

Doktori (Ph.D.) értekezés

# **Az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások pathológiai szerepe és mechanizmusai**

Váradi Judit



Témavezető: Dr. Tószaki Árpád

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

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

2007

## Bevezetés

Napjaink egyik legnagyobb kihívást jelentő egészségügyi problémája a kardiovaszkuláris betegségek és azok kezelése. Az utóbbi évtizedben sajnálatos módon megemelkedett a daganatos betegségek gyakorisága, azonban a felnőtt férfiak és nők esetében is még mindig a kardiovaszkuláris betegségek jelentik a vezető halálokat. Ma már statisztikai modellekkel mérni tudják egy-egy, vagy több rizikófaktor (pl.: túlsúly, diétahiba, dohányzás) befolyását a mortalitási és morbiditási értékekre. Magyarországon is egyre több gondot fordítanak a beteg tájékoztatásra, hogy csökkentsék a rizikófaktorok befolyását. Mivel a rizikófaktorok teljes eliminálása nem valósulhat meg, így preventív célból nagy szükség van a gyógyszeres kezelésre.

A kardiovaszkuláris megbetegedésekre számos gyógyszeres kezelési lehetőség áll rendelkezésre, de további fejlesztések folynak a hatékonyság növelése érdekében. Ezt segítik azok az alap kutatások, melyek molekuláris mechanizmusokat tárnak fel. A kardiovaszkuláris betegségek hátterének megismeréséhez és a gyógyszeres terápia fejlődéséhez járulnak hozzá a szén-monoxiddal (CO) kapcsolatos kutatások.

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

A CO által indukált vasorelaxáció jelenségét 1984-ben figyelték meg, amikor McGrath és Smith exogén CO hatására bekövetkező koronária relaxációt mutatott ki. A CO terápiás szerepe két lehetséges módon jelenik meg. Egyrészt az előbbieken említett módon a HO rendszer farmakológiai stimulálásával endogén CO képződését érhetjük el, másrészt a CO-ot felszabadító molekulák, az ún. **Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs)** alkalmazása

intracelluláris CO-ot produkál. A CORM vegyületek bizonyos átmeneti fém karbonilok, amelyekből CO szabadul fel. A vegyületek több generációját előállították már elő, melyek szerkezet-hatás összefüggései alapján Motterlini kutatócsoportja ma is további fejlesztéseket végez.

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

A CORM-3 vegyületekben az átmeneti fémhez egy glicin molekulát kapcsoltak megnövelve ezzel a CORM vegyület vízzoldékonyságát. A CORM-3 további előnyös tulajdonsága, hogy kevésbé toxikus, mint a CORM-2, valamint bizonyították, hogy mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között bekövetkezik a CO képződése. A további előrelépést jelentett a CORM-3 esetén, hogy a CO felszabaduláshoz szükséges pH és az erős elektron donor ligand is biztosítva van a biológiai környezetben. A biztató eredmények ismeretében remélhetjük, hogy a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében a CORM molekulák további fejlesztése új terápiás lehetőséget fog adni a közeljövőben.

Az iszkémiás szívbetegségek kezelésének további fejlődéséhez járulnak hozzá a napjainkban fellendült apoptózis kutatások. Csak az utóbbi évtizedben alakult ki az az új kutatási irány, amely az apoptózis szemszögéből is vizsgálja a szív- és érrendszeri megbetegedéseket. Bár az apoptózisráta a szívelégtelenségben viszonylag alacsony, de még mindig nagyobb mértékű, mint a normális szívben, ahol ez elhanyagolható. A szívizomsejtekben bekövetkező apoptózist számos induktor molekula katalizálja. A myocardiumban a legerőteljesebbek a szabad gyökök, a citokinek ( $\alpha$ TNF, FAS), autokoidok

(angiotenzin II) és a NO. Az indukciót követően számos útvonalon indulhat meg a sejtelhalás folyamata. Ezen jelátvivő folyamatok mechanizmusának feltárása történik ma is.

