

Doktori (Ph.D.) értekezés

**A szívizom iszkémiás/reperfúziós károsodásai: a
kamra fibrilláció lehetséges molekuláris mechanizmusai**

Szendrei Levente

Témavezető: Dr. Tószaki Árpád

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

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

2004

Rövidítések:

VF:	kamrafibrilláció
COXBIII:	citokróm oxidáz B III alegység
ATPS6:	ATP szintáz 6 alegység
HO:	hemoxigenáz
CO:	szénmonoxid
TTC:	trifenil-tetrazolium-klorid
HR:	szívfrekvencia (ütés/perc)
CF:	koronária áramlás (ml/perc)
AF:	aortakiáramlás (ml/perc)
LVDP:	balkamrai nyomás (kPa)
AOP:	aorta nyomás (mmHg)
AOP dp/dt:	az AOP első deriváltja (mmHg/s)
ISA:	iszkémia
REP:	reperfúzió
EKG:	elektrokardigram
cGMP:	ciklikus GMP
+/+:	HO-1 vad típusú egér
+/-:	HO-1 „knock out” heterozigóta egér
-/-:	HO-1 „knock out” homozigóta egér
GC:	gázkromatográfia
Defib.:	defibrilláció
EAD:	korai utódepolarizáció
DAD:	késői utódepolarizáció
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
NOS	nitrogén oxid szintáz
NO	nitrogén monoxid

Bevezetés

Napjainkban a szív és érrendszeri megbetegedések világszerte vezetnek a halálozási statisztikákat (1. táblázat) (Statisztikai adatok...). 1999-ben a halálozások főbb halálók szerinti megoszlásában a szív-keringési betegségek 51,2 %-al az első helyen szerepelnek.

Haláloki csoportok	1970	1980	1990	1995	1998*	1999*
Fertőző és élősdiek okozta betegségek	2,7	1,4	0,9	0,8	0,7	0,7
Daganatok	21,9	26,1	30,1	32,5	33,6	34
<i>Keringési rendszer betegségei</i>	62,2	71,8	73,7	72,1	71,6	72,8
Légzőrendszer betegségei	5,7	9,4	6,4	6,3	5,2	6,2
Emésztőrendszer betegségei	4,4	6,6	8,7	11,6	10,4	10,2
Morbiditás és mortalitás külső okai	9,2	11,5	12,8	11,2	10,2	10,2
Egyéb	10,3	8,9	7,9	7,7	7,6	8,1
Összes halálozás	116,3	135,7	140,5	142,2	139,3	142,2
* A X. Nemzetközi Haláloki Névjegyzék alapján.						

1. táblázat: Tízezer lakosra jutó halálozás kiemelt halálók csoportok szerint.

Az elmúlt négy évben nem változott lényegesen a keringési betegségek halálozási gyakorisága, azaz igen magas szinten stagnáló állapotot jelez. Az európai népesség kormegoszlására standardizált halálozási arány ebben a betegségcsoportban Magyarországon 3,2-szer magasabb, mint Franciaországban, 2-szer magasabb, mint további 7 európai országban. A volt szocialista országokban kiemelkedően magas a keringési betegségek miatti halálozás, Magyarország közöttük a középmezőnyben helyezkedik el (2. táblázat) (Statisztikai adatok...). Ez a riasztó statisztika önmagában indokolja a témakör részletesebb vizsgálatát, hogy választ kapjunk arra, vajon milyen mechanizmusok játszanak szerepet és milyen hatással vannak a szív és keringési rendszer funkciójára, a szívritmuszavarok és arrhythmiai kialakulására.

A szívizom iszkémiás megbetegedéseiben és a szívsebészeti beavatkozások során az iszkémia/reperfúzió jelenségének központi szerepe van. Bár a reperfúzió nélkülözhetetlen az iszkémia által károsodott szervek felépülésében, mégsem kockázatmentes, mivel maga a reperfúzió (paradox módon) súlyosbíthatja az iszkémia utáni állapotban lévő szövetek funkcióját. Az iszkémiás szívbetegség leggyakoribb következményei a szívelégtelenség, az angina pectoris, szívinfarktus, és az arrhythmiai

következtében, elsősorban a kamrafibrilláció miatt fellépő hirtelen szívhalál. Reperfúzió-indukálta arrhythmia gyakran jelennek meg szívsebészeti műtétek alatt vagy trombolitikus terápia folyamán, de számos esetben előfordulnak a koronáriák görcsének (angina) oldódása során is.

Ország	Év	Standardizált halálozási arány 100 000 lakosra
Franciaország	1994	182,8
Spanyolország	1994	245,9
Svájc	1994	250,5
Belgium	1992	267,7
Hollandia	1995	269,3
Olaszország	1993	284,8
Luxemburg	1995	284,8
Norvégia	1994	293,8
Svédország	1995	295,9
Dánia (b)	1995	316,5
Nagy-Britannia	1995	317,2
Görögország	1995	340,9
Németország	1995	343,8
Portugália	1995	352,5
Finnország	1995	353,9
Szlovénia	1995	366,5
Ausztria	1995	369,3
Írország	1993	401,3
Lengyelország	1995	532,2
Csehország (b)	1995	559,6
Szlovákia (b)	1995	577,7
Magyarország (b)	1999	588,4
Bulgária	1994	706,4
Románia	1995	747,8
Oroszország	1995	795,8
a) A IX. Nemzetközi Halálóki Névjegyzék alapján.		b) A X. Nemzetközi Halálóki Névjegyzék alapján.

2. táblázat

Az európai népesség kormegoszlására standardizált halálozási arányszámok a keringési rendszer betegségei okozta halálozások szerint, 25 európai országban.

A szívizomban az oxigén és tápanyag ellátás hiánya, és az anaerob anyagcseretermékek felszaporodása következtében funkciózavar, majd sejt és szövetelhalás jön létre. Akut iszkémia során a szívizom ATP tartalma és energiatartaléka csökken. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} -ion szint megnő a belső raktárak (szarkoplazmatikus retikulum) ürülése, és az extracelluláris térből való beáramlás következményeként. Ez a kalcium-pumpák működésének zavarához majd kimerüléséhez

vezethet. A szív kontrakciós ereje és pumpafunkciója nagymértékben lecsökken, megnő a szívizom oxigénigénye, s ezzel szemben csökken az oxigénellátás. A szívkamrák falmozgásaiban zavarok lépnek fel, melyek következtében vérnyomáscsökkenés vagy emelkedés alakul ki. Reflexes úton szívfrekvencia változás, vérnyomás-növekedés vagy vérnyomáscsökkenés jelenik meg, ami az oxigén hiánya mellett is jelentős energiát emészt fel, így növelve a szívizom kimerülésének esélyét. A Ca^{2+} -ion felhalmozódás, és a pH csökkenés (acidózis) a sejtek „gap-junction”-it lezárja, ami a sejt-sejt közötti kapcsolatok együttműködésének romlásához vezet. Ebben a fázisban bekövetkezhet a szívizom iszkémia, infarctus, szívelégtelenség és a legrosszabb esetben kamrafibrilláció okozta hirtelen szívhalál. A klinikai tünetek leggyakrabban és legkorábban anginás rohamként jelentkeznek. Mindezen folyamatok mellett az ATP szint csökkenés hatására megnyílnak az ATP függő K-csatornák, ami intracelluláris K^+ veszteséghez és az extracelluláris K^+ szint megnövekedéséhez vezet. Az extracelluláris térben megnőtt K^+ -szint depolarizációt okoz, mely a gyors Na-áram csökkentésén keresztül csökkenti az ingerületvezetés sebességét. Ugyanakkor a megnövekedett extracelluláris K^+ -szint megrövidíti a szívizomsejtek repolarizációját, és a refrakter fázisát. Vagyis e komplex mechanizmusok is elősegítik a szív kimerülését, az arrhythmia kialakulását. A fenti folyamatok végül kamrai tachycardián keresztül kamrafibrillációhoz és hirtelen szívhalálhoz vezethetnek.

Tennant és Wiggers megfigyelte, hogy a kamrafibrilláció nem csak az iszkémiás szakaszban, hanem a keringés visszaállítása után, a reperfüziós szakaszban is nagy intenzitással bekövetkezhet (Tennant R, Wiggers C, 1935). Pontosabban a reperfüzió - mely nélkül az iszkémiás szívizom elhal- arrhythmia-khoz vezethet. Ennek egyik oka az, hogy azokban a sejtekben, melyek az iszkémia ideje alatt hypoxiássá váltak, a hirtelen reoxigenizáció, nagymértékű enzimfelszabadulással, és strukturális károsodással jár az iszkémiás metabolitok kimosódása és a szabad gyökképződés miatt. A reperfüzió során keletkezett szabad gyökök által okozott fokozott oxidatív stresszt tartják a reperfüzió indukálta károsodások egyik fő komponensének. Az egyik lehetséges megközelítés szerint exogén antioxidánsokkal csökkenteni lehet a miokardiális iszkémia/reperfüzió során bekövetkező oxidatív sejt-károsodást. Meglehet, hogy ez a stratégia nem elegendő arra, hogy megvédje a sejteket a szabad gyökök által indukált károsodásoktól, mivel ezen exogén antioxidánsok előfordulása főleg az interstitiális térre korlátozódik (Tosaki A, Das DK, 2002). Másik lehetőség az iszkémiás/reperfundált szervek védelmében, endogén védekező mechanizmusok indukálása, melyek célzottan szerepet játszanak a sejt homeosztázisában és funkciójának fenntartásában.

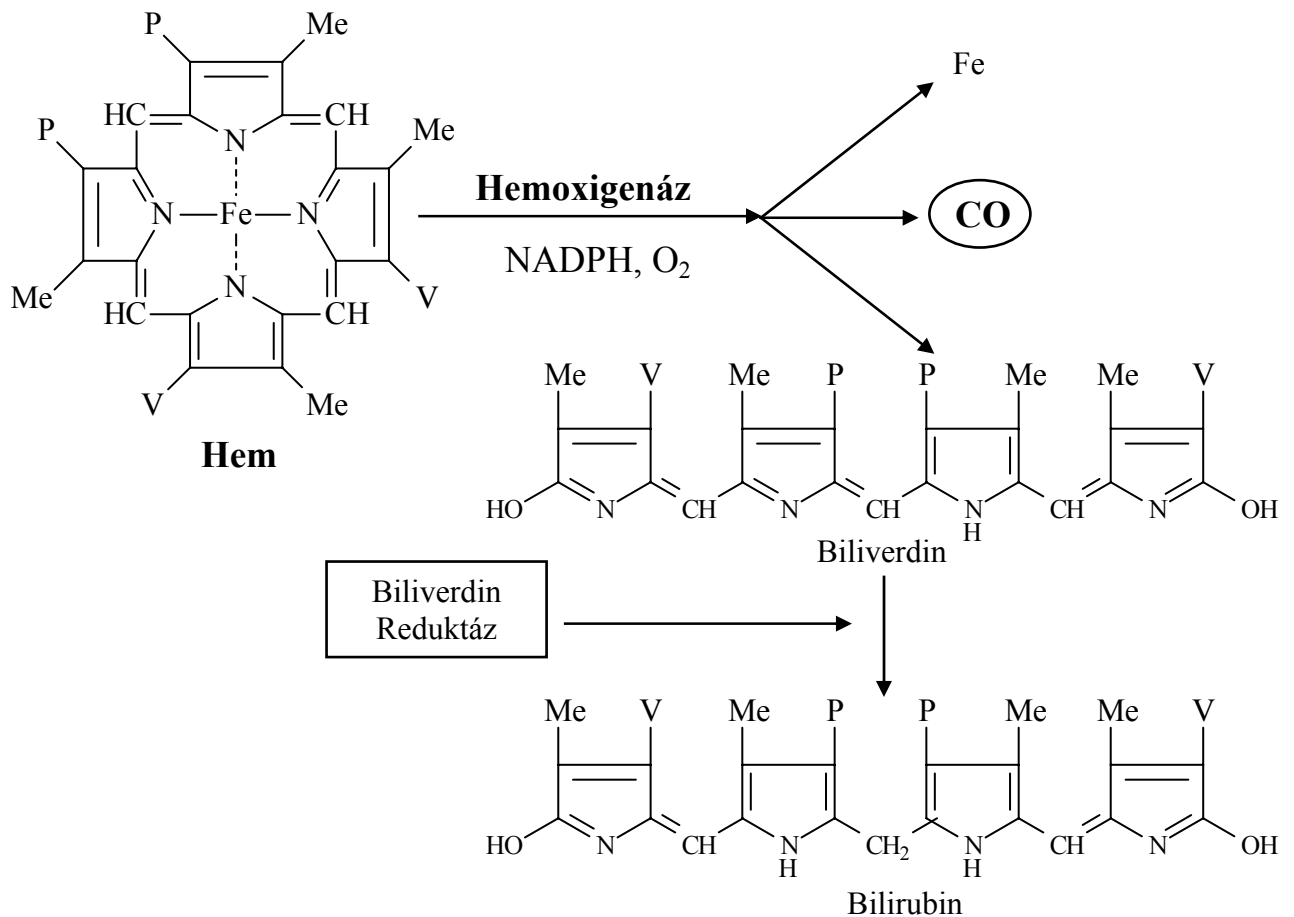
Az adaptáció a hypoxiához vagy az iszkémiához, alapvető jelentőségű a fejlődés, fiziológia és patofiziológia folyamataiban. Az arrhythmiaiak, többek között a kamrafibrilláció kialakulásának mechanizmusa(i), mint például a re-entry, EAD, DAD jól ismertek és definiáltak (Bissel JP és mtsai, 1996; Lincoff AM, Topol E, 1993; Mark DB és mtsai, 1991), azonban a VF kialakulásának genetikai szintű magyarázatáról jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésre. Az idiopátiás kamrafibrilláció mechanizmusának vizsgálata során megállapították, hogy a szív ioncsatornáit kódoló gének mutációi növelik a kamrafibrilláció kialakulását, illetve a hirtelen szívhalál előfordulásának valószínűségét. Közismert az is, hogy a kamrai arrhythmiaiak kialakulásának hátterében a celluláris ioneloszlás felborulása áll. Ennek hátterében csökkent mértékű ATP szintézis állhat, mivel az iszkémia során lecsökkenő celluláris ATP tartalom nem tud elegendő energiát biztosítani a különböző ioncserélők/ionpumpák ($\text{Na}^+\text{-H}^+$, $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$, $\text{Na}^+\text{-K}^+$) megfelelő működéséhez és így a fiziológias ionkoncentrációk visszaállításához. Aerob körülmények között a glikolízis, valamint a citromsav ciklus során keletkező NADH és FADH_2 az elektron transzport láncon keresztül átadja elektronjait az O_2 -nek. Ez energiát szolgáltat egy kemoozmotikus gradiens felépítéséhez, amely az ATP szintézis hajtóereje. Az oxidatív foszforiláció a sejt igényeihez kapcsolódik. Egy visszacsatolás lép fel az ATP bomlástermékeinek következtében, továbbá a mitokondrium emelkedő Ca^{2+} szintje megváltoztatja a mitokondriális dehidrogenáz és ATP szintáz aktivitását (Carmeliet E, 1999). Anaerob körülmények között az oxidatív foszforiláció mértéke csökken. Ennek következtében csökken az ATP szintézise, ami súlyos következményekkel jár. Jelentős változásokat eredményez a celluláris ionkoncentrációkban, zavarokat eredményez a lipid metabolizmusban a felhalmozódó hosszú szénláncú acilcarnitinek, lisofoszfogliceridek, zsírsavak és arachidon sav következtében, valamint fokozza a reaktív köztitermékek és gyökök képződését (Carmeliet E, 1999). Az oxidatív foszforiláció helye a mitokondrium. A humán és más emlős sejtek, szövetek, szervek a csökkent oxigén ellátásra fiziológiailag fontos gének, proteinek, enzimek expressziójával válaszolnak. Az előbb leírtak alapján, kísérleteink során joggal feltételeztük, hogy a mitokondriális gének fontos szerepet játszhatnak az arrhythmogenesisben, az iszkémia/reperfúzióknak kitett szívizomban.

