

EGYETEMI, DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A szívizskémia kezelésének lehetőségei

**Írta:
Dér Péter**

Témavezető: Dr. Tószaki Árpád

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR
GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK
DEBRECEN
2008

Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek világszerte a vezető halálokok közé tartoznak, annak ellenére, hogy megfelelő életmóddal jelentősen csökkenteni lehetne a kialakulásuk valószínűségét. A legfontosabb rizikófaktorok a dohányzás, a telített zsírokban gazdag táplálkozás, a mozgásszegény életmód, az elhízás, a magas vérnyomás, a magas koleszterinszint, a túlzott alkoholfogyasztás, a cukorbetegség. Magyarországon a halálozások több mint fele a szív- és érrendszeri betegségeknek tulajdonítható, ezek közül is az iszkémiás szívbetegség a legfőbb halálokok. Az aggasztó statisztikai adatok indokolják a témakör részletesebb vizsgálatát azért, hogy pontosabb képet alkothassunk a betegség hátterében zajló mechanizmusokról.

Az elmúlt három évtizedben nagyszámú tanulmány foglalkozott a iszkémia/reperfúzió indukálta szívizom károsodások mechanizmusának megértésével és kiterjedt kutatások folytak az iszkémiás károsodások hatékony kezelésének kidolgozása céljából. Így a kísérletes technikák és módszerek nagymértékben fejlődtek. Ennek ellenére az iszkémiás betegségek komplex kezelése továbbra is megoldatlan kérdés maradt.

Az iszkémia kialakulásának hátterében leggyakrabban valamilyen organikus szűkület, esetleg koronárispazmus áll, ami az érintett terület hipoperfúzióját eredményezi. A folyamat során a szívizomban az oxigén- és tápanyagellátás zavara, energetikai funkciózavar és a káros anyagcseretermékek felszaporodása következtében a funkciós paraméterek leromlása, majd sejtpusztulás (nekrózis ill. apoptózis) alakul ki. Az energetikai zavar hátterében tulajdonképpen a miociták csökkent ATP termelése áll, ugyanis a glükóz aerob metabolizmusa leáll, így a sejtek csak anaerob glikolízis és oxigént igénylő zsírsavoxidáció révén jutnak energiához. Következésképp laktát felszaporodás, acidózis jön létre, amelyek az ATP hiánnyal együtt károsítják a sejtmembránt, és zavart okoznak az intracelluláris ionegyensúlyban. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} szint megnő a szarkoplazmatikus retikulumból történő kiürülés és az extracelluláris térből való beáramlás következményeként, amely aritmiák (extraszisztole, VT, VF) kialakulásának veszélyét hordozza magában.

Az évtizedek folyamán számos természetes anyagot és endogén komponens vizsgáltak, de viszonylag kevés figyelmet szenteltek az adrenocorticotrop hormon és fragmentumai – különösképp az adrenocorticotrop hormon (4-10) (ACTH (4-10) - hatásainak a posztisztkémiás szívfunkciókra és az infarktusz területre vonatkozólag. A melanocortinok (α -, β -, γ -MSH) egy nagyobb prekursor molekula, a proopiomelanocortin (POMC) derivátumai. Az ACTH egy 39 aminosavat tartalmazó peptid, amelynek aktív fragmentuma a

13 aminosavból álló alfa-melanocyt-stimuláló hormon (α -MSH), ezen belül helyezkedik el az ACTH (4-10). A melanocortinok hatásait a hét transzmembrán domainből álló, G proteinhez kapcsolt receptorok aktiválásával fejtik ki. Ezek a receptorok számos szervben megtalálhatók. Néhány éve az α -MSH iszkémia/reperfúzió (I/R) indukálta károsodásokkal szembeni protektív hatásait írták le vesében, tüdőben, és agyszövetben. Továbbá publikálták, hogy az ACTH (1-24) és az α -MSH kezelés hatására csökkent az aritmia előfordulása és a letalitás koronária okklúziós patkány modellben. Ezenkívül a melanocortin peptidek egy jellegzetes adrenalin-független gyulladáscsökkentő hatással is rendelkeznek, amelyet centrális és perifériás támadáspontokon fejtenek ki, meglehetősen komplex módon. Egy előző tanulmányunkban bemutatásra került, hogy a melanocortin peptidek pozitívan befolyásolták a miokardiális infarktus káros következményeit, úgymint az aritmiát, az apoptotikus és nekrosis okozta sejthalált és a károsodott szívfunkciót. Az α -MSH, mint endogén derivátum, kétélű fegyverként viselkedhet a váratlan hormonális mellékhatások miatt. Az optimális cél egy olyan hasonló peptid vagy derivátum megtalálása, amely nem rendelkezik semmilyen adrenocortikotrop hatással. Kutatásaink során többek között arra szerettünk volna választ kapni, hogy az ACTH (4-10) rendelkezik-e kardioprotektív hatásokkal, az előbbieken említett mellékhatások nélkül.