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

Az elhaló sejtekben indukálódó apoptózis specifikus fehérjét mutattak ki, amelyeket funkciójuk alapján transzglutaminázoknak neveztek el (tTG). Ezek az enzimek a sejtek legkülönbözőbb helyein lokalizáltak és a sejtfehérjék keresztkötésével stabilizálják az apoptotikus sejt szerkezetét, melyhez  $\text{Ca}^{2+}$ -t igényelnek. A transzglutamináz családkhoz tartozó TG2 enzim abban különbözik a többi tTG-től, hogy a G proteinhez hasonlóan a transzmembrán szignál folyamatokban játszik szerepet és sejt felszíni adhéziós mediátorként is viselkedik. Számos betegségben igazolták a TG2 patológiás szerepét, így a Huntington kórban, a diabetes mellitusban és a malabszorpciós szindrómában. Ezen ismeretek alapján feltételeztük, hogy a myocardiumban nagy „térfogati” arányban jelen lévő mitokondriumok energiaellátottságára befolyással lehet a TG2 jelenléte, vagy hiánya az iszkémia/reperfúzió során.

## Célkitűzések

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

- Kísérleteink egyik célja az volt, hogy az exogén CO védő hatását vizsgáljuk a cGMP/guanilát cikláz rendszer szemszögéből. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a különböző koncentrációjú exogén CO kezelés hogyan befolyásolja a guanilát cikláz rendszerben jelenlevő szignálmolekulák keletkezését. Fontosnak tartottuk továbbá, hogy a 0,001%, 0,01% és 0,1% CO kezelés mellett, *in vitro* körülmények között izolált patkányszív modellen kövessük a kardiális funkciókat (szívfrekvencia, koronária átáramlás, aorta átáramlás, bal kamrai nyomás). Vizsgáltuk továbbá az infarktusos terület nagyságát és a reperfúzió indukálta ventrikuláris fibrilláció előfordulását a cGMP, cAMP szintek és a guanilát cikláz aktivitásának tükrében, hogy összefüggést találjunk a szignálmechanizmusok és a fiziológias paraméterek között az exogén CO kezelés függvényében.
- Vizsgálni kívántuk a CORM-3-ként elnevezett, egyik szén-monoxidot felszabadító molekula ischemia/reperfúzió okozta ventricularis fibrillációra, és ventrikuláris tachycardiára, valamint a myocardialis infarctusra gyakorolt hatását. Célkitűzéseink közé tartozott továbbá, hogy a különböző koncentrációjú CORM-3 kezelés során felszabaduló CO hogyan befolyásolja az ioncsatornák működését, valamint a CORM-3 feltételezett védő hatása tükröződik-e az iszkémiás területek csökkenésében.
- Munkánk harmadik részében az apoptózisban szerepet játszó transzglutamináz-2 enzim myocardiumban betöltött szerepét

tanulmányoztuk. Kísérleteinkkel választ kerestünk arra, érinti-e a légzési láncot a TG2 jelenléte, vagy hiánya az iszkémia/reperfúzió alatt, mennyiben módosul a nagyenergiájú foszfátok produkciója a TG2<sup>+/+</sup> és TG<sup>-/-</sup> egyedek myocardiumában. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy a szívműködésben is expresszállódó  $\alpha_{1b}$ -adrenerg receptor (AR) - amelyen keresztül a TG2 intracelluláris szignálfolyamatot mediál - jelenlétének van -e szerepe az iszkémia/reperfúzió következtében kialakuló kóros folyamatokban.

### *Kísérleti állatok*

Kísérleteink első és második részében hím Sprague-Dawley patkányokat a harmadik részben hím vad típusú (TG2<sup>+/+</sup>) és TG2 „knock out” homozigóta (-/-), AR<sup>-/-</sup> egereket használtunk. Az állatok humánus bánásmódban részesültek a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Animals” előírásainak megfelelően (NIH publication no. 86-23, 1985).

