

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások farmakológiai befolyásolási  
lehetőségei**

**Írta:**

**Bak István**

**Témavezető: Dr. Tósaki Árpád**

**Programvezető: Dr. Gergely Lajos**

DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR  
GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK  
DEBRECEN, 2003

## Bevezetés

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 súlyosbíthatja az iszkémia utáni állapotban lévő szövetek funkcióját. Vagyis a reperfúzió -mely nélkül az iszkémiás szívizom elhal- arrhythmiához vezethet. Ennek oka, hogy azokban a sejtekben, melyek az iszkémia ideje alatt hypoxiássá váltak, a hirtelen reoxigenizáció, nagymértékű enzimefelszabadulással, és strukturális károsodással jár az iszkémiás metabolitok kimosódása és a szabad gyökképződés miatt. A reperfúzió során keletkezett szabad gyökök által okozott fokozott oxidatív stresszt tartják a reperfúzió indukálta károsodások egyik fő összetevőjének.

Az egyik lehetséges megközelítés szerint exogén antioxidánsokkal csökkenteni lehet a miokardiális iszkémia/reperfúzió során bekövetkező oxidatív sejtkárosodást. A Kínából származó páfrányfenyő (*Ginkgo biloba*) leveleiből készült standardizált kivonatot, az EGb 761-et, széles körben alkalmazzák különböző ér- és idegrendszeri rendellenességek kezelésére. A kivonat tartalmaz többek között 24 % flavonoidot, 7 % proanthocianidin származékot, valamint ~6 %-ban terpén eredetű, erősen oxidált ginkgolidokat és bilobalidokat. A flavonoidok és a proanthocianidinek kiváló gyökfogó molekulák, míg a terpének -főként a ginkgolidok- inhibitorai a vérlemezke aktiváló faktornak. Így az EGb 761 két mechanizmus útján is csökkentheti a reperfúzió indukálta károsodások mértékét: 1) a reperfúzió során keletkező szabad gyökök eliminációjával, illetve 2) PAF antagonistá tulajdonsága következtében.

A calcineurin egy citoplazmában található foszfatáz. Az enzim intracelluláris kalciumszint szabályozta aktivitása, felerősíti olyan gének expresszióját, melyek nagymértékben hozzájárulnak a szívhipertrófia és végeredményben a szívelégtelenség kialakulásához. A calcineurin-függő pathophysiologiás folyamatok hozzájárulnak az iszkémiát követő reperfúziós károsodásokhoz. Ezért a calcineurin gátlása szintén célpontja lehet az iszkémia/reperfúzió okozta károsodások megelőzésének.

Másik lehetőség az iszkémiás/reperfundált szervek védelmében, endogén védekező mechanizmusok indukálása, melyek célzottan szerepet játszanak a sejt homeosztázisában és funkciójában. A közelmúltban egy új enzimrendszer került a kutatások előterébe: a mikroszómális hemoxigenáz, mely a hem oxidatív lebontását katalizálja. A folyamat során az enzim oxigén és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfiringyűrűjének  $\alpha$ -metin hidját,

amely így nyíltláncú biliverdinné alakul, e közben felszabadul a vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid keletkezik. 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 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. A HO-2 és a HO-3 konstitutívan expresszálódik. Az előbbi főleg a központi idegrendszerben és a tesztiszben található, míg utóbbiról melynek aminosav szekvenciája ~ 90 %-ban azonos a HO-2-vel keveset tudunk. Kevésbé aktív, mint a HO-2, 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. A porfirinyűrűből felszabaduló vas prooxidáns tulajdonságú, míg ezzel ellentétben a keletkező biliverdin, illetve redukált formája a bilirubin hatékony antioxidáns vegyületek. 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, hasonlóan a nitrogén oxidhoz, így szerepet játszhat a fiziológiás és patológiás értónus szabályozásában. 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.

A miokardiális iszkémia/reperfúzió a miociták pusztulását okozza, amennyiben megfelelő terápiás beavatkozás nem történik meg. Különböző tanulmányok bizonyították, hogy a miociták pusztulása kétféle mechanizmuson, apoptózison és nekrozison keresztül történhet. Már korábban leírták, hogy az apoptózis, a programozott sejthalál egy morfológiailag jól definiált formája, mely magába foglalja a citoplazma zsugorodását, a DNS fragmentálódását és kondenzációját, valamint apoptotikus testek képződését, hozzájárulhat a miociták irreverzibilis károsodásához. Az elmúlt két évtizedben számos vizsgálatot végeztek annak érdekében, hogy csökkentsék az iszkémia/reperfúzió okozta sejthalál, és ez által az infarktusz terület mértékét. Az apoptózis kialakulására sokféle kaszkád mechanizmust leírtak, de a legtöbbet említett jelátviteli mechanizmusok a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), protein kinase C (PKC), p53, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) és a kaszpázok.