A Diabetes mellitus gyakran kapcsolatban van, egyéb károsodások mellett (pl. retinopathia), kardiovaszkuláris komplikációkkal, mint pl. koronária artéria szűkülettel, valamint diabetikus cardiomiopátiával. A postmiokardiális infarktus prognózisa szintén rosszabb diabéteszes betegekben, akiknél magasabb az előfordulása a szívelégtelenségnek és a hirtelen szívhalálnak, összehasonlítva a nem diabéteszes páciensekkel (Behar S és

mtsai, 1997). A diabéteszes miokardiumban a sarcolemmális ion transzport különböző rendellenességei tapasztalhatóak, többek között a $\text{Na}^+\text{-H}^+$ és a $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ cserefolyamatok csökkenése (Pierce és mtsai, 1990; Khandoudi N és mtsai, 1990), valamint a Ca^{2+} és $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPáz-ok gátlása (Heyliger CE és mtsai, 1987). A sarcoplazmatikus retikulum funkciója is károsodott a diabéteszes miokardiumban, mely csökkent ATP szintézisen és elektron transzfer lánc aktivitáson keresztül redukált ATP függő Ca^{2+} transzportban és Ca^{2+} szabályozta ATPáz aktivitásban nyilvánul meg (Ganguly PK és mtsai, 1983; Cave AC és mtsai, 2000; Esumi K és mtsai, 1991; Neubauer S és mtsai, 1992). Ebből eredően bizonyos mitokondriális gének [pl. citokróom 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.

Mint az korábban említésre került, 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) (Tenhunen R és mtsai, 1969), mely a hem oxidatív lebontását katalizálja. A folyamat során az enzim oxigén és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfirinyűrűjének α -metin hídját, amely így nyíltlancú biliverdinné alakul, s eközben felszabadul a vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid (CO) keletkezik. A biliverdint a biliverdin reduktáz bilirubinná alakítja (1. ábra). A HO-nak három izoenzime ismert, HO-1, HO-2 és HO-3, melyek különböző gének termékei. A HO-1, mely hsp (heat shock protein) 32 néven is ismert, indukálható forma és az emlős szervezet szinte minden szövetében előfordul. Expresszióját indukálhatják nehézfém ionok, olyan stimulusok és anyagok, melyek oxidatív károsodást okoznak, pl. hő-sokk, UV sugárzás, hyperoxia, hypoxia és iszkémia is (Maines MD, 1997; Immenschuh S, Ramadori G, 2000). A HO-2 és a HO-3 konstitutívan expresszálódik. Az előbbi főleg a központi idegrendszerben és a tesztiszben található (Maines MD, 1997; Katori M és mtsai, 2002), míg utóbbiról melynek aminosav szekvenciája ~ 90 %-ban azonos a HO-2-vel viszonylag keveset tudunk. Kevésbé aktív, mint a HO-2 (McCoubrey WK és mtsai, 1997), szerepe még nem teljesen tisztázott.

Az elmúlt néhány évben jelentősen megnőtt azon közlemények száma, melyek különböző biológiai funkciókat tulajdonítanak a HO katalizálta hem metabolizmus termékeinek.



1. ábra: A hemoxygenáz működési mechanizmusának sematikus ábrája.

Me: Metil; V: Vinil; P: Propionát

A porfirinűrűből felszabaduló vas prooxidáns tulajdonságú (Zhang F és mtsai, 2001), míg ezzel ellentétben a keletkező biliverdin, illetve redukált formája a bilirubin hatékony antioxidáns vegyületek (Zhang F és mtsai, 2001; Clark JE és mtsai, 2000; Maines MD, 2003). Egyre több bizonyíték van arra is, hogy a folyamat harmadik terméke a CO fiziológiai jelátvivő molekulaként funkcionálhat (Verma A és mtsai, 1993; Zakhary R és mtsai, 1996; Ingi T, Ronnett GV, 1995) illetve, hogy képes a guanil-cikláz aktiválására, ezáltal a celluláris cGMP szint szabályozására (emelésére), hasonlóan a nitrogén oxidhoz, így szerepet játszhat egyaránt a fiziológiás és patológias értónus szabályozásában (Zhang F és mtsai, 2001; Morita T és mtsai, 1995; Sammut IA és mtsai, 1998). A HO rendszer jelentőségét már számos betegségben, többek között asthmában (Lim S. és mtsai, 2000; Choi AMK és Alam J, 1996), endotoxémiában (Wiesel P és mtsai, 2000), cardiomyopathiában (Liu H és mtsai, 2001), és iszkémia/reperfúzió indukálta sérülésekben (Clark JE és mtsai, 2000; Yoshida T és mtsai, 2001; Yet S-F és mtsai, 2001) is leírták. A

bizonyítékok növekvő számának tükrében, mely szerint a HO-1 védelmet biztosít az oxidatív károsodások ellen, a kutatók több figyelmet fordítottak a HO-katalízis antioxidáns tulajdonságú „melléktermékeire”, a már korábban említett biliverdinre, illetve bilirubinra. Ezen kívül a hem degradációval járó endogén CO növekedés az iszkémia/reperfúzió okozta sérülések elleni citoprotekció szabályozásának egyik lehetséges célpontjává vált (Katori M és mtsai, 2002; Sato K és mtsai, 2001; Motterlini R és mtsai, 1998; Choi AMK, 2001). A „citoprotektív” endogén eredetű CO-ról kimutatták, hogy: (i) a szolubilis guanilát-cikláz aktiválásán keresztül szabályozza a celluláris cGMP szintet, hozzájárulva ezáltal az endotheliumtól-függő vasodilatációhoz, valamint megakadályozza a vérlemezkék aggregációját; (ii) csökkenti a NO képződést a nitrogén oxid szintáz (NOS) gátlása következtében; (iii) gyulladás ellenes hatása van; és (iv) gátolja mind az apoptotikus, mind pedig a sejtosztódási mechanizmusokat (Katori M és mtsai, 2002). A HO által termelt CO hatását kifejtheti a keletkezés helyén, vagy pedig a szomszédos sejtekbe diffundálva (Katori M és mtsai, 2002; Morita T és mtsai, 1995).

Bár a HO-1 funkcióját széleskörűen tanulmányozták, illetve napjainkban is tanulmányozzák, a kutatók relatíve kevés figyelmet szenteltek a HO-1 által termelt szénmonoxid szerepének vizsgálatára az iszkémiás/reperfundált szívizomban. Korábbi eredményeink arra engednek következtetni, hogy a kamrafibrilláció és az endogén CO termelés között szoros összefüggés van (Bak I és mtsai, 2002; Pataki T és mtsai, 2001). Abban az esetben, ha a szív reperfúzió indukálta fibrilláción esett át, a miokardiumban a HO-1 mRNS és protein expressziója, következés képen az endogén CO mennyisége jelentős mértékben csökkent. A HO-1 farmakológiai stimulálásával a miokardiumban emelkedett CO termelést tapasztaltunk, míg ezzel párhuzamosan reperfúzió indukálta fibrilláció kialakulását nem regisztráltuk. Ezen eredményeink alapján feltételeztük, hogy a HO-1 „knock out” egyedek miokardiumának kamrafibrilláció iránti érzékenysége kapcsolatban lehet az enzim mRNS és protein expressziójával, az enzim aktivitással és az endogén CO termeléssel. Abban az esetben ha ez így van, úgy elmondhatjuk, hogy a HO-1 mRNS és proteinjének hiánya, ennek következtében pedig a csökkent endogén CO termelés központi szerepet tölthet be a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció kialakulásában.

Célkitűzések

Kísérleteinkben az iszkémia/reperfúzió indukálta arrhythmia farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk genom és a mitokondriális eredetű génexpressziós változások figyelembevételével izolált patkány és egérszíveken. Munkánkat két fő témakörre összpontosítottuk:

- I. Vizsgálni kívántuk, hogy a diabetes hatással van-e a szívizom reperfúzió indukálta károsodásokkal szembeni érzékenységére. Molekuláris biológiai technikák segítségével összehasonlítottuk (i) egyes mitokondriális gének (COXIII és ATP6, melyeket 40 gén közül, beleértve a mitokondriális gének alegységeit is, előzetes szűréssel választottunk ki) expresszióját, (ii) a kamrafibrilláció kialakulásában játszott lehetséges szerepüket, valamint (iii) a szívfunkciókra kifejtett hatásukat iszkémia/reperfúzió alatt diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban. Célkitűzéseink közé tartozott továbbá a vizsgált gének expressziójának tanulmányozása elektromosan úton (nem iszkémia/reperfúzió okozta) fibrillációba hozott diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban.
- II. Kísérleteink második részében célul tűztük ki a hemoxigenáz-1 (HO-1) mRNS expresszióhoz kapcsolódó celluláris védekező mechanizmusok és az endogén szénmonoxid (CO) hatásának vizsgálatát reperfúzió során, fibrilláló és nem fibrilláló szívekben, melyeket HO-1 „vad” típusú (+/+) és „knock out” [heterozigóta (+/-) és homozigóta (-/-)] egerekből nyertünk. Meg kívántuk vizsgálni a HO-1 mRNS és protein expresszió, valamint a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO termelés hatását (i) a reperfúzió indukálta arrhythmia kialakulásának csökkentésére, (ii) az infarktusos terület nagyságára, (iii) a celluláris ionkoncentrációk változására, valamint (iv) a szívfunkciókra.

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat és hím vad típusú (+/+), HO-1 heterozigóta (+/-) és HO-1 „knock out” homozigóta (-/-) egereket használtunk. Az állatok humánus bánásmódban részesültek a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásainak megfelelően (NIH publication no. 86-23, 1985).

Módszerek és anyagok

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

Az állatok nátrium-pentobarbitállal (60 mg/kg) történő általános érzéstelenítését követően iv. heparint adtunk (500 IU/kg) a trombusok kialakulásának megelőzésére a szívkivétel folyamán. A mellkas megnyitása után a szívet kimetszettük és hideg perfúziós oldatba helyeztük. A preparálást követően a szívet az aortán és a vena pulmonalis-on keresztül ún. „dolgozó-perfúziós” készülékkel perfundáltuk. A perfúziós oldat módosított Krebs-Henseleit puffer, melynek összetétele a következő (mM-ban kifejezve): 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.7 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 0.36 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 10 glükóz. A perfúziós oldatot előzőleg 95 % O₂ és 5 % CO₂ keverékével átbuborékolva telítettük (pH: 7.4, 37 °C). A szíveket 5 percig Langendorff-módszer szerint perfundáltuk 37 °C-on és konstans perfúziós nyomáson, mely 100 cm-es vízoszlop nyomásával egyenértékű (10 kPa). A mosási periódust követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk és regisztráltuk a szívfunkciókat. Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a koronária átáramlás mértéket pedig a szívből kicsöpögő folyadék határozott ideig történő gyűjtésével mértük.

Globál és regionális iszkémia/reperfúzió indukálása

Globál iszkémia/reperfúzió:

Tíz perc aerob perfúziót követően elzárjuk a bal pitvarba történő beáramlás és a bal kamrából történő kiáramlás útját, majd 30 percig így iszkémiát hozunk létre. A 120 perces reperfúzió indításához megszüntetjük az elzárásokat. Az iszkémia teljes ideje alatt, hogy megvédjük a miokardiumot a kiszáradástól, az üvegedény páratartalmát, mely a szívet körülveszi, befedjük, s így a páratartalmat konstans (90-100 %) értéken tartjuk, 37 °C-on.

Regionális iszkémia/reperfúzió:

Tíz perc aerob perfúziót követően a bal leszálló fő koronáriát elszorítjuk egy sebészi fonállal, mely egy meggörbített tűhöz kapcsolódik úgy, hogy a fonalat átvezetjük a leszálló koronária ág alatt, majd a fonal végeit egy műanyag csövön keresztül fűzzük. Az iszkémiát úgy idézzük elő, hogy a műanyag cső végét a szív felszínére szorítjuk egy sebészi szorítóval. A reperfúziót pedig a hurok meglazításával indítjuk el. Az iszkémia teljes ideje alatt -hogy megvédjük a miokardiumot a kiszáradástól- az üvegedény

páratartalmát, mely a szívet veszi körül, konstans (90-100 %) értéken tartjuk, a globál iszkémiához hasonlóan 37 °C-on.

Diabétesz kiváltása

A diabéteszt streptozotocin (55 mg/kg) intravénás injekciójával indukáltuk. A nem diabéteszes azonos korú kontrol állatok ekvivalens térfogatú vivőanyagot kaptak. A diabetes mellitus létrejöttét hyperglükémia jelenlétével (vércukorszint meghatározás) bizonyítottuk.

Mért paraméterek

A kísérletek tejes ideje alatt komputeres regisztrációs berendezés segítségével regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el. Az EKG-kat analizáltuk, hogy meghatározzuk a kamrafibrilláció (VF) előfordulását. Kamrafibrillációnak tekintettük, ha az EKG-n rendellenes, irreguláris hullámzó jeleket találtunk. A szívét szinusz ritmusúnak tekintettük, ha az EKG-n szabályos ritmusban normál sinus komplexek jelentek meg (PQRST komplexek létrejöttével). Iszkémia előtt és reperfúzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint az aortanyomást (AOP) és annak első deriváltját (AOPdp/dt).

A serum glükóz mennyiségét standard assay kit segítségével spektrofotometriás úton határoztuk meg. A kísérletek tejes ideje alatt komputeres regisztrációs berendezés segítségével regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el. A reperfúzió indukálta VF előfordulása az általuk használt modell esetén elég nagy (~80-90 %) mind a diabéteszes, mind pedig a nem diabéteszes alanyok esetében. Ezért, 31 és 41 db szívre volt szükségünk külön-külön, hogy 6 db nem fibrilláló, diabéteszes és nem diabéteszes szív álljon rendelkezésünkre. Azon szíveket, melyek a reperfúzió során fibrilláltak tovább osztottuk két csoportra: (i) a reperfúzió indukálta VF kevesebb, mint 3 percig állt fenn, illetve (ii) több mint 10 percig tartott. Az első esetben a VF-t reverzibilisnek (a szív spontán visszatért a normál ritmusba) tekintettük, míg a másodikban irreverzibilisnek (a reperfúzió első 10 percében folyamatosan fennállt). Ha az utóbbi eset állt elő, 10 perc után a szíveket elektromosan defibrilláltuk, majd a reperfúziót 110 percen keresztül tovább folytattuk. Iszkémia előtt és reperfúzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária

átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP).