## **Módszerek és anyagok**

### **Az exogén CO vizsgálatához kapcsolódó módszerek és anyagok**

#### *Izolált „dolgozó-szív” preparátum*

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat (270-340g) használtunk. Az állatokat intraperitoneálisan adott nátrium-pentobarbitállal (60 mg/tts kg) érzéstelenítettük, majd a trombusképződés kivédésére iv. heparint (500 IU/kg) adtunk. A heparin injektálást követően a mellkast megnyitottuk és a szívet kimetszettük, melyet hideg perfúziós oldatba helyeztünk. A preparálást követően a szívet az aortán és a vena pulmonaris-on keresztül ún. „dolgozó-

perfúziós” készülékkel perfundáltuk. Perfúziós oldatként módosított Krebs-Hanseleit bikarbonát puffert használtunk, amelynek összetétele a következő (mM-ban kifejezve): 118 NaCl, 5,8 KCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0,36 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 5 glükóz. A perfúziós oldatot előzőleg 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> keverékével telítettük (pH: 7,4, 37 °C). A szíveket 5 percig Langendorff-módszer szerint perfundáltuk 37 °C-on és konstans perfúziós nyomáson, mely 100 cm-es vízoszlop nyomásával egyenértékű (10 kPa). Az atmosféri periódust (vér és alakos elemeinek eltávolítása) követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk és regisztráltuk a szívfunkciókat. Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a koronária átáramlást, pedig a szívből kicsöpögő folyadék 1 percen keresztül történő gyűjtésével mértük.

#### *Ischemia/reperfúzió kiváltása és a CO kezelés*

Tíz perc aerob perfúziót követően elzártuk mind a bal pitvarba történő beáramlás mind a bal kamrából történő kiáramlás útját, majd 30 percig így teljes (globális) iszkémiát hoztunk létre. A reperfúzió megindításához megszüntettük az elzárásokat. A 120 perces reperfúzió első 10 percében a perfúziót Langendorff módban végeztük, hogy elkerüljük az irreverzibilis kamrafibrilláció (VF) gyakori előfordulását. A szíveket különböző koncentrációjú CO kezelésnek vetettük alá. Az iszkémia kiváltása előtti 10 percben és a Langendorff reperfúzió alatt CO-ot tartalmazó perfúziós folyadékot áramoltattunk át. A CO koncentrációját az egyes csoportoknál 0,001, 0,01, 0,1 (v/v)% -ra állítottuk be. Az iszkémia ideje alatt a myocardium kiszáradástól való védelméért a szívet körülvevő üvegedényt lefedtük és így a páratartalmat konstans értéken (90-100%) tartottuk.

#### *Mért paraméterek*

A kísérletek alatt komputeres regisztrációs berendezés (AD Instruments, Australia) segítségével regisztráltuk az epikardiális elektrokardiogramot (EKG),

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

#### *Az infarktusos terület meghatározása*

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

### *cAMP és cGMP szintek meghatározása a szívizomban*

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

### *A guanilát cikláz aktivitás meghatározása*

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

## **A CORM-3 vizsgálatával kapcsolatos módszerek és anyagok**

### *Izolált „dolgozó-szív” preparátum készítése*

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

### *A kísérlet menete a CORM-3 vizsgálatban*

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

### *A szöveti $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ és $\text{Ca}^{2+}$ mérése*

A reperfúziót követően a szíveket 0-5 °C-ra gyorsan lehűtöttük és 5 percre 100 mmol/l triszhidroxi-amino-metánt (Tris puffert) és 220 mmol/l szacharózt tartalmazó oldatba merítettük. Ezzel a perfúzióval az volt a célunk, hogy kimossuk az ionokat az extracelluláris térből és leállítsuk a sejtmembrán iontranszportjaiért felelős enzimaktivitást. A myocardium 5 perces hideg pufferrel történő mosásával így az ionok több, mint 90%-át távolítjuk el az extracelluláris térből. A kimosást követően a szíveket 48 órán keresztül 100 °C-on szárítottuk és 20 órán át 550 °C-on hamvasztottuk. A hamut 5 ml 3M salétromsavval oldottuk és ionmentesített vízzel tízszeresére hígítottuk. A myocardialis  $\text{Na}^+$ -ot 330,3 nm-en a  $\text{K}^+$ -ot 404,4 nm-en, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot pedig 422,7 nm-en mértük levegő-acetilén lángban atomabszorpciós spektrofotométerrel (Perkin-Elmer 1100-B).