Az apoptózis általános „végrehajtói” a kaspázok. Az aktivált kaspázok indukálják a sejtekben az apoptózis végbemenetelét az által, hogy megváltoztatják különböző intracelluláris proteinek funkcióját. Ezért a kaspázok gátlása célravezető lehet az iszkémia/reperfúzió indukálta apoptózis mértékének csökkentésére.

### **Célkitűzések**

Kísérleteinkben az iszkémia/reperfúzió indukálta arrhythmia farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk, izolált patkányszíveken. Munkánkat három fő témakörre összpontosítottuk:

- I. Vizsgálni kívántuk az FK 506 jelzésű calcineurin inhibitor és az EGb 761 jelzésű páfrányfenyő kivonat kombinált hatását a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére és a reperfúzió indukálta arrhythmia kialakulásának csökkentésére.
- II. 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. Vizsgálni kívántuk továbbá a p-n-tert-butyl- $\alpha$ -phenilnitron (PBN), mint gyökfogó molekula, hatását a HO-1 mRNS és protein expresszióra, valamint az endogén CO termelésre. Továbbá tanulmányozni kívántuk a cink-protoporfirin IX (ZnPPIX), HO inhibitor, hatását a HO-1 mRNS és protein expresszióra, illetve az enzim aktivitásra.
- III. Célkitűzéseink közé tartozott továbbá a miokardiális apoptózis mechanizmusának vizsgálata. Választ kerestünk arra, hogy kaspáz apoptotikus mechanizmus gátlásával -általános, vagy specifikus inhibitorok használatával- csökkenthető-e az infarktos terület nagysága, illetve az apoptózis mértéke a szívizomban, valamint az enzim gátlása elősegíti-e a posztisztkémiás szívfunkciók felépülését.

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat 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

### **I. Az FK 506 és EGb 761 kombinált hatásának vizsgálata**

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

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányok (250-300 g) szívét izoláltuk, és dolgozó perfúziós készülékkel perfundáltuk. Nátrium-pentobarbitállal (60 mg/kg) történő érzéstelenítést követően iv. heparint adtunk (500 IU/kg). A mellkas megnyitása után a szíveket kimetszettük és ghideg 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 volt, melynek összetétele a következő (mM-ban kifejezve): 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.7 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>, 10 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 vízszlop nyomásával volt egyenértékű (10 kPa). A mosási periódust követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk. Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a Koronária átáramlás mértéket pedig a szívből kicsöpögő folyadék határozott ideig történő gyűjtésével mértük.

#### *Iszkémia/reperfúzió kiváltása*

Tíz perc aerob perfúziót követően elzártuk a bal pitvarba történő beáramlás és a bal kamrából történő kiáramlás útját, majd meghatározott ideig így iszkémiát hoztunk létre. A reperfúzió indításához megszüntettük az elzárásokat. Az iszkémia teljes ideje alatt -hogyan megvédjük a miokardiumot a kiszáradástól, az üvegedény páratartalmát, mely a szívet körülvette befedtük, s így a páratartalmat konstans (90-100 %) értéken tartottuk.

#### *Mért paraméterek*

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el és poligráffal rögzítettünk. Az EKG-kat analizáltuk, hogy meghatározzuk a ventricularis fibrillatio (VF) és ventricularis tachycardia (VT) előfordulását, valamint, hogy megállapítsuk, hogy a VF reverzibilis (a szív spontán visszatért a normális ritmusba), vagy irreverzibilis (a reperfúzió első 3 percében folyamatosan fennállt) volt-e. Három perc kamra fibrillációt követően (irreverzibilis VF) a szíveket defibrilláltuk és rögzítettük a szívfunkciókat. 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) és annak első deriváltját (+LVdp/dt<sub>max</sub>) (Experimetria, Budapest) a bal pitvaron és a mitrális billentyűn keresztül a bal kamrába helyezett katéter segítségével.

#### *A kísérletek időbeli lefolyása*

A vizsgálat első részében a patkányokat (n=12 csoportonként) különböző dózisu (0, 1, 5, 10, 20 és 40 mg/ttkg/nap) FK 506-al kezeltük 10 napon keresztül. Huszonnégy órával az utolsó kezelést követően a szíveket izoláltuk és 30 perc globál iszkémiát követő 120 perc reperfüziónak vetettük alá. A vizsgálat második részében az állatokat 10 napon keresztül orálisan kezeltük 25 mg/kg/nap EGb 761-el, 25 mg/kg/nap EGb 761 plusz 1 mg/kg/nap FK 506-al, 25 mg/kg/nap EGb 761 plusz 5 mg/kg/nap FK 506-al, külön-külön. Az utolsó kezelés után 24 órával a szíveket izoláltuk és végrehajtottuk rajtuk, a fentebb említett iszkémia/reperfüziós protokollt. A kísérletek során regisztráltuk az arrhythmia (VF, VT) előfordulását, valamint a szívfunkciókat (HR, CF, AF, LVDP és +LVdp/dt<sub>max</sub>).