Totál RNS izolálás és Northern-blot

A totál RNS izolációját patkány szív szövetből (100 mg) 1 ml TRIzol reagensben (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Germany) történő homogenizációval, guanidium thiocianat módszerrel végeztük, a kézikönyv leírása alapján (Sambrook J és mtsai, 1989). Az RNS pelletet oldottuk 100 µl dietil-pirokarbonát vizes oldatában, s a koncentrációkat a 260 nm-en ultraibolya spektroszkópiával mért elnyelésből számoltuk ki.

A Northern blot hibridizációt és az RNS izolálását Chomczynski és Sacchi módszere szerint végeztük (Chomczynski P, Sacchi N, 1987). A bal kamrából (kb.80-100 mg szövet) 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) 18 órás kapilláris átvitel elve alapján. Vákuumban 2 órán át 80 °C-on történő melegítés után hibridizációt hajtottunk végre ³²P-vel jelölve (5 x 10⁶ cpm/filter) egy hibridizációs szekrényben a gyári előírásoknak megfelelően (QuickHyb, Stratagene, CA, USA). Az autoradiográfia és az automata radiometriás vizsgálat után a „housekeeping” gén mRNS szintre vonatkozóan (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz) ismét hibridizációt hajtottunk végre, hiszen kontrollként ezen csoporthoz viszonyítottuk az expressziós változásokat.

Western-blot

A mintákat homogenizáltuk Tris-HCl (13.2 mM/l), glicerin (5.5 %), SDS (0.44 %) és β-merkaptoetanol elegyében. Az oldható proteinek azonos mennyiségét (50 µg) Tris-glicin-SDS-poliakrilamid gél (12 %) elektroforézissel elválasztottuk és Western blot analízist végeztünk, ahogy azt Pellacani és mtsai leírták (Pellacani A és mtsai, 1998), rekombináns patkány HO-1 protein antitestet (1:1,000, Stressgen) használva. A relatív HO-1 protein expressziót denzitometriásan analizáltuk.

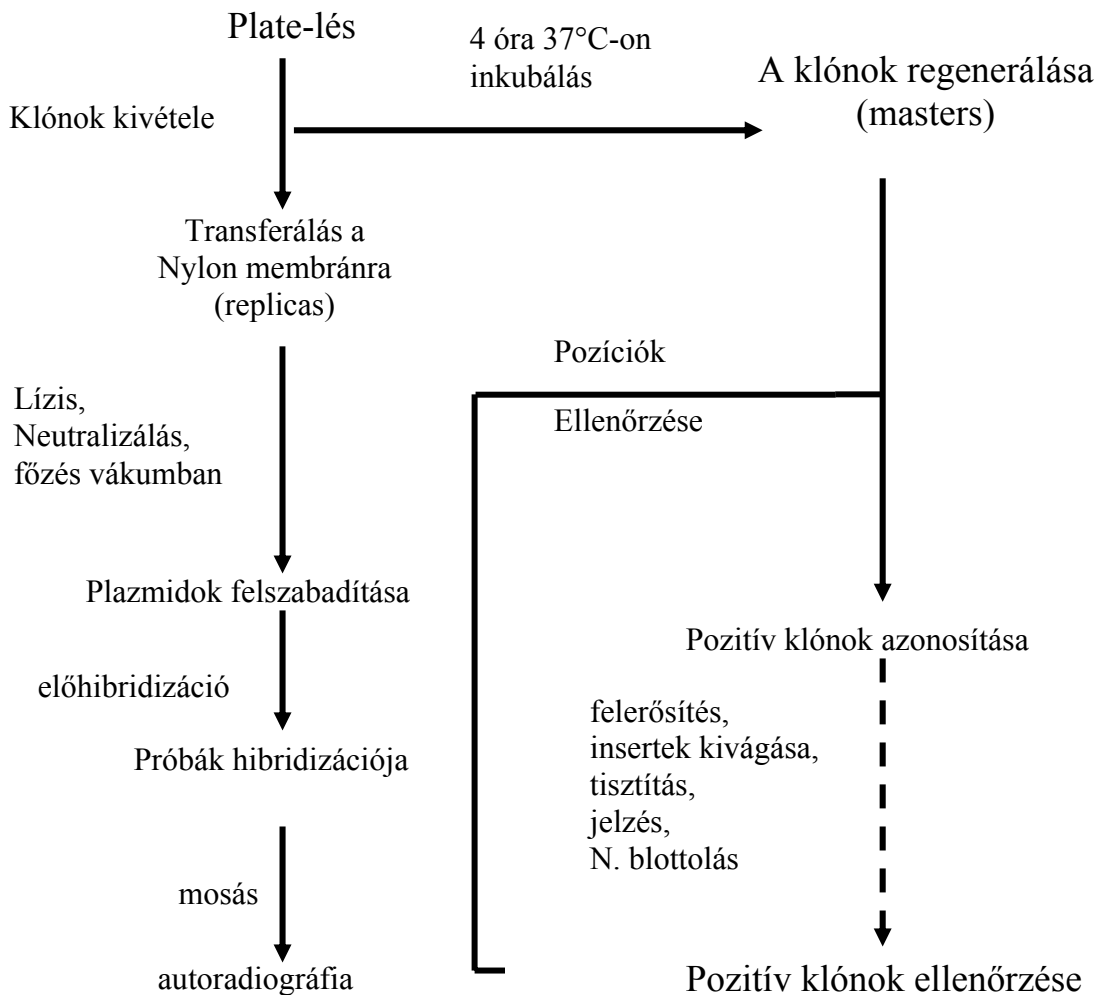
RT-PCR

Ötven ng total RNS-t vagy pedig 20 ng mRNS-t tartalmazó mintát „amplification grade” DNáz I-el (Gibco-BRL) inkubáltuk, hogy az esetleges DNS szennyezést eltávolítsuk, majd random egyszálú cDNS szintézisnek vetettük alá, 0,1 µg random 9-mer primerek (Stratagene) alkalmazásával. A mintákat, melyek 0,1 µg kezdeti total RNS-t

tartalmaztak, specifikus primerek segítségével, 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; Citokróm Oxidáz III, 338 bp: 5'-CTTAGCATCAGGAGTCTC és 5'-TATCATGCTGCGGCTTCA. A fragmenseket 10 μ Ci [32 P] dCTP-el reakciónként megjelöltük. A be nem épült (nem inkorporálódott) nukleotidokat 3 %-os agaróz gélen elválasztottuk, a felerősített fargmensek radioaktivitását pedig folyadék szcincillációs detektorral detektáltuk.

cDNS klónok létrehozása és a mitokondriális gének analízise

Az alábbi ábra összefoglalja a legfontosabb lépéseket (2. ábra).



2. ábra: cDNS klónok létrehozása és a mitokondriális gének analízise.

DNS szekvenálás és a gének azonosítása

A Sanger és mtsai által kidolgozott dideoxi-mediálta lánchosszabbító/lánclezáró módszert használtuk (Sanger F és mtsai, 1977), szubsztrátként denaturált plasmid DNS-t (pUC 19 pSPORT 1 vector; Gibco-BRL) használtunk. Az M13/pUC „univerzális és a T7/T3 α szekvenáláshoz használatos primereket és a Sequenase 2.0 kitet használtuk a ³⁵S-el jelölt reakciókban. A sávokat 47 cm-es 6 % poliakrilamid/urea géleken választottuk szét, kettős töltést alkalmazva (2,5 és 5 óra, 2000 V-on futtatva). A GenBank és az EMBL adatbázisokban a DNS szekvenciák közötti hasonlóság keresésében Pearson-Lipman algoritmust használtunk (Pearson WR és Lipman DJ, 1982).

Az infarktusos terület meghatározása

Az infarktusos terület meghatározásához a patkányszíveket, minden egyes kísérlet végén, 30 ml 1 %-os trifeniltetrazolium-klorid (TTC) oldattal perfundáltuk (az egérszíveket 10 ml-el), az aorta kanül egyik oldalsó ágán keresztül, majd a mintákat -70 °C-on tároltuk a további analízisig. A fagyasztott szíveket (csak a kamrai szövetet) transzverzálisan szeleteltük az apico-bazális axisra merőlegesen, s 1-2 mm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszetek tömegét lemértük, miután a nedvességet eltávolítottuk a szövetről, majd tárgylemezek közé helyeztük, és szkenneltük. A „risk” területet -melyet minden kísérlet végén Evans blue-t használva határoztunk meg (Moncanu és mtsai, 2000)- és az infarktusos zónát minden egyes metszetben megjelöltük, majd a területeket pixelben megadva számoltuk ki. Az ép kamrai szövetet a TTC oldat vörösre festi, míg az infarktusos terület nem veszi fel a festéket, így az fehér marad. A területeket planimetriás software alkalmazásával határoztuk meg, majd a metszetek tömegével felszoroztuk és összegeztük, hogy megkapjuk a veszélyeztetett („risk”), illetve az infarktusos terület tömegét (grammban kifejezve). Az infarktusos terület nagyságát, a veszélyeztetett területre („risk area”) vonatkozó %-os arányában fejeztük ki.

A szöveti CO meghatározása

A CO tartalmat gázkromatográf segítségével határoztuk meg (Cook MN és mtsai, 1995). A reperfüzió végén a szíveket eltávolítottuk a készülékről, majd négyszeres térfogatú 0.1 M foszfát-pufferben (pH:7.4) homogenizáltuk. A homogenizátumot 4 °C-on, 15 percig, 12800 x g-n centrifugáltuk, és az így kapott felülúszót használtuk a CO tartalom meghatározásához. A reakció elegy összetétele a következő volt: 150 μ l 12800 g felülúszó, 60 μ l NADPH (4.5 mM) és 50 μ l 3.5/0.35 mM methemalbumin. A vak mintákba NADPH

helyett 60 µl foszfát-puffert adtunk. A mintákat előinkubáltuk 5 percig 37 °C-on, majd a „headspace”-t oxigénnel átaramoltattuk és a mintákat 37 °C-on, 1 órán keresztül, sötétben tovább inkubáltuk. A reakciót a minták jéggel történő hűtésével állítottuk le, majd a gázteret egy órán belül analizáltuk. Gáztömör fecskendővel (Hamilton Co., USA), minden egyes üvegcséből, 1000 µl headspace gázt injektáltunk a kolonnára. Az analízis 150 másodpercig tartott egy 200 cm hosszú, 0.3 mm belső átmérőjű rozsdamentes acél kolonnán. A csúcsokat integráltuk, a kapott eredményeket pedig önkényesen választott egységben fejeztük ki. A mérésekhez Molselect 5 Å töltött kolonnát használtunk. A kolonnátér hőmérséklete 30 °C volt.

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

A szíveket gyorsan, ionmentes, 100 mM/L trishidroxi-metil-amino-metánt és 200 mM/L szaharózt tartalmazó jéghideg pufferbe merítve 0-5 °C-ra lehűtöttük, hogy kimossuk az ionokat az extracelluláris térből, valamint, hogy meggátoljuk a membrán iontranszportért felelős enzimek aktivitását. Öt perces hideg pufferrel történő mosás az ionok több mint 90 %-t eltávolítja 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 (Tosaki A és mtsai, 1988).

HO-1 lokalizációja immunhisztokémiával

A vad típusú (+/+), heterozigóta (+/-) valamint homozigóta (-/-) HO-1 mutáns egerekből preparált szíveket formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyazást követően a bal kamrai szövetből 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk poli-1-lizinnel bevont tárgylemezre (Sigma, St.Luis, USA). Deparaffinálást és rehidratálást követően az endogén peroxidáz aktivitást és a nem specifikus fehérjék kötődését 3% hidrogén-peroxidot tartalmazó normál kecske szérummal blokkoltuk. Ezt követően két órán keresztül inkubáltuk a mintákat tisztított, patkánymájából izolált HO-1-gyel és nyúlban termeltetett, poliklonális anti-HO-1 antitesttel (Stress Gen Biotech., Canada). A primer antitestet a gyártó utasításainak megfelelően, 1:750 arányban hígítottuk. Ezután PBS-sel alaposan mostuk, majd további fél órán át inkubáltuk a metszeteket, kecskében termeltetett, biotinnal jelölt, anti-nyúl IgG második antitesttel (Vector Laboratories,

Burlingam, CA, USA), amit a gyártó utasításainak megfelelően, 1:200 arányban hígítottunk. Újabb alapos, PBS-sel történő mosást követően az immunreakciót peroxidáz enzimmel konjugált streptavidinnel (Zymed, USA) (30 perc) mutattuk ki. A színreakciót 3-amino-9-etilkarbazol szubsztráttal [0.1 M acetát pufferben (pH 5.2) készített oldat], a háttérfestést Gill's hematoxilinnel végeztük. A festődés intenzitásának növeléséhez néhány másodpercig 1% litium-karbonát oldatban inkubáltuk a mintákat. Ezt követően vízzel alaposan mostuk, majd fél órán keresztül 80°C-on tartottuk. A mikroszkópos vizsgálatokat Zeiss Axiolab mikroszkóppal végeztük, a felvételeket Zeiss Axiocam kamerával rögzítettük.

A kísérletek folyamata

A szíveket (n = 6 csoportonként) 30 perc preisztkémiás periódusban perfundáltuk. Az első 10 perc során Langendorff-módszer szerint, standard perfúziós oldattal kimostuk a vért és annak sejtes alkotórészeit a miokardiumból. A következő periódusban a készüléket „dolgozó” módba kapcsoltuk és regisztráltuk a kontrol értékeket. Ezt követően a szíveket 30 perc globál/regionális iszkémiának és az azt követő 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. Mivel a „dolgozó” szívpreparátum érzékenyebb különböző hatásokra, illetve a pre- és afterload-ra, mint a Langendorff-preparátum, ezért a reperfúzió első 10 percében Langendorff-módszer szerint perfundáltuk a szívet, hogy elkerüljük a kamrai arrhythmiák kialakulását. Ha a reperfúzió kezdeti szakaszában fibrilláció történt, a szívet defibrilláltuk 20 V-os négyszög hullám impulzust alkalmazva 1 ms-os időtartam alatt. A kísérletek végén a szíveket eltávolítottuk a készülékről majd Northern és Western blot-ot végeztünk, meghatároztuk az infarktusz terület nagyságát, valamint a celluláris ionkoncentrációkat.

A mitokondriális génexpresszió vizsgálata során a szíveket az állatok két azonos korú csoportjából izoláltuk: (i) nem diabéteszes állatokból, melyeket 8 héttel a szív izolálása előtt citrát pufferrel oltottunk be, valamint (ii) diabéteszes patkányokból, mely állatokat 8 héttel a szív izolálása előtt streptozotocinnal (55 mg/kg, i.v.) kezeltünk. A kísérletek egy másik részében a szíveket nem tettük ki iszkémia/reperfúzióknak, hanem a szíveket elektromosan fibrillációba hoztuk (20 Hz, 1200 ütés/perc), 10 percen keresztül 5 V-os négyszög hullám impulzusokat alkalmazva 1 ms-os időtartam alatt. Ezt követően a szíveket defibrilláltuk, a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk és a reperfúziót további 110 percig folytattuk. Minden egyes kísérlet végén meghatároztuk az mRNS expressziót.