## **A TG2<sup>-/-</sup> egereken végzett kísérletre vonatkozó módszerek és anyagok**

### *A preparátumok feldolgozása, a meghatározandó komponensek extrahálása*

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

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

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

## *Statisztika*

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

## **Eredmények**

### **A CO-val kapcsolatos eredmények**

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

- Eredményeink szerint, az iszkémia kiváltása az azt követő 10. és 30. percben kis mértékű, de szignifikáns növekedést eredményezett a cAMP és cGMP szintekben. A szöveti nukleotid koncentrációk azonban a 40. perctől követően a normál értékre csökkentek vissza.
- A 0,001% CO tartalmú perfúziós folyadék alkalmazása szignifikánsan emelte a szöveti cAMP és cGMP tartalmát a kontroll csoport adataihoz képest. A cAMP koncentrációját  $0,30 \pm 0,03$  nmol/g-ról  $0,52 \pm 0,05$  nmol/g-ra, a cGMP koncentrációját  $25,8 \pm 3,0$  pmol/g-ról  $111,5 \pm 11,2$  pmol/g-ra növelte. A nukleotid koncentrációkat nmol/g és pmol/g nedves tömegre

vonatkoztattuk. Hasonló tendenciát figyeltünk meg a 0,01% CO kezelést követően.

- A kísérletek során kapott cGMP eredmények jól tükröződnek a megfelelő guanilát cikláz aktivitási értékekben. A kezeletlen csoport adataihoz képest -  $184 \pm 25$  fmol/mg protein - a guanilát cikláz aktivitási értékek a 0,001% CO-val kezelt csoport esetén  $442 \pm 38$  fmol/mg proteinre, a 0,01% CO-val kezelt csoport esetén  $463 \pm 44$  fmol/mg proteinre emelkedtek.

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

- A 0,001% és 0,01% CO jelenlétében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az infarktusos terület méretében. Számszerűen, az iszkémia/reperfúzió átesett és nem kezelt szívek infarktusos területének aránya  $39\% \pm 5\%$ -ról  $21\% \pm 3\%$ -ra csökkent a 0,001% CO-val kezelt csoportban, a 0,01% CO-val kezelt csoport esetén  $18\% \pm 4\%$ -ra redukálódott. A CO koncentrációját 0,1%-ra tovább növelve, azonban a kontroll csoport értékeihez közeli eredményt kaptunk.
- A 0,001%-os és a 0,01%-os CO kezelés jelentős mértékben 92%-ról ( $p < 0.05$ ) 17%-ra ( $p < 0.05$ ) csökkentette a reperfúzió indukálta VF előfordulását a kontrol csoporthoz képest. Ha a CO koncentrációját viszont 0,1%-ra megnöveltük, a reperfúzió indukálta VF a vizsgált minták mindegyikében ventrikuláris tachycardiával, vagy bradycardiával és különböző ritmusos áramlási zavarokkal együtt jelentkezett.
- A reperfúzió indukálta VF előfordulásának vizsgálati eredményei és az infarktusos területek összehasonlított adatai alapján azt állapítottuk meg, hogy az exogén CO kezelés esetén a 0,1% CO koncentráció egyértelműen kardiotoxikus hatást eredményezett.

### *A CO hatása a szívfunkciókra*

- Az iszkémia indukálása előtt a szívfunkciók lényegesen nem változtak a 0,001% és 0,01% CO kezelésben részesült csoportokban. A 30 percig fenntartott iszkémiát követő 60. és 120. percben leolvasott CF, AF és LVDP értékek azonban jelentős növekedést mutattak a kezelésben nem részesült kontroll csoport értékeihez képest.
- Nem tapasztaltunk viszont változást a HR értékeiben a CO-val kezelt csoportok esetében sem az iszkémia indukálása előtt, sem az iszkémiát követő reperfúzió során.
- A 0,1% CO kezelés alatt igen gyakori VF-t és ventrikuláris tachycardiát, bradycardiát, valamint ectopiás ütések figyeltünk meg az EKG-n, melyek lehetetlenné tették a szívfunkciók regisztrálását (HR, CF, AF, LVDP)

