábbi szívfunkciókat mértük: bal-kamrai kifejlődő nyomás (LVDP), bal-kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP), szívfrekvencia (SZF), aorta flow (AF), koronária átáramlás (KF), perctérfogat (PT), kardiális kontraktilitás (KK-dp/dt). Az alapértékek mérése után 30 perc globál iszkémiát indukáltunk, majd 2 óra reperfúziót alkalmaztunk. A miokardiális funkciók mérését a reperfúzió 15., 30., 60., és 120., perceiben végeztük.

A szívfunkciók:

A kardiális paraméterek esetén a bal-kamrai kifejlődő nyomást (a maximális és minimális szisztolés nyomás különbsége), a bal-kamrai végdiasztolés nyomást, a szívfrekvenciát, a koronária áramlást (időegység alatt a szívről lecsöpögő Krebs oldat mennyisége), az aorta kiáramlást (flowméter), a szív kontraktilis erejének idő szerinti deriváltját (dp/dt) mértük (45;46). Az LVDP, LVEDP, SZF, dp/dt értékeit Gould p23XL transzducer (Gould Instrument System Inc., Valley View, OH) segítségével detektáltuk és a jelek felerősítésére, pedig Gould 6600 szignál erősítőt (Gould Instrument System Inc., Valley View, OH) alkalmaztunk. A paraméterek monitorozását Cordat II real-time softwear (Triton technologies, San Diego, CA) segítségével végeztük.

Infarktusos terület meghatározása:

A perfúzió végén a szíveket 10% TTC (triphenyl tetrazolium) oldattal injektáltuk át 20 percig infarktusos terület meghatározása. A bal kamrát eltávolítottuk és 1 mm vastagságú haránt metszeteket készítettünk, és azokat szkenneltük, majd egy speciális softwear (Scion Image) segítségével értékeltük (47;48). Az infarktusos terület fehérré vált, míg az ép miokardiális szövet piros maradt. Az értékelésnél mértük a metszetek súlyát, illetve az elhalt és az intakt szív terület nagyságát, majd ezek összegzésével megkaptuk a teljes elhalt és ép miokardium nagyságát.

Northern blot analízis:

Az RNS izolálását Hattori által leírt módon hajtottuk végre (49). Az elektroforézist, a blottolási technika lépéseit, valamint a hibridizációt, a kísérleti terv szerint végeztük. Feltöltő standardként GADPH mRNS-ét alkalmaztuk, a blottot szkenneltük, majd Trx1 arányát viszonyítottuk GADPH mRNS-hez (49). A képet ez követően vizualizáltuk, majd analizáltuk NIH Image analízis softwearrel.

A malonaldehyd mérése az oxidatív károsodás mértékének megállapítására:

Az oxidatív károsodás mértékét a malonaldehyd (MDA) illetve az MDA-DNPH származék koncentrációjának HPLC-vel történő meghatározásával végeztük (50).

Az apoptotikus sejtek detektálása TUNEL módszerrel:

Az apoptotikus sejtek immunhisztokémiai detektálását TUNEL módszerrel végeztük (45;48). A metszeteket a festés során inkubáltuk monoklonális egerben termeltetett antitesttel, amely a szívizom nehéz myosin lánc felismerésével és ahhoz kötődésével alkalmas az apoptotikus sejtek detektálására. A fluoreszcens festéssel nyert metszetek értékelését laser konfokális mikroszkóp alatt végeztük. Az apoptotikus sejtek számát a teljes kardiomyocita sejtszámhoz viszonyítottuk és %-ban formában fejeztük ki.

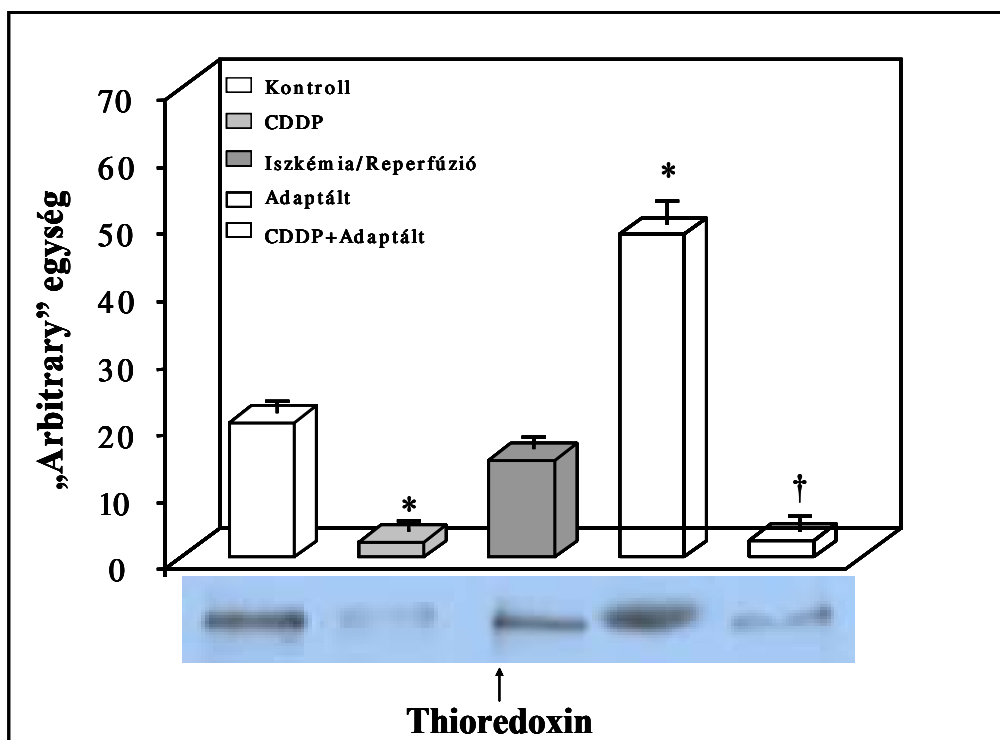
Statisztikai analízis:

A miokardiális funkciók értékeit, az MDA koncentrációt, az infarktusos terület nagyságát átlagoltuk és a szórással jellemeztük. A statisztikai analízist egy mintás variancia analízis és Scheffé-féle csoportos összehasonlító teszttel végeztük a csoportok közötti szignifikáns különbségek megállapítására. Az eltérések melyek szignifikánsnak mutatkoztak, standard Student t-test teszttel nyertek megerősítést.

EREDMÉNYEK II.

Patkány szíveken végzett kísérletek:

Kísérleteinkben először az iszkémia/reperfúzió hatását vizsgáltuk a Trx „overexpresszió”-val összefüggésben. Northern blot analízis megerősítette azt a tényt, hogy a Trx jelen van az ép szívszövetben. Elképzeléseinket igazolták eredményeink, hogy a CDDP blokkolta a Trx expressziót. Ugyancsak megfigyelhető volt az, hogy az iszkémia/reperfúzió hasonló hatást eredményezett a Trx expresszióját illetően. Az oxidatív stressz okozta károsodások mérséklődése volt megfigyelhető akkor, ha a szívet perkondicionáltuk.



16. ábra Az iszkémi/reperfúzió valamint a prekondíció hatása humán Trx expresszójára. Northern blot analízissel kapott blottot szkenneltük majd denzitometriás vizsgálatnak vettük alá „housekeeping” β aktin gén alkalmazásával. Az oszlopdiagram a kísérleti csoportok számtani átlagát és szórását mutatják. * $p < 0.05$ vs. Kontroll, † $p < 0.05$ vs. Adaptált.

A Trx hatása az iszkémiát követően kardiális funkciókra:

A posztiszkémiás funkciókat vizsgálva nem tapasztaltunk lényeges változást, amikor a szíveket 2 óra 45 percig perfundáltuk. Ugyancsak nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést abban az esetben, ha 15 perces előkezelést végeztünk CDDP-vel. Az elképzeléseinknek megfelelően a miokardiális funkciók az iszkémiát követő 60 percben jelentős gyengülést mutattak, mely megfigyelhető volt egészen a reperfúzió végéig. Érdekes módon a CDDP-vel történő előperfúzió szintén rosszabbodást eredményezett a reperfúzió során. A

prekondicionált szívekben a posztiszkémiás funkciók javulást mutattak az iszkémia-reperfúzió által előidézett miokardiális károsodásokkal szemben. A kardiális védőhatással bíró prekondíció előnyös tulajdonságait a CDDP-vel történő előkezelés teljes mértékben megszüntette.

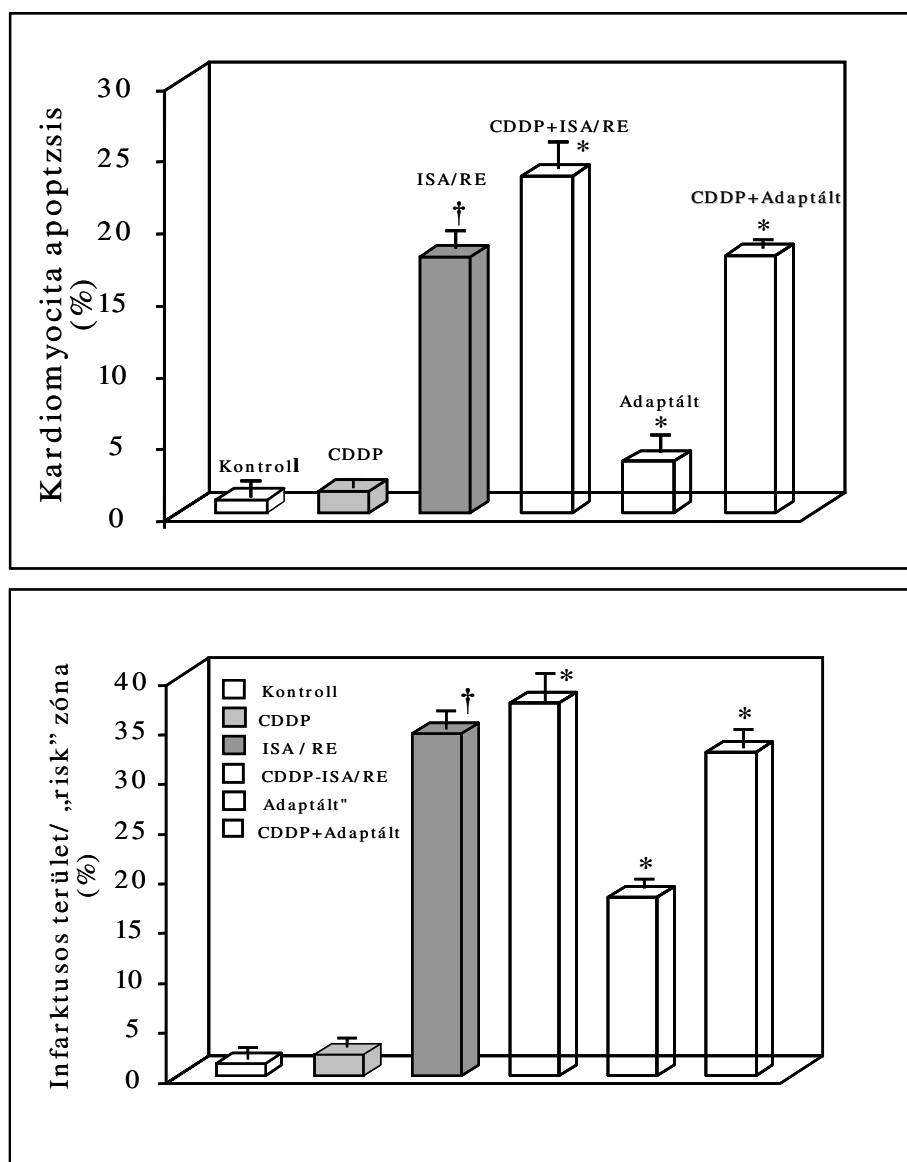
Az iszkémiás adaptáció és a Trx gátlás hatása a myokardiális kontraktilis funkciókra izolált dolgozó patkányszívben.

Csoportok	Alapértékek	Reperfúzió (60 perc)	Reperfúzió (120 perc)
Kontroll			
Szívfrekvencia (ütés/perc)	315 ± 9,5	310 ± 11,4	312 ± 8,3
Koronária „flow” (ml/perc)	27,4 ± 1,1	26,1 ± 1,0	25,5 ± 0,8
Aorta „flow” (ml/perc)	52 ± 2,2	45,7 ± 3,1	42,0 ± 4,2
B. K. „D” nyomás (Hgmm)	112 ± 5,4	107 ± 7,8	103 ± 6,8
Inhibitor			
Szívfrekvencia	318 ± 1,0	309 ± 8	311 ± 12
Koronária „flow”	26,7 ± 1,2	24,3 ± 0,9	22,2 ± 1,4
Aorta „flow”	50,5 ± 2,0	43,8 ± 2,8	40,4 ± 1,5
B. K. „D” nyomás	114 ± 11,0	106 ± 12,2	99 ± 7,8
Iszkémia/Reperfúzió			
Szívfrekvencia	312 ± 7	301 ± 8	295 ± 8
Koronária „flow”	26,5 ± 1,4	22,0 ± 1,6*	19,2 ± 1,5*
Aorta „flow”	49,3 ± 1,2	28,7 ± 2,0*	23,7 ± 1,4*
B. K. „D” nyomás	112 ± 6,4	65 ± 3,9*	57 ± 4,2*
Inhibitor+ Iszkémia/Reperfúzió			
Szívfrekvencia	308 ± 11	295 ± 9	288 ± 7
Koronária „flow”	27,7 ± 0,9	19,2 ± 1,8*	17,3 ± 1,2*
Aorta „flow”	51,5 ± 1,7	22,5 ± 2,1*	19,6 ± 1,1*
B. K. „D” nyomás	110 ± 7,5	59 ± 5,4*	52 ± 4,3*
Adaptált			
Szívfrekvencia	310 ± 12	302 ± 7	300 ± 5
Koronária „flow”	26,2 ± 1,7	22,8 ± 0,9*	21,0 ± 1,5*
Aorta „flow”	50,0 ± 1,8	35,6 ± 1,6*	30,3 ± 1,5*
B. K. „D” nyomás	105 ± 7,4	87 ± 5,2*	82 ± 6,5*
Inhibitor+ Adaptáció			
Szívfrekvencia	313 ± 6,7	300 ± 8,8	292 ± 5,7
Koronária „flow”	27 ± 2,2	20,5 ± 2,1*	18,5 ± 1,6*
Aorta „flow”	51,7 ± 1,8	27,2 ± 1,8*	21,1 ± 0,8*
B. K. „D” nyomás	112 ± 7,5	71 ± 5,7*	65 ± 4,9*

Átlag ± szórás, $n = 6$, * $P < 0.05$ a kontroll értékekhez viszonyítva. A bal kamrai kifejlődő nyomás (B. K. „D”)

A Trx hatása a miokardiális infarktusos terület nagyságára valamint az apoptotikus sejtek számára:

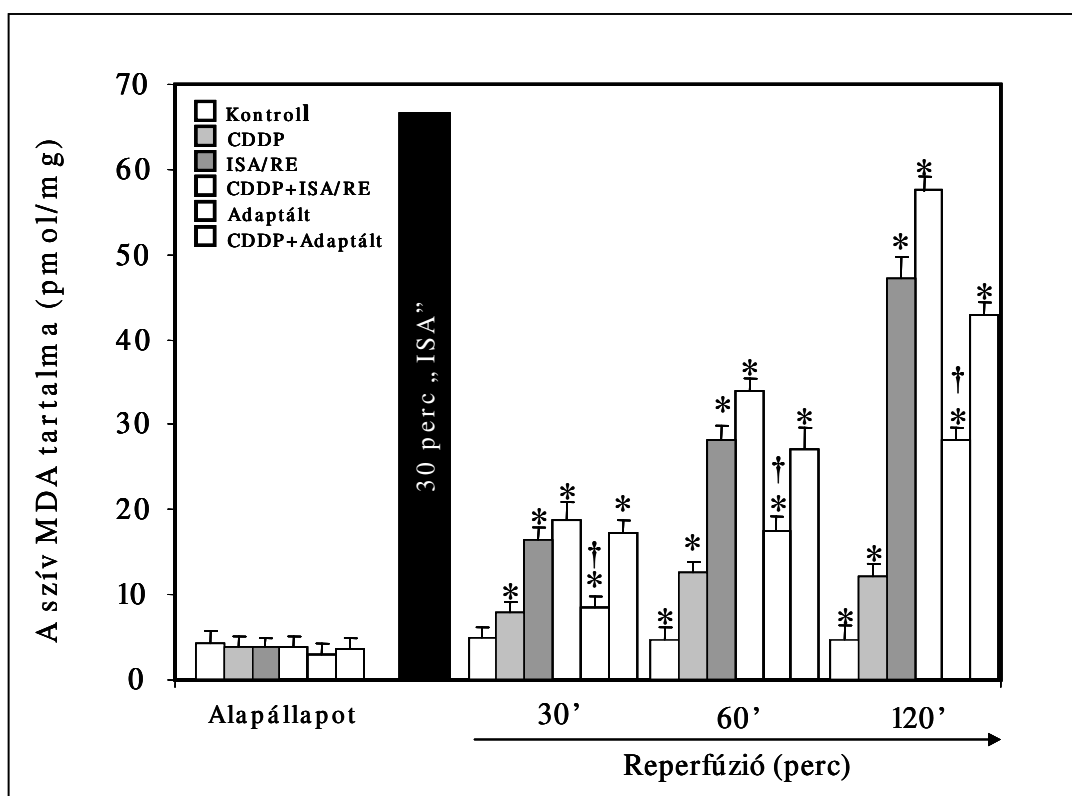
A miokardiális szövetelhalások két nagyon fontos tényezőre vezethetők vissza: 1. apoptózis, 2. nekrozis. Kísérleteinkben CDDP hatását vizsgáltuk a miokardiális infarktusos terület nagyságára vonatkozóan (17. ábra). A CDDP kezelés nem mutatott jelentős változást a szív funkciókra, viszont csekély mértékű apoptotikus sejtelhalást okozott, és nem szignifikáns módon növelte az infarktusos terület nagyságát is. A prekondicionált szíveknél azt tapasztaltuk, hogy az elhalással kiterjedt terület valamint az apoptotikus sejtek száma szignifikáns csökkenést mutatott. A védőmechanizmus teljes mértékben gátlható volt azokban a szívekben melyek korábban CDDP-vel való kezelést kaptak.



17. ábra Az iszkémia/reperfúzió valamint az iszkémiás prekondíció hatásának vizsgálata Tunel módszerrel az valamint TTC festéssel. Az eredményeket számtani átlag és szórás formájában adtuk meg. n=6 *p< 0.05 vs. Kontroll, †p<0.05 vs. ISA/RE.

A Trx hatása az iszkémia indukálta oxidatív károsodásra:

A kísérleteink során az oxidatív stressz mértékét HPLC-vel történő MDA tartalom mérésével határoztuk meg. Az MDA tartalom jelentős emelkedést mutatott az összes kísérleti csoport vizsgálata során, elsősorban a reperfúziós időtartam kezdetén, majd ez a növekedés később mérséklődött. A CDDP kezelés hasonló tendenciát mutatott aerob módon perfundált szívekben is. Ez a hasonlóság megfigyelhető volt a másik CDDP-vel előkezelt csoportban, ahol iszkémiát alkalmaztunk, de az MDA tartalomban észlehető változás nem volt szignifikáns mértékű. Az adaptációs kísérlet eredménye viszont tényleges MDA tartalom csökkenést mutatott számunkra, és ezt a mérséklődést a CDDP alkalmazása megszüntette.