Statisztika

A szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP, AOP és AOPdp/dt), infarktusz terület, miokardiális elektrolit koncentrációk, valamint a szöveti CO tartalom értékeinek közlésekor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Először „egyutas” variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk, van-e különbség a különböző csoportok adatai 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

I. „Subtractive screening”

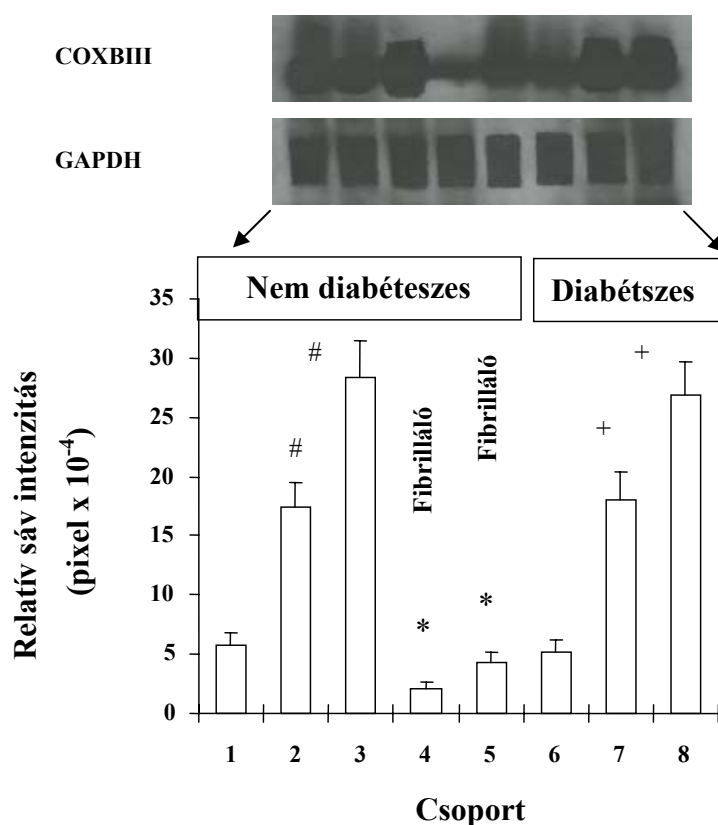
Specifikus cDNS könyvtárat hoztunk létre plasmid pSPORT 1 alkalmazásával 30 perc iszkémiának kitett patkányszív balkamrai szívizmot használva kiindulási szövetként, és poly(A)⁺ RNS-t alkalmaztunk klónozásra. A rekombinánsok száma 340,000 körüli volt s a közepes „insert” méret 1.5 és 2.0 kb. A DNS szekvenálást követő adatbázisban való keresés alapján 8 különböző gént azonosítottunk. A 8 gén kódja volt a citokróm oxidáz alegység I, II, III, az ATP szintáz 6 és 8, valamint három alegysége (1, 2, 3) a citokróm b-nek (3. táblázat).

Gén	Klón	Hossz	Lokalizáció
Citokróm oxidáz, alegység I	6	1.6 kb	mt DNS, heavy strand
Citokróm oxidáz, alegység II	4	0.7 kb	mt DNS, heavy strand
Citokróm oxidáz, alegység III	8	0.8 kb	mt DNS, heavy strand
ATP szintáz, subunit 6	3	0.7 kb	mt DNS, heavy strand
ATP szintáz, subunit 8	2	0.5 kb	mt DNS, heavy strand
Citokróm b	3	1.2 kb	mt DNS, heavy strand
Ismeretlen	1	1.1 kb	sejtmagi
Ismeretlen	1	1.9 kb	sejtmagi

3. táblázat: A „screening” eredménye.

II. Azonosított gének mRNS expressziója

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

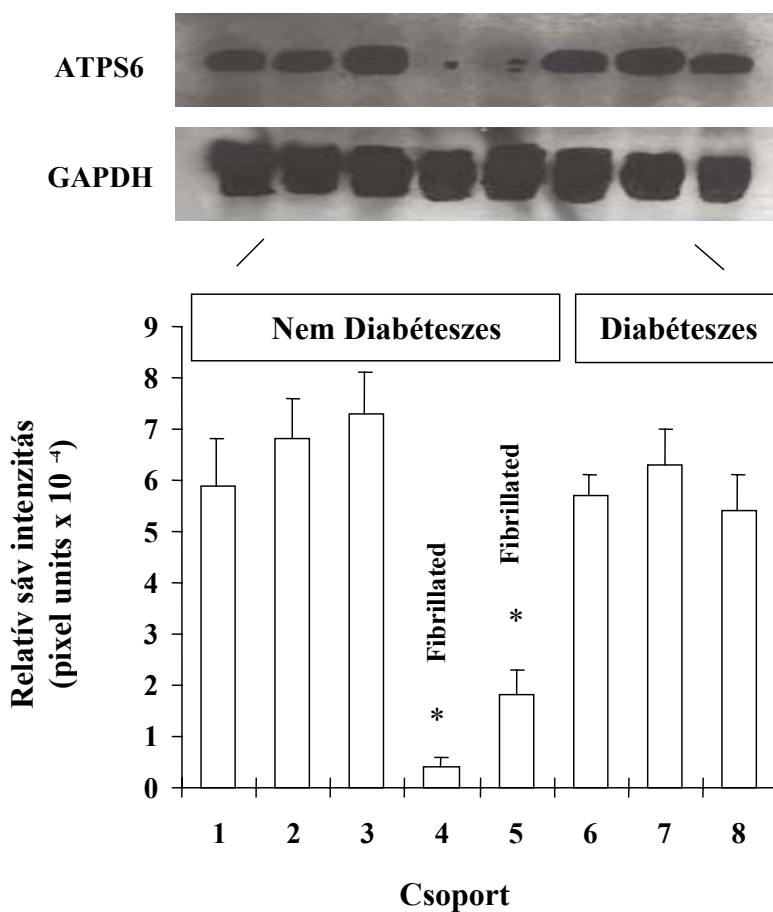


3. ábra: A COXBIII expressziója diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban.

1: 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, # $p < 0.05$ 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).

A diabéteszes fibrilláló szívizomban a COXBIII-t nem tudtuk detektálni ezért semmilyen statisztikai analízist nem tudunk véghezvinni, s nem is tüntettük fel ezt az ábrán.

A 4. ábrán az ATP5B-re vonatkozó Northern blot eredmények láthatóak. Az ATP5B upregulációját szintén tapasztaltuk, azonban eltérően a COXBIII-tól ez nem volt statisztikailag szignifikáns 30 perc iszkémiát (4. ábra 2. csoport) és 120 perc reperfúziót (4. ábra 3. csoport) követően a nem diabéteszes/nem fibrilláló szívizomban. A reperfúzió során irreverzibilis (4. ábra 4. csoport), illetve reverzibilis fibrilláción (4. ábra 5. csoport) átesett szívek esetén az ATP5B expresszió jelentős mértékű downregulációját tapasztaltuk. Az ATP5B expresszió diabéteszes, iszkémia/reperfúzióknak (4. ábra 7. és 8. csoport) kitett szívekben hasonló mértékű volt, mint a nem diabéteszes/nem fibrilláló csoporté.



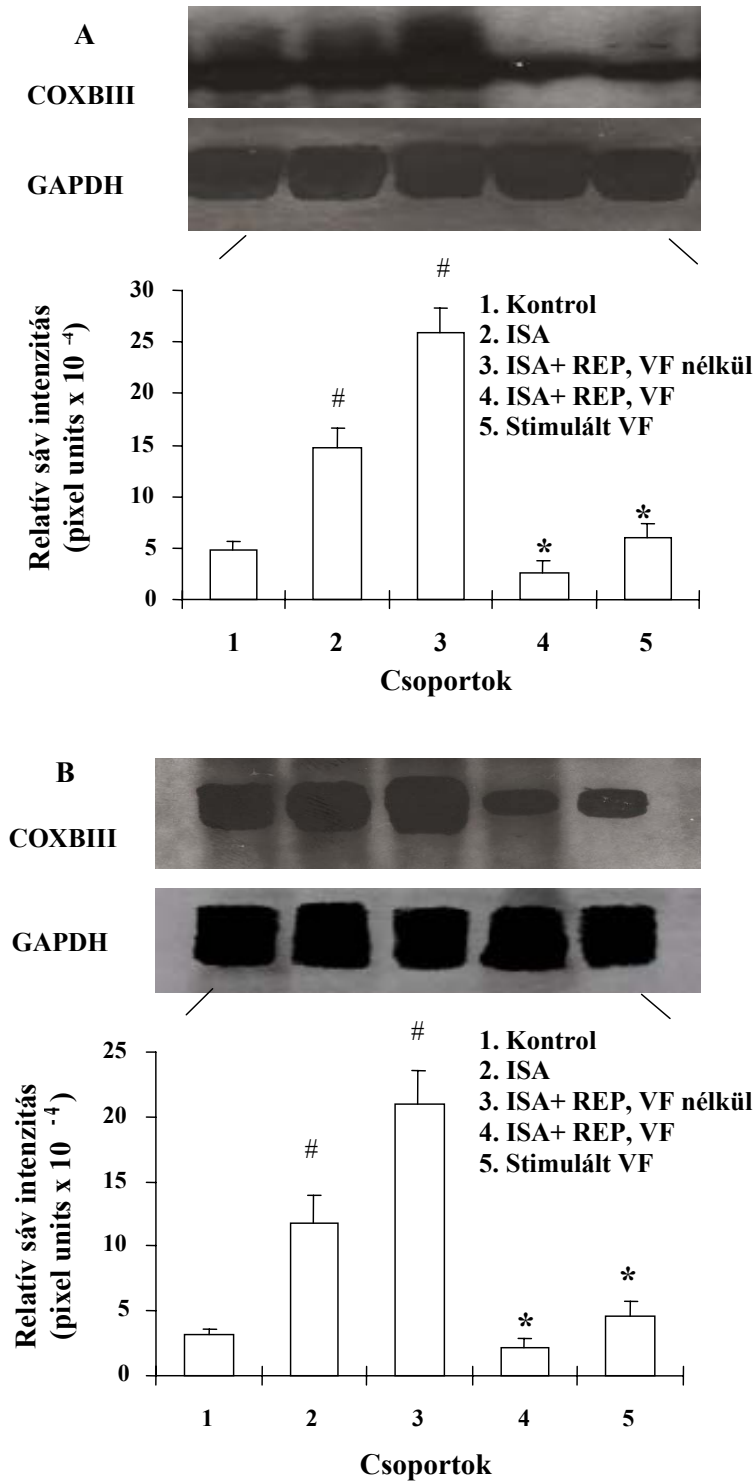
4. ábra: Az ATP5B expressziója diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban.

1: 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 a nem fibrilláló, iszkémiás/reperfundált csoporttal összehasonlítva (3. csoport).

Abban az esetben, ha a diabéteszes szív fibrillált a vizsgált gén expressziója nem volt detektálható, így nem lehetett statisztikai analízist végezni, s az ábrán nem került feltüntetésre.

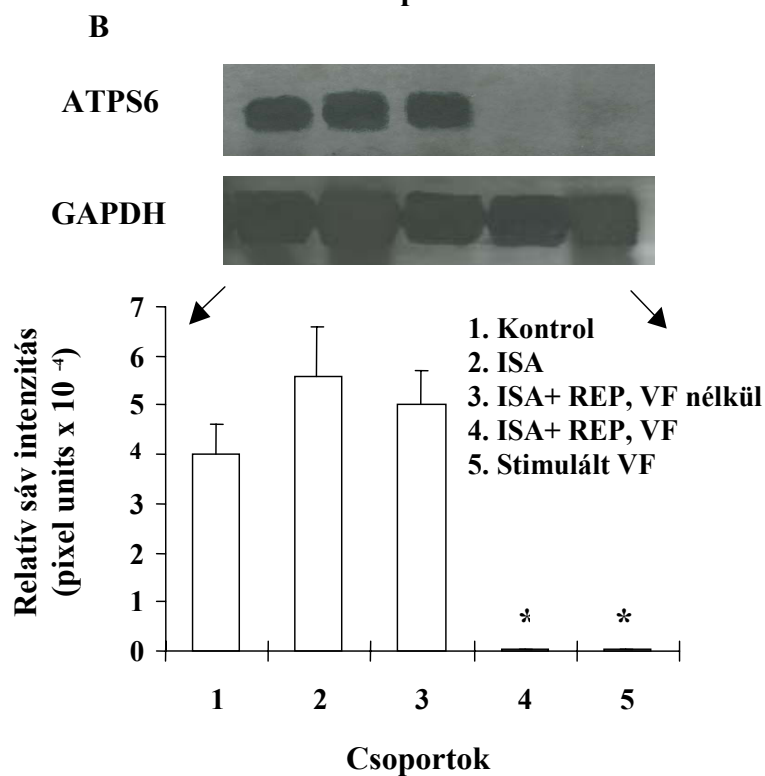
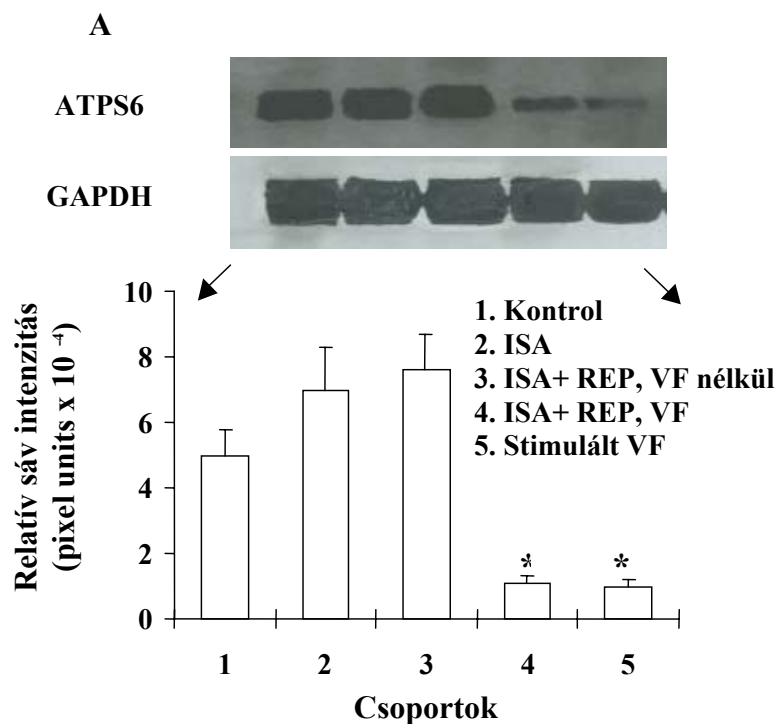
A 5. ábrán a COXBIII expressziója látható nem diabéteszes (A) és diabéteszes (B) miokardiumban. A vizsgált gén expressziója 30 perc iszkémiát követően (5. ábra A, 2. csoport) nőtt az aerob kontroll csoporthoz (5. ábra A, 1. csoport) viszonyítva. Ez a növekedés 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúciónak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

Az 6. ábra az ATP5B gén expressziójának változását mutatja nem diabéteszes (A) és diabéteszes (B) szívizomban. Hasonlóan a COXBIII expressziójának változásához, az iszkémia/reperfúzió indukálta (6. ábra A-B, 4. csoport), illetve az elektromos úton kiváltott kamrafibrilláció (6. ábra A-B, 5. csoport) jelentős mértékű intenzitás csökkenést eredményezett, mind a diabéteszes, mind pedig a nem diabéteszes csoportban az ATP5B expressziójában összehasonlítva az iszkémia/reperfúciónak kitett, nem fibrilláló szívekkel. (6. ábra A-B).



5. ábra: A reperfüzió-indukálta és elektromos úton kiváltott VF hatása a COXBIII expresszió változására nem diabéteszes (A) és diabéteszes (B) szívizomban.