### **A CORM-3-mal kapott eredmények**

#### *Az infarktusos terület és az arrhythmia*

- Az iszkémiát elszenvedett, kezeletlen szívizomban az infarktusos terület mértéke  $38 \pm 1,3$  %, amely a különböző koncentrációjú CORM-3 kezelés hatására  $33,5 \pm 1,6$  %-ra ( $p < 0,05$ , 10  $\mu$ M CORM-3),  $23,3 \pm 1,5$  %-ra ( $p < 0,05$ , 25  $\mu$ M CORM-3) és  $20,7 \pm 1,2$  %-ra ( $p < 0,05$ , 50  $\mu$ M CORM-3) csökkent.
- Az infarktusos területhez hasonlóan a reperfúzió indukálta VF gyakorisága szintén csökkent a CORM-3-mal történő kezelés hatására. A kezelésben nem részesült csoport esetén a reperfúzió indukálta VF 100 %-ról 33 %-ra ( $p < 0,05$ , 25  $\mu$ M CORM-3) és 8 %-ra ( $p < 0,05$ , 50  $\mu$ M CORM-3) csökkent. A reperfúzió indukálta VT (kamrai tachycardia) gyakorisága a VF-hoz hasonló tendenciát mutat.

- A reperfúzió indukálta VF, VT időtartamát és szinusz ritmust a Langendorff módban végzett perfúzió első 2 percében regisztráltuk és amennyiben szükségesnek találtuk defibrilláltuk, hogy mérni tudjuk a szívfunkciókat. A VF, VT időtartama  $5\pm 2$  sec-ra és  $26\pm 8$  sec-ra csökkent ( $p<0,05$ ) az  $50\text{ }\mu\text{M}$  CORM-3-mal kezelt csoportnál a kezeletlen szívek  $14\pm 4$  sec és  $93\pm 12$  sec értékeihez képest. Következésképpen a szinusz ritmus időtartama  $13\pm 4$  sec-ról  $89\pm 15$  sec-ra nőtt ( $p<0,05$ ) az  $50\text{ }\mu\text{M}$  CORM-3-mal történő kezelés hatására

#### *A szívfunkciókra gyakorolt hatás eredményei*

- A 25 és  $50\text{ }\mu\text{M}$  CORM-3 kezelés után jelentős növekedést figyeltünk meg a coronária átfolyásban (CF), aortakiáramlásban (AF) és balkamrai nyomásban (LVDP) a nem kezelt csoporthoz viszonyítva. Az AF 30 perc iszkémia/120 perc reperfúziót követően a kezeletlen csoportnál mért  $9,8\pm 0,9$  ml/percről  $18,7\pm 1,2$  ml/percre ( $p<0,05$ ,  $25\text{ }\mu\text{M}$  CORM-3),  $22,2\pm 1,9$  ml/percre ( $p<0,05$ ,  $50\text{ }\mu\text{M}$  CORM-3) emelkedett.
- Nem figyeltünk meg az előbbiekhöz hasonló javulást a szívfrekvenciában a kontroll csoport értékeihez képest.
- Fontos megjegyezni, hogy a HR, CF, AF és LVDP iszkémia előtti értékei a kezeletlen csoportban statisztikailag nem különböztek a CORM-3-mal kezelt csoportok értékeitől.

#### *A CORM-3 hatása a myocardium ionösszetételére*

- Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a CORM-3 szignifikáns mértékben nem változtatja meg a szívizom  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  összetételét a nem iszkémiás szívizomban. A 30 perc iszkémia/ 120 perc reperfúziót követően a celluláris  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció jelentősen megnövekedett  $85\pm 5\text{ }\mu\text{mol/g}$ -ra és  $4.1\pm 0,3\text{ }\mu\text{mol/g}$ -ra (száraz súlyra vonatkoztatva) az

iszkémiát megelőző állapot  $30 \pm 3$   $\mu\text{mol/g}$  és  $1,5 \pm 0,2$   $\mu\text{mol/g}$  koncentrációhoz képest. Az ionok koncentrációit mindig száraz tömegre vonatkoztattuk.