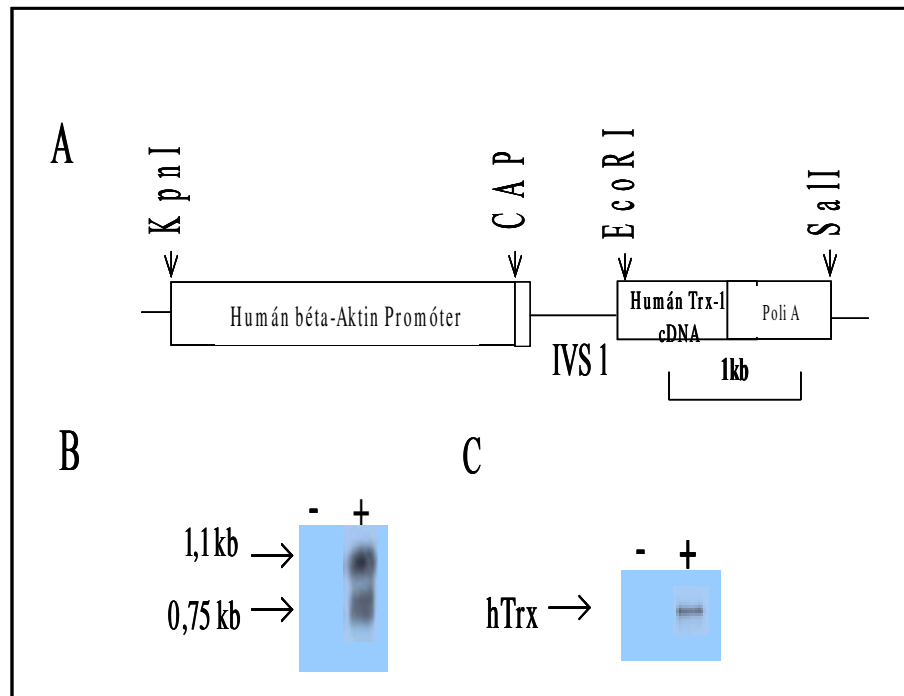


18. ábra Az iszkémia/reperfúzió és az PK hatása a koronária flow MDA tartalmára, mely markerként szolgál az oxidatív stressz fokának megállapítására. Az eredményeket számtani átlag és szórás formájában adtuk meg (n=6). *p<0.05 vs. Kontroll, †p<0.05 vs. ISA/RE, ‡p<0.05 vs. Adaptált.

Egérkísérletek:

Az RNS blot analízis egyértelműen mutatja, hogy a Trx expressziója magas az agyszövetben, a szívben, a tüdőben, a vázizomzatban, a lépben, a nyelvben, ugyanakkor kevésbé intenzív mértékben volt kimutatható a vesében és a májban. A kísérlet eredményei azt mutatják, hogy két különböző bázis nagyságú Trx mRNS-t nyertünk a transzgén egerek szívéből. Az egyik 1,1 Kb, a másik 0,75 Kb nagyságú volt. Az 1,1 Kb-nyi Trx mRNS a

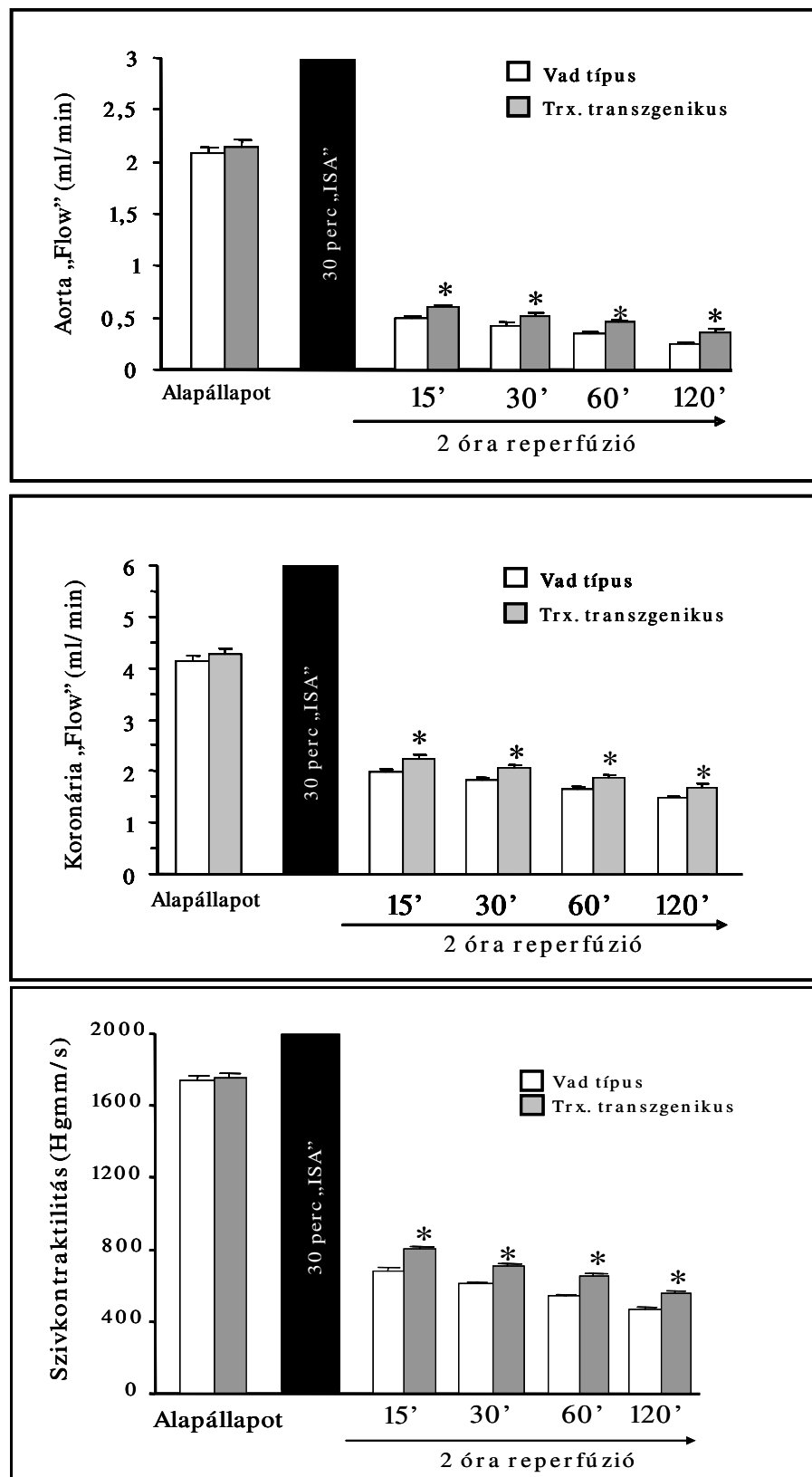
várákozásaink ellenére hosszabb volt, ami az emberi β -aktin-hTrx1 transzgenikus egérből származott. A hibridizáció során a keresztkötések nem voltak számottevőek az egér és a humán Trx próba között. Western blot analízis során sikerült kimutatnunk a hTrx protein jelenlétét a transzgenikus egerekből származó szövetekből. Egy 12 kDa nagyságú protein sikerült detektálnunk, melyhez a humán Trx ellen termelt antitest nagy affinitást mutatott. A saját egér Trx gén által expresszált protein detektálását is megpróbáltuk, amihez nagyobb antitest inkubációs periódusra volt szükséges.



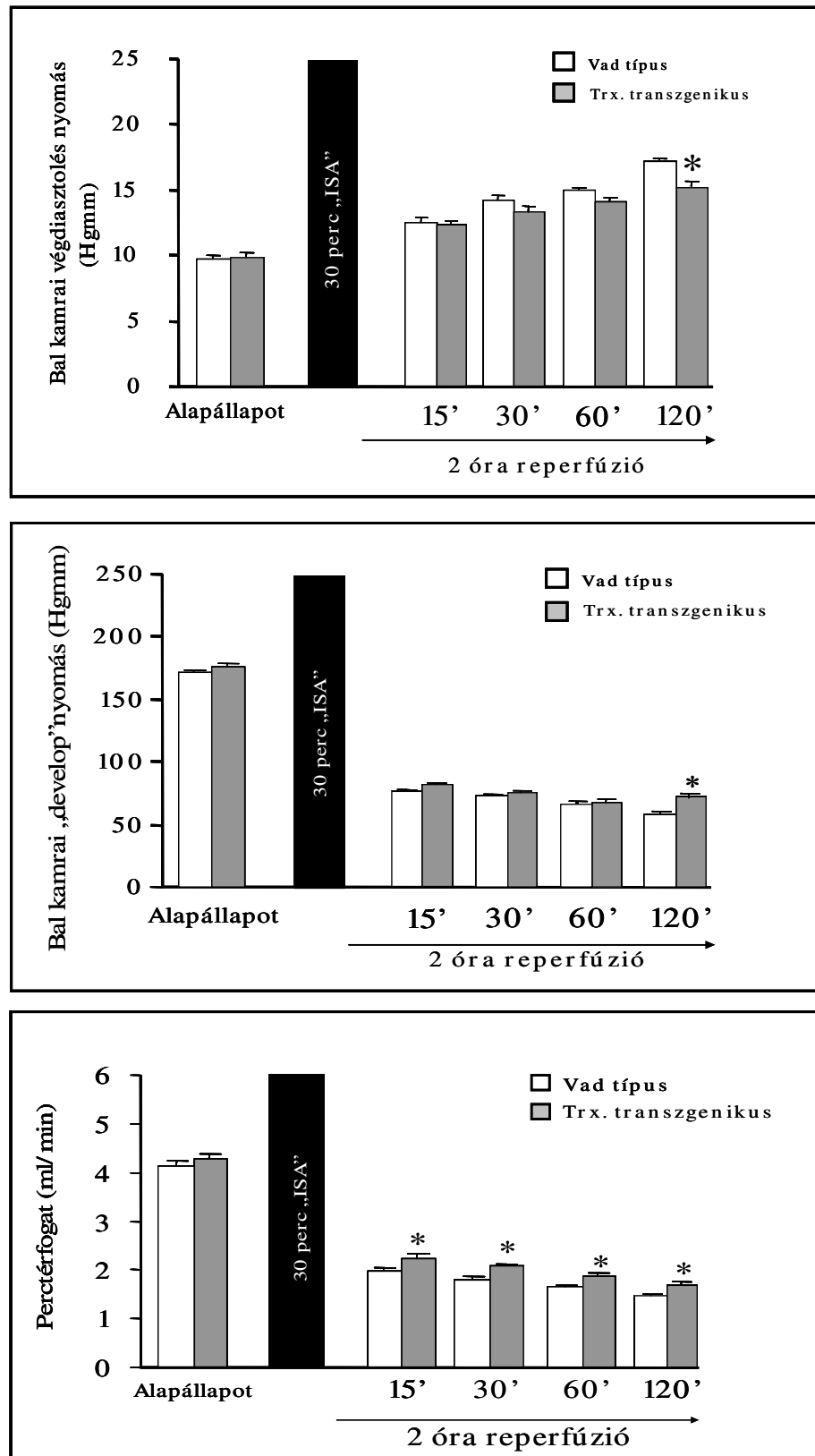
19. ábra A., A humán β -aktin hTrx1 transzgén struktúrája. A CAP és IVS1 helyek mutatják a transzkripció kezdő helyét és a közbülső szekvenciáit a humán β -aktin génnek. A KpnI és SalI által emésztett vektoriális szekvenciát izolálva történt meg a transzgén egerek létrehozása. B., A transzgenikus egerek RNS blot analízise során 35 μ g transzgenikus és vad típusú egérszívából izolált totál RNS-t vizsgálata történt meg gélelektroforézissel. C., Western blot vizsgálat során 25 μ g mennyiségű proteint analizáltunk transzgenikus és vad típusú egérszívekből.

A miokardiális funkciók:

A vezetési zavarok és kamrafibrilláció gyakori előfordulása miatt 2 vad és 2 transzgenikus szívet a további statisztikai analízisből kizártuk. A bal-kamrai „develop” nyomás a reperfüziós alatt csökkenést mutatott a kontroll értékekhez képest (20/A ábra). A Trx egerek viszont erre a szívfunkciós paraméterre vonatkozólag szignifikánsan magasabb értékeket mutattak a kontroll szívekhez képest. A kardiális kontraktilitás esetében (dp/dt) hasonló tendencia volt megfigyelhető (20/C ábra). Az aorta flow-t hasonló változás kísérte a reperfüzió során, de itt az értékek közötti különbségek szignifikáns mértékűek voltak (20/B ábra).



20. ábra A posztiszkémiás Trx transzgenikus és vad típusú egerek bal kamrai funkciói 30 perc globál iszkémiát követően és 2 óra reperfúzió során. Koronária Flow (A) , Aorta Flow (B) és a Szívkontraktilitás (C) paramétereit a számtani átlaggal és szórással jellemeztük (n=6). *p<0.05 vs. Vad típussal szemben.

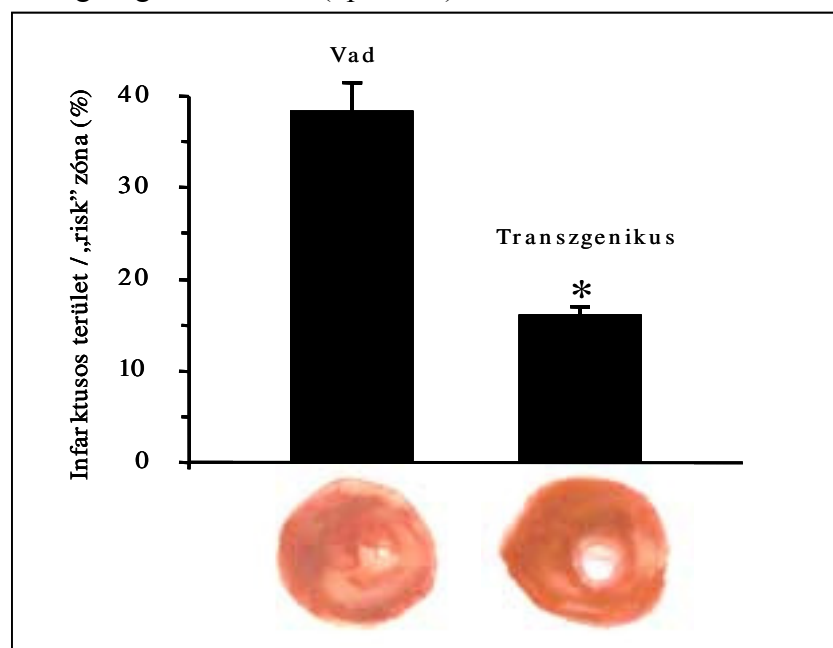


21. ábra A posztisztkémiás Trx transzgenikus és vad típusú egerek bal kamrai funkciói 30 perc globál iszkémiát követően és 2 óra reperfúzió során. A bal kamrai „develop nyomás” (A), a bal kamrai végdiasztolés nyomás (B), és a perctérfogat (C) paramétereit a számtani átlaggal és szórással jellemeztük (n=6). *p<0.05 vs. Vad típussal szemben.

A bal kamrai végdiasztolés nyomás a Trx transzgenikus csoportnál kisebb volt az összefüggő vad típus értékeihez viszonyítva, és ez statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a „reflow” 120. percében (21/A). A bal kamrai kifejlődő nyomás az iszkémiát követően csökkenést mutatott mindkét kísérleti csoportban, viszont a transzgenikus egerek paraméterei a vad típushoz képest szignifikánsan nagyobbak voltak a teljes reperfúziós időtartam alatt (21/B). A perctérfogat (AF+KF) mérésekor azonos tendencia volt megfigyelhető a LVEDP-hez képest (21/C).

A miokardiális infarktusos terület:

Az infarktusos terület meghatározása céljából mértük az elhalt és az ép miokardiális területet haránt irányban vágott metszeteken. Az infarktusos terület nagyságát %-os módon fejeztük ki a teljes szívterülethez képest. A elhalt miokardiális terület nagysága, amelyek a transzgenikus egerekből ($15.90 \pm 0.29\%$) származtak, kisebb volt a vad típushoz ($37.11 \pm 0.18\%$) képest. A két csoport esetén az infarktusos terület nagyságára vonatkozó különbség szignifikáns volt (* $p < 0.05$).



22. ábra Az iszkémia/reperfúzió hatása az infarktusos terület nagyságára. A 30 perces iszkémia és 2 órás „reflow” után a vad és transzgenikus egerek ép szívszövetei 10 %-s TTC oldattal festődtek. Az infarktusos terület nagyságát a „risk” zónához viszonyítva %-s formában számoltuk (n=6). * $p < 0.05$ vs. Vad típus.

III. STAT5A és STAT6 szignáltranszdukciós molekulák szerepe az iszkémia-prekondícióban

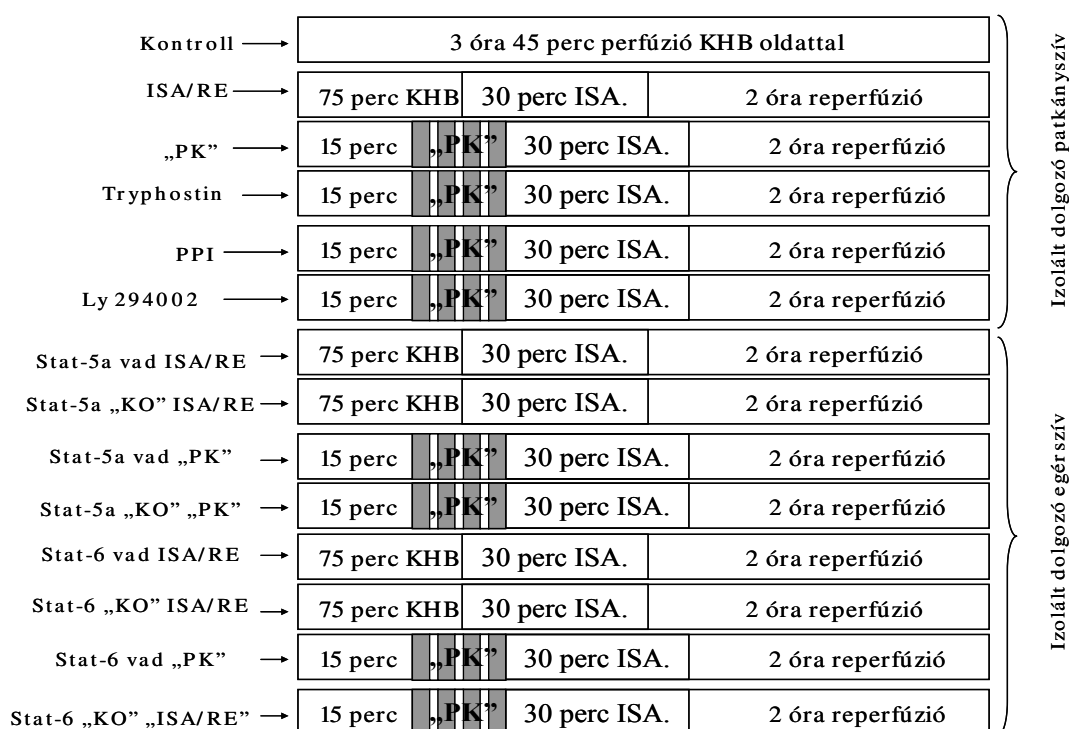
Az iszkémiás prekondíció (PK) jelentőségével és molekuláris folyamataival egyre több tudományos közlemény foglalkozik az utóbbi időkben. Mechanizmusának pontos megismerése fontos eszköz lehet a szívsebészeti beavatkozásokban a hosszabb iszkémiás periódus okozta miokardiális károsodások elleni tolerancia kiépítésében. Az PK azt jelenti, hogy rövid ideig tartó iszkémiás állapotok és azokat követő reperfúzió védelmet nyújt a szívszövetnek a később kiváltott hosszabb iszkémiás inzultussal szemben. Az PK folyamata két szakaszra bontható: 1. A korai szakasz: rövid ideig tartó iszkémiás állapotot követően 1-2 óráig marad fenn. Hátterében feltehetően a NO valamint a szabad gyökök illetve az adenozin okozta molekuláris és szignáltranszdukciós folyamatok indukálása áll. A szakaszra jellemző a mitokondriális K_{ATP} csatorna aktivációja, mely a membránponteciál emelésével gátolja a sejtmembránon keresztül történő Ca^{2+} beáramlást, megakadályozva az $[Ca^{2+}]_i$ szint emelkedését. A NO szabadgyökkel szembeni előnyös védekező hatása mellett a leukocyták „migrációjának” befolyásolásával, valamint az endothélium funkciójának megőrzésével biztosít további védelmet az iszkémia indukálta károsító hatásokkal szemben (trombocytá aggregáció gátlása, a leukociták „homing”-ra kifejtett negatív hatás). A JanusK-STAT proteinek indukálta szignáltranszdukciós folyamatoknak is fontos szerepe lehet az oxidatív stressz kiváltotta apoptózis szabályozásában az által, hogy a bcl-2 gén upregulációjának illetve a bax gén downregulációja fokozásával gátolja az apoptózis folyamatát (78). 2. Késői fázis: hatása egészen 24-72 óráig érvényesül, elsősorban génexpressziós szinten nyújt védelmet a miokardium számára. Hátterében bizonyos antioxidáns enzimek génexpressziójának aktiválódása áll, elsősorban a Janus kináz aktivációjával (92). Ez utóbbi a szignál transzduktor és transzkripció aktivátor nevű faktor (STAT) révén bizonyos protektív gének szabályozását és kifejeződését indítja el (77). A késői prekondíció folyamatában természetesen számos egyéb faktor is részt vesz (NF- κ B, MAPK), amelyek közül az előbbi működésének fokozódása figyelhető meg az endotheliális NO produkció indukálta PKC aktiváció következtében. A PKC által közvetített további transzdukció során a MAPK is működésbe lép, mely a STAT proteinek serin-oldalláncainak foszforilációjával lehetővé teszi a kettősen foszforilált STAT (STAT-1, STAT-3) proteinek transzlokációját a nukleuszba és ott az iNOS génexpressziójának szabályozását (73;91). A korábbi publikációk már felvetették annak lehetőségét, hogy egyéb STAT proteinek is szerepet játszhatnak az iszkémiás prekondíció folyamatában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK III.