Az I/R témakörének tárgyalása során, fontos említést tennünk egy, már évtizedek óta vizsgált jelenségről, a prekondicionálásról (PC). Ennek során a ciklikusan ismétlődő rövid idejű I/R epizódok toleranciát és védelmet alakítanak ki a szövetben egy később bekövetkező, máskülönben az életet veszélyeztető kimenetelű iszkémiával szemben. A PC jelenségét először Murry és mtsai. írták le. Kutyákon végzett kísérleteikben az 5 perc a. circumflex okklúziót és 5 perc reperfúziót követő 40 percnyi iszkémia során szignifikánsan csökkent az infarktusos terület nagysága a kontroll csoporthoz képest, ahol a prekondicionálás elmaradt. Ezt a jelenséget klasszikus vagy korai prekondicionálásnak nevezik. Az ún. késői prekondicionálás jelenségét a 90-es évek elején fedezték fel. Ennek során a prekondicionált szíveket csak 24 óra elteltével vetették alá a hosszabb idejű iszkémiának. A prekondicionált csoport funkciós paraméterei szignifikánsan jobbak voltak, mint a kontroll csoporté. Azóta a PC mechanizmusát a szívben széles körben vizsgálták és rámutattak, hogy intracelluláris mediátorok által szabályozott események egész sora megy végbe a PC kiváltotta stressz tolerancia kialakulása során. Az intracelluláris mediátorok (pl. nitrogén monoxid (NO), kalcium, adenozin, thioredoxin1 (TRX1) és reaktív szabadgyökök által kiváltott szignálok kaszkádja olyan stressz-rezisztens szívet eredményez, amely képes megvédeni magát a későbbi, végzetes kimenetelű iszkémiával szemben. Nemrégiben megállapították, hogy az

intracelluláris messengerként ismert ceramidnak jelentős szerepe van a PC mechanizmusában. A szfingomielinből képződő ceramid a kardiomiociták pusztulását idézi elő a I/R során. Egy tanulmányban leírták, hogy a TNF α mediálta PC, ceramid szignálmechanizmuson keresztül megy végbe. Egy másik publikáció szerint, a permeábilis, exogén ceramid csökkentette az infarktusos terület nagyságát, ami alátámasztja a ceramid szerepét a PC mechanizmusában. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a ceramid a lipid raftok (membrán mikrodomainek) belsejéből fejt ki szignál mechanizmusát, amelyek olyan receptorszervező struktúrák, amelyek szfingolipidekben (szfingomielin, glikoszfingolipidek) és koleszterinben gazdagok. Fontos lipid raft struktúrájú képletek a „caveolák”. Ezek a plazma membrán 50 – 100 nm nagyságú, palack formájú betüremkedései és gyakran gyöngysorszerűen helyezkednek el a membránban. A caveolák szelektíven képesek felvenni a membránhoz kapcsolódó proteineket, kialakítva ezzel egy egyedülálló szignál-mikrodomaint, kontrollálva ezáltal a transzmembrán szignálmechanizmusokat. A caveolák a caveolinok jelenlétének meghatározásával különböztethetők meg a többi lipid raft domaintól. A caveolin három különféle 22 – 24 kDA molekulatömegű izoformáját határozták meg, melyek közül a caveolin-1 és -2 minden sejttypusban előfordul, míg a caveolin-3 csak az izomsejtekből mutatható ki. A caveolin-1, amely olyan nem-receptorhoz kötött tirozin-kinázok szubsztátja, mint a Fyn, Abl vagy az Src, egy scaffolding protein és oxidatív stressz hatására foszforilálódik a tirozin 14-en a fent említett enzimek hatására. A tirozin-foszforiláció további szignálokat aktivál, kulcsszerepet játszva ezáltal a caveolákban lejátszódó szignálmechanizmusokban.