- A kontrol csoport esetén iszkémia/reperfúzió indukálta  $\text{K}^+$  veszteség tapasztaltunk  $300 \pm 9$   $\mu\text{mol/g}$ -ról  $238 \pm 8$   $\mu\text{mol/g}$ -ra.
- A 25 és 50  $\mu\text{M}$  CORM-3 kezelés után szignifikánsan kisebb mértékű növekedést figyeltünk meg az iszkémiát követő  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  tartalomban. A kezelés hatására a celluláris  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció poszt-iszkémiás növekedése  $85 \pm 5$   $\mu\text{mol/g}$ -ról és  $4,1 \pm 0,3$   $\mu\text{mol/g}$ -ról jelentősen mérséklődött a 25  $\mu\text{M}$  CORM-3 kezelés után  $57 \pm 6$   $\mu\text{mol/g}$ -ra és  $2,8 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/g}$ -ra, az 50  $\mu\text{M}$  CORM-3 kezelés után  $49 \pm 5$   $\mu\text{mol/g}$ -ra és  $2,3 \pm 0,2$   $\mu\text{mol/g}$ -ra.

### **A $\text{TG2}^{-/-}$ egereken végzett kísérletre vonatkozó eredmények**

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

- A  $\text{TG2}^{-/-}$  egerekben az infarktusos terület nagysága  $47,2 \pm 3,3$  %-ra növekedett a vad típusú csoport  $37,2 \pm 2,1$  % értékéhez képest.
- Az infarktusos területhez hasonlóan a reperfúzió indukálta VF aránya is jelentősen - 83 %-ra - megemelkedett a  $\text{TG2}^{-/-}$  egerekben, a vad típusúakban mért 33 %-hoz képest.
- A szívfunkciók rosszabbodását mutatta az AF értékének csökkenése is. Az iszkémiát követő reperfúzió után az aorta kiáramlás a vad típusú egerek esetén  $2,6 \pm 0,4$  ml/perc volt, a  $\text{TG2}^{-/-}$  egerekben csak  $0,8 \pm 0,1$  ml/percet mértünk.
- Fontos megjegyezni, hogy a  $\text{TG2}^{-/-}$  egerekben már az iszkémiát megelőzően kisebb HR, CF, AF és AOP értékeket kaptunk, mint a vad

típus esetén. A változást minden esetben szignifikánsnak vettük, ha a  $*p < 0,05$ .

*A nagyenergiájú foszfáttartalom változása az iszkémia/reperfúzió kiváltása után*

- Már az iszkémiát megelőzően jelentős különbség mutatkozott a két vizsgált csoport nagyenergiájú foszfát tartalmában. A vad típusú egerekben mért  $6,18 \pm 2,52 \mu\text{mol/g}$  nedves tömegre vonatkoztatott ATP tartalom a  $\text{TG2}^{-/-}$  egyedekben  $3,37 \pm 1,32 \mu\text{mol/g}$ -ra csökkent. A  $\mu\text{mol/g}$  koncentráció egységet minden esetben nedves tömegre vonatkoztattuk. Hasonló mértékű különbséget mértünk az ADP esetében ( $0,34 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$  a vad típusnál,  $0,17 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$  a  $\text{TG2}^{-/-}$  egyedekben) és az AMP esetében is ( $0,073 \pm 0,027 \mu\text{mol/g}$  a vad típusnál,  $0,039 \pm 0,011 \mu\text{mol/g}$  a  $\text{TG2}^{-/-}$  egyedekben). A kreatin-foszfát tartalom az előbbiekhöz hasonlóan alacsonyabb volt a  $\text{TG2}^{-/-}$  egerekben ( $4,55 \pm 1,07 \mu\text{mol/g}$ ), mint a vad típusban ( $6,48 \pm 0,51 \mu\text{mol/g}$ ).
- Az iszkémia/reperfúzió kiváltása után az ATP tartalom a vad típusú egerekben  $3,81 \pm 2,41 \mu\text{mol/g}$ -ra a  $\text{TG2}^{-/-}$  egerekben  $2,00 \pm 1,20 \mu\text{mol/g}$ -ra csökkent. Az ADP tartalomban szignifikáns változás nem következett be sem a vad sem a  $\text{TG2}^{-/-}$  egyedekben. Az AMP értékekben további csökkenést figyeltünk meg. A vad típus esetén  $0,024 \pm 0,011 \mu\text{mol/g}$ , a  $\text{TG2}^{-/-}$  egyedekben  $0,029 \pm 0,011 \mu\text{mol/g}$  adódott. A CrP tartalom jelentősen nem, de csökkent a vad típusú egerekben  $5,20 \pm 1,43 \mu\text{mol/g}$ , a  $\text{TG2}^{-/-}$  egerekben  $3,36 \pm 1,11 \mu\text{mol/g}$ -ra.