A STAT5A és STAT6 egerek létrehozása:

A „knock out” egerekben, a STAT5A és STAT6 gén teljes hiánya volt detektálható, s az egereket a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) biztosította számunkra. Western blot analízis megerősítette ezeknek a proteineknek a hiányát azokból a szívekből, melyek KO egerekből származtak. Az KO egerekhez tartozó vad típusú állatok genetikai vonalait (B6129SF2/J101045-STAT5A és BALB/cJ000651-STAT6) szintén a fent említett forgalmazó biztosította.

Kísérleti protokoll:



23. ábra. Kísérleti terv

A kísérleteink alatt két modellrendszert használtunk. 1. Izolált dolgozó patkányszív perfúziós rendszert, melynek során a szívet iszkémia/reperfúciónak illetve prekondicionálásnak vetettük alá. 2. Izolált dolgozó egérszív metodikát, melyet STAT5A és STAT6 genetikailag manipulált egerek esetében alkalmaztunk. A patkányszívekkel (hím Sprague-Dawley) történő kísérletek során az állatokat 3 csoportra osztottuk. Az első csoportnál normál perfúziót alkalmaztunk 3 óra 45 percig. A második kísérleti csoportban

30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót alkalmaztunk. A harmadik csoportban a szíveket prekondicionáltuk a következő módon: 4 ciklusú 5 perc rövid iszkémia és az azt követő 10 perces reperfúzió útján, melyet 30 perc globál iszkémia és 2 óra reperfúzió követett. A prekondicionálás folyamán a szíveknél a következő kezeléseket alkalmaztuk: **1.** tyrphostin AG 490, (inhibitor JAK 2 -re); **2.** 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl)-pyrazolo-3, 4-D-pyrimidine (PPI); (Src kináz inhibitor) **3.** LY-294002 (phosphatidylinositol PI-3 kináz inhibitor). Az inhibitorokkal 15 percig perfundáltuk a szíveket retrográd módon majd ezt követően 30 perc globál iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vetettük alá azokat. A „knock out” egerekkel történő kísérleteinkben a következő protokolnak megfelelően jártunk el: 30 perc globál iszkémiát követően 2 óra reperfúziót alkalmaztunk. A szívek izolálását, perfúzióját és a mért paramétereket egy korábbi fejezetben ismertettük.

Infarktusos terület meghatározása:

Az infarktusos terület módszerét és meghatározását részleteiben ismertettük.

Westren blot analízis:

A bal kamrából származó szöveteket homogenizáltuk (mM-ban): 25 Tris HCl, 25 NaCl, 1 orthovanadát, 10 NaF, 10 pyrophosphát, 10 okadaik sav, 0.5 EGTA, és 1 PMSF jelenlétében. Minden egyes szívből 100 µg protein homogenátumot inkubáltunk 1µg antitesttel 1 óran keresztül 4 C^o-on mely, STAT6 illetve STAT5A ellen lett termeltetve (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA). Ezt követően a keletkezett immunkomplexet kicsapattuk A-sepharose protein segítségével, majd a keletkezett terméket elektroforizáltuk SDS-PAGE gélen. Az így elválasztott proteineket immobilizáltuk egy polivinil-difluorid membránon, amit blottoltunk phosphotyrozin antitesttel, a STAT5A és STAT6 proteinek foszforilációs fokának ellenőrzése végett. Keletkezett terméket ezután láthatóvá tettük egy képalkotó módszer segítségével, az így létrejött protein sávokat, majd intenzitásuk szerint jellemeztük egy NIH nevű program használatával.

TUNEL módszer:

A módszer ismertetését a 27. oldalon megtettük.

Statisztikai analízis:

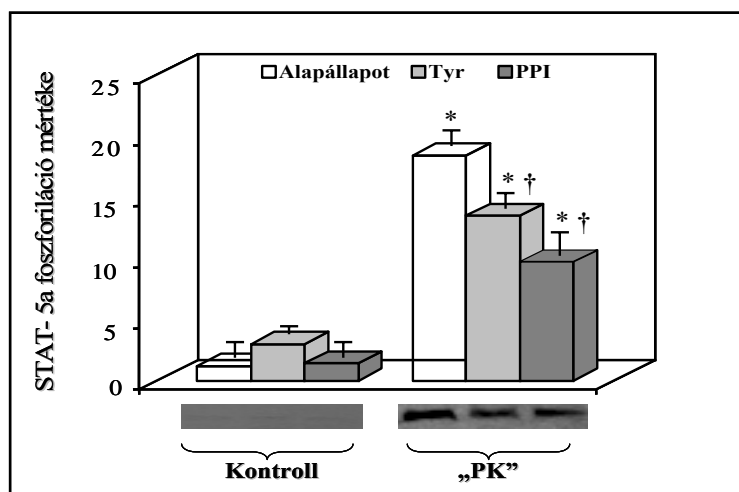
A funkcionális paraméterek, apoptotikus sejtek, valamint az infarktusos területet, mint számszerű átlagot és szórást fejeztünk ki. Az adatok statisztikai elemzése esetében egy-

mintás variancia analízist alkalmaztuk a csoportok közötti különbségek megállapítására. Az így nyert eltérések analízisét Student t-teszt használatával valósítottuk meg. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha *p érték kisebb volt, mint 0,05.

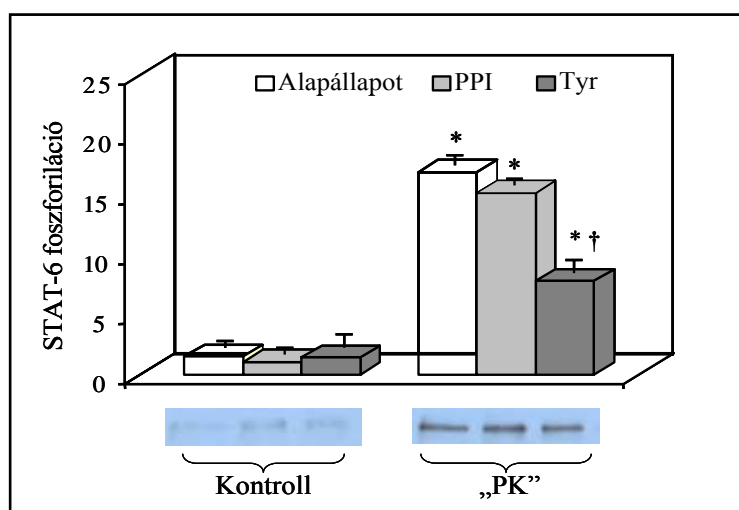
EREDMÉNYEK III.

Az izolált patkányszív kísérlet:

Western blot analízis bizonyította számunkra, hogy a STAT5A és STAT6 erősen foszforilálódott a prekondicionálás során (24. ábra). Tyrphostin vagy PPI-nek nem volt hatása mindkét proteinforma vad típusú foszforilációjának gátlására, viszont nem teljes mértékben hatásosak voltak STAT5A foszforilációs állapotának negatív irányba történő befolyásolására. A PPI sikeresen blokkolta a STAT5A foszforilációját, bizonyítva, az src szerepét a STAT5A foszforilációban, viszont nem volt ilyen jellegű hatása megfigyelhető a STAT6-ra. A tyrphostin rendelkezett mindkét proteinformára vonatkozó blokkoló hatással, alátámasztva a JAK2 szerepét a foszforilációs kaszkádban.



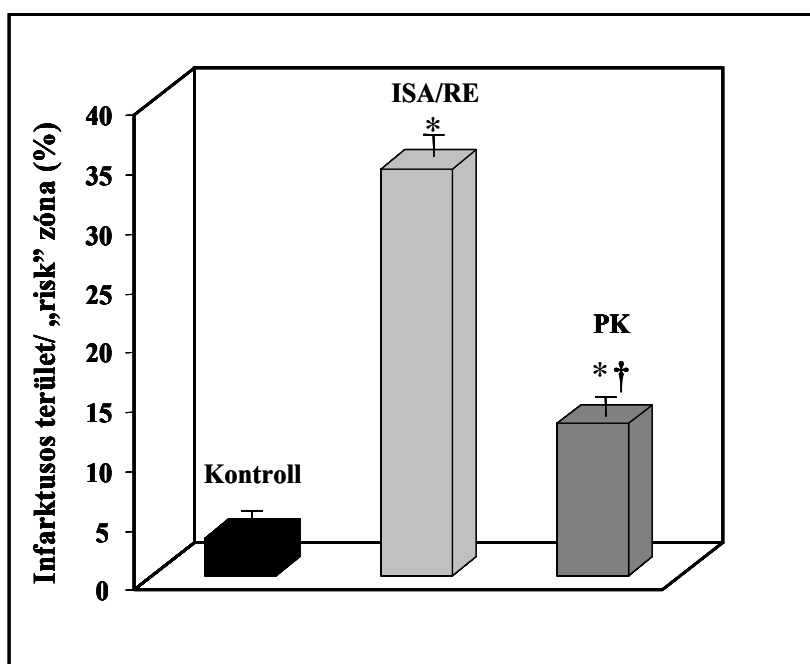
24. ábra A tyrphostin és a PPI hatása iszkémiás „PK” mediálta STAT5A foszforilációra. A citoszólikus frakció Western blot analízise azt mutatja, hogy a STAT5A foszforilálódik. A diagram a foszforiláció intenzitását szemlélteti (n=6). *p<0.05 vs. Kontroll; †p<0.05 vs. Alapállapot.



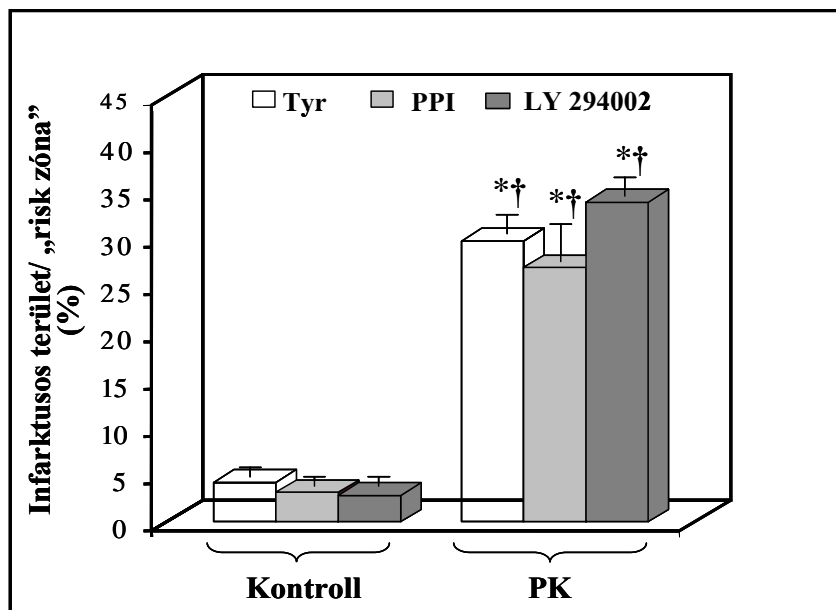
25. ábra A tyrphostin és a PPI hatása iszkémiás „PK” mediálta STAT6 foszforilációra. A citoszólikus frakció Western blot analízise azt mutatja, hogy a STAT6 foszforilálódik. A diagram a foszforiláció intenzitását szemlélteti (n=6). *p<0.05 vs. Kontroll; †p<0.05 vs. Alapállapot.

A STAT5A és STAT6 foszforiláció gátlásának hatása a miokardiális infarktusos területre és a kardiomyocita apoptózisra:

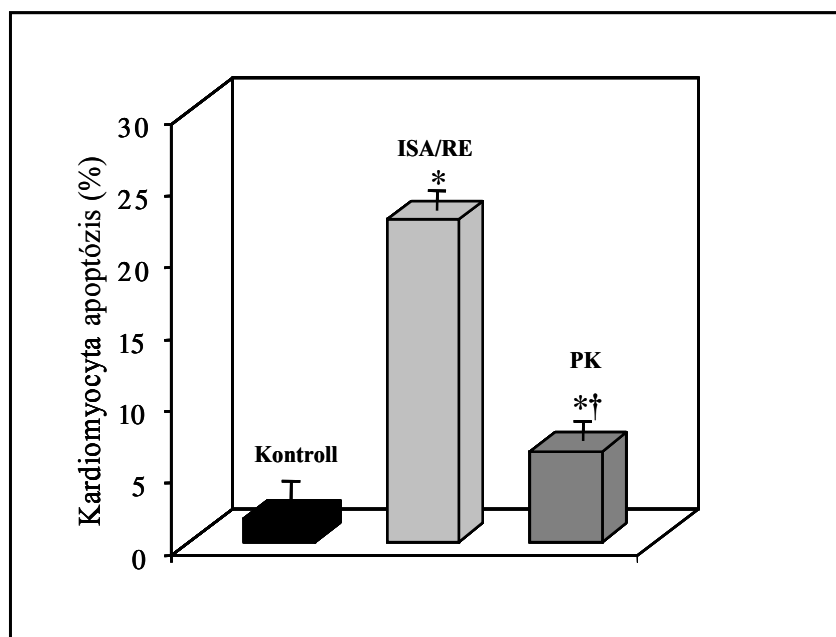
A nekrozis és az apoptózis két fontos komponense a miokardiális infarktus létrejöttének, ezért vizsgáltuk a tyrphostin és a PPI hatását kísérleti modellünkben. A vártak megfelelően az iszkémia után az infarktusos zóna nagysága illetve az apoptotikus sejtek száma növekedett, viszont azok szignifikáns mértékben csökkentek iszkémiás prekondícióban. Az alkalmazott foszforiláz inhibitorok, amelyek nem rendelkeznek semmiféle hatással a szívre, az iszkémiás prekondíció előnyös hatásait meggátolták, rámutatva arra, hogy prekondíció során egy összetett, bonyolult szignáltranszdukciós kaszkád rendszer aktiválódik. Kísérleteinkben meghatároztuk a PI-3 és Akt molekulák szerepét az ún. „downstream” szignálkaszkádban. Az LY-294002 a PI-3 kináz gátlásával teljesen megszüntette a prekondíció előnyös hatását, utalva a PI-3-Akt fontosságára a prekondíció indukálta miokardiális struktúrák és fiziológiai működés megőrzésében, ami a STAT molekulák szerepével függ össze.



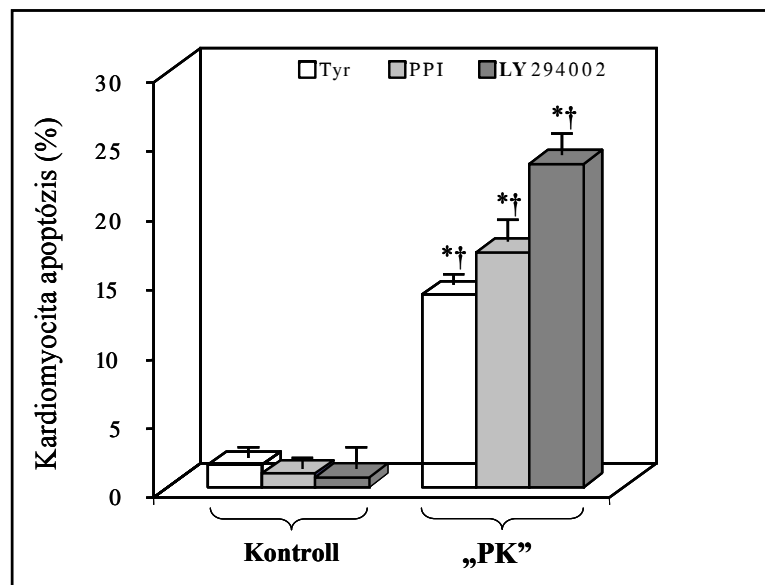
26. ábra Az infarktusos terület nagyságának változása a kontroll, iszkémia/reperfundált, és a prekondicionált szívekben. A prekondicionálás hatására az infarktusos zóna nagysága mintegy felére csökkent az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális infarktusos területhez képest (n=6). *p<0.05 vs. Kontroll; †p<0.05 vs. PK.



27. ábra Az infarktusos terület nagyságának változása a kontroll, és a prekondicionált szívekben tyrphostin, PPI-I valamint LY 294002-t történő kezelés hatására. (n=6). A foszforiláz inhibitorok hatására az infarktusos zóna nőtt. *p<0.05 vs. Kontroll; †p<0.05 vs. PK.