#### *A szíveket a kísérletekből kizáró okok*

Azon szíveket zártuk ki a kísérletekből, melyeknél: a) kamrai arrhythmia alakult ki az iszkémia indukciója előtt és b) a preiszkémias CF és AF értékek 17 ml/perc és 40 ml/perc alatt voltak. Így összesen ebből a kísérletsorozatból 3 szívet zártunk ki.

#### *Statisztika*

A szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP és +LVdp/dt<sub>max</sub>) 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 gyógyszerrel kezelt csoportok értékeit a gyógyszermentes csoportéval a Bonferroni korrekcióval kiegészített kétmintás t-teszttel hasonlítottuk össze. A VF és VT nem parametrikus (nem követi a Gauss eloszlást) eloszlást követ, ezért e paraméterek összehasonlításakor hí-négyzet tesztet alkalmaztunk a kezelt és kezeletlen (kontrol) csoportok összehasonlításakor. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a  $p < 0.05$ .

## **II. A hemoxigenáz és az endogén szénmonoxid szerepének vizsgálata iszkémiás/reperfundált szívekben**

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

A szív izolálását, perfundálását, valamint az iszkémia kiváltását és a reperfúziót a korábban leírtak szerint végeztük.

#### *Mért paraméterek*

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezetünk el (Haemosys, Experimetria, Budapest). Az EKG-kat analizáltuk, hogy meghatározzuk a kamrafibrilláció (VF) kialakulását, vagy hiányát. Abban az esetben, ha a szív fibrillált, öt perc kamrafibrillációt követően a szívet defibrilláltuk és rögzítettük a szívfunkciókat. Iszkémia előtt és reperfúzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária áramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP) (Haemosys, Experimetria, Budapest).

#### *A kísérletek időbeli lefolyása*

A szíveket (n = 6 csoportonként) 3x 10 perc preiszkémiás 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. A harmadik 10 perc során egy másik Langendorff tartályból olyan perfúziós oldattal perfundáltuk a szívet, mely 1  $\mu$ M PBN-t tartalmazott. Ezt követően a szíveket 30 perc globál iszkémiának és az azt követő 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. A reperfúzió első 10 percében PBN-t tartalmazó oldattal perfundáltuk a szívet. A reperfúzió során regisztráltuk a szívfunkciókat. A kísérletek végén mértük a szöveti CO tartalmat és az enzimaktivitást, valamint Northern- és Western-blottot segítségével a HO-1 mRNS és protein expresszió meghatározása érdekében.

#### *A szöveti CO tartalom meghatározása*

A CO tartalmat gázkromatográf segítségével határoztuk meg. A reperfúzió 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  $\mu$ l 12800 g felülúszó, 60  $\mu$ l NADPH (4.5 mM) és 50  $\mu$ l 3.5/0.35 mM methemalbumin. A vak mintákba NADPH helyett 60  $\mu$ l foszfát-puffert adtunk. A mintákat előinkubáltuk 5 percig 37 °C-on, majd a „headspace”-t oxigénnel átáramoltattuk 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 üvegséből, 1000 µl headspace gázt injektáltunk a kolonnára. Az analízis 90 másodpercig tartott egy 240 cm hosszú, 0.3 mm belső átmérőjű rozsdamentes acél kolonnán. A csúcsokat integráltuk, a kapott eredményeket pedig önkényesen választott egységben fejeztük ki. A mérésekhez Chromosorb 80/100 mesh (10 % Carbovax 20 M 3.5 % KOH) töltött kolonnát használtunk. A kolonnatér hőmérséklete 120 °C, míg az injektor hőmérséklete 150 °C volt.

#### *Teljes RNS izolálás és Northern-blot*

Körülbelül 100 mg patkány szívszövetből TRIzol reagenssel (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Germany), izoláltuk a teljes RNS mennyiséget, majd Northern-blotot végeztünk.

#### *Western-blot*

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

#### *A HO-1 aktivitás meghatározása*

Száz mg szívszövetet homogenizáltunk 10 ml 200 mM foszfát-pufferben, majd centrifugáltuk (19000 x g, 4 °C, 10 perc). A felülúszót eltávolítottuk, és újra centrifugáltuk (100,000 x g, 4 °C, 60 perc). A kicsapódott frakciót 2 ml 100 mM foszfát pufferben szuszpendáltuk. A Biliverdin-reduktáz tisztítását Tenhunen és mtsai által kidolgozott technikával végeztük. A reakció elegy összetétele (2 ml végtérfogatra): 100 µM kálium-foszfát (pH: 7.4), 15 nM hemin, 300 µM BSA, 1 mg biliverdin-reduktáz és 1 mg miokardiális mikorszóma frakció. A mintákat 37 °C-on 1 órán keresztül sötétben inkubáltuk. A reakciót a minták jégre helyezésével állítottuk le. A bilirubin mennyiségét a 464 és 530 nm-en mért abszorbanciák különbségéből számítottuk ki. A mikroszómális frakció protein tartalmát Lowry és mtsai módszerével határoztuk meg.



