

## A MYOCARDIUM ISCHAEMIÁS KÁROSODÁSA KÖVETKEZTÉBEN FELSZABADULÓ TROPONIN DEGRADÁCIÓS TERMÉKEK VIZSGÁLATA

Hertelendi Z., Tóth A., Jenei C.<sup>1</sup>, Édes I.<sup>1</sup>, Papp Z.

DEOEC, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológia Tanszék, Debrecen

<sup>1</sup>DEOEC, Kardiológiai Intézet, Debrecen

A myocardium ischaemiás anyagcserezavarát követően a szívizomsejtek kontraktilis fehérje-rendszere sérül. Célunk a myocardialis infarctus során intracellulárisan aktiválódó proteolitikus folyamatok elemzése, melyhez az infarctuson átesett betegek szérumból a troponin degradációs termékek molekulatípus szerinti megoszlását kívánunk eljutni. A fehérjekárosító folyamatok modellezését rekombináns módszerekkel előállított, tisztított troponin I molekulák in vitro  $\mu$ -calpain hasításával valósítjuk meg. A troponin I molekulákat a vérplazma többi fehérjéjétől SDS-poliacrylamid gélelektroforézis segítségével választottuk el. A molekulák azonosítását Western immunoblot módszerrel (kecskében termeltetett humán troponin I ellenes poliklonális elsődleges antitest, biotinált kecske IgG ellenes nyúlban termeltetett poliklonális másodlagos antitest, VECTOR kit és ECL előhívás) végeztük. A betegek szérumával történő kísérletek során több technikai problémát kellett megoldanunk. A szérumban nagy mennyiségben jelen levő immunoglobulinok könnyűlánc az elektroforézist követően a troponin I molekulatípusának megfelelő magasságban helyezkedett el, jelentős mértékben elfedve a troponin I által adott jelet. Másrészt a szérumban a troponin I még nagy kiterjedésű infarctus után is olyan alacsony mennyiségben volt jelen (kb. 30–50  $\mu$ g/L), mely a szérum direkt Western immunoblot analíziséhez általunk használt detektálási technika érzékenységi határa (1  $\times$  10<sup>-3</sup>  $\mu$ g/L) alatt volt. Ezért a troponin I detektálási küszöbének fokozására immunprecipitációs lépést kellett a protokollba iktatnunk. Ehhez eszközként a Liaison („Byk-Sangtec Diagnostica Liaison cTnI assay”) kolloidális vassal jelzett troponin I specifikus antitestet választottuk, melyet a myocardialis infarctus rutin diagnosztikájában is alkalmaznak. Az immunprecipitáció optimalizálása során a szérum és az antitestek mennyiségének változtatásával sikerült a myocardialis infarctus miatt szérumba kerülő troponin I molekulák izolálása. Ugyanilyen körülmények között  $\mu$ -calpain által in vitro hasított troponin I degradációs termékeket tudtunk precipitálni. (A munka az ETT 239/2003 támogatásával valósult meg)

## EVALUATION OF TROPONIN DEGRADATION PRODUCTS RELEASED INTO THE BLOOD STREAM DURING MYOCARDIAL ISCHEMIC INJURY OF THE MYOCARDIUM

experimental, ischaemia, myocardial infarction

Due to the ischemic disorder of the myocardium the myofibrillar system of the myocytes is damaged. Our aim was to analyze the proteolytic processes activated during myocardial infarct, through the determination of the molecular weight of the troponin degradation products in the blood of patients with myocardial infarct. To model the protein damaging processes calpain-mediated digestion of recombinant and purified troponin I molecules was carried out in vitro. The troponin I molecules were separated from the other plasma proteins of the blood plasma by SDS-polyacrylamid gel electrophoresis. Molecules were identified by Western immunoblot (human troponin I specific polyclonal primary antibody produced in goat, biotinylated goat IgG specific polyclonal secondary antibody produced in rabbit, VECTOR kit and ECL development). During experiments with patients' plasma some technical problems arose. The light chain of the immunoglobulins being present in great quantities in the serum following the gel electrophoresis considerably masked the band of troponin I. On the other hand, troponin I was present in small quantities (about 30–50  $\mu$ g/L) in the serum of patients with extensive heart infarct being under the sensitivity limit of our detecting technique (1  $\times$  10<sup>-3</sup>  $\mu$ g/L) applied for the serum direct Western immunoblot analysis. Hence, to raise the detection threshold of troponin I we had to insert an immunoprecipitation step into the protocol. To this end we chose the Liaison („Byk-Sangtec Diagnostica Liaison cTnI assay”) troponin I specific antibody conjugated with colloidal iron which is also used in the routine diagnostic of the myocardial infarct. As a result of the optimization the immunoprecipitation we could isolate the troponin I molecules released into the blood stream during myocardial infarct. Under the same laboratory circumstances we also managed to detect the troponin I degradation products digested in vitro by calpain. (Supported by the ETT 239/2003 GRANT)

## A TUDÓVIZENYŐ VIZSGÁLATA ULTRAHANG SEGÍTSÉGÉVEL KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT – A „COMET” ARTEFAKTUMOK JELENTŐSÉGE