### **Következtetések**

I. Kísérleteink során *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a CO függő cGMP és cAMP szinteket, a guanilát cikláz aktivitást, a VF gyakoriságát és mértük a szívfunkciókat, valamint meghatároztuk az infarktusos terület

nagyságát. Az izolált dolgozó szív modell ideális kísérleti körülményt biztosított az exogén CO myocardiális hatásának tanulmányozásához, mivel a vér/hemoglobin/CO rendszer kizárásával követni tudtuk az oxigén transzport zavarát. Az eredményeink azt mutatták, hogy a CO alacsony koncentrációban való jelenléte a perfúziós folyadékban védelmet nyújtott az iszkémia/reperfúzió során fellépő kedvezőtlen behatások ellen, amely az emelkedett cGMP és cAMP szöveti koncentrációkban tükröződött vissza. A cAMP szint kis mértékű növekedése - közvetlenül intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedése- különféle arrhythmia-khoz vezethet mind az iszkémia során, mind az iszkémiát követő szakaszban. A cGMP koncentrációja azonban a többszörösére emelkedett, mely a cAMP arrhythmogén hatását tudta ellensúlyozni, amely az iszkémia/reperfúzió indukálta VF gyakoriságát csökkentette, kifejlődését megakadályozta. A cGMP szintek növekedése és az ezzel összefüggő guanilát cikláz aktivitás emelkedése azt mutatja, hogy a CO indukálta aktivitás fokozódása alapvető fontosságú az iszkémia/reperfúzió átesett myocardium védelmében.

A reperfúzió hatására kialakuló hypoxia következtében szignálfolyamatok indulnak meg, melyek fontos szabályozója a CO. Tapasztalataink azt mutatják, hogy az exogén CO ezen moduláló, kardioprotektív hatása szigorúan koncentrációfüggő. Összefoglalásként elmondhadjuk, hogy a CO preventív szerepére irányuló vizsgálatok adatait az adott kísérleti körülmények tükrében kell elemezni és a következtetéseket levonni. Fontos paraméternek tekinthető az alkalmazott CO koncentráció, a kezelés időtartama, az hogy *in vivo*, vagy *in vitro* körülmények között történt-e a kísérlet, és nem utolsósorban tartalmazott-e az alkalmazott modell vért és sejtes elemeket, vagy sem. Így eredményeinket és az irodalomban megjelenő más tanulmányokat is a CO klinikai alkalmazása előtt ezen körülmények figyelembevételével kell értékelni.

II. Vizsgálataink során megkíséreltük felderíteni, hogy a CORM-3 molekulából a sejtekben felszabaduló CO kapcsolatban van-e a szívfunkciók

posztiszkémiás javulásával, az alatta bekövetkező kamrai arrhythmia gyakoriságának csökkenésével valamint az iszkémia/reperfúzió átesett myocardium infarktusos területének csökkenésével. Eredményeink betekintést adnak a CORM-3-nak a myocardialis ionösszetételre gyakorolt hatására, ezen kívül az iszkémiát követő szívfunkciók visszanyerése és a CORM-3-ból felszabaduló CO lehetséges kapcsolatára.

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

infarktusos terület jelentős mértékű csökkenése és a poszt-iszkémiás szívfunkciók javulása.

A CO  $K^+$  csatornákra kifejtett közvetlen hatása és a háttérben lezajló mechanizmusok teljes megismeréséhez még további vizsgálatokra van szükség. Munkánk során azonban sikerült bizonyítani, hogy a CORM-3-ból felszabaduló CO-nak egyértelműen hatása van az alapvetően fontos ionok egyensúly viszonyaira, mely által a szívizom védelmét biztosítja az iszkémia/reperfúzió következtében kialakuló myocardialis szöveti és működésbeli elváltozásokkal szemben.