## *Statisztika*

A kapott értékek 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 nem fibrillált, a fibrillált a PBN-el kezelt és a ZnPPiX-el kezelt csoportok adatait a Bonferroni korrekcióval kiegészített kétmintás t-teszttel hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a  $p < 0.05$ .

## **III. Kaszpáz gátlás szerepének vizsgálat iszkémia/reperfúzió indukálta apoptózis során**

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

A szív izolálását és perfundálását a korábban leírtak szerint végeztük.

### *Iszkémia/reperfúzió kiváltása*

Tíz perc aerob perfúziót követően a bal leszálló fő koronáriát elszorítottuk egy sebészi fonállal -mely egy meggörbített tűhöz kapcsolódott- úgy, hogy a fonalat átvezettük az ér alatt, majd a fonal végeit egy műanyag csőbe húztuk. Az iszkémiát úgy idéztük elő, hogy a műanyag cső végét a szív felszínére szorítottuk egy sebészi szorítóval. A reperfúziót pedig a hurok meglazításával indítottuk el. Az iszkémia teljes ideje alatt -hogy megvédjük a miokardiumot a kiszáradástól- az üvegedény páratartalmát, mely a szívet vette körül, konstans (90-100 %) értéken tartottuk. A reperfúzió indukálta arrhythmia megelőzése érdekében a szíveket előzőleg Langendorff-módszer szerint relatív magas  $K^+$  koncentrációjú perfúziós oldattal perfundáltuk. Ha a reperfúzió kezdeti szakaszában fibrilláció történt, a szívet defibrilláltuk 20 V-os négyszög hullám impulzust alkalmazva 1 ms-os időtartam alatt.

### *Az infarktos terület meghatározása*

Az infarktos terület meghatározásához a szíveket, minden egyes kísérlet végén, 30 ml 1 %-os trifeniltetrazolium-klorid (TTC) oldattal perfundáltuk, az aorta kanül egyik oldalsó ágán keresztül, majd a mintákat  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 metszeteket 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- és az infarktos zónát minden egyes metszetben megjelöltük, majd a területeket pixelben megadva számoltuk ki. Az ép kamrai szövetet a TTC oldat vörösre festette, míg az infarktos terület fehér maradt. A területeket planimetriás software alkalmazásával határoztuk meg, majd a

metszetek tömegével felszoroztuk és összegeztük, hogy megkapjuk a veszélyeztetett („Risk”), illetve az infarktusz terület tömegét (grammban kifejezve). Az infarktusz terület nagyságát az infarktuszhoz, a veszélyeztetett területre vonatkozó %-os arányában fejeztük ki.

#### *Az apoptotikus sejtek kimutatása*

Az apoptotikus sejthalált a terminal-deoxynucleotidyl-transferase deoxyuridine nick end labelling (TUNEL) módszer alkalmazásával határoztuk meg.

#### *Mért paraméterek*

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardiogramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezetünk el. Iszkémia előtt és reperfüzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a coronária áramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP) és annak első deriváltját ( $+LVdp/dt_{max}$ ) (Haemosys, Experimetria, Budapest) a bal pitvaron és a mitrális billentyűn keresztül a bal kamrába helyezett katéter segítségével. Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a coronaria áramlás mértékét pedig a szívből kicsöpögő folyadék határozott ideig történő gyűjtésével mértük. Az infarktusz terület nagyságát és a TUNEL-pozitív apoptotikus sejteket az iszkémia/reperfüziót követően határoztuk meg.

#### *A kísérletek végrehajtásának folyamata*

A szíveket (n = 6 csoportonként) két csoportba osztottuk. Az első, kezeletlen kontrol csoportba tartozó szíveket a kezdeti 10 perces stabilizáló perfúziót követően, 30 perc regionális iszkémiának és az azt követő 120 perc reperfüzióknak vetettük alá. A másik csoportba tartozó szíveket a reperfüzió indítását követő első 10 percben szelektív, vagy nem szelektív kaszpáz inhibitor tartalmú perfúziós oldattal perfundáltuk. Az inhibitorok koncentrációi a következők voltak: 0.1 valamint 0.5  $\mu$ M YVAD-cmk (általános kaszpáz inhibitor); 0.07 valamint 0.2  $\mu$ M Ac-DEVD-cmk (szelektív kaszpáz-3 inhibitor) és 0.07 valamint 0.2  $\mu$ M z-LEHD-fmk (szelektív kaszpáz-9 inhibitor). Az inhibitorokat DMSO-ban oldottuk, majd közvetlenül felhasználás előtt a perfúziós oldattal hígítottuk. A DMSO végkoncentrációja a Krebs-Henseleit oldatban nem haladta meg a 0.03 %-ot, mely koncentráció nincs hatással a szívfunkciókra, az alkalmazott modell esetén. A kezeletlen szíveket 0.03 % DMSO-t tartalmazó oldattal perfundáltuk a reperfüzió első 10 percében.