Jambrik Z.<sup>1</sup>, Adamicz A.<sup>2</sup>, Kaszaki J.<sup>2</sup>, Varga A.<sup>1</sup>, Forster T.<sup>1</sup>, Boros M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SZTE, II. Belgyógyászati Klinika, Kardiológia – Haemodynamika, Szeged

<sup>2</sup>SZTE, Sebészeti Műtétan, Szeged

**Bevezetés:** 1997 óta ismert, hogy tüdőoedémás betegben a mellkas echocardiographiás vizsgálata során a transducertől sugárszerűen eredő echogen artefaktumok (comet-tail) figyelhetők meg. Korábbi vizsgálatunkban kimutattuk, hogy fulladás, ill. egyéb okok miatt hospitalizált betegekben a cometek száma egyenes arányban áll a radiológiailag becsült extravasculáris tüdővíz tartalommal. **Cél:** 1. Megvizsgálni a comet artefaktumok jelenlétét egy experimentális tüdőoedema modellben. 2. Összefüggést találni az echoval mért comet szám, illetve gravimetriával mért nedves/száraz tömeg index között. 3. Meghatározni a comet metódus alkalmasságát az oedema kialakulásának bizonyos fázisaiban. **Módszer:** Tizenhét Na-pentobarbitallal altatott vietnami csüngőhasú disznót használtunk vizsgálatunkban. Öt áloperált állat alkotta a kontroll csoportot (1. csoport). Tizenkét állatban oleinsav centrális vénás infúziójával (0,01 ml/kg) váltottunk ki tüdőoedemat. Ezen állatokban a mellkas echo vizsgálatát végeztük alapállapotban közvetlenül az oleinsav beadása után, 30 (2. csoport, n=5), illetve 60 perccel (3. csoport, n=7) az infúzió után. A vizsgálat végén mindkét tüdőfélből biopsziát vettünk a gravimetria számára. Ugyancsak regisztráltuk az artériás nyomás (systolés, diastolés, közép), a centrális nyomást és a szívfrekvenciát. **Eredmények:** Harminc perccel az oedema indukciója után a comet szám szignifikánsan magasabb volt, mint alapállapotban (28,6  $\pm$  8,1 vs. 5,2  $\pm$  2,5). A kimetszett tüdőszövet nedves/száraz tömegaránya hasonló volt a 2. és 3. csoportban és szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll csoportban (0,001). Ugyancsak szignifikánsnak bizonyult a nedves/száraz tömegarány, illetve a  $\leq$  comet szám lineáris korrelációja mindkét oleinsavval kezelt csoportban (2. csoport: r=0,81, p=0,027, 3. csoport: r=0,59, p=0,04). **Összefoglalás:** Vizsgálatunk alapján megállapíthatjuk, hogy kísérleti modellünkben a mellkas ultrahang vizsgálata alkalmas volt az extravasculáris tüdővíz változásainak diagnosztikájára és már 30 perccel az oedema létrehozása után alkalmas az oedema kialakulás időbeli folyamatának megfigyelésére.

## THE „COMET-TAIL” ARTIFACT CAN ESTIMATE THE EXTRAVASCULAR LUNG WATER CONTENT IN PIGS. AN EXPERIMENTAL, ULTRASOUND STUDY

congestive heart failure, experimental

**Background:** It is known that a comet-like artifact could be obtained by echocardiographic examination of the lung with pulmonary edema in humans. In our previous study a strong linear correlation was found between the comet number and the extravascular lung water score assessed by chest X-ray in patients with or without dyspnoe. The aims of the present study were 1. to investigate the presence of the comet-tail artifact in an experimental model of pulmonary edema, 2. to estimate correlation between the comet number (measured by ultrasound) and the wet/dry ratio of the lung tissue (measured by gravimetry) and 3. to assess the time-dependency of the ultrasound comet method. **Subjects and method:** Seventeen Na-pentobarbital anesthetized, cannulated (central vein and carotid artery) mini-pigs were used: 5 sham-operated animals served as controls (group 1), in 12 animals pulmonary edema was induced by injection of oleic acid (0.1 ml/kg) via the central venous catheter. In these animals, the ultrasonic evaluation of the lung was performed at the baseline and 30 min after the injection of oleic acid (group 2, n=5) or 60 min after the injection (group 3, n=7). At the end of the experiments biopsy samples were taken from both lungs to determine wet/dry weight ratio by gravimetry. During the study the heart rate, the arterial and the central venous pressure were monitored and recorded. A significant increase in the comet number was observed 30 min after the edema induction vs. basal values (28.6  $\pm$  8.1 vs. 5.2  $\pm$  2.5). The wet/dry ratio was similar (0.001) than in the control group  $\leq$  in group 2 and 3, and significantly higher (p (group 2: 7.18  $\pm$  0.70, group 3: 7.10  $\pm$  0.50, group 1: 5.61  $\pm$  0.08). Moreover, a significant correlation was found between the wet/dry ratio and the comet number at the end in both oleic acid-treated groups (r=0.81, p=0.027 and r=0.59, p=0.04, respectively). **Conclusion:** In our experimental pig model the ultrasonic evaluation of the chest is able to diagnose the extravascular lung water changes and may be used to estimate the time course of edema formation in the lung tissue 30 min after the induction of the edema.