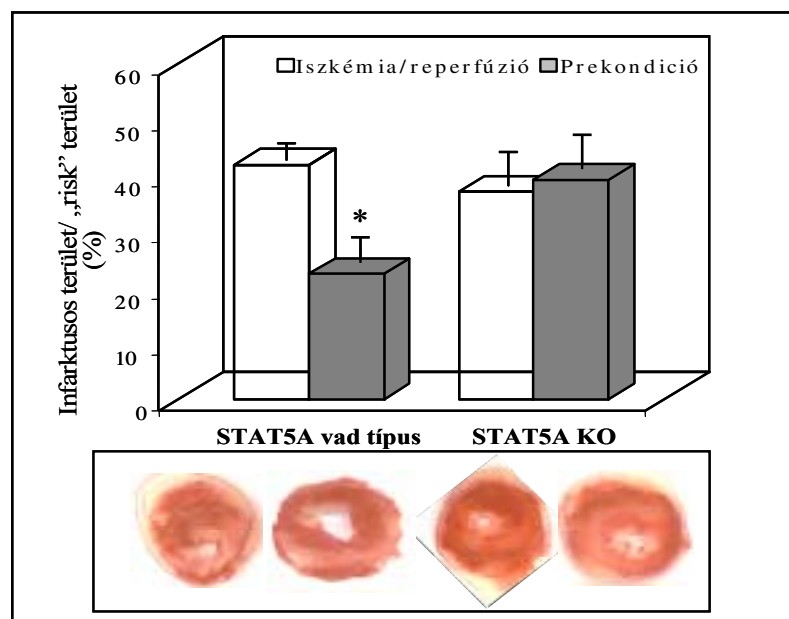
28. ábra Az apoptotikus kardiomyocita számának változása a kontroll, az iszkémia/reperfundált, és a prekondicionált szívben. A prekondíció során kardiomyociták száma mintegy 75%-kal csökkent az iszkémia/reperfúzió indukálta apoptotikus folyamathoz képest (n=6). *p<0.05 vs. Kontroll; †p<0.05 vs. „PK”.



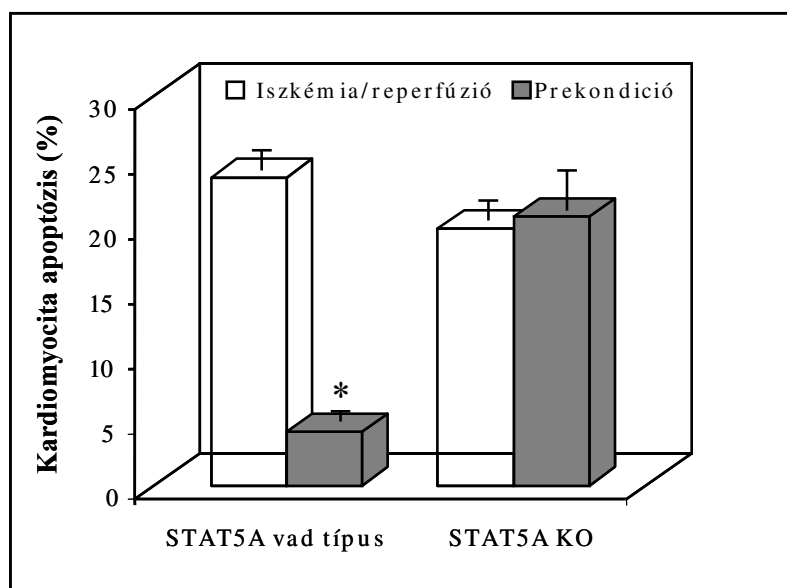
29. ábra Az apoptotikus kardiomyocita szám alakulása a kontroll, és a prekondicionált szívekben tyrphostin, PPI-l valamint LY 294002-t történő kezelés hatására. (n=6). A foszforiláz inhibitorokkal történő előkezelés megnövelte az apoptotikus sejtek számát. * $p < 0.05$ vs. Kontroll; † $p < 0.05$ vs. „PK”.

Az izolált egérszív kísérletek:

Western blot vizsgálat igazolta a STAT5A és STAT6 protein teljes hiányát mindkét KO állatvonalból származó kardiális szövetből. Az infarktusos területet és az apoptózist vizsgálva a STAT5A KO egerekben a miokardiális infarktusos terület nagysága és az apoptotikus sejtek száma emelkedett a prekondicionált szövetekben a vad típusú egyedekhez viszonyítva.

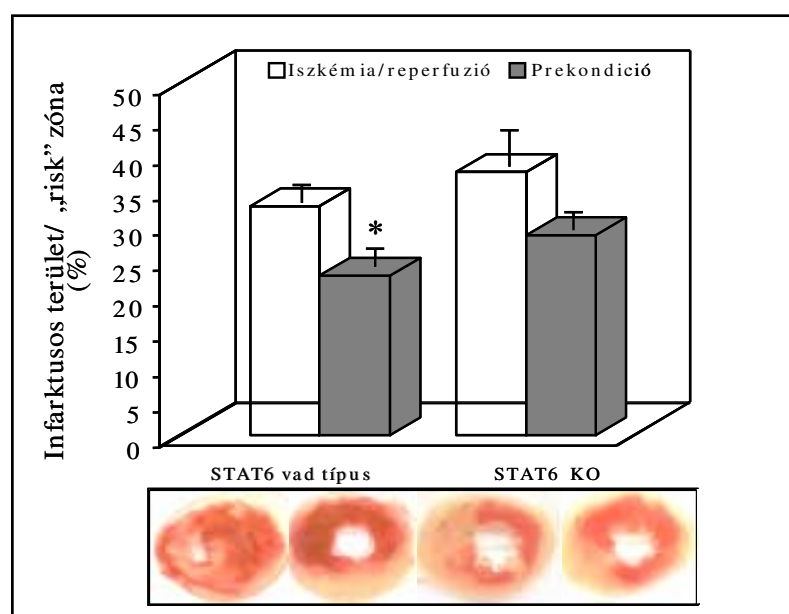


30. ábra A prekondíció hatása az infarktusos terület nagyságára STAT5A vad típusú és KO egér szívekben. Az infarktusos zóna a vad típusú miokardium transzverzális metszetében a prekondíció következményeként csökkent, ami nem volt megfigyelhető a KO egerekben (n=6). * $p < 0.05$ vs. Iszkémia/Reperfúzió szívé.

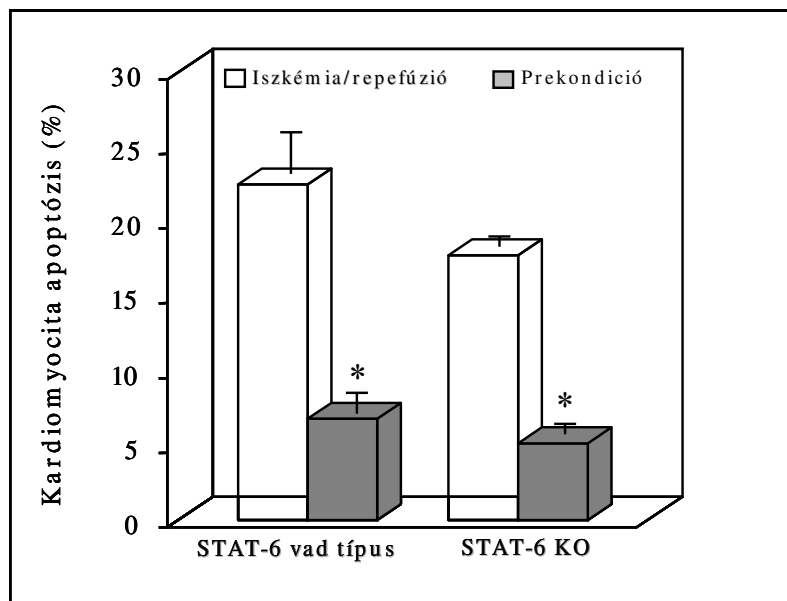


31. ábra A prekondíció hatása az infarktusos terület nagyságára valamint a kardiomyocita apoptózisra, STAT5A vad típus és KO egér szívekben. Az apoptotikus sejtek száma a vad típusú miokardium transzverzális metszetében a prekondíció következményeként csökkent, ami nem volt megfigyelhető a KO egerekben (n=6). *p<0.05 vs. Iszkémia/Reperfúziónt szív.

A prekondicionált STAT6 KO iszkémia/reperfundált egér szívekben csökkent infarktusos területet és apoptotikus sejt számot kaptunk a STAT KO egérszívekkel összehasonlítva mely, a vad típusú egérszívekhez viszonyítva nagyobb volt.



32. ábra A prekondíció hatása az infarktusos terület nagyságára STAT6 vad típusú és KO egérszívekben. Az infarktusos terület a vad és a KO típusú miokardium transzverzális metszetében a prekondíció következményeként csökkent az iszkémia/„reflow”-on átesett miokardiumhoz képest (n=6). *p<0.05 vs. Iszkémia/Reperfundált szív.



33. ábra A prekondíció hatása a kardiomyocita apoptózisra, STAT6 vad típus és KO egérszívekben. Az apoptotikus sejtek száma a vad és a KO típusú miokardium transzverzális metszetében a prekondíció következményeként csökkent az iszkémia/"reflow"-on átesett miokardiumhoz képest (n=6). *p<0.05 vs. Iszkémia/Reperfundált szív

A szívfunkciók:

A szívfunkciók vizsgálatakor a STAT5A vad típusú egerekben melyek korábban iszkémiás prekondíciónak voltak alávetve, a kardiális paraméterekben javulást mutattak az iszkémia/reperfundált csoporthoz képest. Ugyanez a hatás nem volt azonban megfigyelhető a STAT5A KO egerekben, még prekondíció alkalmazásakor sem. A STAT6 csoporttal végrehajtott izolált egérszíves kísérletek során, a prekondíció előnyös hatásai hűen tükröződtek a vizsgált paraméterekben, mind a vad illetve a KO szívek esetében.

IV. Mitokondriális gének (COXB III, ATPS6) és a Hemoxigenáz-I (HO-I) szerepe a ventrikuláris arrhythmiákkal szemben.

A szívbetegségek, és a szívsebészeti beavatkozások alkalmával a szívizom iszkémiás inzultusnak van kitéve. A reperfúzió előidézte károsodások következményeként kamrai arrhythmiák jöhetnek létre, melynek eredményeként a szív teljesítménye romlik. Az emlős sejtek, szövetek, szervek érzékenyen reagálnak a csökkent oxigén ellátásra, és fiziológiailag fontos gének proteinek, enzimek expressziójával válaszolnak. A hemoxigenáz (HO) jelentőségét az iszkémiás miokardium károsodásai elleni védőmechanizmusokban már több kutató felvetette (96;97). Az enzim működés alkalmával oxigén és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfiringyűrűjének α -metin hídját, amely így nyíltláncú biliverdinné alakul, s közben felszabadul a vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid (CO) keletkezik (2;106). A porfiringyűrűből felszabaduló vas prooxidáns tulajdonságú, míg ezzel ellentétben a keletkező biliverdin, illetve redukált formája a bilirubin hatékony antioxidáns molekula (107;108). Egyre több bizonyíték van arra is, hogy a folyamat harmadik terméke a CO fiziológiai jelátvivő molekulaként funkcionálhat illetve, hogy képes a guanil-cikláz aktiválására, ezáltal a celluláris cGMP szint szabályozására (3). Az I-es és II-es típusú diabetes pathomechanizmusa egyaránt szoros kapcsolatban van a kardiovaszkuláris komplikációk kialakulásával, mint pl. koronária artéria szűkület létrejöttével valamint a diabetikus cardiomiopátia kifejlődésével (4;5). A posztmiokardiális infarktus prognózisa szintén rosszabb diabéteszes betegekben, akiknél magasabb az előfordulása a szívelégtelenségnek és a hirtelen szívhalálnak. A diabéteszes miokardiumban, molekuláris szinten, a sarcolemmális ion transzport különböző rendellenességei figyelhetők meg, többek között a $\text{Na}^+\text{-H}^+$ és a $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ cserefolyamatok működési zavara, valamint a Ca^{2+} és $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPáz-ok működésének különböző fokú gátlása (6). A sarcoplazmatikus retikulum funkciója is károsodottnak tűnik a diabéteszes miokardiumban, mely csökkent ATP szintézisen és elektron transzfer lánc aktivitáson keresztül csökkent ATP függő Ca^{2+} transzportban és Ca^{2+} szabályozta ATPáz aktivitásban nyilvánul meg. Ebből eredően bizonyos mitokondriális gének [pl. citokróm oxidáz B III alegység (COXBIII), és az ATPáz 6 alegység (ATPS6)] expressziója hatással lehet különböző ionsatornák és ionpumpák működésére, így központi szerepet játszhat az arrhythmogenesisben, a szívfunkciók zavarában az iszkémiás/reperfundált szövetben (8). Közismert tény az, hogy az arrhythmiák kialakulásáért többek között az ionháztartás felborulása, a rendellenes ionmozgások a felelősek.

Anyagok és módszerek IV.

Izolált „dolgozó-patkányszív” és „dolgozó-egérszív” preparátum:

A dolgozó egér és patkány szívpreparátum leírása megegyezik ez előző fejezetben leírtakkal.

Diabétesz kiváltása:

A diabéteszt streptozotocin (55 mg/kg) intravénás injekciójával indukáltuk. A nem diabéteszes azonos korú kontrol állatok azonos térfogatú vivőanyagot kaptak.

Teljes RNS izolálás és Northern-blot analízis:

A totál RNS izolációját patkány szív szövetből (100 mg) 1 ml TRIzol reagensben (Gibco BRL, Germany) történő homogenizációval, guanidium thiocianát módszerrel végeztük. Az RNS pelletet oldottuk 100 µl dietil-pirokarbonát vizes oldatában, s a koncentrációkat a 260 nm-en ultraibolya spektroszkópiával mértük.

A Northern blot hibridizációt és az RNS izolálását Chomczynski és Sacchi módszere szerint végeztük. A bal kamrából preparált RNS-ből 5 µg totál RNS-t horizontális elektroforézisnek vetettünk alá formaldehid tartalmú 1% agaróz-géleken és transzferáltuk pozitív töltésű nylon membránra (GeneScreen Plus). Vákuumban 2 órán át 80 °C-ra történő melegítés után hibridizációt hajtottunk végre ³²P-vel jelölve. Az autoradiográfia és az automata radiometriás vizsgálat után kontrollként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz ismételt hibridizációt hajtottunk végre.

Western-blot analízis:

A mintákat homogenizáltuk Tris-HCl (13.2 mM/l), glicerin (5.5 %), SDS (0.44 %) és β-merkaptotanol elegyében. Az oldható proteinek azonos mennyiségét (50 µg) Tris-glicin-SDS-poliakrilamid gél (12%) elektroforézissel elválasztottuk Pellacani és mtsai leírása szerint, rekombináns patkány HO-1 protein antitestet (1:1,000, Stressgen) használva. A relatív HO-1 protein expressziót denzitometriásan analizáltuk.

HO-1 lokalizációjának meghatározása immunhisztokémiai módszerrel:

A vad típusú, heterozigóta valamint homozigóta HO-1 mutáns egerek szíveit formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyazást követően a bal kamrai szövetből 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Ezt követően két órán keresztül inkubáltuk a mintákat tisztított, patkánymájából izolált HO-1-gyel és nyúlban termeltetett, poliklonális anti-HO-1 antitesttel.

RT-PCR:

Ötven ng total RNS-t vagy pedig 20 ng mRNS-t tartalmazó mintát „amplification grade” DNáz I-el (Gibco-BRL) inkubáltuk, majd random egyszálú cDNS szintézisnek vetettük alá, 0,1 µg random 9-mer primerek (Stratagene) alkalmazásával. A mintákat, specifikus primerekkel, 12-26 ciklussal felerősítettünk optimalizált reakciókörülmények között AmpliTaq PCR kit segítségével. A primerek szekvenciája a következő volt: ATPáz 6, 312 bp: 5'-CGAACCTGAGCCCTAATA és 5'-GTA-GCTCCTCCGATTAGA; Citokróom Oxidáz III, 338 bp: 5'-CTTAGCATCAGGAGTCTC és 5'-TATCATGCTGCGGCTTCA. A fragmenseket 10 µCi [³²P] dCTP-el reakciónként megjelöltük. A be nem épült nukleotidokat 3 %-os agaróz gélen elválasztottuk, a felerősített fargmensek radioaktivitását pedig folyadék szcintillációs detektorral detektáltuk.

DNS szekvenálás és a gének azonosítása:

A szekvenáláshoz Sanger és mtsai által leirt dideoxi-mediálta lánchosszabbító/lánclezáró módszert alkalmaztuk. Az M13/pUC „univerzális és a T7/T3α szekvenáláshoz használatos primereket és a Sequenase 2.0 kitet használtuk a ³⁵S-el jelölt reakciókban. A sávokat 47 cm-es 6 % poliakrilamid/urea géleken elválasztottuk. A GenBamk és az EMBL adatbázisokban a DNS szekvenciák közötti hasonlóság keresésében Pearson-Lipman algoritmust használtunk.

A celluláris Na⁺, K⁺, és Ca²⁺ koncentrációk meghatározása:

A szíveket gyorsan, ionmentes, 100 mM/L trishidroximetil-amino-metánt és 200 mM/L szaharózt tartalmazó jéghideg pufferbe merítve 0-5 °C-ra lehűtöttük, hogy kimossuk az ionokat az extracelluláris térből. A mosási periódust követően a szíveket 48 órán keresztül 100 °C-on szárítottuk, majd 20 órán keresztül 550 °C-on tartva elhamvasztottuk. A hamut 5 ml 3 M salétromsavban felvettük, majd ionmentes vízzel 10 x hígítottuk. A miokardiális Na⁺ tartalmat 330,3 nm-n, a K⁺ mennyiségét 404,4 nm-n, míg a Ca²⁺ koncentrációt 422,7 nm-n mértük levegő-acetilén lángban, atomabszorpciós spektrofotométer segítségével.

Az infarktusos terület meghatározása:

Az infarktusos terület meghatározásánál a fentiek szerint jártunk el.

Statisztika:

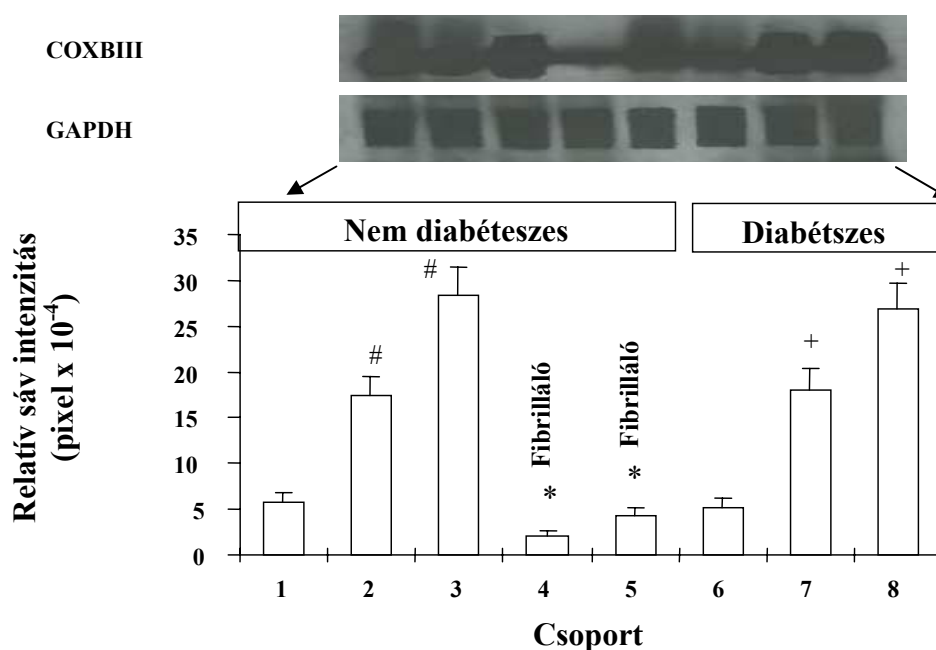
A szívfunkciók, infarktusos terület, miokardiális elektrolit koncentrációk, valamint a szöveti CO tartalom értékeinek közlésekor a számtani átlagot és a középérték standard

hibáját adtuk meg. Egyutas variancia analízis végrehajtásával állapítottuk meg, hogy van-e különbség a különböző csoportok között. Ha volt különbség, a vad típusú csoportok értékeit a HO-1 heterozigóta és homozigóta csoportéval, illetve a diabéteszes csoport értékeit a nem diabéteszes csoportokéval a Bonferroni korrekcióval kiegészített kétmintás t-tesztel hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $*p < 0.05$.