1: 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/reperfüziós, nem fibrilláló csoporthoz viszonyítva (3. csoport).



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

1: Aerob kontrol; 2: iszkémiás miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált fibrilláción átesett miokardium; 5: iszkémiás/reperfundált, elektromos úton fibrillációba hozott miokardium;

* $p < 0.05$ az iszkémia/reperfüziós, nem fibrilláló csoporthoz viszonyítva (3. csoport).

Mindkét vizsgált gén expressziója megfigyelhető iszkémiát követően, mind a nem diabéteszes, mind pedig a diabéteszes szívizomban. Reperfúzió során a génexpresszió változása azonos volt a nem fibrilláló diabéteszes és nem diabéteszes csoportokban egyaránt. Azokban a nem diabéteszes szívekben, melyek a reperfúzió során fibrilláltak az ATP6 (8 ± 3 mRNS relatív mennyiség) és a COXBIII (6 ± 1 mRNS relatív mennyiség) expresszióban jelentős csökkenést tapasztaltunk, a diabéteszes fibrilláló csoportban azonban a vizsgált gének nem voltak detektálhatóak RT-PCR segítségével (4. táblázat).

4. táblázat: Kvantitatív RT-PCR eredmények a COXBIII és ATP6 expressziójára vonatkozóan, nem fibrilláló és fibrilláló, diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban.

	ISA előtt		ISA után		RE után	
	NDiab.	Diab.	NDiab.	Diab.	NDiab.	Diab.
ATPáz alegység 6:						
Nem fibrilláló szívekben	38 ± 8	24 ± 7	$56 \pm 6^*$	$49 \pm 9^\#$	$67 \pm 8^*$	$48 \pm 7^\#$
Fibrilláló szívekben	ND	ND	ND	ND	$8 \pm 3^\blacklozenge$	UD
Citokróom oxidáz III:						
Nem fibrilláló szívekben	25 ± 5	13 ± 3	$48 \pm 6^*$	$33 \pm 6^\#$	$58 \pm 8^*$	$42 \pm 5^\#$
Fibrilláló szívekben	ND	ND	ND	ND	$6 \pm 1^\blacklozenge$	UD

mRNS relatív mennyisége GAPDH kontrolhoz viszonyítva; NDiab.: nem diabéteszes, Diab.: diabéteszes, ND: nem detektált, UD: detektálható szint alatt; n=6 csoportonként, * $p < 0.05$ és $^\#p < 0.05$ összehasonlítva a nemiszkémiás nem diabéteszes és diabéteszes szívekkel. $^\blacklozenge p < 0.05$ a nem diabéteszes nem fibrilláló csoporthoz viszonyítva.

III. Szívfunkciók, szérum glükóz

A szívfunkciók közül az AF, valamint a LVDP, csökkent a diabéteszes szívizomban (szérum glükóz: 508 ± 31 mg/dl) (6. táblázat), összehasonlítva az azonos korú nem diabéteszes (szérum glükóz: 128 ± 31 mg/dl) csoporttal (5. táblázat). A reperfúzió viszonylag gyenge szívfunkciókat eredményezett a nem diabéteszes nem fibrilláló szívizomban (5. táblázat). 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 (5. táblázat).

5. táblázat: Szívfunkciók iszkémia/reperfundált nem fibrilláló, fibrilláló, és elektromos úton fibrillációba hozott nem diabéteszes szívekben.

Csoport	<u>Iszkémia előtt</u>				<u>60 perc Reperfúziót követően</u>				<u>120 perc reperfúziót követően</u>			
	HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP
Aerob CTL	311±8	26.3±1.0	50.9±2.0	17.8±0.3	299±9	24.9±1.8	49.2±1.4	16.9±0.5	300±7	25.6±1.3	47.9±2.2	16.0±0.5
ISA+RE No VF	307±7	27.1±1.2	52.0±1.8	17.4±0.4	296±8	20.0±1.3	22.0±1.2	14.2±0.3	294±9	20.4±1.0	21.6±1.4	14.2±0.4
ISA+RE, VF	319±8	28.0±0.7	51.0±1.4	17.9±0.5	296±6	16.7±1.1*	11.2±0.6*	11.0±0.4*	298±7	17.1±0.8*	10.6±0.6*	11.0±0.6*
ISA+RE, EVF	310±8	26.5±1.0	52.6±2.4	17.6±0.4	293±9	21.0±1.3#	23.0±1.5#	15.0±0.5#	288±8	20.2±1.0#	22.0±1.4#	15.1±0.5#

n=6 csoportonként, *p<0.05 összehasonlítva az ISA/REP No VF csoporttal, #p<0.05 az ISA/REP VF csoporttal összehasonlítva.

6. táblázat: Szívfunkciók iszkémia/reperfundált nem fibrilláló, fibrilláló, és elektromos úton fibrillációba hozott diabéteszes szívekben.

Csoport	<u>Iszkémia előtt</u>				<u>60 perc Reperfúziót követően</u>				<u>120 perc reperfúziót követően</u>			
	HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP
Aerob CTL	306±8	26.1±1.2	39.0±1.6	16.1±0.5	291±9	25.3±1.0	36.8±1.7	15.4±0.6	295±8	24.2±2.0	34.2±2.1	14.7±0.5
ISA+RE No VF	300±7	25.7±1.0	38.2±1.1	15.7±0.6	286±7	19.8±1.2	19.7±1.0	13.0±0.4	284±9	18.7±1.8	17.4±1.7	12.1±0.4
ISA+RE, VF	309±9	26.8±0.9	37.2±1.8	15.8±0.7	288±8	16.9±0.8	6.5±0.8*	8.0±0.6*	285±9	16.0±0.9	5.1±0.6*	7.0±0.5*
ISA+RE, EVF	299±8	25.2±0.7	36.8±2.0	15.5±0.6	279±9	19.7±0.7#	13.8±1.0#	12.4±0.5#	276±8	18.6±0.8#	13.7±0.8#	11.9±0.4#

n=6 csoportonként, *p<0.05 összehasonlítva az ISA/REP No VF csoporttal, #p<0.05 az ISA/REP VF csoporttal összehasonlítva.

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 (5. és 6. táblázat).

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 (6. táblázat).

IV. 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. Így 105 HO-1^{+/-} és 13 HO-1^{-/-} egeret kaptunk. A HO-1 génhányos egyedek valamivel könnyebbek voltak (26±3 g) a vad típusú (30±4 g), illetve a heterozigóta (31±3 g) azonos korú alomtársaiktól születéstől a korai felnőttkorig (12-13 hét), ezen kívül viszont teljesen megkülönböztethetetlenek voltak. Megfigyeltük továbbá, hogy 22 hetes korokra a HO-1^{-/-} állatok lesoványodtak, külső állapotuk romlott, valamint kevésbé aktívak voltak a vad típusú, illetve a heterozigóta egyedekhez képest. A HO-1^{-/-} állatok korai halálózása a 22. hét után általános volt, ezért kísérleteinkhez 16-18 hetes állatokat használtunk.

V. HO-1 jelenlétének igazolása egérszívben

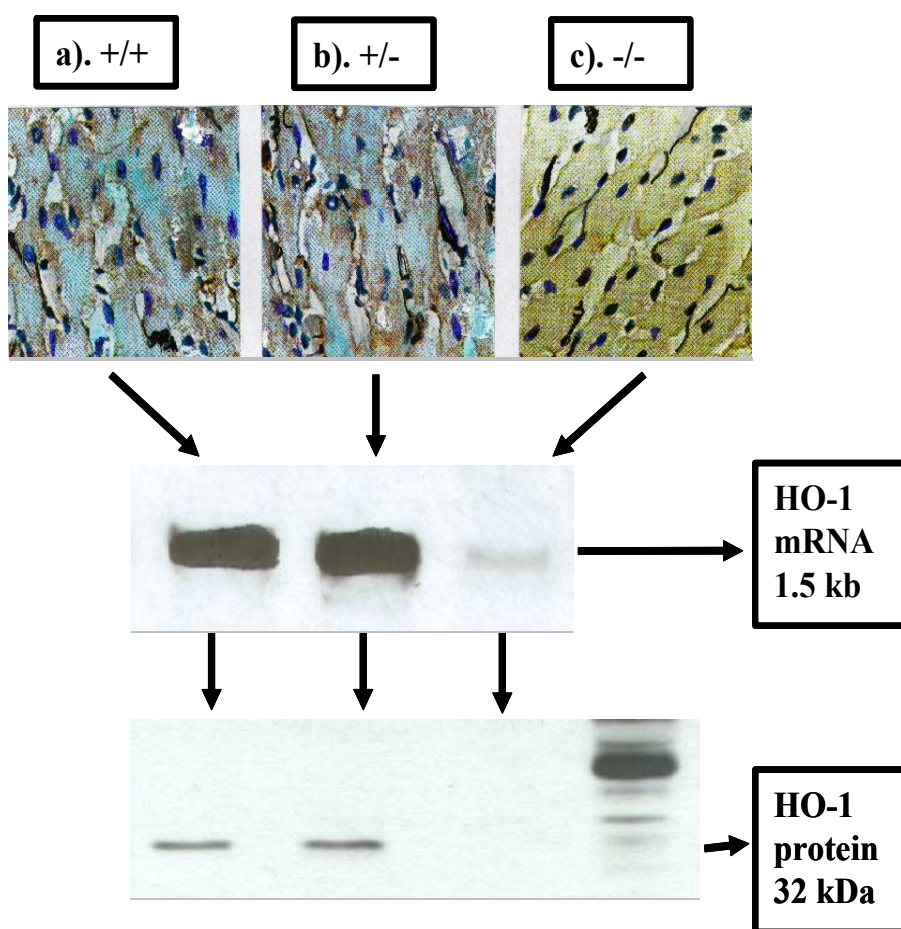
Megvizsgáltuk az enzim mRNS és protein expresszió változását, valamint az enzim lokalizációját Northern blot, Western blot és immunhisztokémia segítségével (7. ábra).

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 (7. ábra felső

panel, a-b, kék festődés). HO-1^{-/-} miokardium esetén nem tapasztaltunk festődést (7. ábra felső panel, c).

Ugyanez volt megfigyelhető a Northern blot technikával kapott eredményekben, vagyis a HO-1 mRNA 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 (7. 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 (7. ábra alsó panel).



7. ábra: A HO-1 lokalizációjának és expressziójának vizsgálata aerob perfúzió átesett egér miokardiumban.

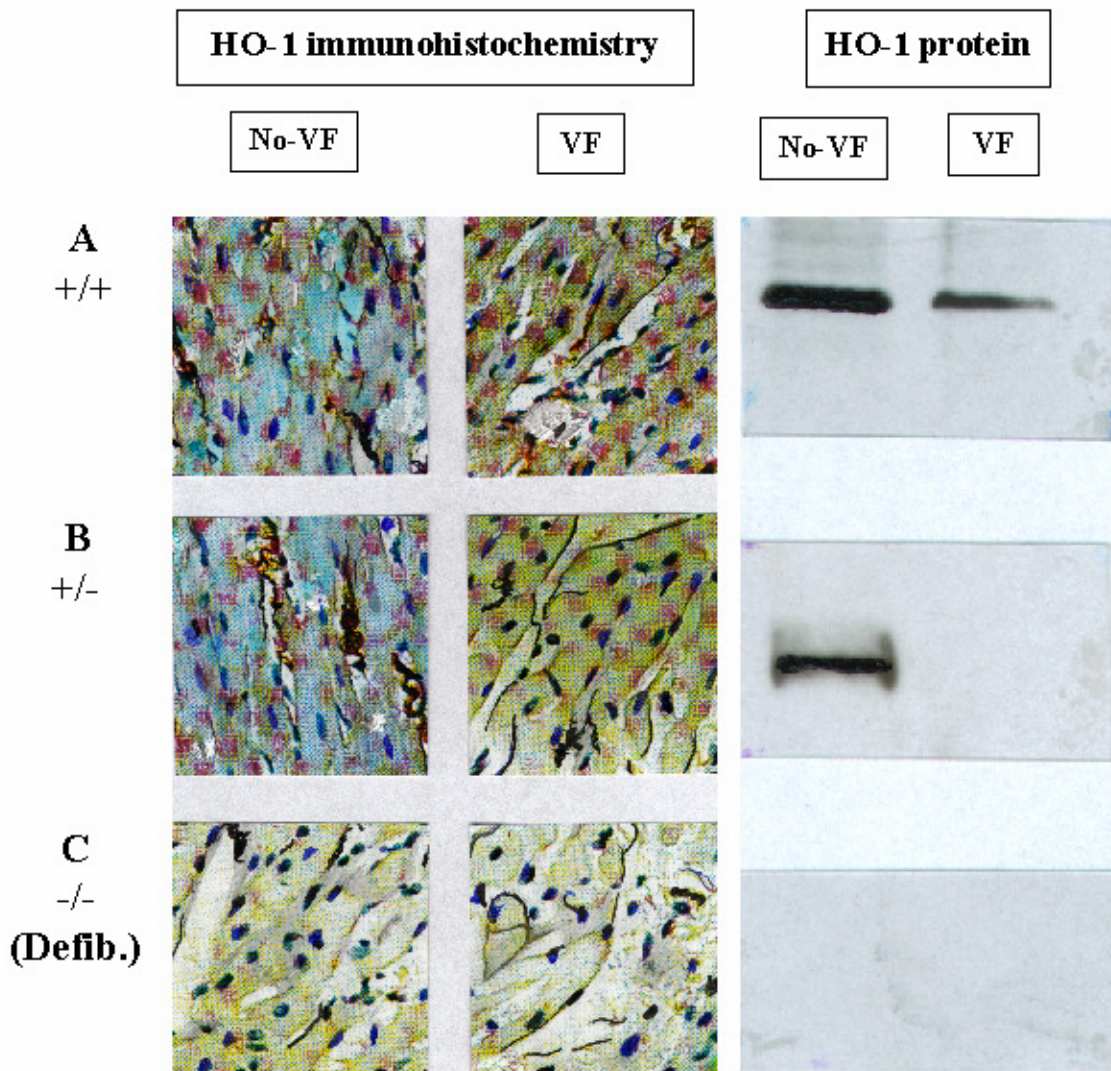
a). vad típusú, b). heterozigóta, c). HO-1 „knock out” egér miokardium

Felső panel: immunhisztokémia, középső panel: Northern blot, alsó panel: Western blot

VI. 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/reperfúzióknak kitett szívek esetében, immunhisztokémia és Western blot segítségével (8. ábra).



8. ábra: A HO-1 expresszió változása iszkémia/reperfúzióknak kitett izolált egérszívben.