### *A szíveket a kísérletekből kizáró okok*

Azon szíveket zártuk ki a kísérletekből, melyeknél: a) kamrai arrhythmia alakult ki a regionális iszkémia indukciója előtt és b) a preisztkémiás CF és AF értékek 19 ml/perc és 35 ml/perc alatt voltak. Ez alapján 4 szívet zártunk ki a tanulmányból.

### *Statisztika*

A szív funkcionális paramétereinek (HR, CF, AF, LVDP), az infarktus mértékének és a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számának közlésekor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. A különbségek megállapítására Student féle t-tesztet végeztünk. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a  $p < 0.05$ .

## **Eredmények**

### **I. Az FK 506 és EGb 761 kombinált hatásának vizsgálata**

#### *Az FK 506 hatása az arrhythmiai kialakulására és a szívfunkciókra*

I. Különböző dózisú FK 506-al kezelt állatokban a reperfüzió indukálta kamrafibrilláció kialakulása dózis-függő módon csökkent. Tehát 1, 5, 10, 20, és 40 mg/kg FK 506 csökkentette a totál (reverzibilis és irreverzibilis) kamrai fibrillációk kialakulását, a gyógyszermentes kontrol értékhez viszonyítva, 92 %-ról 92%-ra, 83%-ra, 67%-ra, 33%-ra ( $p < 0.05$ ) és 25%-ra ( $p < 0.05$ ). Az irreverzibilis kamrai fibrilláció és a kamrai tachycardia előfordulása ugyanezt a tendenciát mutatta. Az állatok kiválóan tolerálták az FK 506-ot. Nem volt látható jele toxicitásnak még a legmagasabb alkalmazott dózis esetén sem.

II. A kezeletlen csoport HR, CF, AF, LVDP és  $+LVdp/dt_{max}$  értékei ( $305 \pm 8$  ütés/perc,  $27.3 \pm 0.8$  ml/perc,  $49.9 \pm 1.4$  ml/perc,  $18.2 \pm 0.3$  kPa és  $807 \pm 21$  kPa/s) nem változtak meg szignifikáns mértékben FK 506 kezelés következtében. Hús és 40 mg/kg FK 506-al történt kezelés a posztisztkémiás szívfunkciók jelentős mértékű javulását eredményezte. A szívfrekvencia nem mutatott szignifikáns változást a kezelt csoportokban a kezeletlen kontrol értékekkel összehasonlítva sem iszkémia előtt, sem pedig az iszkémiát követő reperfüzió során.

#### *Az FK 506 és az EGb 761 kombinált hatása az arrhythmiai kialakulására és a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére*

III. Önmagában sem 25 mg/kg EGb 761 kezelés, sem pedig 1 vagy 5 mg/kg FK 506 kezelés nem csökkentette szignifikáns mértékben a reperfüzió indukálta arrhythmiai (VF és

VT) kialakulását. Huszonöt mg/kg EGb 761 együtadása 1, illetve 5 mg/kg FK 506-al, statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a total (reverzibilis és irreverzibilis) és az irreverzibilis kamrai fibrillációk előfordulását, a 92-92 %-os kontroll értékekről 42% ( $p < 0.05$ ) és 33%-ra ( $p < 0.05$ ), valamint 25% ( $p < 0.05$ ) és 8%-ra ( $p < 0.05$ ). A reperfüzió indukálta kamrai tachycardia hasonló csökkenést mutatott.

IV. A szívfunkciók nem változtak jelentős mértékben abban az esetben, ha csak az egyik, vagy csak a másik anyaggal kezeltük az állatokat, az alkalmazott dózisok esetén. Abban az esetben, ha 25 mg/kg EGb 761-t kombináltuk 1, illetve 5 mg/kg FK 506-al, a posztisztkémiás szívfunkciók (CF, AF, LVDP és  $LVdp/dt_{max}$ ) felépülése szignifikáns mértékben javult. A szívfrekvencia az egyetlen paraméter, mely nem mutatott változást sem iszkémia előtt, sem pedig utána a kezelés hatására.