EREDMÉNYEK IV.

Az azonosított gének mRNS expressziója:

A COXBIII upregulációját tapasztaltuk már 30 perccel az iszkémia indukcióját ($p < 0.05$ a kontrollhoz viszonyítva) (34. ábra 2. csoport) és 120 perc reperfúziót követően ($p < 0.05$ a kontrollhoz viszonyítva) (34. ábra 3. csoport) nem diabéteszes, nem fibrilláló szívekben. A COXBIII mRNS expresszió jelentős mértékű csökkenését tapasztaltuk reperfúzió során mind az irreverzibilis fibrilláló (34. ábra 4. csoport), mind pedig a reverzibilis fibrilláló (34. ábra 5. csoport) nem diabéteszes szívizomban ($p < 0.05$). A diabéteszes, iszkémia/reperfúzióknak kitett szívekben (34. ábra 7. és 8. csoport) a COXBIII expressziója jelentős mértékben emelkedett összehasonlítva a diabéteszes aerob kontroll (34. ábra 6. csoport) értékekkel ($*p < 0.05$).

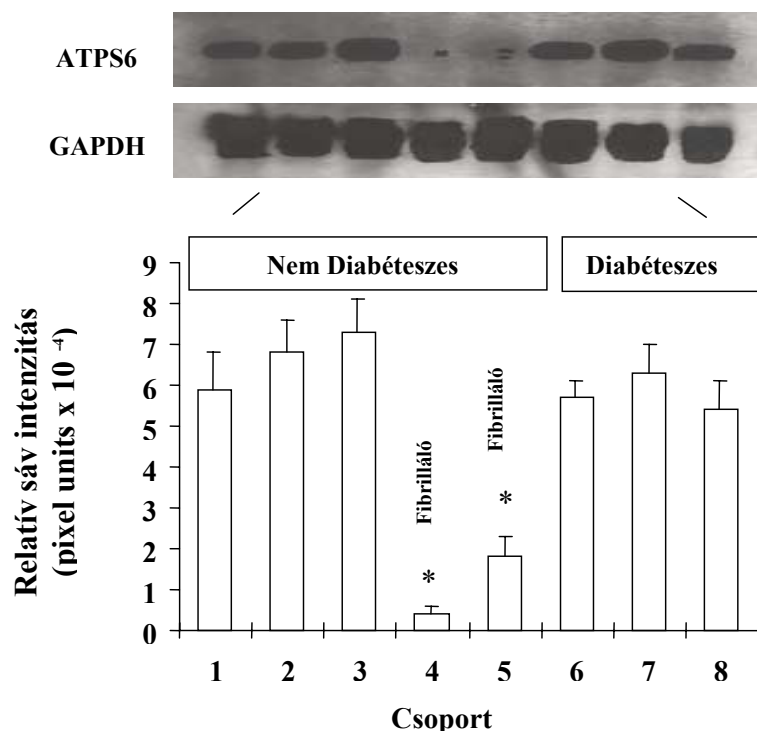


34. ábra, A COXBIII expressziója diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban.

Aerob nem diabéteszes kontrol; 2: iszkémiás, nem diabéteszes miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált, nem diabéteszes miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált, nem diabéteszes, irreverzibilisen fibrilláló miokardium; 5: iszkémiás/reperfundált, nem diabéteszes, reverzibilisen fibrilláló miokardium; 6: aerob diabéteszes miokardium; 7: iszkémiás, diabéteszes miokardium; 8: iszkémiás/reperfundált, diabéteszes miokardium; $n=6$ csoportonként, # $p < 0.05$ összehasonlítva a nemiszkémiás nem diabéteszes szívekkel (1. csoport). * $p < 0.05$ az iszkémia/reperfúziós, nem fibrilláló csoporthoz viszonyítva (3. csoport). + $p < 0.05$ a nemiszkémiás diabéteszes csoporthoz viszonyítva (6. csoport).

Az ATP5A6 upregulációját szintén tapasztaltuk, azonban eltérően a COXBIII-tól ez nem volt statisztikailag szignifikáns 30 perc iszkémiát (35. ábra 2. csoport) és 120 perc reperfúziót (35. ábra 3. csoport) követően a nem diabéteszes/nem fibrilláló szívizomban. A reperfúzió során irreverzibilis (35. ábra 4. csoport), illetve reverzibilis fibrilláción (35. ábra 5. csoport) átesett szívek esetén az ATP5A6 expresszió jelentős mértékű downregulációját

tapasztaltuk. Az ATPS6 expresszió diabéteszes, iszkémia/reperfúciónak (35. ábra 7. és 8. csoport) kitett szívekben hasonló mértékű volt, mint a nem diabéteszes/nem fibrilláló csoporté.

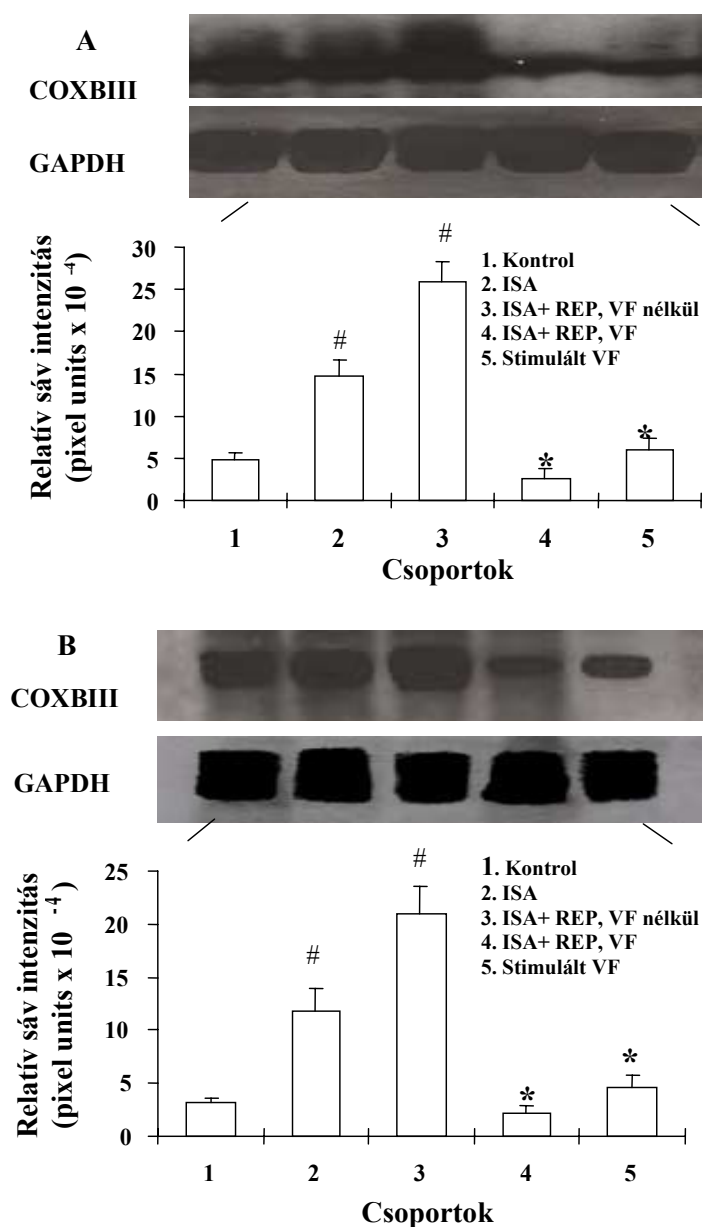


35. ábra, Az ATPS6 expressziója diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban.

Aerob nem diabéteszes kontroll; 2: iszkémiás, nem diabéteszes miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált, nem diabéteszes miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált, nem diabéteszes, irreverzibilisen fibrilláló miokardium; 5: iszkémiás/reperfundált, nem diabéteszes, reverzibilisen fibrilláló miokardium; 6: aerob diabéteszes miokardium; 7: iszkémiás, diabéteszes miokardium; 8: iszkémiás/reperfundált, diabéteszes miokardium; n=6 csoportonként, *p<0.05 a nem fibrilláló, iszkémiás/reperfundált csoporttal összehasonlítva (3. csoport).

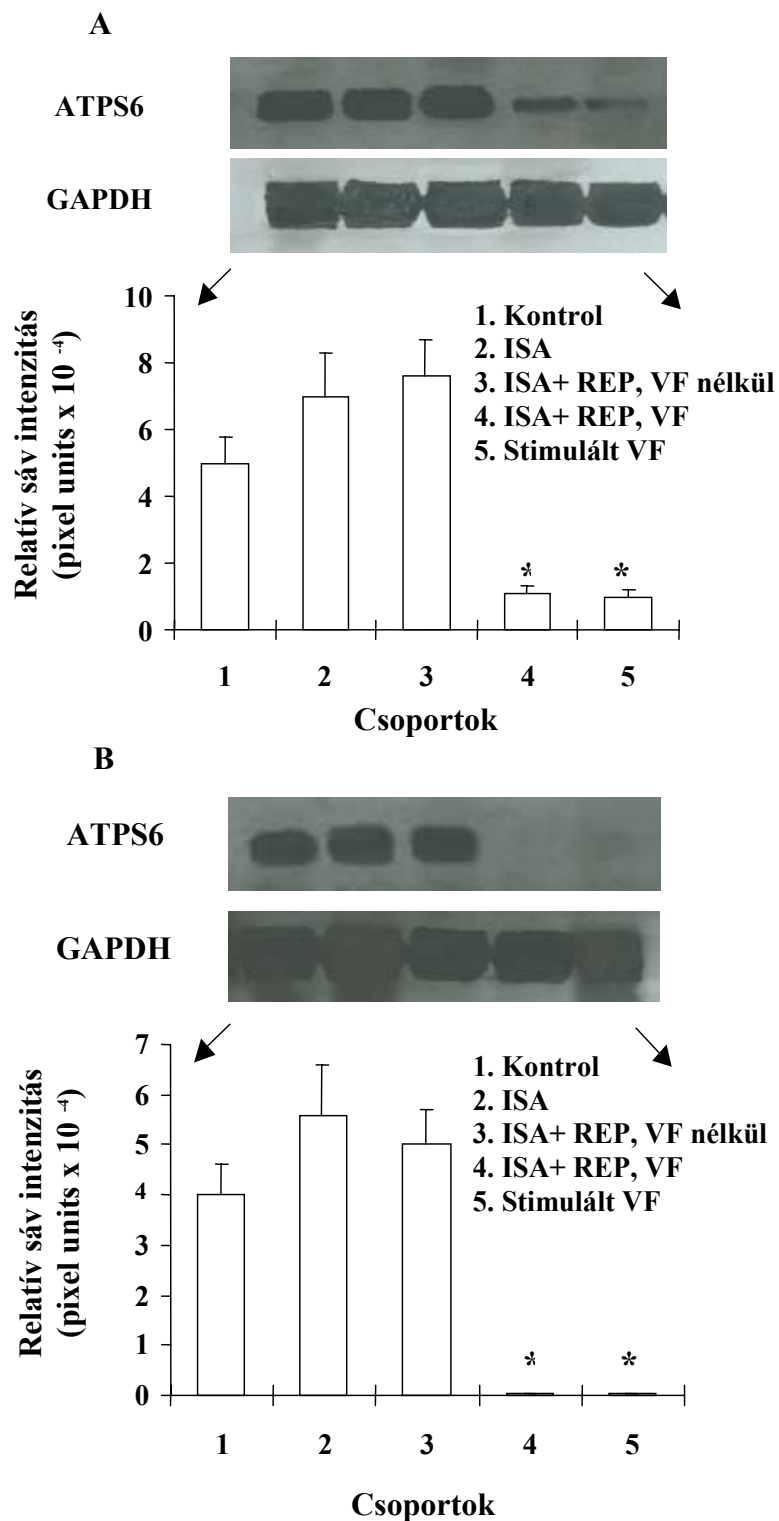
A vizsgált gén expressziója 30 perc iszkémiát követően (36. ábra A, 2. csoport) nőtt az aerob kontroll csoporthoz (36. ábra A, 1. csoport) viszonyítva. Ez a növekedés 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúciónak kitett nem fibrilláló szívizomban (36. ábra A, 3. csoport) még jelentősebb volt. Továbbá, iszkémia/reperfúciónak kitett fibrilláló szívizomban (36. ábra A, 4. csoport) a COXBIII expresszió jelentős mértékű csökkenését figyeltük meg. Ugyanezt a csökkenést tapasztaltuk az elektromos úton fibrillációba hozott szívizom esetében (36. ábra A, 5. csoport). A COXBIII expresszió változásai diabéteszes szívizomban megegyeztek a nem diabéteszes csoportban tapasztaltakkal (36. ábra B 1-5 csoportok). Az 37. ábra az ATPS6 gén expressziójának változását mutatja nem diabéteszes (A) és diabéteszes (B) szívizomban. Hasonlóan a COXBIII expressziójának változásához, az iszkémia/reperfúzió indukálta (37. ábra A-B, 4. csoport), illetve az elektromos úton

kiváltott kamrafibrilláció (37. ábra A-B, 5. csoport) jelentős mértékű intenzitás csökkenést eredményezett, mind a diabéteszes, mind pedig a nem diabéteszes csoportban az ATP56 expressziójában összehasonlítva az iszkémia/reperfúciónak kitett, nem fibrilláló szívekkel. (37. ábra A-B).



36. ábra, A reperfúzió-indukálta és elektromos úton kiváltott VF hatása a COXBIII expresszió változására nem diabéteszes (A) és diabéteszes (B) szívizomban.

Aerob kontrol; 2: iszkémiás miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált fibrilláción átesett miokardium; 5: iszkémiás/reperfundált, elektromos úton fibrillációba hozott miokardium; #p<0.05 összehasonlítva a nemiszkémiás szívekkel (1. csoport). *p<0.05 az iszkémia/reperfúziós, nem fibrilláló csoporthoz viszonyítva (3. csoport).



37. ábra , A reperfüzió-indukálta és elektromos úton kiváltott VF hatása az ATPS6 expresszió változására nem diabéteszes (A) és diabéteszes (B) szívizomban.

Aerob kontrol; 2: iszkémiás miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált fibrillációban átesett miokardium; 5: iszkémiás/reperfundált, elektromos úton fibrillációba hozott miokardium; * $p < 0.05$ az iszkémia/reperfüziós, nem fibrilláló csoporthoz viszonyítva (3. csoport).

Szívfunkciók, szérumban glükóz tartalom:

A szívfunkciók közül az AF, valamint a LVDP, csökkent a diabéteszes szívizomban (szérumban glükóz: 508 ± 31 mg/dl), összehasonlítva az azonos korú nem diabéteszes (szérumban glükóz: 128 ± 31 mg/dl) csoporttal. A reperfúzió viszonylag gyenge szívfunkciókat eredményezett a nem diabéteszes nem fibrilláló szívizomban. Azon iszkémia/reperfúzióknak kitett nem diabéteszes szívekben, melyekben az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodást reperfúzió indukálta kamrafibrilláció kialakulása tovább súlyosbította, a posztiszkémiás szívfunkciók további romlását figyeltük meg. Az eredmények jól magyarázhatók azzal az ismert ténnyel, mely szerint a VF megjelenése erősíti a reperfúzió indukálta sérüléseket. Vagyis egy akut iszkémiás esemény, melyhez kamrafibrilláció társul a posztiszkémiás szívfunkciók további romlását eredményezheti mind nem diabéteszes, mind pedig a diabéteszes miokardiumban.

Elektromosan fibrillációba hozott, nem diabéteszes és diabéteszes szívizomban egyaránt, a fibrilláció utáni szívfunkció értékei jobbak voltak az iszkémia/reperfúzióknak kitett és fibrilláló szívek értékeihez viszonyítva. Ugyanez a tendencia volt megfigyelhető a diabéteszes, iszkémia/reperfúzióknak kitett, fibrilláló és nem fibrilláló szívekben, bár a szívfunkciók és a kontraktilitás jelentős mértékben rosszabbak voltak, mint az azonos korú nem diabéteszes csoporté.

HO-1 „knock out” egerek:

HO-1 „knock out” életképes egerek csak HO-1^{+/-} (heterozigóta) egyedek, vagy HO-1^{+/-} (heterozigóta) és HO-1^{-/-} (homozigóta) állatok pároztatásával jöhetnek létre. A homozigóta egyedek túlélési %-a kb. 18 %. A HO-1^{-/-} (homozigóta) szülők pároztatása nem eredményez életképes almot. Ezért a kísérleteinkhez szükséges HO-1 „knock out” egereket HO-1^{+/-} heterozigóta és HO-1^{-/-} homozigóta állatok egymással történő pároztatásával nyertük.

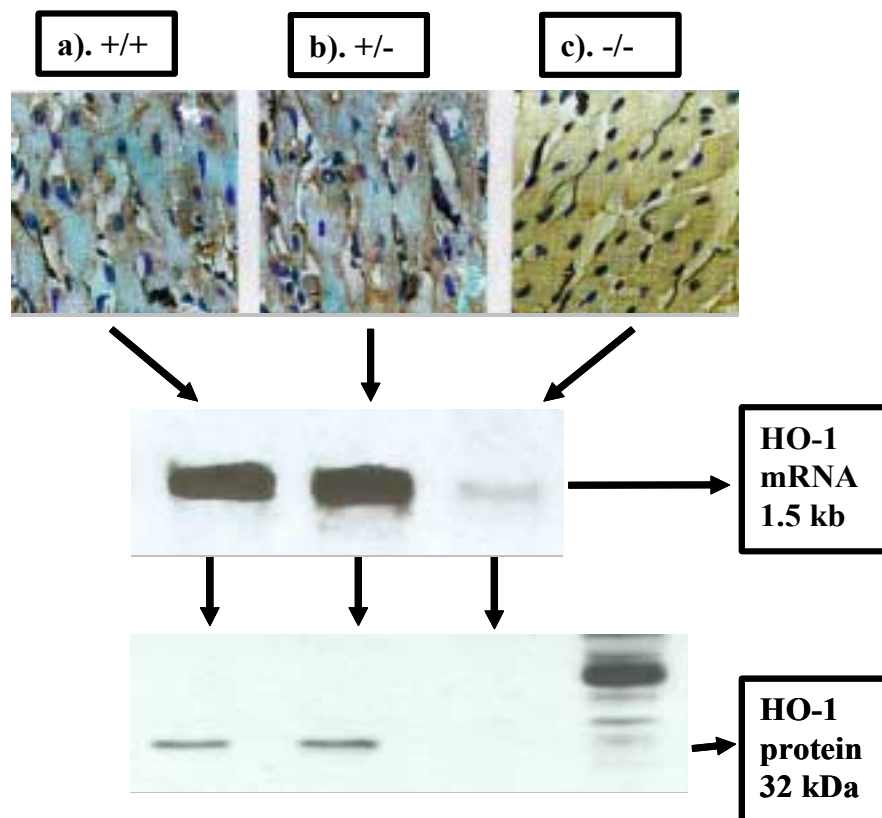
HO-1 jelenlétének igazolása egérszívből:

Megvizsgáltuk az enzim mRNS és protein expresszió változását, valamint az enzim lokalizációját Northern blot, Western blot és immunhisztokémia segítségével (38. ábra).

Aerob körülmények között perfundált HO-1^{+/+}, HO-1^{+/-} és HO-1^{-/-} egerek szívéből bal kamrai biopsziákat vettünk, majd immunhisztokémiát végeztünk. Húsz perc aerob perfúzió után átesett szívekből nyert mintákban homogén citoplazmatikus festődést tapasztaltunk a vad típusú, valamint a heterozigóta miokardiumok esetén (38. ábra felső

panel, a-b, kék festődés). HO-1^{-/-} miokardium esetén nem tapasztaltunk festődést (38. ábra felső panel, c).