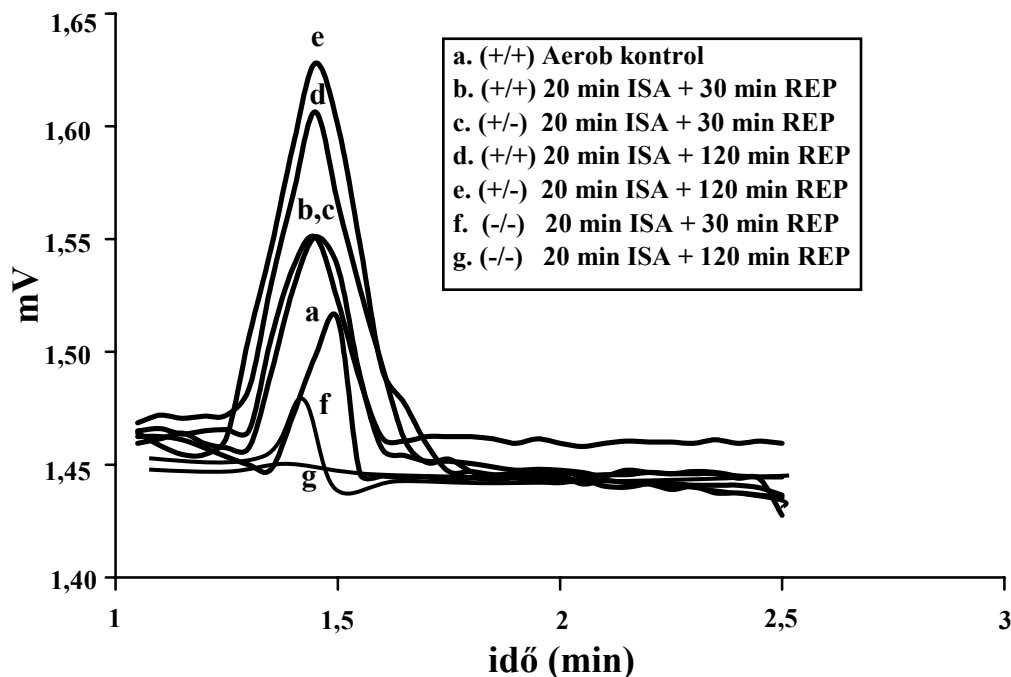
VF: fibrillált szív, No-VF nem fibrillált szív, Defib.: Defibrilláció

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 +/+ (8. ábra A) és a +/- heterozigóta (8. 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 (8. ábra C). Itt kell megjegyeznünk, hogy a HO-1 „knock out” állatokból izolált szívek minden esetben fibrilláltak, így ezeket elektromos úton defibrilláltuk (Defib.).

VII. Endogén CO tartalom meghatározása

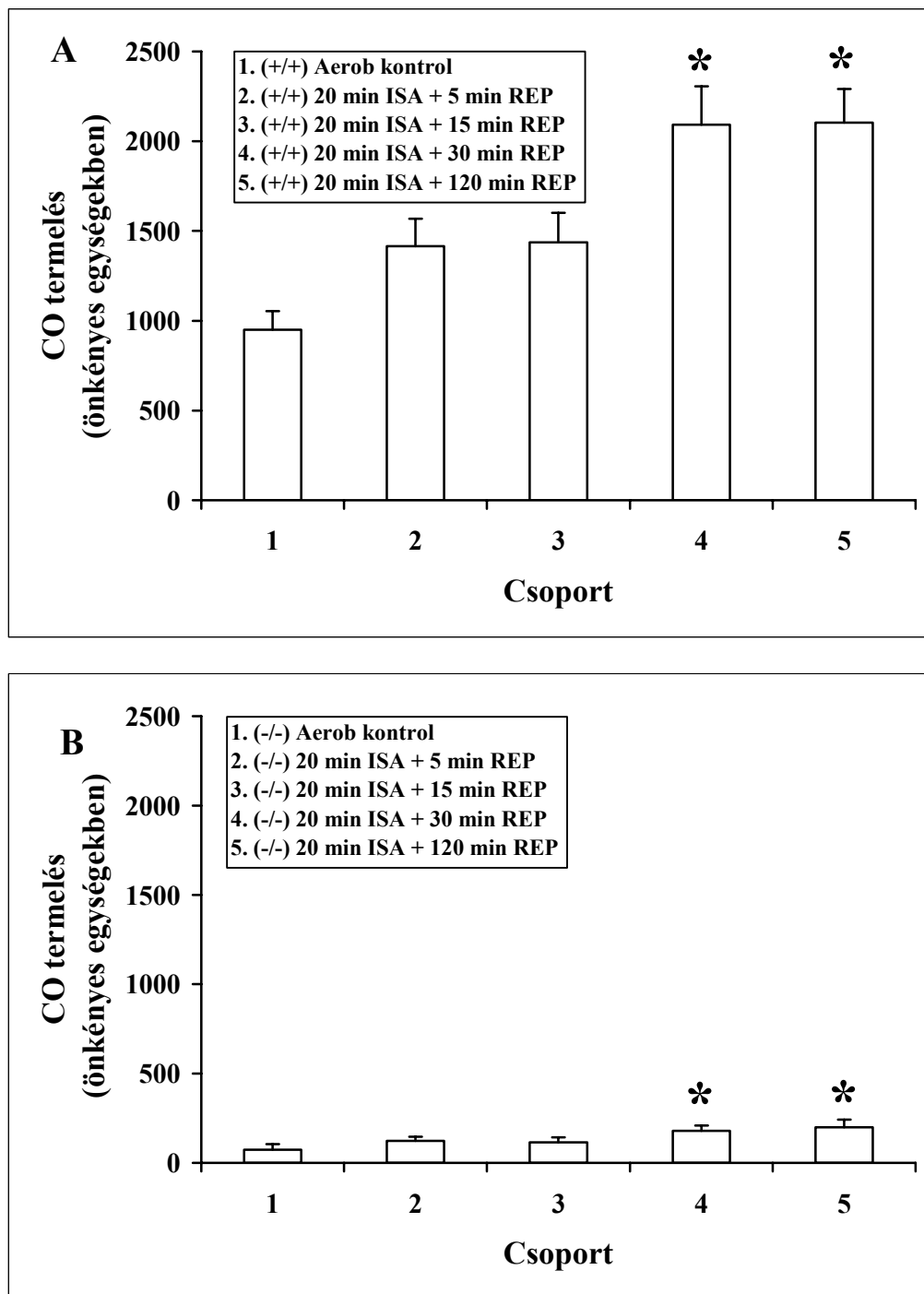
A 9. ábrán reprezentatív GC kromatogramok láthatók. Megfigyelhető, hogy húsz perc iszkémiának és 30, valamint 120 perc reperfúciónak kitett vad típusú (9. ábra b és d kromatogram), valamint heterozigóta (9. ábra c és e kromatogram) szívekben az endogén CO mennyisége jelentős mértékben nőtt az aerob kontrol (9. ábra a kromatogram) értékekhez viszonyítva. HO-1^{-/-} eger miokardium esetén (9. ábra f és g kromatogram) az endogén CO mennyisége nagyon alacsony volt, köszönhetően a HO-1 rendszer hiányának. Abban az esetben, ha a szív fibrilláción esett át nem tudtunk CO-t kimutatni.



9. ábra: Reprezentatív GC kromatogramok.

ISA: iszkémia, REP: reperfúzió, +/+ : vad típusú, +/-: heterozigóta, -/-: HO-1 „knock out” miokardium

A következő ábrán (10. ábra) a gázkromatográfias mérések eredménye látható 20 perc iszkémiát és az azt követő 5, 15, 30, és 120 perc reperfúzió után, vad típusú (A) és HO-1 K.O. miokardiumok (B) esetén. Jól látható, hogy az iszkémia/reperfúzió után és nem fibrilláló szívizomban az enzim által termelt endogén CO mennyisége jelentős mértékben emelkedett (10. ábra A). Az iszkémia/reperfúzió után kitett nem fibrilláló HO-1 -/- szívek esetén is tapasztaltunk kismértékű CO termelést (10. 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.



10. ábra: A GC-s mérések kvantitatív eredménye.
 n=6 csoportonként; *p<0.05 az aerob kontrol csoporthoz viszonyítva

VIII. Szívfunkciók, infarktos terület és miokardiális Na^+ , K^+ , és Ca^{2+} tartalom

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk a szívfunkciókat (7. táblázat). 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.

7. táblázat: Szívfunkciók 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak kitett vad típusú, HO-1 heterozigóta és HO-1 homozigóta egér miokardiumban.

Csoport	Iszkémia előtt					30 perc Reperfúziót követően					120 perc reperfúziót követően				
	HR (ütés/min)	CF (ml/min)	AF (ml/min)	AOP (mmHg)	AOP dp/dt (mmHg/s)	HR (ütés/min)	CF (ml/min)	AF (ml/min)	AOP (mmHg)	AOP dp/dt (mmHg/s)	HR (ütés/min)	CF (ml/min)	AF (ml/min)	AOP (mmHg)	AOP dp/dt (mmHg/s)
Vad típus (+/+)	290±10	2.8±0.2	3.1±0.2	161±7	3876±76	260±11	2.1±0.1	1.0±0.1	74±5	990±40	270±10	2.2±0.1	0.8±0.1	69±5	964±55
Heterozigóta (+/-)	294±9	2.7±0.2	3.0±0.1	152±8	3924±90	248±8	1.9±0.2	0.9±0.1	68±5	935±38	251±8	2.0±0.1	0.7±0.1	61±4	893±37
Homozigóta (-/-)	252±7*	2.0±0.1*	1.7±0.1*	127±6*	2851±57*	224±7*	0.8±0.1*	0.4±0.1*	42±4*	641±32*	230±6*	1.1±0.1*	0.6±0.1*	44±5*	627±29*

*p<0.05 a vad típusú (+/+) csoporthoz hasonlítva; n=6 csoportonként

8. táblázat: A celluláris Na⁺, K⁺ és Ca²⁺ tartalom iszkémia előtt és reperfúzió után, HO-1 vad típusú, heterozigóta és homozigóta egérszívben.

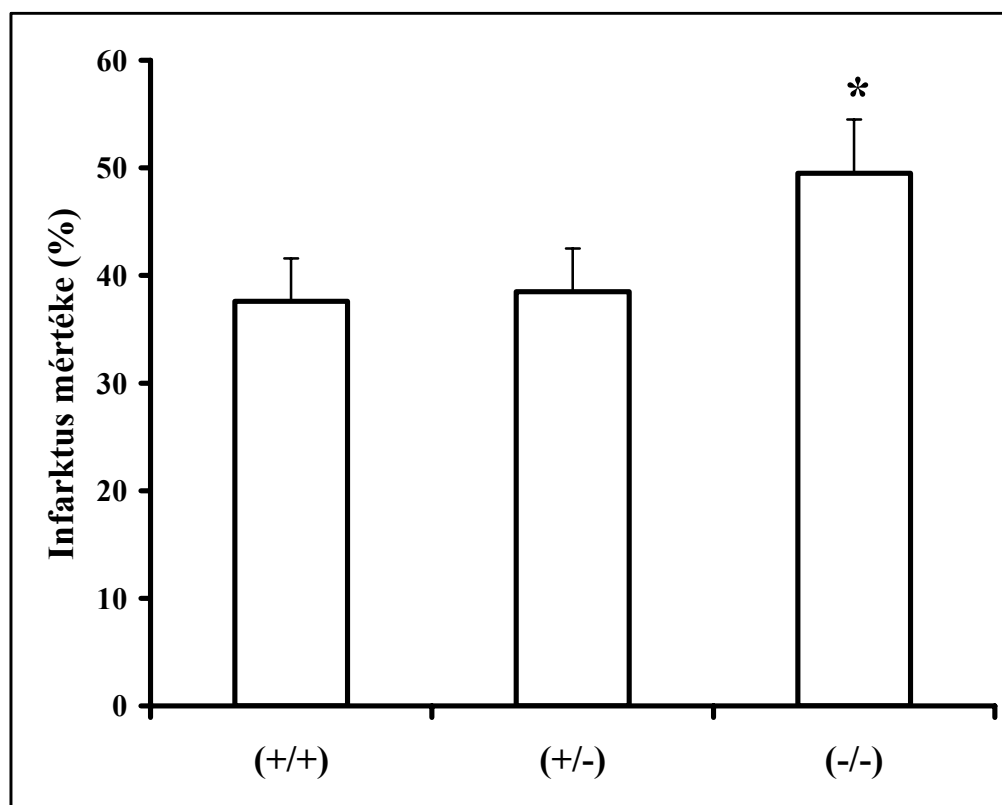
Csoport	Iszkémia előtt			120 perc reperfúziót követően		
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺
Vad típus (+/+)	29±4	278±7	1.7±0.2	80±6	233±6	4.3±0.5
Heterozigóta (+/-)	31±3	270±9	1.8±0.3	86±8	233±9	4.3±0.7
Homozigóta (-/-)	39±4*	253±8*	2.6±0.4*	99±7*	180±9*	5.5±0.6*

*p<0.05 a vad típusú (+/+) csoporthoz hasonlítva; n=6 csoportonként; az adatok µM/g száraz tömegre vannak feltüntetve.

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 Ca²⁺ koncentráció az iszkémia indukciója előtt szignifikáns emelkedést mutatott a HO-1^{-/-} csoportban összehasonlítva a másik két vizsgált csoport adataival (8. táblázat). Továbbá a celluláris K⁺ tartalom jelentősen alacsonyabb volt (253±8 μmol/g, száraztömegre) a homozigóta knock out szívekben, mint az aerob perfúzió átesett vad típusú szívizomban (278±7 μmol/g, száraztömegre). Az iszkémiás miokardium reperfúziója a celluláris iontartalom, hasonló mértékű zavarát eredményezte minden vizsgált csoportban, mely a -/- csoportban még súlyosabb volt (8. táblázat).

Az infarktusos terület nagysága jelentős mértékben nagyobb volt a HO-1^{-/-} csoportban (49,5±5 %, p<0,05) összehasonlítva a vad típusú (37,6±4 %), illetve a heterozigóta (38,5±4 %) csoport értékeivel (11. ábra).



11. ábra: Az infarktusos terület nagysága iszkémia/reperfúziónak kitett izolált egérszívekben. (+/+): vad típusú, (+/-): HO-1 heterozigóta, (-/-): HO-1 „knock out” homozigóta miokardium
*p<0.05 a (+/+) csoporthoz viszonyítva.

Diszkusszió

Az egészséges vagy beteg szívizomban bekövetkező hirtelen és nagymértékű iszkémiás rohamok patológiás események egész sorozatát indíthatják be, melyek a sejtfunkciók részleges károsodásán keresztül a szívizomsejtek elpusztulásáig vezethetnek. A miokardium iszkémiás periódusai, azok időtartamától függően különböző mértékű változásokat eredményezhetnek bizonyos gének expressziójában és a szívfunkciókban egyaránt. Az arrhythmiák, többek között a kamrafibrilláció kialakulásának mechanizmusa(i), mint például a re-entry, jól ismertek és definiáltak (Bissel és mtsai, 1996; Lincoff és Topol, 1993; Mark és mtsai, 1991), azonban a VF kialakulásának genetikai szintű magyarázatáról jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésre. Az idiopátiás kamrafibrilláció mechanizmusának vizsgálata során megállapították, hogy a szív ioncsatornáit kódoló gének mutációi növelik a kamrafibrilláció kialakulásának, illetve a hirtelen szívhalál előfordulásának valószínűségét (Chen és mtsai, 1993; Priori és mtsai, 1999). Ebből kiindulva feltételeztük -mivel a mitokondrium az oxidatív foszforiláció helye-, hogy a mitokondriális gének fontos szerepet játszhatnak az arrhythmogenesisben iszkémia/reperfúzióknak kitett szívizomban.