## **II. A hemoxigenáz és az endogén szénmonoxid szerepének vizsgálata iszkémiás/reperfundált szívekben**

I. Kísérleteink során 30 perc perfúciónak kitett szívekben detektálható mennyiségű CO keletkezett. Abban az esetben, ha a szív fibrillált nem tudunk CO-t kimutatni a mintákban. Harminc perc iszkémiát követő 120 perc reperfüzió szignifikáns mértékben növelte a hemoxigenáz által termelt endogén CO mennyiségét. Egy  $\mu\text{M}$  PBN kezelés hatására ez a növekedés még számottevőbb volt.

II. A HO-1 mRNA expresszió  $\sim 3.5$  x nőtt, a nem-iszkémiás kontrol értékekhez viszonyítva. Azokban a szívekben, melyeket 1  $\mu\text{M}$  PBN-el kezeltünk a HO-1 mRNA expresszió még tovább növekedett  $\sim 5$ x, a kontrol értékhez képest, míg abban az esetben, ha a szív fibrillált szignifikáns csökkenés figyelhető meg. Az enzim protein expresszió változása szorosan követte az mRNA szint változását. Azaz, itt is megfigyelhető a kezelésekre hatására bekövetkező növekedés, valamint a fibrilláció következtében fellépő csökkenés.

III. Kísérleteink során megvizsgáltuk a ZnPPiX HO inhibitor hatását az enzim mRNA és protein expressziójára, valamint az enzimaktivásra. Megfigyeltük, hogy az enzim mRNA és protein expressziója növekszik az iszkémiás/reperfundált miokardiumban, összehasonlítva a nem iszkémiás szívizmokkal. Mivel a ZnPPiX indukálja a kamrai fibrilláció kialakulását, ugyanúgy, mint az iszkémiás/reperfundált fibrillált szívizmokban csökkenést tapasztaltunk az mRNA és protein expresszióban.

IV. A hemoxigenáz aktivitás 1  $\mu\text{M}$  PBN kezelés hatására szignifikánsan nőtt a kontrol értékekhez képest. Azonban itt is csökkenés figyelhető meg mind a fibrilláló szívekben, mind pedig a ZnPPiX-el kezelt csoportban.

V. Az iszkémia előtti HR, CF, AF és LVDP értékei ( $312 \pm 9$  ütés/perc,  $26.2 \pm 1.3$  ml/perc,  $51.4 \pm 2.2$  ml/perc és  $18.1 \pm 0.4$  kPa/s) nem változtak meg szignifikáns mértékben  $1 \mu\text{M}$  PBN kezelés hatására. Reperfúzió során a szívfrekvencia nem, de a koronária átáramlás, az aorta kiáramlás és a balkamrai kontrakciós erő statisztikailag szignifikáns mértékben nőtt a kontrolértékekhez képest  $1 \mu\text{M}$  PBN kezelés következtében.

### **III. Kaszpáz gátlás szerepének vizsgálat iszkémia/reperfúzió indukálta apoptózis során**

I. YVAD-cmk kezelés hatására a CF, AF, és a LVDP statisztikailag szignifikáns mértékben nőtt a kontrol értékekhez képest. A szívfrekvencia nem mutatott jelentős mértékű eltérést a kezeletlen kontrol értékektől YVAD-cmk kezelés hatására. Az alkalmazott szelektív kaszpáz inhibitorok hatására nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrol értékektől.

II. TTC festéssel kimutattuk, hogy a kezeletlen szívben az infarktus mértéke számottevő volt, míg YVAD-cmk kezelés az infarktusos terület nagyságát jelentős mértékben csökkentette.

III. Azokban a mintákban, melyeket 30 perc aerob perfúciónak tettünk ki, nem találtunk apoptotikus sejteket. Harminc perc iszkémiát követő 120 perc reperfúzió után átesett minták esetén, meglehetősen nagy számú TUNEL pozitív apoptózisos sejtet detektáltunk a szívszövetben, propídiium-jodid és fluoreszcens szűrőket alkalmazva. Általános kaszpáz inhibitor kezelést követően az apoptózist szenvedett sejtek száma, következésképpen az apoptotikus sejthalál mértéke az infarktusos területen, jelentős mértékben csökkent. Szelektív kaszpáz inhibitorok esetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrol értékektől.

IV. YVAD-cmk kezelés jelentős mértékben csökkentette az infarktusos területet a  $32 \pm 5\%$  kontrol értékről  $18 \pm 3\%$ -ra ( $P < 0.05$ ), illetve  $15 \pm 5\%$ -ra ( $P < 0.05$ ), külön-külön. Szelektív kaszpáz inhibitorok hatására nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést, az általunk használt modell esetén.