Ugyanez volt megfigyelhető a Northern blot technikával kapott eredményekben, vagyis a HO-1 mRNS 1,5 kb sávját detektáltuk, mind a +/+, mind pedig a +/- egyedek esetén, míg a -/- szívekből kapott mintákban nem volt detektálható a 1,5 kb sáv (38. ábra középső panel. A Western blot mérések során az enzim proteinje detektálható volt a +/+ és +/- szívekből származó minták esetén, míg a HO-1^{-/-} mintákban nem volt detektálható a HO-1 protein (38. ábra alsó panel).

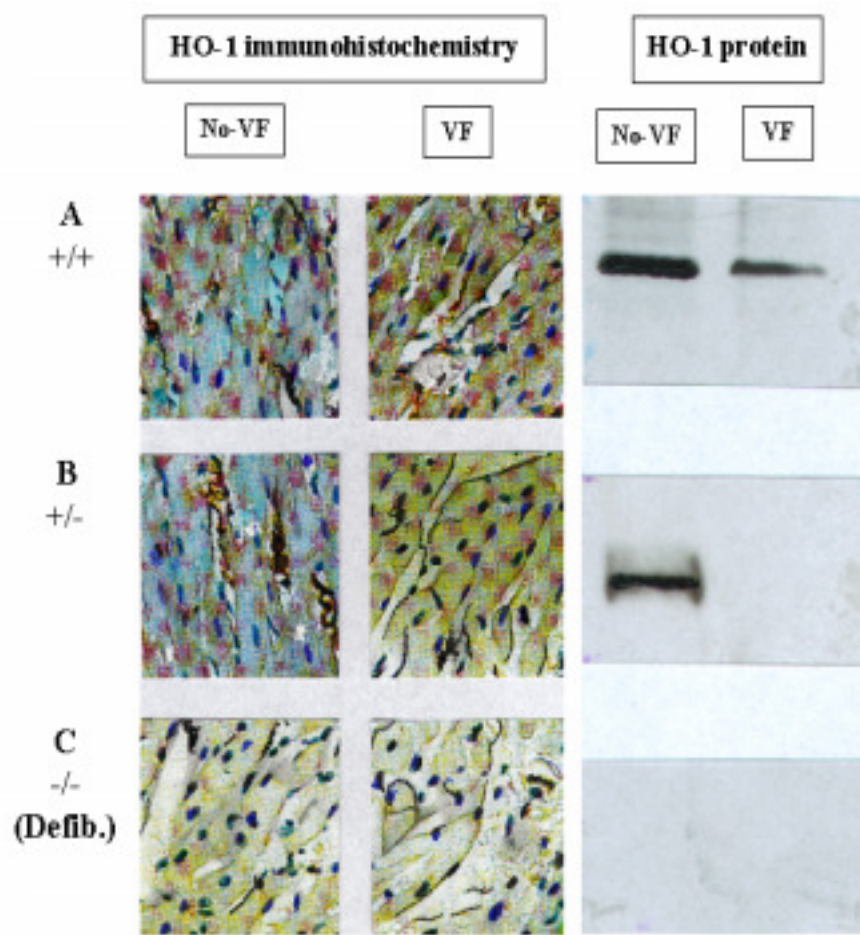


38. ábra, A HO-1 lokalizációjának és expressziójának vizsgálata aerob perfúzióan átesett egér miokardiumban.

a). vad típusú, b). heterozigóta, c). HO-1 „knock out” egér miokardium
Felső panel: immunhisztokémia, középső panel: Northern blot, alsó panel: Western blot

HO-1 expresszió vizsgálata iszkémiás/reperfundált egérszívben:

Kísérleteink során megvizsgáltuk a HO-1 protein expresszió változását fibrilláló és nem fibrilláló szívekben egyaránt, mindhárom típusú (+/+; +/-; -/-) egerekből izolált és iszkémia/reperfúziónak kitett szívek esetében, immunhisztokémia és Western blot segítségével (39. ábra).



39. ábra, A HO-1 expresszió változása iszkémia/reperfúciónak kitett izolált egérszívben.

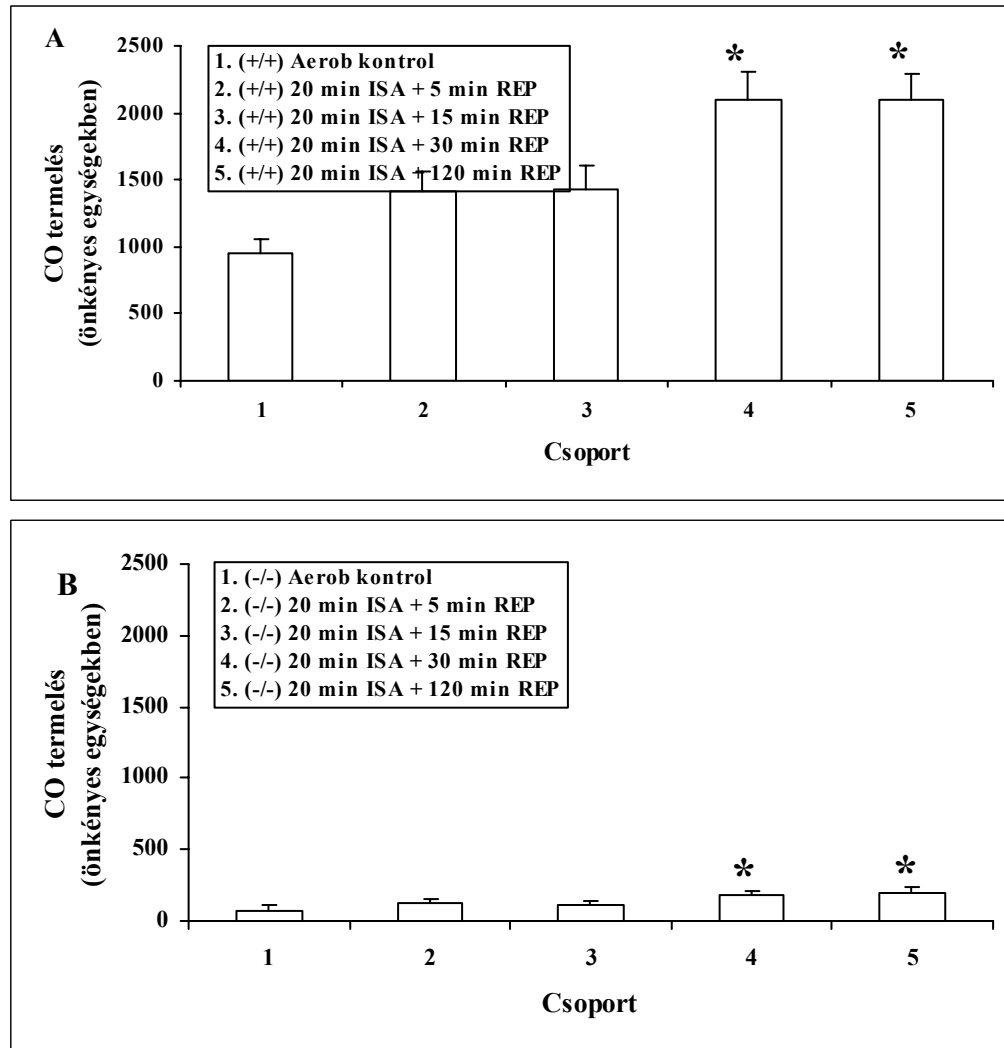
VF: fibrillált szív, No-VF nem fibrillált szív, Defib.: Defibrilláció
A) vad típusú, B) heterozigóta, C) HO-1 „knock out” egér miokardium

Abban az esetben, ha a szív fibrillált (VF) az enzim expressziója jelentős mértékben csökkent (csökkent festődés) a vad típusú $+/+$ (39. ábra A) és a $+/-$ heterozigóta (39. ábra B) szívekben egyaránt, összehasonlítva nem fibrilláló szívizommal (No-VF). A $-/-$ homozigóta szívek esetében nem tudtuk kimutatni az enzim expresszióját sem immunhisztokémia, sem pedig Western blot segítségével (39. ábra C). Itt kell megjegyeznünk, hogy a HO-1 „knock out” állatokból izolált szívek minden esetben fibrilláltak, így ezeket elektromos úton defibrilláltuk (Defib.).

Endogén CO tartalom meghatározása:

A következő ábrán a gázkromatográfiás mérések eredménye látható 20 perc iszkémiát és az azt követő 5, 15, 30, és 120 perc reperfúzió átesett, vad típusú (A) és HO-1 K.O. miokardiumok (B) esetén. Jól látható, hogy az iszkémia/reperfúzió átesett és nem fibrilláló szívizomban az enzim által termelt endogén CO mennyisége jelentős mértékben

emelkedett (40. ábra A). Az iszkémia/reperfúzióknak kitett nem fibrilláló HO-1 ^{-/-} szívek esetén is tapasztaltunk kismértékű CO termelést (40. ábra B). Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy más útvonalakon keresztül is keletkezhet CO, azonban ezek az útvonalak kevésbé meghatározóak, mint a HO-1-től függő CO termelés.



40. ábra, A GC-s mérések kvantitatív eredménye.

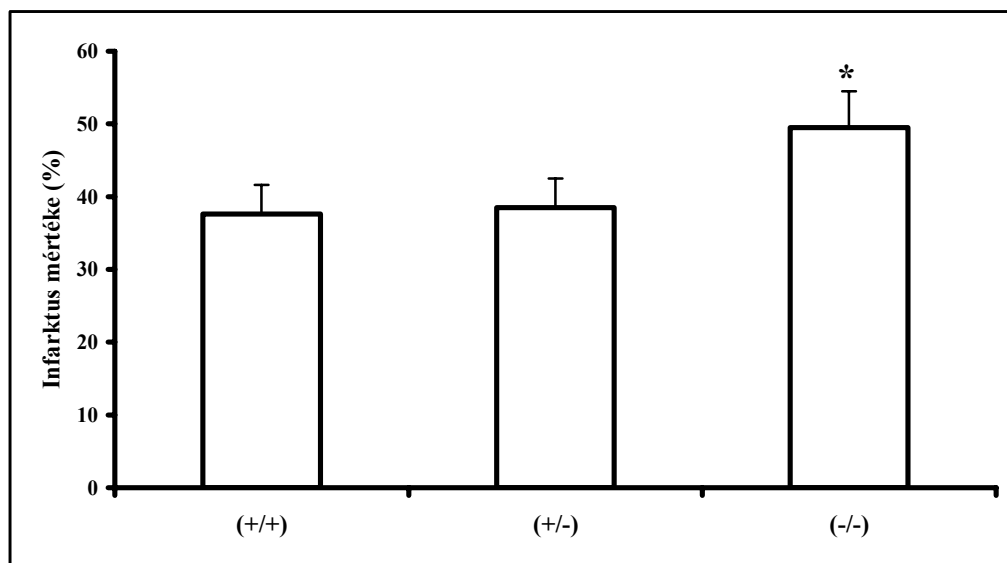
n=6 csoportonként; *p<0.05 az aerob kontrol csoporthoz viszonyítva

Szívfunkciók, infarktusos terület és miokardiális Na⁺, K⁺, és Ca²⁺ tartalom:

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk a szívfunkciókat. Az iszkémia előtti szívfunkció értékei a HO-1^{-/-} csoportnak rosszabbak voltak a vad típusú és a heterozigóta csoportéhoz viszonyítva. Ugyanilyen jelentős különbséget tapasztaltunk a csoportok között, 20 perc iszkémiát követő 30, illetve 120 perc reperfúzió során. A HO-1^{-/-} szívek a reperfúzió során mind fibrilláltak, így azokat elektromos úton defibrilláltuk (7. táblázat), s így tudtuk meghatározni a szívfunkciókat.

A szöveti Na^+ és Ca^{2+} koncentráció az iszkémia indukciója előtt szignifikáns emelkedést mutatott a HO-1^{-/-} csoportban összehasonlítva a másik két vizsgált csoport adataival. Továbbá a celluláris K^+ tartalom jelentősen alacsonyabb volt ($253 \pm 8 \mu\text{mol/g}$, száraztömegre) a homozigóta knock out szívekben, mint az aerob perfúzió átesett vad típusú szívizomban ($278 \pm 7 \mu\text{mol/g}$, száraztömegre). Az iszkémiás miokardium reperfúziója a celluláris iontartalom, hasonló mértékű zavarát eredményezte minden vizsgált csoportban, mely a -/- csoportban még súlyosabb volt.

Az infarktusos terület nagysága jelentős mértékben nagyobb volt a HO-1^{-/-} csoportban ($49,5 \pm 5 \%$, $p < 0,05$) összehasonlítva a vad típusú ($37,6 \pm 4 \%$), illetve a heterozigóta ($38,5 \pm 4 \%$) csoport értékeivel.



41. ábra, Az infarktusos terület nagysága iszkémia/reperfúciónak kitett izolált egérszívekben.

(+/+): vad típusú, (+/-): HO-1 heterozigóta, (-/-): HO-1 „knock out” homozigóta miokardium
 * $p < 0.05$ a (+/+) csoporthoz viszonyítva.

DISZKUSSZIÓ

I. Diskusszió

A HFE mutációból adódó vas depozíció, az általa indukált sejtkárosító folyamatok szoros összefüggést mutatnak a szabadgyökök indukálta folyamatokkal, melyek nem megfelelő kezelés hiányában súlyos szervi működési zavarokat idézhetnek elő. Ezen betegségek kezelési alternatívái viszonylag szűk spektrumúak, mivel a várható eredményesség igen csekély sikert mutat. Az extenzív mennyiségű vasat tartalmazó szervraktárak (lép) eltávolítása (phlebotomia) lehet megoldás, amely hosszú távon a beteg állapotát javíthatja. A HFE mutáció következtében gyakori módon jelentkeznek különféle májbetegségek, amelyek magukba foglalják a májcirrhosis és a hepatocelluláris karcinoma jelenlétet (12;13). Itt a megoldást a májtranszplantációs beavatkozás jelentheti a betegek számára, de ezt a nagyban befolyásolja a megfelelő kompatibilis donorok száma. Gyógyszeres alternatív megoldásként még Fe^{2+} -kelátor, deferoxamine alkalmazás is szóba jöhet, amely sikerrel kecsegtet (17). Ugyanakkor C-vitamin adása az ilyen betegek számára ellenjavallt, mivel az aszkorbinsav súlyosbíthatja a vas által előidézett toxicitást. Természetesen a megfelelő terápia megválasztásában bizonyos szérumproteinek monitorozása feltétlenül szükséges és ezek értékei alapvetően meghatározzák a sikeres kezelést (szérum transferrin, szérum ferritin).

A jelenlegi tanulmányban modelleztük a haemokromatózis nevű kórképet, amelyet a Fe^{2+} felhalmozódás jellemez a parenchymás szervekben, magába foglalva egyaránt a szívet és májat. Az előbbi szervet érintő patológiás folyamat, a miokardiális szöveti elemek esetében fibrózis kifejlődése révén súlyos vezetési zavarokat és kardiomyopáthiát idéz elő (14;15). Fontos tehát a patológiás folyamat mechanizmusának megismerése, mely segíthet effektíve hatásos terápiás intervenciók megtervezésében. Munkánk célja az volt, hogy direkt korrelációt tárjon fel a diéta vastartalma és a HFE mutáció polimorfizmusa között, amely nagymértékben befolyásolja az iszkémia/reperfúzió okozta szív károsodásokat. A vasterápia következtében kialakuló dózis-hatás jellegű eredményeket alátámasztja diéta vastartalmától függően változó csökkent posztisztkémiás funkciók, emelkedett apoptotikus kardiomyocita szám, megnövekedett infarktusos terület egyaránt a vad és a HFE „knock out” egerekben. Az antioxidáns enzimstátusz is tükrözi a diéta vastartalmának jelentőségét és szerepét az indukált oxidatív stressz ellen védekező mechanizmusokban, amelyek a nagy mennyiségben keletkező toxikus gyökök ellen nem elégségesek. Az oxidatív stressz előidézte lipid-

peroxidáció, melyet az MDA tartalom HPLC meghatározásával detektáltunk, szoros összefüggést mutatott az állati takarmányok vastartalmával (nagyobb Fe^{2+} adag-nagyobb oxidatív károsodás). Tehát a diéta vastartalma és az HFE polimorfizmus szoros összefüggést mutat az oxidatív károsodásokkal szembeni fogékonyságra.

A nem heme-hez kötött vas depozíciója igen súlyos toxicitást eredményez a szívben, kezdetben ez vezetési zavarok, és arrhythmiai formájában jelentkezik, hosszú távon pedig kardiomyopáthiát idéz elő. A vas túltelítődéssel járó szívgyengeséget általában a vas megjelenéséből eredményezhető szisztolés és diasztolés funkciók romlása kíséri (18). A Fe^{2+} által előidézett károsodások folyamata még nem teljesen tisztázott, viszont kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a Fe^{2+} jelen van mind vad típusú és a HFE „knock out” egerek szívizomzatában. Az szívek hisztológiai szempontból egy fokozott kötőszöveti elemek (miofibrillum) jelenlétet mutatják, amelyet a mitokondriumok számának növekedése kíséri. Valójában igen nehéz különbséget tenni a krónikus vas túltelítődés okozta szívgyengeség kialakulása, valamint a Fe^{2+} okozta iszkémiás szabad gyökképződés között. Iszkémiás, reperfundált szívben a ROS vezetési zavarok és kardiális „stunning” kialakulását eredményezi, viszont a krónikus Fe^{2+} „overload” jelenség egy fokozott érzékenységet jelent a miokardium számára az oxidatív stresszel szemben (16). A vas katalizálta szabad gyök ($\text{HO}\cdot$) képződés celluláris károsító folyamatai révén súlyos zavarokat idéz elő az intakt szívszövetben. Az utóbbiban szerepe van a lipid peroxidációt jelző MDA koncentráció változásának, amely tekintélyes mennyiségben volt detektálható az HFE „knock out” 300 ppm egérszívekben a kontroll csoporthoz viszonyítva. Koronária betegségekben is kimutatták, hogy pathofiziológiájukban a ROS fontos szereppel bír, amelyek érintkezve targetjeikkel protein degradációt, DNS-törést, és lipid-peroxidációt okoznak (22;24). Ezért ROS „scavengerek” alkalmazása egy olyan terápiás intervenciók lehetőség, amely sikerrel kecssegethet az oxidatív stressz elleni védekezésben (21). Az ebselen mint antioxidáns alkalmazását követően a miokardium teljesítőképességét növelte, bizonyítva ezzel annak előnyös hatását. Az emlős szív rendelkezik saját antioxidáns enzim rendszerrel magába foglalva olyan komponenseket, mint az α -tocoferol, aszkorbinsav, β -karotin, illetve SOD, kataláz, glutathion-peroxidáz (21;23). Ezek a védekező vonal első elemei a ROS okozta károsító hatásokkal szemben, melyek direkt módon eliminálják ezeket a reakcióképes tényezőket.

Az HFE mutáció igen széles körben terjedt el bizonyos etnikai populációk között, és ott a heterozygóták (10%-os gyakoriság) elfordulása mutat összefüggést a magas vastartalomtól eredő Fe^{2+} depozícióval. Mind a kísérleti és az epideminológiai adatok azt mutatják, hogy

alacsonyabb Fe^{2+} tartalom alacsonyabb kockázatot hordoz magával a koronária betegségek kialakulásában. Klinikai szempontot figyelembe véve a magas szérumban Fe^{2+} egy rizikó faktora a koronária betegségek létrejöttének, amelyek a miokardiális infarktusból eredezhetők. A megoldást bizonyos antioxidáns komponensek általi terápia jelentheti, de az ismeretek hiánya további kísérletek végrehajtására kell, hogy ösztönözzék a kutatókat. Alternatív megoldásként még szóba jöhetnek még olyan táplálkozási komponensek, melyek képesek valamilyen módon a Fe^{2+} felszívódását megváltoztatni.