Megvizsgáltuk, hogy a mitokondriális mRNS expresszió, milyen kapcsolatban lehet a reperfúzió indukálta VF előfordulásával, perfundált, diabéteszes és nem diabéteszes patkány szívizomban. Továbbá magyarázatot kerestünk és vizsgáltuk a VF és a mitokondriális génexpresszió, konkrétan a COXBIII és ATP6 expresszió közötti kapcsolatot iszkémia/reperfúzióknak ki nem tett, elektromos úton fibrillációba hozott szívizomban. Az általunk vizsgált gének expressziója növekedett 30 perc iszkémiát követően, de reperfúzió indukálta fibrilláció során jelentős mértékű „downregulációt” tapasztaltunk. Abban az esetben, ha kamrafibrilláció nem alakult ki nem tapasztaltuk a vizsgált mRNS expressziójának csökkenését. Hasonlóan más emlősökhöz, a patkány mitokondriális genomja is csak 13 proteint kódoló területet tartalmaz (COX I, II, III; ATPase 6, 8; citokróm B, valamint NADH 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) (Bay és mtsai, 1998). Kísérleteinkben a reperfúzió 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, bár a fibrilláció indukálta közepes mértékű iszkémia szerepe sem zárható ki teljes mértékben. Feltehetően az

elektromos fibrilláció indukálta koronária vasokonstrikció nem valószínű, hogy magyarázatot adhat a mitokondriális génexpresszió változására, de kétségtelen, hogy ez a tényező befolyásolhatja a szív fibrillációt követő felépülését, összehasonlítva az iszkémia/reperfúzió indukálta fibrilláción átesett szívizommal. Vagyis az iszkémia/reperfúzióknak kitett szívek esetén a koronária átáramlás mértéke kevésbé közelítette meg a preiszkémias értékeket összehasonlítva az elektromos úton fibrillációba hozott szívekkel, melyeknél a koronária átáramlás mértéke elérte az iszkémia előtti érték 80-95 %-t. A VF és CF közötti kapcsolat és azok arányainak összefüggései, valamint azok jelentősége széleskörűen tanulmányozott terület a kardiovaszkuláris farmakológián belül (Curtis és Hearse, 1989).

Ahogy azt korábban is feltételeztük, a mitokondriális mRNS expresszió arrhythmogenesisben játszott szerepének magyarázatára szolgáló mechanizmusok magukba foglalhatják az mRNS által kódolt proteinek is, melyek központi szerepet töltenek be a membránokon keresztül történő iontranszport szabályozásokban. Kísérleti eredményeink jól tükrözik, hogy a szív a szívfunkciók tekintetében képes az iszkémias inzultust követően felépülni, valamint hogy a COXBIII és az ATP5B „downregulációja” a kamrafibrillációból eredhet. Bár úgy tűnik, hogy ezek az eredmények egymásnak ellentmondanak, lehetséges, hogy az elektromos úton létrehozott fibrilláció okozta károsodás heterogén, és hogy az irreverzibilis károsodás a szívizomsejtek egy meghatározott kis populációjából indul ki. Így az elektromos úton indukált fibrilláció végén a nem károsodott, vagy csak reverzibilis károsodást szenvedett sejtek visszanyerhetik funkciójukat, megközelítve a normál értékeket, de ennek ellenére a mitokondriális mRNS expresszióban további romlás következik be. A mitokondriális mRNS expresszió változásának fibrilláló, nem fibrilláló és elektromos úton fibrillációba hozott szívekben végzett vizsgálatok alapján feltételezzük, hogy az iszkémia/reperfúzió indukálta szívfunkció romlást a VF indukálta károsodások tovább súlyosbítják.

Azok a hatások, melyek a mitokondriális gének fokozott transzkripcióját eredményezik az iszkémias/reperfundált szívben, jelenleg még tisztázatlanok. Számos jelátviteli útvonalról, melyek különböző gének expresszióját szabályozzák, megállapították, hogy aktiválódik, vagy dezaktiválódik iszkémia/reperfúzió során, illetve már több tanulmány is foglalkozott promoter elemekkel történő kapcsolatukkal nukleáris gének szabályozásában. A közelmúltban leírtak egy transzkripció faktor, mely úgy tűnik, hogy feltehetően kölcsönhatásba lép a mitokondriális DNS D-hurkában a promoter régióval, azonban még nem tisztázott, hogy vajon ez egy járulékos faktor, vagy pedig

aktívan szabályozza a transzkripciót intracelluláris messengerek hatására (Attardi és Schatz, 1988; Shade és Clayton, 1993).

Több kutatócsoport is tanulmányozta a hypoxia-indukálta nukleáris faktor (HIF-1) szerepét különböző sejtvonalakban, illetve szövet típusban (Wang GL és Semenza, 1993; Semenza G L, 1999). Megállapították, hogy a HIF-1 jelen van és funkcionál a különböző kísérleti modellekben. Ez alapján feltételezték, hogy ez a transzkripció faktor általános szerepet játszik az emlős szövetek hypoxia/iszkémiára adott válaszában, valamint, hogy szabályozhatja más hypoxia/iszkémia indukálta gének expresszióját. HIF-1 kötőhelyet azonosítottak pl. az iNOS génben is (Jung és mtsai, 2000). Az iszkémia/reperfúzióknak kitett szívizomban bekövetkező mitokondriális mRNS expresszió változás jelentőségének felismerése, valamint a mitokondriális gének azonosítása, mint a HIF-1 szabályozás célpontjai újabb hipotézis felállítását, illetve bizonyítását teszi lehetővé, mely szerint a mitokondriális génexpresszió változások a HIF-1-en keresztül is hozzájárulhatnak az iszkémiát követő kamrai diszfunkciók szabályozásához.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy a diabéteszes szívizom másképpen reagál a miokardiális károsodásokra, mint a nem diabéteszes szívizom. Kísérleteinkben az arrhythmogén mechanizmusokra vonatkozólag nem tapasztaltunk jelentős mértékű változást a COXBIII és ATP5B mRNS expresszióval kapcsolatban az iszkémia/reperfúzióknak kitett diabéteszes és nem diabéteszes csoport között, mely arra utal, hogy mindkét gén központi szerepet játszhat az arrhythmia kialakulásában diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban egyaránt. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a vizsgált gének mRNS és protein expressziójának farmakológiai stimulálásával a reperfúzió indukálta VF kialakulása megelőzhető, valamint, hogy ezek a gének jelentős mértékben szabályozhatják az arrhythmia kialakulásának mechanizmusait iszkémia/reperfúzióknak alávetett diabéteszes és nem diabéteszes szívekben egyaránt.

Munkánk második részében arra törekedtünk, hogy még közvetlenebb bizonyítékokat szerezzünk a HO-1 által termelt endogén CO szerepéről, a reperfúzió indukálta kamrafibrillációk kialakulásának megelőzésében. A celluláris CO termelés mérésével közvetlen bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy az említett védekezési mechanizmus a HO-1 mRNS indukción keresztül, az emelkedett endogén CO termelésnek tulajdonítható. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy többek között az infarktusz terület nagysága jelentős mértékben nagyobb volt a HO-1^{-/-} homozigóta egér csoportban, mint a vad típusú, illetve a heterozigóta egér csoportokban, továbbá, hogy ez a növekedés az infarktusz terület nagyságában emelkedett miokardiális Na⁺ és Ca²⁺, valamint csökkent

K^+ koncentrációkkal is összefüggésbe hozható. Kimutattuk, hogy a HO-1, illetve a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO produkció fontos szerepet játszik a miokardiális homeosztázisban az által, hogy megvédi a szívet az iszkémia/reperfúzió indukálta funkcionális károsodásoktól melyek magukba foglalják a reperfúzió indukálta VF-t is. Iszkémia/reperfúziós inzultust követően a HO-1 mRNS és protein nagymértékű „downregulációját”, valamint az enzim aktivitás csökkenését tapasztaltuk mind a fibrilláló vad típusú, mind pedig a fibrilláló heterozigóta egér szívek esetében. Aerob perfúzióknak kitett HO-1^{-/-} szívekben nem tudtuk detektálni sem a HO-1 mRNS-t, sem pedig annak proteinjét. A HO-1 knock out (-/-) homozigóta szívekben a szívfunkciók rosszabbak voltak mind aerob körülmények között mind pedig reperfúzió során, összehasonlítva a vad típusú szívekkel. Reperfúzió során a homozigóta (-/-) szívek minden esetben fibrilláltak, ami bizonyítja, hogy mind a HO-1 mRNS mind pedig proteinjének jelenléte, illetve a HO-1 enzim aktivitás antiarrhythmias hatású lehet.

A HO-1, illetve a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO termelés pontos mechanizmusa, melynek során kifejti védő hatását jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képezi (Masini és mtsai, 2003; Chen és mtsai 2003; Shibahara és mtsai, 2003). A keletkező biliverdinről kimutatták, hogy megvédi a szívizomsejteket az oxidatív károsodásoktól, valamint elősegíti a posztisztkémiás szívfunkciók nagyobb mértékű felépülését (Clark és mtsai, 2000). Továbbá az emelkedett szérumbilirubin koncentráció kapcsolatba hozható a korai familiáris koronária artéria rendellenesség csökkent mértékű előfordulási valószínűségével is (Hopkins és mtsai, 1996). 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 (emelésére). Ezáltal, hasonlóan a nitrogén oxidhoz, szerepet játszhat egyaránt a fiziológiás és patológiás értónus szabályozásában (Clark és mtsai, 2003). A HO rendszer jelentőségét már számos betegségben, többek között asthmában, endotoxémiában, cardiomyopathiában, és iszkémia/reperfúzió indukálta sérülésekben is leírták. A bizonyítékok növekvő számának tükrében, mely szerint a HO-1 védelmet biztosít az oxidatív károsodások ellen, a kutatók egyre több figyelmet fordítottak a HO-katalízis antioxidáns tulajdonságú „melléktermékeire”, a már korábban említett biliverdinre, illetve bilirubinra. Ezen túlmenően a hem degradációval járó endogén CO növekedés az iszkémia/reperfúzió okozta sérülések elleni citoprotekció szabályozásának egyik lehetséges célpontjává vált. A „citoprotektív” CO-ról kimutatták, hogy a celluláris cGMP szint szabályozásán keresztül hozzájárul az endotheliumtól-függő vasodilatációhoz, elősegítve ezáltal a jobb keringést és

vérrellátást a koronáriákban a reperfüzió folyamata során. Másik jelentős tulajdonsága, hogy a nitrogén oxid szintáz (NOS) gátlása révén csökkenti a NO képződést, gyulladás ellenes hatása van, gátolja mind az apoptotikus, mind pedig a sejtosztódási mechanizmusokat, valamint immunszuppresszív tulajdonságokkal is rendelkezik (Katori és mtsai, 2002; Braudeau és mtsai, 2003; Zhang és mtsai, 2003). Feltételezhető, hogy a CO előbb említett tulajdonságai mind hozzájárulnak a kardioprotektív hatásokhoz az iszkémiás/reperfundált szívszövetben. A HO által termelt CO hatását kifejezheti egyrészt közvetlenül a keletkezés helyén, vagy pedig a szomszédos sejtekbe diffundálva.

Kísérleteink célja a HO-CO rendszer szerepének vizsgálata volt az iszkémiás/reperfundált szívizomban. Mindemellett azonban meg kell említenünk a nitrogénoxid szintáz (NOS-NO) rendszer szerepét is, tekintettel arra, hogy a két rendszer nagyon sok hasonlóságot mutat. Egyrészt mind a HO, mind a NOS rendszernek van konstitutív és indukálható izoformja, továbbá mind a CO és az NO képes aktiválni a guanil-cikláz, melynek következtében megnő a cGMP szint, amely hatékony szekunder-messsengerként funkcionálva többek között vaosrelaxációt eredményez. Ezen túlmenően, a legtöbb hatás, melyek indukálják az iNOS expresszióját, mint pl. catecholaminok, citokinek és az iszkémia/reperfúzió, szintén indukálják a HO-1 expressziót. A CO és NO relatív hozzájárulása a guanil-cikláz aktiválásához a kardiovaszkuláris rendszerben jelenleg még tisztázatlan. Számos patológiai körülmény során, mint pl. hypoxia, hő sokk, és iszkémia/reperfúzió, a CO mediálta hatás lehet a domináló. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint HO inhibitor alkalmazása gátolta a cGMP termelést, ugyanakkor NOS inhibitoroknak nem volt hatásuk (Morita és mtsai, 1995). Pannen és mtsai vérzéses sokk patkány modelljén kimutatták, hogy a CO indukálja a mikrocirkuláris dilataciót és a sejtek védelmét, míg a NO esetében nem tapasztaltak jelentős hatást az alkalmazott modellen (Pannen és mtsai, 1998). Mindamelllett, hypertermiás stressz szintén emelte a cGMP szintet CO termelésen keresztül, míg a NO-nak nem volt szignifikáns hatása (Ewing és mtsai, 1994). Újabb kutatások bizonyították, hogy a NO sokkal erősebb stimulátora a guanil-cikláznak, (kb. 300-400 x emelkedést eredményez az enzim aktivitásban, összehasonlítva a CO okozta 5-15 x emelkedéssel) (Hoenicka és mtsai, 1999; Sharma és Magde, 1999). Valószínűsíthetjük tehát, bár általában a NO dominánsabb aktivátora a guanil-cikláznak, hogy bizonyos körülmények között, egyes szövetekben, az endogén CO fiziológiai funkciója fontosabb lehet. Mivel mind az NO, mind pedig a CO a guanil-cikláz stimulálásán keresztül feje ki hatását, ezért további kísérletekre van szükség,

hogy bizonyításra kerüljön az a tény, hogy az emelkedett cGMP szint legalább részben az endogén CO-nak tulajdonítható az általunk használt modell estén.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy HO-1 vad típusú, valamint HO-1 „knock out” hetero-, illetve homozigóta egerek szívszövetének használatával kimutattuk, hogy a HO-1, illetve a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO produkció fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer iszkémia/reperfúziós inzultusra adott válaszában. A K.O. állatokból izolált szívek érzékenyebbek voltak az iszkémia/reperfúzióra, rosszabb posztiszkémiás szívfunkciókat mutattak, valamint reperfúzió során, minden esetben fibrilláltak. A K.O. egyedekből izolált szívek esetében az infarktusz terület nagysága is nagyobb volt a másik két vizsgált csoporthoz viszonyítva, valamint a celluláris ionkoncentrációkban is nagymértékű zavarokat figyeltünk meg. Ezen eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a hemoxigenáz-1 mRNS, az ahhoz kapcsolódó protein szintézis, valamint az enzim aktivitás központi szerepet játszhat a szív fiziológiai működésének megőrzésében, vagy helyreállításában az által, hogy megvédi a szívizmot az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásoktól. Feltételezhető továbbá, hogy a HO-1 mRNS expresszió farmakológiai stimulálása révén a reperfúzió indukálta kamrafibrillációk kialakulása kivédhető. Újabb kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy exogén úton bevitt CO megfelelően és szigorúan kontrollált alkalmazása, hasonlóan az endogén CO termelés stimulálásához, megvédi a miokardiumot és más szerveket is a reperfúzió indukálta károsodásoktól (Sato és mtsai, 2001; Fujita és mtsai, 2001). Mindezeket túl azonban még további kísérletek szükségesek az iszkémia/reperfúzió indukálta génexpresszió, a kapcsolódó protein szintézis és HO aktivitás „up”- és „downregulációja” közötti kapcsolatok megoldására a fibrilláló és nem fibrilláló szívizomban.

Összegzés

A szívizom iszkémia/reperfúzió egyike a morbiditás és mortalitás általános okozóinak. A csökkent oxigénellátás és perfúzió súlyos klinikai következményekkel járhat. Vizsgálataink során az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk genom és a mitokondriális eredetű génexpressziós változások figyelembevételével izolált patkány és egérszíveken.