### **Következtetések**

I. Eredményeink alátámasztják azon feltételezést, mely szerint az FK 506 antiarrhythmias hatású lehet, továbbá bizonyítják, hogy az FK 506 képes a szívfunkciók javítására, ha azt megfelelő dózisban alkalmazzuk. Valószínűsíthető, hogy ez a hatás a calcineurin/NFAT3/GATA4 folyamatsor gátlásának eredménye. Mindamelllett, mivel a molekuláris jelátviteli útvonalak, melyek a calcineurintól függő génexpressziót összekapcsolják az arrhythmia kialakulásával és a szívfunkciók változásával még nem

ismertek, ezen munka alapján az észlelt hatások nem magyarázhatóak meg, csupán feltételezések lehetségesek. Az FK 506-ról leírták, hogy a gyógyszer hosszú távú használata vesekárosodást, valamint kedvezőtlen interakciókat okoz. Így feltételezhető, hogy az FK 506 kombinálása más gyógyszerkészítményekkel, csökkenti a gyógyszer alkalmazandó dózist anélkül, hogy csökkentené kardioprotektív hatását, s így módon lehetővé válik az FK 506 klinikai alkalmazását különböző szívbetegségek megelőzésében és terápiájában. Kísérleteinkben a kínai páfrányfenyő standardizált kivonatát (EGb 761) választottuk az FK 506-al történő kombinált kezeléshez, jól ismert kardioprotektív hatása, és alacsony toxicitása miatt. A két anyag kombinációjával történő kezelés csökkentette a posztisztkémiás arrhythmia kialakulási valószínűségét, és ezzel párhuzamosan javította az iszkémiát követő szívfunkciókat. Az ezen hatásokhoz hozzájáruló molekuláris mechanizmusok még nem ismertek, de majdnem biztosan magukba foglalják az oxigén tartalmú szabad gyökök csökkenését, ami a miociták membránjának kisebb mértékű károsodását okozza, mely az EGb 761 antioxidáns tulajdonságának eredménye. E mellett a ginkgolidok hozzájárulhatnak a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  ionok membránon keresztül történő fiziológiás cseréjének és eloszlásának helyreállításához.

Mint az korábban említésre került, az EGb 761 PAF antagonistá tulajdonsága következtében is csökkentheti a reperfüzió indukálta arrhythmia kialakulását. A PAF nagymértékben hozzájárul különböző betegségek, többek között szívbetegségek, kialakulásához. Továbbá bizonyították, hogy a PAF közvetlenül hozzájárul az iszkémiát követő reperfüziós károsodásokhoz mind a szívizomban, mind pedig más szövetekben. Ezt a hatást meggátolhatjuk PAF-receptor antagonistá vegyületekkel, pl. ginkgolidokkal történő előkezeléssel.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a patkányok FK 506-al történő kezelése a posztisztkémiás szívfunkciók javulását és az arrhythmia csökkenését eredményezte. Az alkalmazott két vegyület együtt adása szinergista hatást váltott ki. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a mindkét anyagot magába foglaló gyógyszeres beavatkozás, egy új és hatékony lehetőséget biztosít a szívbetegségek és sebészeti beavatkozások következtében fellépő iszkémiás károsodások kezelésében. Eredményeink szintén felvetik a lehetőségét annak, hogy szívhipertrofia kialakulása megelőzhető a kombinált terápia alkalmazásával, lehetővé téve az FK 506 szubtoxikus dózisu alkalmazását, a ginkgolidokkal történő együttadásnak köszönhetően.

II. Munkánk második részében arra törekedtünk, hogy még közvetlenebb bizonyítékokat szerezzünk a HO-1 által termelt endogén CO szerepéről, a reperfüzió 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. PBN használatával, a HO-1 mRNS expresszió és az endogén CO termelés stimulálására, bemutattuk, hogy az endogén CO nélkülözhetetlen a reperfüzió indukálta kamrai fibrillációk megelőzésében. A PBN hatásmechanizmusa, mely a HO-1 mRNS expresszió fokozásán keresztül emelkedett endogén CO termeléshez vezet, magába foglalhatja a következőket: 1) a HO-1 gén azon gének közé tartozik, melyek expresszióját szabad gyökök indukálják. Így az egyik lehetséges magyarázat -az emelkedett HO-1 mRNS szintre- stabil PBN-gyök adduktok képződése, melyek a PBN, és a reperfüzió során keletkező reaktív oxigén speciesek kölcsönhatásából keletkeznek. Ezen magyarázat szerint, a stabil PBN-gyök adduktok, hosszabb féléletidejük következtében, hatékonyak lehetnek a HO-1 génexpresszió szabályozásában, mely emelkedett endogén CO termelésben fejeződik ki; 2) másik lehetséges magyarázat a HO-1 mRNS szupraindukciójára és az emelkedett CO termelésre, a reaktív oxigén speciesek eliminálása és ezáltal ezek és a sejt kompartmentjei közötti közvetlen kölcsönhatások csökkentése. A gyökfogó-anyag magában, nem volt hatékony modulátora a HO-1 génexpresszióknak és a szívfunkcióknak az általunk használt koncentrációban, mivel a preiszkiás szívfunkciók értékei nem változtak meg PBN kezelés hatására, ami jól mutatja, hogy a PBN és a reperfüzió során keletkező reaktív szabad gyökök kölcsönhatása szükséges a HO-1 mRNS expresszió szabályozásához. A mechanizmus, mely során a reaktív gyökök a transzkripció szintjén szabályozzák a HO-1 gént, még nem ismert, de számos transzkripciós faktor, többek között az NF $\kappa$ B és a HIF-1 szerepet játszhat a folyamatban.