II. Diszkusszió

A Trx a redox rendszer fontos alkotója, mely thiol-csoportjai révén részt vesz több molekula redox állapotának meghatározásában, befolyásolva indirekt módon a sejt szintű molekuláris folyamatokat. A jelen tanulmányban bizonyítottuk a Trx előnyös és protektív hatását az iszkémia/reperfúzió indukálta molekuláris károsodásokkal szemben. A kísérlet eredményeit a Trx-re vonatkozólag az alábbiakban foglaljuk össze:

1. A thioredoxin génje az iszkémia/reperfúzió esetében downregulálódik, míg iszkémiás prekonfúzió során a gén aktivációja figyelhető meg.
2. A thioredoxin indukálta kedvező hatások a CDDP történő előkezeléssel blokkolhatóak voltak, amit a „recovery” posztiszkémiás funkciók romlása valamint az apoptotikus sejtek számának emelkedése, és infarktusz terület nagyságának növekedése kísért.
3. A Trx blokkolása még adaptált szív esetében is növeli az oxidatív stressz iránti fogékonyságot.
4. Azok az egérszívek, amelyekben a Trx gén több másolat formájában van jelen, nagyobb hatékonyságot mutattak az oxidatív stressz indukálta miokardiális károsodásokkal szemben.

A thioredoxin, egy fontos sejt fehérje diszulfid reduktáz, amely elsődlegesen emlős szövetekben expresszállódik, különösen a szívben. Rendelkezik dithiol és diszulfid aktív helyekkel, és elektron donorként funkcionál a ribonukleotid reduktáz, valamint thioredoxin peroxidáz számára (52). Redukálásában a Trx reduktáz nevű enzim vesz részt, amely a szükséges redukáló erőt a NADPH felhasználásával végzi. Ebben a tanulmányban a kísérletek végrehajtásával igyekeztünk bizonyítani a Trx redox regulációs szerepét a szív iszkémia/reperfúziós folyamatában. A miokardiális iszkémia/reperfúzió jelensége együtt asszociálódik ROS képződéssel, amelynek negatív hatásait az PK-val ki lehet védeni (53;54; 55). A jelenségben fontos szereppel bír a Trx mint fontos redox-szignál komponens, amely

csökkent mértékű expressziója növeli a miokardiális szövet érzékenységet az oxidatív stresszel szemben, ami apoptózis növekedésének formájában érvényesül (55). A thioredoxin két formája ismert: 1. Citoszolban és a nukleuszban lokalizálódó forma, amely mint redox-regulátor fontos, és szükséges ahhoz, hogy redukáló ekvivalenst biztosítson a Trx peroxidáz illetve ribonukleotid reduktáz, valamint számos transzkripció faktor (NF- κ B, PKC, $\rightarrow$ apoptózis gátlása) részére. 2. Mitocondriális forma (56;57).

Patkány kísérletekben a daganatterápiában alkalmazott CDDP-t vizsgáltuk, amely a sejtciklus szabályozásával valamint az apoptózis indukciójával fejti ki hatását celluláris szinten, gátolva a tumor sejtek burjánzását és növekedését. A CDDP alkalmazásával a Trx hatásai reverzibilis módon gátolhatóak voltak mind transzkripció és transzláció szinten. Az 1 mM-os CDDP-vel történő 15 perces előkezelés a Trx hatásait szinte teljes mértékben blokkolta, viszont kisebb koncentrációban a CDDP csak részben volt hatékony. Egy másik készítmény a bis-(glutathionato)-platinum (GS-Pt) is hasonló hatásokkal rendelkezik mind a Trx illetve a glutathion rendszerre (52). Számos transzkripció faktor (NF- κ B, AP-1) működése szigorúan szabályzott redox-állapotuk által a Trx mechanizmus útján (35;52). A korábbi publikációk már kitértek arra, hogy az NF- κ B és AP-1 DNS kötő képessége fokozódik iszkémia reperfüzió során, jelezve, hogy e molekulák fontos szerepet játszanak az iszkémia/reperfüzióval szembeni miokardiális tolerancia kifejlődésében (52;58). A Trx mint celluláris antioxidáns védelmet biztosít az oxidatív stressz előidézte szabadgyök képződéssel szemben. Eredményeink is mutatják azt, hogy az „overexpresszáldott” humán Trx hatásos eszközként működik, melyet kísérleteink során csökkent MDA produkció és posztiszkémiás „felépülés” jellemez. A celluláris antioxidáns „reserv” fokozott transzkripciója volt dokumentálható ugyancsak Trx jelenlétében, elsősorban Mn-SOD révén (62;63). A szabad gyökök fokozott jelenlétére a funkcionális paraméterek gyengülése, továbbá megemelkedett MDA koncentráció utal (64;65). A ROS (HO $\cdot$) szerepét az iszkémiás miokardiumban már elektron paramagnetikus rezonancia spektroszkópiás módszer alkalmazásával már számos kutató korábban kimutatta, amely nagy mennyiségben képződik reperfüzió folyamán. Számos korábbi publikáció már foglalkozott a Trx fokozott aktivációjával (transzkripció, transzláció), amely oxidatív stressz és az iszkémás prekondíció következményeként ismertté vált (62;66;67). Az eredményeink azt mutatják, hogy a Trx-nak fontos szerepe van az iszkémiás miokardium szignáltranszdukciós folyamataiban. Ez okból humán Trx gént hordozó transzgenikus egerek létrehozásával meghatároztuk a Trx protein sejtelettani jelentőségét. A human β -aktin promotor-alapú transzgenikus expressziós rendszert használatával Trx-t

génmanipulált egereket állítottunk elő és ezekből Western blot, Northern blot valamint Southern blot analízis segítségével sikerült megerősíteni a hTrx jelentőségét és szerepét. Az alkalmazott molekuláris biológiai módszerekkel viszont nem sikerült egyértelműen igazolni a hTrx expresszió fontosságát. A transzgenikus egerek alkalmazásával pozitív korrelációt figyeltünk meg a hTrx jelenléte valamint az iszkémia/reperfúzió előidézte miokardiális károsodás mérséklődése között, melyet a kontraktilis paraméterek, csökkent infarktusos terület, és apoptotikus sejtszám bizonyít. Összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy a Trx olyan tulajdonságokkal rendelkezik, melyek előnyösek és szerepet játszanak az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális károsodás mérséklődésében, illetve az iszkémiás prekonfúzió folyamatában.

III. Diszkusszió

Eredményeink bizonyítják, hogy a STAT5A és nem a STAT6 szignál transzdukciós protein fontos szerepet játszik az iszkémiás prekonfúzióban, bár mindkét protein foszforilálódik PK során. A STAT5A prekonfúziós aktivitása kétféle módon történhet: src illetve a Jak2 kináz segítségével megvalósuló szignáltranszdukcióval, az előbbinek tulajdonítva nagyobb szerepet. Az src mediálta mechanizmus valójában szorosán kapcsolódik PI-3 kiváltotta Akt-regulálta ún. túlélést biztosító molekuláris folyamatokhoz, amelyek a kardiomyocytákban csökkentik az apoptózis indukálta sejthalál mértékét (67). A vizsgált változások igen kifejezetten jelentkeztek a STAT5A KO egerekben, és ez teljesen gátolható volt Jak illetve Src valamint PI-3 kináz inhibitorok adásával vad típusú állatokban. A Jak2 inhibitor tyrphostin és Src inhibitor PPI alkalmazása STAT5A szignáltranszdukciós aktivitásának illetve a prekonfúzió hatásának nagymértékű csökkenését eredményezte, amit az apoptotikus sejtek számának, az infarktusos terület nagyságának növekedését és a szívfunkciós paraméterek romlását okozta. A korábbi publikációk jelezték, hogy a STAT-nak számos formája létezik különféle sejtfiziológiai funkciókban. A proteinek legfontosabb sajátossága az, hogy rendelkeznek SH2 doménnal mely kapcsolatba lép a tyrozin foszforilációs hellyel, elősegítve a STAT proteinek rendeződését receptoraikhoz (88). Az SH2 domain-nek közötti dimerizáció legfontosabb kulcslépése a karboxi-terminálisan elhelyezkedő foszfotyrozinn keresztül megvalósuló tyrozin foszforiláció, és nukleuszba történő transzportja. Számos tanulmányban megfigyelték, hogy iszkémia/reperfúzió során a STAT molekula aktiválódik, mely a Jak2 kináz közbenjárásával valósult meg (69). Ezzel egyidőben antiapoptotikus gének (bcl-2) upregulációját is megfigyelték utalva arra, hogy a Bcl-2-nek fontos szerepe lehet a Jak2-

STAT indukálta szignalizációban (81;91). Sikerült bizonyítanunk, hogy a STAT5A aktiváció nem csupán Jak2 révén, hanem Src segítségével is megvalósul. Több bizonyíték is amellett szól, hogy az Src kináz aktív részese a prekondíció szignáltranszdukciós folyamatainak (68,69). Korábban leírták, hogy a Src aktivációja megfigyelhető az iszkémia mediálta folyamatokban, ugyanakkor képes triggerelni a prekondíció előidézte előnyös hatásokat is. Feltehetően protein kináz C- ϵ megvalósuló folyamatról van szó, de ennek direkt bizonyítékeként igen kevés információ szolgál (74;82). A jelen munkában bizonyítottuk, hogy az Src valamint Jak2 kináz azonos módon játszik szerepet az iszkémiás prekondícióban. Az Src kináz-STAT5A indukálta Akt-IP3-mediálta szignáltranszdukciós mechanizmusoknak igen fontos szerepet tulajdonítanak az iszkémiával szembeni nyújtott protekcióban (76;88). PI-3 kináz inhibitor LY-294002 alkalmazásával indirekt módon sikerült bizonyítani azt, hogy az Akt mint végrehajtó protein vesz részt a „túlélési” folyamat során, elsősorban az apoptózist indukáló bax protein foszforilációjában, eliminálva a prekondíció nyújtotta védő hatásokat (71;94). Kísérleteink eredményei azt bizonyítják, hogy STAT5A szignálmolekula részt vesz az iszkémiás prekondíció mechanizmusában, melynek aktivációja Jak2 illetve Src kinázok révén valósul meg (72). Az Src úton történő transzdukció során az IP-3 indukálta Akt protein is részt vesz, eredményezve ezzel a prekondíció kedvező hatását az iszkémiás miokardium funkcióinak felépülésére.

IV. Diskusszió

A miokardium iszkémiája eltérő változásokat eredményezhet bizonyos gének expressziójában és a szívfunkciókban egyaránt. Az arrhythmiák, többek között a kamrafibrilláció kialakulásának mechanizmusa jól ismertek és definiáltak, azonban a VF kialakulásának genetikai okairól jelenleg kevés információ áll rendelkezésre (111;112). Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a mitokondriális mRNS expresszió, milyen kapcsolatban lehet a reperfüzió előidézte VF előfordulásával, perfundált, diabéteszes és nem diabéteszes patkány szívizomban. Továbbá vizsgáltuk a VF és a mitokondriális génexpresszió, konkrétan a COXBIII és ATP6 expresszió közötti kapcsolatot iszkémia/reperfüzióknak ki nem tett, elektromos úton fibrillált szívizomban. Kísérleteinkben a reperfüzió indukálta VF kialakulása jelentős mértékben függött a COXBIII és az ATP6 expresszió downregulációjától. Mindezt alátámasztják elektromos úton fibrillációba hozott szíveken végzett kísérleteink is, mely szerint feltehető, hogy a kamrafibrilláció felelős a génexpresszió csökkenéséért.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a vizsgált gének mRNS és protein expressziójának farmakológiai stimulálásával a reperfúzió indukálta VF kialakulása megelőzhető.

Munkánk második részében arra törekedtünk, hogy direkt összefüggést találjunk a HO-1 által termelt endogén CO jelentőségéről, a reperfúzió indukálta kamrafibrillációk kialakulásának megelőzésében. Kimutattuk, hogy a HO-1, illetve a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO produkció fontos szerepet játszik a miokardiális homeosztázisban azáltal, hogy megvédi a szívet az iszkémia/reperfúzió indukálta funkcionális károsodásoktól melyek magukba foglalják a reperfúzió indukálta VF-t is.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az iszkémia/reperfúzió mindennapos problémát jelent szívsebészeti illetve trombolitikus eljárások során, amikor a hosszabb iszkémiás peridust követő hirtelen perfúzió okozta energia-felszabadulás szabadgyök-képződést és súlyos vezetési zavarok kialakulását eredményezi. Ezért lényeges a folyamat lépésinek ismerete, ami hasznos lehet a gyógyszeres terápia megtervezésében és végrehajtásában.

A disszertáció három fő részben foglalkozik a szabadgyök indukálta kardiális károsodások jelenségével. Az első részben a HFE génmutáció és a vasterápia közötti összefüggés fontosságát vizsgáltuk, különös tekintettel a szabadgyök képződés folyamatára. Megállapítottuk, hogy a diéta vastartalma szoros korrelációt mutat az iszkémia/reperfúzió indukálta kardiális károsodások mértékével, amit az infarktusos terület nagysága és az apoptotikus sejtek számának emelkedése és a kontraktilis funkciók gyengülése kísér. Az antioxidáns enzimstátusz vizsgálata rámutatott arra, hogy ezek aktivitása lecsökkent a HFE KO egerek szívében a vasterápia következtében. Vizsgálva a nem heme-hez kötött Fe^{2+} depozícióját, igen magasnak találtuk az HFE KO egerek szívszövetében, alátámasztva a fent említett hipotézist.

A második fejezet a Trx redox protein protektív hatásával foglalkozik. Transzgenikus egerek felhasználásával bizonyítottuk, hogy a Trx hatékony volt az iszkémia/reperfúzió indukálta celluláris károsodás kivédésében, melyet a csökkent nagyságú infarktusos terület, mérséklődött apoptotikus sejtelhalás, javult posztiszkémiás funkciók egyértelműen bizonyítanak. A Trx expressziója CDDP-vel történő előkezeléssel gátolható volt, amely az általa okozott előnyös hatásokat megszüntette patkányszíven végzett kísérletekben.

A dolgozat harmadik része a STAT5A és STAT6 szignáltranszdukciós proteinek prekondícióban betöltött szerepét vizsgálta. Eredményeink azt mutatják, hogy a STAT5A rendelkezik meghatározó szereppel az iszkémiás prekondícióban, amely valójában Src tyrozin és Jak2 kináz révén valósul meg. Foszforiláz inhibitorok alkalmazása bebizonyította, hogy mind az Src illetve Jak2 indukálta STAT5A aktiváció gátolható, melyet a prekondíciós védőhatásának elmaradása kísér. STAT5A KO egerek megnövekedett infarktusos területet, és emelkedett apoptotikus sejtszámot mutattak. STAT6 KO egerekkel történő kísérletekben a STAT6 protein prekondícióban foszforilálódott, azonban ennek háttere ismeretlen volt.

A dolgozat negyedik része hemoxigenáz enzim, valamint mitokondriális citokróm oxidáz és ATPáz ventrikuláris fibrilláció elleni hatékonyságát igyekezett feltárni. A mitokondriális

enzimek (COXBIII, ATPáz 6) protektív sajátosságainak vizsgálata azokat a tényeket erősítheti meg, hogy az oxidatív foszforilációs kaszkád számos tagja anti-arrhythmogén tulajdonsággal rendelkezik, mely farmakológiai befolyásolása előnyös lehet a diabetogén szívekben gyakran előforduló kamrai fibrillációkkal szemben.

Az iszkémia/reperfúzió útján történő kísérleteink során a HO-I KO. szívek érzékenyebben reagáltak az iszkémia/reperfúzióra, amit posztiszkémiás szívfunkciók rosszabbodása jellemzett, valamint reperfúzió során, minden esetben fibrilláltak. Ezek az eredmények bizonyíthatják azokat a teóriákat, hogy a hemoxigenáz-1-nek fontos szerepe van a miokardium fiziológiájának megtartásában, vagy helyreállításában az által, hogy megvédi a szívizmot az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásoktól.

Eredményeink azt mutatják, hogy bizonyos gének fontos szerepet töltenek be az iszkémia/reperfúzió indukálta celluláris károsodások elhárításában, illetve a prekondícióban, mint védekezési mechanizmus létrejöttében. A gének gyakorlati felhasználását és génterápiás alkalmazását azonban jelen tudományos ismereteink még nem teszik lehetővé.

SUMMARY

The phenomenon of the ischemia/reperfusion has relevant role in the cardiac surgery and thrombolytic treatment, because the elevation of immediate O₂ tension causes severe free radicals generation-induced cell injury. To know the mechanisms of this type of process could be beneficial and useful tool in developing new therapeutic agents.

In this present work we focused on the free radical induced myocardial damages. In the first section we tried to establish correlation between the dietary iron content and HFE polymorphism using isolated working mice hearts. Our study revealed that HFE knock out mice feeding with 30 and 300 ppm iron showed susceptibility to ischemic/reperfusion induced cardiac injury. This phenomenon was evidenced by impaired left ventricular function, increased infarct size, and elevated cardiac apoptotic cell numbers. The antioxidant enzyme including SOD, catalase, and peroxidase indicated lower activity in HFE KO mice feeding with 30 and 300 ppm iron enriched diet.

In the second part of the thesis, we made effort to examine the human Trx effect against the reperfusion-induced cell injury. Using Trx transgenic mice, that are containing extra copy of the Trx gene, were submitted 30 minutes ISA and 2 hours reperfusion. These transgenic mice displayed improved cardiac function, reduced infarct size and apoptotic cell numbers. The MDA contents, which is a marker of the oxidative stress was significantly reduced, indicating that Trx has important role in the cellular defense mechanisms. Preperfusion of the hearts with CDDP, an anticancer agent, was used to determine its effect on the Trx in the cardioprotection. We found that all beneficial action of Trx were diminished with the administration of CDDP. The CDDP also was able to abolish the protective effects of precondition in connection with the Trx elevated expression in ischemic/reperfused hearts.

In the third part of our study we focused on the role STAT5A and STAT6 in ischemic preconditioning. All animals and their corresponding wild type mice were subjected to PK and 30 minutes ischemia followed by 2 hours reperfusion. Using different type of phosphorylase inhibitors to elucidate what kind of signal-transduction pathways could be activated after PK. Our results demonstrated that the Src and Jak2 kinase activated STAT5A has a significant role in the ischemic preconditioning evidenced by decreased phosphorylation by PPI, and tyrphostin. In mice studies the STAT5A KO showed increased infarction and an elevation in the cardiac apoptotic cell numbers.

In the final part of our study, our data suggest that COXBIII, ATPS6, and HO-1 may play a critical role in arrhythmogenesis, and the stimulation of COXBIII, ATPS6, and HO-1 mRNA expression may prevent the development of VF in both nondiabetic and diabetic ischemic/reperfused myocardium.

Our result shows that certain genes could be involved in ischemic/reflow induced myocardial cellular injury and process of ischemic preconditioning. The practical advantages of these genes are still unknown, but further experiments are needed to be performed. Further research work will be necessary to confirm the application of these genes in gene therapy process which might be useful tool in the treatment of cardiac diseases.