A biológiai rendszerekben alkalmazható, kémiai CO hordozónak tervezett CORM molekulák megjelenése igazolta azt a fontos feltevést, hogy a CO kis mennyiségei alkalmazhatók arra, hogy megvizsgálják ennek a kétatomos gáz még specifikusabb hatását, és további vizsgálatok irányulnak majd a CO kardiális elváltozások és más elváltozásokban betöltött kedvező hatásának optimalizálására.

III. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint - összhangban más kutatók megállapításaival - az iszkémia/reperfúzió előtti és utáni szívfunkciós értékek jelentősen különböznek a nem génmódosított egyedek esetén. Hasonló szignifikáns eltérést figyeltünk meg a TG2<sup>-/-</sup> egerek egyes szívfunkciós paraméterei és a vad típusú egerek ugyanazon paraméterei között. Külön kiemelendő, hogy a TG2<sup>-/-</sup> egerek szívfunkciós paraméterei az iszkémia előtt is gyengébbek voltak a vad típus értékeihez viszonyítva.

Tekintettel arra, hogy iszkémia/reperfúzió előtt és után is szignifikánsan rosszabb szívfunkciót mutattunk ki a TG2 knockout egerekben a vad típushoz képest, kísérleteink másik részében arra kerestük a választ, hogy a TG2 enzim hiánya hogyan befolyásolja a nagyenergiájú foszfát tartalmat az iszkémia/reperfúziót követően. Adataink egyértelműen tükrözik, hogy a nagyenergiájú foszfát tartalom fenntartása sérült az iszkémia/reperfúzió alatt a

TG2<sup>-/-</sup> egerek esetén is és a vad típusnál is, amely arra enged következtetni, hogy a mitokondriális ATP termelés jelentős mértékben sérült az iszkémia/reperfúzió során.

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

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

### Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

1. Bak I., **Varadi J.**, Nagy N., Vecsernyes M., Tosaki A., (2005) The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol* **51**:453-459. **IF: 1.018**
2. **Varadi J.**, Lekli I., Juhasz B., Bacskay I., Szabo G., Gesztelyi R., Szendrei L., Varga E., Bak I., Foresti R., Motterlini R., Tosaki A., (2007) Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecules on post-ischemic myocardial recovery. *Life Sciences* **80**:1619-1626. **IF: 2.512**
3. Szondy Zs., Mastroberardino P.G., **Varadi J.**, Farrace M.G., Nagy N., Viti I., Wieckowski M.R., Melino G., Rizzuto R., Tosaki A., Fesüs L. and Piacentini M., (2006) Tissue transglutaminase (TG2) protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by relating ATP synthesis *Cell Death Differ* **13**:1827-1829. **IF: 7,785**

### Az értekezéshez fel nem használt közlemények

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

3. Kiss T., Fenyvesi F., Pasztor N., Feher P., **Varadi J.**, Kocsan R., Szenté L., Fenyvesi E., Szabo G., Vecsernyes M., BacsKay I., (2007) Cytotoxicity of different types of methylated  $\beta$ -cyclodextrins and ionic derivatives *Die Pharmazie* (Közlésre elfogadva) **IF: 0,677**

### **Absztraktok**

**Varadi J.**, Lekli I., Juhasz B., Foresti R., Motterlini R., Tosaki A., (2006) Cardioprotective mechanisms of sour cherry seed extract against ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts *J Mol Cell Cardiol* **40**P117, p963 **IF: 3.872**

Bácskay I., Kocsán R., Fenyvesi F., Fehér P., Sipos T., **Váradi J.**, Vecsernyés M., (2005) Cytotoxicity of different types of surfactant on HeLa cells. *E J Pharmaceutic Sci* **25**:S46-S47 **IF: 2.347**

### **Poszter**

Fenyvesi F., Kiss T., Bácskay I., Fodor Z., Fehér P., **Váradi J.**, Fenyvesi É., Szenté L., Vecsernyés M., (2006) A Caco-2 transzport model és alkalmazásának lehetőségei ciklodextrinek felszívódást befolyásoló hatásának tanulmányozásában *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII.*