Eredményeink azt mutatták, hogy azok a szívek, melyeket ZnPPiX HO inhibitorral perfundáltunk, minden esetben fibrilláltak, következésképpen a HO-1 mRNS és protein expresszió jelentős mértékű csökkenését tapasztaltuk a reperfundált fibrilláló miokardiumban. Továbbá az enzim gátlása ZnPPiX-el jelentős mértékben csökkentette a HO aktivitást a fibrilláló szívizomban. Az eredményekből látható, hogy a HO-1 mRNS és protein expresszió downregulációja, és a HO enzim aktivitás csökkenése fontos szerepet játszhat a reperfüzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulásában. Eredményeink azt is mutatják, hogy a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO termelés egy kulcsfontosságú lépés lehet a reperfüzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulásának megelőzésében, de még további kísérletekre is szükség van ezen a területen. Előzetes várakozásainknak megfelelően az enzim által termelt szén-monoxid

mennyisége különbözött a fibrilláló, és nem fibrilláló szívekben. Így elmondhatjuk, hogy a HO-1 expresszió indukciója, mely tükröződik az endogén CO termelés növekedésében, megelőzheti a reperfüzió indukálta kamrai fibrilláció kialakulását.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az endogén CO termelés jelentős mértékben csökkent azokban a szívekben, melyek a reperfüzió során kamrai fibrilláción estek át. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az endogén CO fontos szerepet játszhat az arrhythmogenesisben. A PBN-el kezelt szívekben a HO-1 mRNS expressziója, és ennek következtében az endogén CO termelés jelentős mértékű emelkedését tapasztaltuk, ezzel párhuzamosan pedig reperfüzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulását nem regisztráltuk. Így eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a HO-1 mRNS expresszió farmakológiai stimulálása révén a reperfüzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulása kivédhető. Mindezeket túl még további kísérletek szükségesek az iszkémia/reperfüzió indukálta génexpresszió, a kapcsolódó protein szintézis és HO aktivitás up- és downregulációja közötti kapcsolatok megoldására a fibrilláló és nem fibrilláló szívizomban.

III. Munkánk során bebizonyítottuk, hogy nem szelektív (általános) kaszpáz inhibitor (YVAD-cmk), ha jelen van a reperfüzió indításakor és a folyamat korai fázisában, megfelelő védelmet biztosít a miokardium számára az általunk használt miokardiális infarktus modell esetén. Kísérleteink azt is bizonyították, hogy specifikus kaszpáz inhibitorok (kaspáz-3 és 9) nem nyújtanak védelmet a kontraktilitási károsodások ellen, illetve nem csökkentik az infarktusos terület nagyságát okklúzió/reperfüziós inzultust követően, izolált patkány szívek esetén. Az általános kaszpáz inhibitor védő hatása kísérleteinkben a TUNEL pozitív apoptotikus sejtek számának jelentős mértékű csökkenésében is tükröződött. Ezzel ellentétben, szelektív kaszpáz inhibitorok alkalmazása nem csökkentette a TUNEL pozitív sejtek számát jelentős mértékben, és nem előzte meg a posztisztkémiás szívizom károsodást. Így, azon terápiás beavatkozások, melyeket a hypoxia során indukálódó kaszpáz aktivitás gátlására terveznek, hasznosnak bizonyulhatnak a szívfunkciók megőrzésében, az apoptotikus sejt vesztés gátlása következtében.



## Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

### *Közlemények*

1. Haines D. D., **Bak I.**, Ferdinandy P., Mahmoud F. F., Al-Harbi S. A., Blasig I. E., Tosaki A. (2000) Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF antagonist free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**: 37-44; **IF**: 1.553
2. 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. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **364**: 501-507; **IF**: 2.472
3. **Bak I.**, Papp G., Turoczy 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; **IF**: 5.082

### *Absztrakt*

1. **Bak I.**, Tosaki A. (2001) Caspase inhibition on infarct size and cardiac function in ischemic and reperfused isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**: A7
2. **Bak I.**, Papp G., Joo F., Tosaki A. (2002) Heme oxygenase related carbon monoxide and ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34 (6)**: A6

### Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

1. 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; **IF**: 2003-ban várható.
2. Pataki T., **Bak I.**, Kovacs P., Bagchi D., Das D. K., Tosaki A. (2002) Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**: 894-899; **IF**: 5.021