Irodalom

1. Anderson GJ, Powell LW. Of metals, mice, and men: what animal models can teach us about body iron loading. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1185–1186.
2. Attardi G., Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4: 289-333.
3. Bay Y., Attardi G. (1998) The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *EMBO J* 17: 4848-4858
4. Behar S., Boyko V., Reicher-Reiss H., Goldbourt U. (1997) Ten-year survival after acute myocardial infarction: comparison of patients with and without diabetes. *Am Heart J* 133: 290-296
5. Bissel J. P., Castaigne A., Mercier C., Lion L., Leizorovicz A., and EMIP group. (1996) Ventricular fibrillation following administration of thrombolytic treatment. *Eur Heart J* 17: 213-221
6. Braudeau C., Bouchet D., Toquet C., Tesson L., Ménoret S., Iyer S., Labois C., Willis D., Jarry A., Buelow R., Anegón I., Chauveau C. (2003) Generation of heme oxygenase-1 transgenic rats. *Exp Biol Med* 228: 466-471
7. Burke W, Thomson E, Khoury MJ, McDonnell SM, Press N, Adams PC, Barton JC, Beutler E, Brittenham G, Buchanan A, Clayton EW, Cogswell bME, Meslin EM, Motulsky AG, Powell LW, Sigal E, Wilfond BS, Collins FS. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population-based screening. *JAMA*. 1998; 280: 172–178.
8. Carmeliet E. (1999) Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiological Reviews* 79: 917-1017
9. Cave A. C., Ingwall J. S., Friedrich J., Liao R., Saupe K. W., Apstein C. S., Eberli F. R. (2000) ATP synthesis during low-flow ischemia: influence of increased Glycolytic substrate. *Circulation* 101: 2090-2096
10. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Wolff RK, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996; 13: 399–408.
11. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am Epidemiol*. 2001; 154: 193–206.
12. Young IS, Trouton TG, Torney JJ, McMaster D, Callender ME, Trimble ER. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. *Free Radic Biol Med*. 1994; 16: 393–397.

13. Livrea MA, Tesoriere L, Piantaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freislebel H-J, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A. Oxidative stress and antioxidant status in α -thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood*. 1996; 88: 3608–3614.
14. Powell LW. Broadsheet number 54: hereditary hemochromatosis. *Pathology*. 2000; 32: 24–36.
15. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Jiang J, Fei Y, Brunt EM, Ruddy DA, Prass CE, Schatzman RC, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR, Sly WS. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 2492–2497.
16. Maulik N, Yoshida T, Das DK. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24: 869–875.
17. Cordis GA, Maulik N, Das DK. Detection of oxidative stress in heart by estimating the dinitro-phenylhydrazine derivative of malonaldehyde. *J Mol Cell Cardiol*. 1995; 27: 1645–1653.
18. Ray PS, Martin JL, Swanson EA, Otani H, Dillman WH, Das DK. Transgene overexpression of α B crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *FASEB J*. 2001; 15: 393–402.
19. Stevens RG, Jones DY, Micozzi MS, Taylor PR. Body iron stores and the risk of cancer. *N Engl J Med*. 1988; 319: 1047–1052.
20. Stevens RG, Morris JE, Anderson LE. Hemochromatosis heterozygotes may constitute a radiation-sensitive subpopulation. *Radiat Res*. 2000; 153: 844–847.
21. Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984; 219: 1–14.
22. Bartfay WJ, Dawood F, Wen WH, Lehotay DC, Hou D, Bartfay E, Luo X, Backx PH, Liu PP. Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron overload. *Cardiovasc Res*. 1999; 43: 892–900.
23. Burkitt MJ, Mason RP. Direct evidence for in vivo hydroxyl radical generation in experimental iron overload: an ESR spin-trapping investigation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 8440–8444.
24. Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation*. 1987; 76: 906–915.

25. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Li XY, Triana JF, Lai EK, McCay PB. Iron-mediated radical reactions upon reperfusion contribute to myocardial stunning. *Am J Physiol.* 1990; 259: H1901–H1911.
26. Gutteridge JMC, Rowley DA, Griffiths E, Halliwell B. Low-molecularweight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci.* 1985; 68: 463–467.
27. Cutler DJ, Isner JM, Bracey AW, Hufnagel CA, Conrad PW, Roberts WC, Kerwin DM, Weintraub AM. Hemochromatosis heart disease: an unemphasized cause of potentially reversible restrictive cardiomyopathy. *Am J Med.* 1980; 69: 923–928.
28. Das DK, Maulik N. Evaluation of antioxidant effectiveness in ischemia reperfusion tissue injury methods. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 601–610.
29. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto CD, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing heart. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1131–1141.
30. Maulik N, Yoshida T, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis in ischemic reperfused mouse heart by glutathione peroxidase. *Mol CellBiochem.* 1999; 196: 13–21.
31. Das DK, Maulik N, Moraru II. Gene expression in acute myocardial stress: induction by hypoxia, ischemia/reperfusion, hyperthermia, and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27: 181–193.
32. Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1799–1805.
33. Fleming RE, Sly WS. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64: 663–680.
34. Arscott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams Jr CH. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3621–6.
35. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989;264: 13963–6.
36. Holmgren A, Luthman M. Tissue distribution and subcellular localization of bovine thioredoxin determined by radioimmunoassay. *Biochemistry* 1978; 17: 4071–7.
37. Prieto-alamo MJ, Jurado J, Gallardo-madueno R, Monje-casas F, Holmgren A, Pueyo C. Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2000; 275: 13398–405.

38. Tanaka T, Nishiyama Y, Okada K, Hirota K, Matsui M, Yodoi J, et al. Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulfhydryl depletion. *Lab Invest* 1997; 77: 145–55.
39. Das DK. Redox regulation of cardiomyocyte survival and death. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 23–37.
40. Das DK, Engelman RM, Maulik N. Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. *Annals NY Acad Sci* 1999; 874: 49–68.
41. Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 2000; 485: 7–12.
42. Maulik N, Sato M, Price BD, Das DK. An essential role of NF- κ B in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett* 1998; 429: 365–9.
43. Yagi K, Liu C, Bando T, Yokomise H, Inui K, Hitomi S, et al. Inhibition of reperfusion injury by human thioredoxin (adult T-cell leukemia-derived factor) in canine lung transplantation. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1994; 108: 913–21.
44. Nakamura H, Vaage J, Valen G, Padilla CA, Bjornstedt M, Holmgren A. Measurements of plasma glutaredoxin and thioredoxin in healthy volunteers and during open-heart surgery. *Free Rad Biol Med* 1998; 24: 1176–86.
45. Kihlstrom M. Protection effect of endurance training against reoxygenation-induced injuries in rat heart. *J Appl Physiol* 1990; 68: 1672–8.
46. Isowa N, Yoshimura T, Kosaka S, Liu M, Hitomi S, Yodoi J, et al. Human thioredoxin attenuates hypoxia/reoxygenation injury of murine endothelial cells in a thiol-free condition. *J Cell Physiol* 2000; 182: 33–40.
47. Gunning P, Leavitt J, Muscat G, Ng SY, Kedes L. A human b-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4831–5.
48. Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacey E. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1994.
49. Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 1979; 18: 5294–9.
50. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5201–5.
51. Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Kisin E, Kagan VE, et al. Hypoxic preconditioning preserves antioxidant reserve in the working rat heart. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 133–40.

52. Ray PS, Martin JL, Swanson EA, Otani H, Dillmann WH, Das DK. Transgene overexpression of alpha B crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *FASEB J* 2001; 15: 393–402.
53. Sato M, Cordis GA, Maulik N, Das DK. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 2000; 279: H901–7.
54. Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol* 2002; 282: H1996–2003.
55. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, et al. Role of Stat 3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1929–36.
56. Cordis GA, Maulik N, Das DK. Detection of oxidative stress in heart by estimating the dinitrophenylhydrazine derivative of malonaldehyde. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1645–53.
57. Ho Y-S, Vincent R, Dey MS, Slot JW, Crapo JD. Transgenic models for the study of lung antioxidant defense: enhanced manganese containing superoxide dismutase activity gives partial protection to B6C3 hybrid mice exposed to hyperoxia. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1998; 18: 538–47.
58. Arner ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102–9.
59. Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 1047–60.
60. Maulik N, Goswami S, Galang N, Das DK. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF- κ B on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Lett* 1999; 443: 331–6.
61. Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messengers during preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem* 1999; 196: 59–67.
62. Maulik N, Yoshida T, Engelman RM, Deaton D, Flack III JE, Rousou JA, et al. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death associated with ischemia/reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1998; 186: 139–45.
63. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signalregulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998; 17: 2596–606.
64. Schenk H, Klein M, Erlbrugger W, Droge W, Schulze-osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1672–6.

65. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-kappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation* 2001; 103: 2296–302.
66. Maulik N, Das DK. Potentiation of angiogenic response by ischemic and hypoxic preconditioning of the heart. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 13–24.
67. Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 307–14.
68. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 351–69.
69. Das KC, Lewis-MolockY, White CW. Elevation of manganese superoxidedismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713–26.
70. Das DK, Moraru II, Maulik N. Gene expression in acute myocardial stress. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 181–93.
71. Das DK, Engelman RM, Kimura Y. Molecular adaptation of cellular defenses following preconditioning of the heart by repeated ischemia. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 578–84.
72. Esumi K., Nishida M., Shaw D., Smith T. W., Marsh J. D. (1991) NADH measurements in adult rat myocytes during stimulated ischemia. *Am J Physiol* 260:H1743-1752
73. Ewing J F., Raju V. S., Maines M. D. (1994) Induction of heart heme oxygenase-1 (HSP32) by hyperthermia: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 408-414
74. Holmgren, Bj^rnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995; 252: 199–208.
75. Chen Z, Siu B, Ho Y-S, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, et al. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2281–9.
76. Kishimoto C, Shioji K, Nakamura H, Nakayama Y, Yodoi J, Sasayama S. Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heartfailure. *Jpn Circ J* 2001; 65: 491–4.
77. Blake RA, Garcia-Paramio P, Parker PJ, and Courtneidge SA. Src promotes PKC δ degradation. *Cell Growth Differ* 10: 231–241, 1999.
78. Booz GW, Day JN, and Baker KM. Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1443–1453, 2002.
79. Cheng JJ, Chao YJ, and Wang DL. Cyclic strain activates redox-sensitive proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) in endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 48152–48157, 2002.

80. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, and Greenburg ME. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231–241, 1997.
81. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B. *Curr Opin Cell Biol* 10: 262–267, 1998.
82. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MAQ, and Das DK. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1929–1936, 2001.
83. Hattori R, Otani H, Uchiyama T, Imamura H, Cui J, Maulik N, Cordis GA, Zhu L, and Das DK. Src tyrosine kinase is the trigger but not the mediator of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1066–H1074, 2001.
84. Hou J, Schindler U, Menzel WJ, Ho TC, Brasseur M, and McNight SL. An interleukin 4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265: 1701–1706, 1994.
85. Kitakaze M, Node K, Asanuma H, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Sanada S, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, and Hori M. Protein tyrosine kinase is not involved in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning in canine hearts. *Circ Res* 87: 303–308, 2000.
86. Mascareno E, El-Shafei M, Maulik N, Sato M, Guo Y, Das DK, and Siddiqui MAQ. JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion. *Circulation* 104: 325–329, 2001.
87. Maulik N, Engelman RM, Flack JE, Rousou JA, Deaton D, and Das DK. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene bcl-2. *Circulation* 100: II369–II375, 1999.
88. Maulik N, Sasaki H, Addya S, and Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 485: 7–12, 2000.
89. Miki T, Miura T, Tsuchida A, Nakano A, Hasegawa T, Fukuma T, and Shimamoto K. Cardioprotective mechanism of ischemic preconditioning is impaired by postinfarct ventricular remodeling through angiotensin II type 1 receptor activation. *Circulation* 102: 458–463, 2000.
90. Omura T, Yoshiyama M, Ishikura F, Kobayashi H, Takeuchi K, Beppu S, and Yoshikawa J. Myocardial ischemia activates the JAK-STAT pathway through angiotensin II signaling in in vivo myocardium of rats. *J Mol Cell Cardiol* 33: 307–316, 2001.
91. Ping P, Zhang J, Zheng YT, Li RCX, Dawn B, Tang XL, Takano H, Balafanova Z, and Bolli R. Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 85: 542–550, 1999.

92. Ray PS, Martin JL, Swanson EA, Otani H, Dillmann WH, and Das DK. Transgene overexpression of α B crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *FASEB J* 15: 393–402, 2001.
93. Sato M, Cordis GA, Maulik N, and Das DK. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H901–H907, 2000.
94. Sato M, Engelman RM, Otani H, Maulik N, Rousou JA, Flack JE, Deaton DW III, and Das DK. Myocardial protection by preconditioning of heart with losartan, an angiotensin II type1-receptor blocker: implication of bradykinin-dependent and bradykinin-independent mechanisms. *Circulation* 102, Suppl 3: III346–III351, 2000.
95. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, and Akira S. Essential role of STAT6 in IL-4 signaling. *Nature* 380: 627–630, 1996.
96. Tenhunen R., Marver H. S., Schmid R. (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 244: 6388-6394
97. Tennant R., Wiggers C. (1935) The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 112: 351-362
98. Timokhina I, Kissel H, Stella G, and Besmer P. Signaling through PI-3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and Jnk activation in mast cell proliferation. *EMBO J* 17: 6250–6262, 1998.
99. Tong H, Chen W, Steenbergen C, and Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 87: 309–315, 2000.
100. Williams JG. STAT signaling in cell proliferation and in development. *Curr Opin Genet Dev* 10: 503–507, 2000.
101. Valdembri D, Serini G, Vacca A, Ribatti D, and Bussolino F. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB J* 16: 225–227, 2002.
102. Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, and Bolli R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9050–9055, 2001.
103. Yoshida T, Maulik N, Ho YS, Alam J, and Das DK. Hmox-1 constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: a study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the heme oxygenase-1 gene. *Circulation* 103: 1695–1701, 2001.
104. Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 57: 435–455, 2002.

105. Zeng ZZ, Yellaturu CR, Neeli I, and Rao GN. 5 (*S*)-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates DNA synthesis in human microvascular endothelial cells via activation of Jak/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling, leading to induction of expression of basic fibroblast growth factor 2. *J Biol Chem* 277: 41213–41219, 2002.
106. Wiesel P., Patel A. P., DiFonzo N., Marria P. B., Sim C. U., Pellacani A., Maemura K., LeBlanc B. W., Marino K., Doerschuk C. M., Yet S. F., Lee M. E., Perrella M. A. (2000) Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation* 102: 3015-3023
107. Yet S-F., Tian R., Layne M. D., Wang Z. Y., Maemura K., Solovyeva M., Ith B., Melo L. G., Zhang L., Ingwall J. S., Dzau V. J., Lee M-E., Perrella M. A. (2001) Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 89: 168-173
108. Yoshida T., Maulik N., Ho Y. S., Alam J., Das D. K. (2001) H_{mox-1} constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection. *Circulation* 103: 1695-1703
109. Zakhary R., Gaine S. P., Dinerman J. L., Ruat M., Flavahan N. A., Snyder S. H. (1996) Heme oxygenase-2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 795-798
110. Zhang F., Kaide J-I., Rodrigez-Mulero F., Abraham N. G., Nasjletti A. (2001) Vaso-regulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am J Hypertens* 14: 62S-67S
111. Pellacani A., Wiesel P., Sharma A., Foster L. C., Huggins G. S., Yet S. F., Perrella M. A. (1998) Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor- β 1. *Circ Res* 83: 396-403
112. Shade G. S., Clayton D. A. (1993) Mitochondrial transcription initiation. *J Biol Chem* 268: 16083-16086
113. Priori S.G., Barhanin J., Hauer R. N., Haverkamp W., Jongsma H.J., Kleber A. G., McKenna W. J., Roden D. M., Rudy Y., Schwartz K., Schwartz P. J., Towbin J. A., Wilde A. M. (1999) Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management III. *Circulation* 99: 674-681
114. Chen Q., Kirsch G. E., Zhang D., Brugada R., Brugada J., Potenza D., Moya A., Borggrefe M., Breithard G., Ortiz-Lopez R., Wang Z., Antzelevitch C., O'Brien R. E., Schulze-Bahr E., Keating M. T., Towbin J. A., Wang Q. (1993) Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392: 293-96

Köszönetnyilvánítás

Ezuttal szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Tósaki Árpád Tanszékvezető Úrnak, aki munkámat a kezdetektől segítette és a szükséges anyagi, és tudományos háttérrel biztosította számomra.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak a Gyógyszerhatástani Tanszék dolgozóinak. Külön köszönöm Dr. Bak Istvánnak a kísérletek során nyújtott önzetlen segítségét.

Megköszönöm családom támogatását, segítségét, mivel ők a kezdetektől mellettem voltak és támogatták munkámat.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE

Közlemények:

1. Bak I, Szendrei L, **Turoczi T**, Papp G, Joo F, Das DK, de Leiris J, Der P, Juhasz B, Varga E, Bacskay I, Balla J, Kovacs P, Tosaki A. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J*. 2003 Nov; 17 (14): 2133-5. **Impact Factor: 7,252**
2. Szendrei L, **Turoczi T**, Kovacs P, Vecsernyes M, Das DK, Tosaki A. Mitochondrial gene expression and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused nondiabetic and diabetic myocardium. *Biochem Pharmacol*. 2002 Feb 1; 63 (3): 543-52. **Impact Factor: 3,542**
3. **Turoczi T**, Chang VW, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK. Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Jun; 35 (6): 695-704. **Impact Factor: 4,091**.
4. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *Circ Res*. 2003 Jun 13; 92 (11): 1240-6. **Impact Factor: 9.694**.
5. Yamaura G, **Turoczi T**, Yamamoto F, Siddiqui MA, Maulik N, Das DK. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285 (2): H476-82. **Impact Factor: 3,369**.

Absztrakt:

1. Cordis G, **Turoczi T**, Jun L, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. Detection of Oxidative Stress in Mouse Heart affected by HFE Mutation and Dietary Iron Content by estimating the Dinitrophenylhydrazine Derivative of Malonaldehyde. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003, **35** (6):A46 **IF: 4,091**
2. Cordis G, **Turoczi T**, Jun L, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. Detection of Oxidative Stress in Mouse Heart affected by HFE Mutation and Dietary Iron Content by estimating the Dinitrophenylhydrazine Derivative of Malonaldehyde. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003, **35** (6):A46 **IF: 4,091**
3. Szendrei L, **Turoczi T**, Das DK, Tosaki A. The role of the mitochondrial gene expression in ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2001, **33**: (6) p.A117, **IF: 4,091**
4. Szendrei L, **Turóczi T**, Das DK, Tosaki A. Reperfusion-induced ventricular fibrillation and mitochondrial gene expression in ischemic/reperfused hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2002, **34** (6): A61, **IF: 4,091**

5. Szendrei L, Bak I, Juhasz B, **Turoczi T**, Das DK, Tosaki A. The role of heme-oxygenase-1 and carbon monoxide in reperfusion-induced ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003, **35** (6): A45, **IF: 4,091**
6. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003, **35** (6):A39, **IF: 4,091**
7. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *FASEB J.*, 2003, **17** (5): A18 **IF: 7,252**
8. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *Circ.* 2003 Jun 13; **92** (11): 1240-6. **IF: 11.164**

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM, DE A TÉMÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ KÖZLEMÉNYEK

1. Bak I, Papp G, **Turoczi T**, Varga E, Szendrei L, Vecsernyes M, Joo F, Tosaki A. The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *A. Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 1; **33** (5): 639-48. **Impact Factor: 5,533.**
2. Juhasz B, Der P, **Turoczi T**, Bacsikay I, Varga E, Tosaki A. Preconditioning in intact and previously diseased myocardium: laboratory or clinical dilemma? *Antioxid Redox Signal.* 2004 6 (2): 325-33. **Impact Factor: 3,027**