Megállapítottuk, hogy:

- A diabéteszes szívizom másképp reagál a miokardiális károsodásokra, mint a nem diabéteszes.
- Kísérleteinkben az arrhythmogén mechanizmusokra vonatkozólag nem tapasztaltunk jelentős mértékű változást a COXBIII és ATP5B mRNS expresszióval kapcsolatban az iszkémia/reperfúzióknak kitett diabéteszes és nem diabéteszes csoport között.
- Az általunk vizsgált gének expressziója növekedett 30 perc iszkémiát követően reperfúzió indukálta fibrilláció során jelentős mértékű downregulációt tapasztaltunk.
- Abban az esetben, ha kamrafibrilláció nem alakult ki, nem tapasztaltuk a vizsgált mRNS expressziójának csökkenését.
- Kísérleteinkben a reperfúzió indukálta VF kialakulása jelentős mértékben függött a COXBIII és az ATP5B expresszió downregulációjától.
- 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 még közvetlenebb bizonyítékokat szerezzünk a HO-1 által termelt endogén CO szerepéről, a reperfúzió indukálta kamrafibrillációk kialakulásának megelőzésében.

Főbb megállapítások:

- A K.O. állatokból izolált szívek érzékenyebbek voltak az iszkémia/reperfúzióra, rosszabb posztiszkémiás szívfunkciókat mutattak, valamint reperfúzió során, minden esetben fibrilláltak.
- Az infarktusos terület nagysága jelentős mértékben nagyobb volt a HO-1^{-/-} homozigóta csoportban, mint a vad típusú, illetve a heterozigóta csoportokban.
- Ez a növekedés az infarktusos terület nagyságában összefüggésbe hozható emelkedett miokardiális Na⁺ és Ca²⁺, valamint csökkent K⁺ koncentrációkkal.
- Iszkémia/reperfúziós inzultust követően a HO-1 mRNS és protein nagymértékű downregulációját, valamint az enzim aktivitás csökkenését tapasztaltuk mind a fibrilláló vad típusú, mind pedig a fibrilláló heterozigóta szívek esetében.
- Aerob perfúzióknak kitett HO-1^{-/-} szívekben nem tudtuk detektálni sem a HO-1 mRNS-t, sem pedig annak proteinjét.
- A celluláris CO termelés mérésével közvetlen bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy a tapasztalt pozitív hatások a HO-1 mRNS indukción keresztül, az emelkedett endogén CO termelésnek tulajdonítható.
- Mindezek alapján feltételezhető, hogy a HO-1 mRNS expresszió farmakológiai stimulálása révén a reperfúzió indukálta kamrafibrillációk kialakulása kivédhető.

Summary

Cardiac ischemia/reperfusion is among the most common causes of morbidity and mortality. Decreased oxygen supply and perfusion can cause serious injuries. The overall aims of our studies were to investigate pharmacological approaches capable of reducing ischemia/reperfusion induced damage in relation of genomic and mitochondrial gene expression in isolated rat and mouse hearts.

Main observations:

- Diabetic hearts respond on different ways to the susceptibility of the myocardium in comparison with the nondiabetic myocardium.
- In our studies, significant changes, regarding the arrhythmogenic mechanism in connection with COXBIII and ATP5B mRNA expression, were not observed between ischemic/reperfused diabetic and nondiabetic myocardium,
- An increase in the expression of the two mitochondrial-encoded genes, COXBIII and ATP5B, after 30 min ischemia and a downregulation of these two genes after 2 hours reperfusion in fibrillated hearts.
- In nonfibrillated myocardium, upon reperfusion, the downregulation of the mitochondrial genes studied was not observed.
- The development of reperfusion-induced VF was critically dependent upon the downregulation of COXBIII and ATP5B.
- Our findings suggest that pharmacological stimulation of the expression of COXBIII and ATP5B during reperfusion could prevent the development of VF.

In the second part of our studies, we have endeavored to obtain more circumstantial evidence for the involvement of HO-1-related endogenous CO production and its direct measurement in the genesis of reperfusion-induced ventricular fibrillation.

Our data show, that:

- The myocardium from HO-1 knockout mice exposed to ischemia/reperfusion was severely injured; the poor recovery of postischemic cardiac function was recorded, and all hearts developed reperfusion-induced VF.
- Infarct size was significantly increased in homozygous (-/-) mouse hearts.
- This increase in infarct size related to a significant elevation in myocardial Na⁺ and Ca²⁺ accumulation and K⁺ loss.
- After ischemia/reperfusion, there was extensive HO-1 mRNA and protein downregulation, and enzyme activity reduction in fibrillated HO-1 heterozygous and homozygous mouse myocardium.
- The lack of HO-1 mRNA and its protein was observed in aerobically perfused, without an episode of ischemia/reperfusion, homozygous mouse myocardium.
- We now provide direct evidence by measuring cellular CO production suggesting that this is the case and the protective effect against the development of reperfusion-induced VF is attributable to the generation of endogenous CO through HO-1 mRNA induction.
- On the basis of these findings, we postulate that HO-1 may play a central role in cardiac physiology by protecting the heart from ischemia/reperfusion-induced damage.

Irodalomjegyzék

- Attardi G., Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* **4**: 289-333
- Bak I., Papp G., Turoczi T., Varga E., Szendrei L., Vecsernyes M., Joo F., Tosaki A. (2002) The role of heme oxygenase related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Radic Biol Med* **33**: 639-648
- 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
- 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
- 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
- Braudeau C., Bouchet D., Toquet C., Tesson L., Ménoret S., Iyer S., Laboisie C., Willis D., Jarry A., Buelow R., Anegon I., Chauveau C. (2003) Generation of heme oxygenase-1 transgenic rats. *Exp Biol Med* **228**: 466-471
- Carmeliet E. (1999) Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiological Reviews* **79**: 917-1017
- 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
- 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
- Chen Y-H., Yet S-F., Perrella M. A. (2003) Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Exp Biol Med* **228**: 447-453
- Choi A. M. K. (2001) Heme oxygenase-1 protects the heart. *Circ Res* **89**: 105-107
- Choi A. M. K., Alam J. (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress inducible protein in oxidant induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**: 9-19
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159

- Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Kaur H., Green C. J., Motterlini R. (2000) Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**: H643-H651
- Clark J. E., Naughton P., Shurey S., Green C. J., Johnson T. R., Mann B. E., Foresti R., Motterlini R. (2003) Cardioprotective actions by water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res* **93**: e2-e8
- Cook M. N., Nakatsu K., Marks G. S., McLaughlin B. E., Vreman H. J., Stevenson D. K., Brien J. F. (1995) Heme oxygenase activity in adult rat aorta and liver as measured by carbon monoxide formation. *Can J Physiol Pharmacol* **73**: 515-518
- Curtis M. J, Hearse D. J. (1989) Reperfusion-induced arrhythmias are critically dependent upon occluded zone size: relevance to the mechanism of arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* **21**: 625-637
- 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
- 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
- Fujita T., Toda K., Karimova A., Yan S-F., Naka Y., Yet S-F., Pinsky D. J. (2001) Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by depression of fibrinolysis. *Nat Med* **7**: 598-604
- Ganguly P. K., Pierce G. N., Dhalla K. S., Dhalla N. S. (1983) Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Endocrin Metabol* **244**: E528-E535
- Heyliger C. E., Prakash A., McNeill J. H. (1987) Alterations in cardiac sarcolemmal Ca²⁺ pump activity during diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart and Circ Physiol* **252**: H540-H544
- Hoenicka M., Becker E. M., Apeler H., Sirichoke T., Schroder H., Gerzer R., Stasch J. P. (1999) Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med* **77**: 14-23
- Hopkins P. N., Wu L. L., Hunt S. C., James B. C., Vincent G. M., Williams R. R. (1996) Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**: 250-255
- Immenschuh S., Ramadori G. (2000) Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* **60**: 1121-1128
- Ingi T., Ronnett G. V. (1995) Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* **15**: 8214-8222

- Jung F., Palmer L. A., Zhou N., Johns R. A. (2000) Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* **86**: 319-325
- Katori M., Anselmo D. M., Busuttill R. W., Kupiec-Weglinski J. W. (2002) A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system. *Transplant Immunol* **9**: 227-233
- Khandoudi N., Bernard M., Cozzone P., Feuvray D. (1990) Intracellular pH and role of Na⁺/H⁺ exchange during ischemia and reperfusion of normal and diabetic rat hearts. *Cardiovasc Res* **24**: 873-878
- Lim S., Groneberg D., Fischer A., Oates T., Caramori G., Mattos W., Adcock I., Barnes P. J., Chung K. F. (2000) Expression of heme oxygenase isoenzyme 1 and 2 in normal and asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* **162**: 1912-1918
- Lincoff A. M., Topol E. (1993) Illusion of reperfusion: Does anyone achieve optimal reperfusion during acute myocardial infarction? *Circulation* **87**: 1792-1705
- Liu H., Song D., Lee S. S. (2001) Role of heme oxygenase-carbon monoxide pathway in pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in the rat. *Am J Physiol* **280**: G68-G74
- Maines M. D. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 517-554
- Maines M. D. (2003) Bile Pigments: Newcomers to the Cell Signaling Arena. *Toxicol Sci* **71**: 9-10
- Mark D. B., Sigmon K., Topol E. J., Kereiakes D. J., Pryor D. B., Candela R. J., Califf R. M. (1991) Identification of acute myocardial infarction patients suitable for early hospital discharge after aggressive interventional therapy: results from the thrombolysis and angioplasty in acute myocardial infarction registry. *Circulation* **83**: 1186-1193
- Masini E., Vanacci A., Marzocca C., Pierpaoli S., Giannini L., Fantappié O., Mazzanti R., Mannaioni P. F. (2003) Heme oxygenase-1 and the ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Exp Biol Med* **228**: 546-549
- McCoubrey W. K., Huang T. J., Maines M. D. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* **247**: 725-732
- Mocanu M. M., Baxter G. F., Yellon D. M. (2000) Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* **130**: 197-200
- Morita T., Perrella M. A., Lee M-E., Kourembanas S. (1995) Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1475-1473
- Motterlini R., Gonzales A., Foresti R., Clark J. E., Green C. J., Winslow R. M. (1998) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ Res* **83**: 568-577

- Neubauer S., Newell J. B., Ingwall J. S. (1992) Metabolic consequences and predictability of ventricular fibrillation in hypoxia: A ^{31}P - and ^{23}Na -nuclear magnetic resonance study of the isolated rat hearts. *Circulation* **86**: 302-310
- Pannen B. H., Kohler N., Hole B., Bauer M., Clemens M. G., Geiger K. K. (1998) Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* **102**: 1220-1228
- Pataki T., Bak I., Csonka C., Kovacs P., Varga E., Blasig I. E., Tosaki A. (2001) Regulation of ventricular fibrillation by heme oxygenase in ischemic/reperfused hearts. *Antioxid Redox Signal* **3**: 125-134
- Pearson W. R., Lipman D. J. (1982) Improved tools for biological sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444-2448
- 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
- Pierce G. N., Ramjiawan B., Dhalla N. S., Ferrari R. (1990) Na^+ - H^+ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles isolated from diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **258**: H255-H261
- 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
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) In *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sammur I. A., Foresti R., Clark J. E., Exon D. J., Vesely M. J. J., Sarathchandra P., Green C. J., Motterlini R. (1998) Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br J Pharmacol* **125**: 1437-1444
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5468
- Sato K., Balla J., Otterbein L., Smith R. N., Brouard S., Lin Y., Csizmadia E., Sevigny J., Robson S. C., Vercellotti G., Choi A. M., Bach F. H., Soares M. P. (2001) Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J. Immunol* **166**: 4185-4194
- Semenza G. L. (1999) Regulation of mammalian O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Ann Rev Cell Dev Biol* **15**: 551-578
- Shade G. S., Clayton D. A. (1993) Mitochondrial transcription initiation. *J Biol Chem* **268**: 16083-16086

- Sharma V. S., Magde D. (1999) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: a mechanistic model. *Methods* **19**: 495-505
- Shibahara S., Nakayama M., Kitamuro T., Uono-Fujimori R., Takahashi K. (2003) Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. *Exp Biol Med* **228**: 472-473
- Statisztikai adatok Magyarország 1999. évi egészségügyi helyzetéről *Népegészségügy*, 6/2000
- Tenhunen R., Marver H. S., Schmid R. (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* **244**: 6388-6394
- Tennant R., Wiggers C. (1935) The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* **112**: 351-362
- Tosaki A., Balint S., Szekeres L. (1988) Protective effect of lidocaine against ischemia and reperfusion-induced arrhythmias and shifts of myocardial sodium, potassium, and calcium content. *J Cardivasc Pharmacol* **12**: 621-628
- Tosaki A., Das D. K. (2002) The role of heme oxygenase signaling in various disorders. *Mol Cell Biochem* **232**: 149-157
- Verma A., Hirsch D. J., Glatt C. E., Ronnett G. V., Snyder S. H. (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* **259**: 381-384
- Wang G. L., Semenza G. L. (1993) General involvement of hypoxia inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4304-4308
- 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
- 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
- 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
- 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
- Zhang F., Kaide J-I., Rodrigez-Mulero F., Abraham N. G., Nasjletti A. (2001) Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am J Hypertens* **14**: 62S-67S

Zhang X., Shan P., Otterbein L. E., Alam J., Flavell R. A., Davis R. J., Choi A. M. K., Lee P. J. (2003) Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem* **278**: 1248-1258

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tósaki Árpád tanszékvezető egyetemi tanárnak, és Dr. Bak István egyetemi tanársegédnek a disszertáció létrejöttéhez nyújtott nélkülözhetetlen gyakorlati és elméleti segítségeikért, valamint az eredmények folyóiratokban történő publikációjáért.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. **Szendrei L**, Turoczi T, Kovacs P, Vecsernyes M, Das DK, Tosaki A. (2002) Mitochondrial gene expression and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused nondiabetic and diabetic myocardium. *Biochem Pharmacol* **63**: 543-552. **IF: 3,542**
2. 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. (2003) Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* **17**: 2133-2135 **IF: 7,252**

Absztrakt

1. **Szendrei L.**, Turoczi T., Das D. K., Tosaki A. (2001). The role of mitochondrial gene expression in ventricular fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* **33 (6)**: A117. **IF: 4.091**
1. **Szendrei L.**, Turoczi T., Das D. K., Tosaki A. (2002) Reperfusion-induced ventricular fibrillation and mitochondrial gene expression in ischemic/reperfused hearts. *J Mol Cell Cardiol* **34 (6)**: A61. **IF: 4.091**
2. **Szendrei L.**, Bak I., Juhasz B., Turoczi T., Das D. K., Tosaki A. (2003) The role of heme oxygenase-1 and carbon monoxide in reperfusion-induced ventricular fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* **35 (6)**: A45. **IF: 4.091**

Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

1. Kovacs P., Bak I., **Szendrei L.**, Vecsernyes M., Varga E., Blasig I. E., Tosaki A. (2001) Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *N-S Arch Pharm* **364**: 501-507; **IF: 2.566**
2. Bak I., Papp G., Turoczi T., Varga E., **Szendrei L.**, Vecsernyes M., Joo F., Tosaki A. (2002) The role of heme oxygenase related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Rad Biol Med* **33**: 639-648; **IF: 5.533**