Az indukálható és endotheliális nitrogén monoxid szintetázok (iNOS, eNOS) által termelt NO szerepe a PC mechanizmusában jól ismert. Mivel a NO szerepet játszik a ceramid szignáljában, továbbá a NOS a lipid raftokban és más caveolinban gazdag domaineiben kimutatható, kísérletet tettünk annak meghatározására, hogy milyen feladatot tölt be a ceramid-NO szignál az iszkémia és a prekondicionálás során.

A PC pontos hatásmechanizmusa a mai napig sem teljesen tisztázott és néha ellentmondásos magyarázatok látnak napvilágot. Fontos kiemelni, hogy a különböző állatokkal (nyúl, patkány, kutya vagy sertés) végzett kísérletek túlnyomó többségét egészséges, koronária vagy miokardiális sérülésektől mentes állatszíveken végezték. A kapott eredmények patofiziológiai és klinikai jelentősége flymódon nem kellően megalapozott. Kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy a hiperkoleszterinémiás állatok szívei ugyanúgy adaptálódnak-e a prekondicionálás során az iszkémia indukálta károsodásokhoz, mint az egészséges szívszövet.

Az iszkémia során fellépő hipoperfúzió miatt oxidatív stressz alakul ki, amelynek folyamán az aktiválódott NADH-, xantin- és ciklooxidáz nagy mennyiségű szuperoxid aniont generál, amely membránkárosodást, sejtpusztulást idéz elő a szívszövetben. Az iszkémiát követő reperfúzió során szintén ezek a reaktív szabadgyökök felelősek az ún. reperfúzió-indukálta szívizomkárosodásért is. Ismert tény, hogy azon vegyületek (pl. szuperoxid-dizmutáz, kataláz), melyek képesek befogni a szabad gyököket, kardioprotektív tulajdonságokkal rendelkeznek. Az étrendi antioxidánsok (alfa-tokoferol, aszkorbinsav, béta-karotin) valamint egyes kéntartalmú aminosavak fontos antioxidánsokként jöhetnek számításba. Ezen felül az extracelluláris folyadékban jelen levő ceruloplazmin, albumin, transferrin haptoglobin a védelem „második vonalát” képezi az oxidatív behatásokkal szemben. Emellett számos növényi eredetű struktúra is rendelkezik kardioprotektív tulajdonságokkal. A fitoszterolok például azáltal, hogy gátolni képesek a koleszterin abszorpcióját, csökkentik a plazma koleszterin és LDL szintjét. Omega-3-zsírsavval kombinálva pedig még hatékonyabban csökkentik a kardiovaszkuláris megbetegedések rizikóját. Kísérleteinkben a Makhana antioxidáns hatását vizsgáltuk I/R modellen.

Az *Euryale ferox* (Nymphaeaceae család) - vagy más néven Makhana - sima levélfelülettel rendelkező, egynyári vagy évelő óriás vízililiom. A leveleket, csészeleveleket és a gyümölcsöt hajlott tövisek borítják. Az édes és fanyar ízű magvakat termő növény Kelet-Indiában őshonos, de évezredek óta termesztik Kínában is. A Makhana magok ehetőek, a sült magok rendkívül táplálóak és 77 % könnyen emészthető szénhidrátot tartalmaznak.

A Makhana széleskörben alkalmazott növény a kelet-ázsiai gyógyászatban olyan betegségek gyógyításában, mint a krónikus hasmenés, vesebántalmak, fehér folyás vagy a lépelégtelenség. Azokról a mechanizmusokról, amelyek révén a növény kifejti terápiás hatásait, viszonylag keveset tudunk. Egy nemrégiben megjelent tanulmány kimutatta, hogy az *Euryale ferox* magvak kivonata jelentős antioxidáns aktivitással rendelkezik. A kísérletekhez a stabil szabadgyököt tartalmazó 1,1-difenil-2-pikrilhidrazint (DPPH) alkalmazták és az eredmények alapján elmondható, hogy a kivonatok relatíve magas oxigéngyök megkötő képességgel rendelkeznek. Vizsgálták továbbá az *Euryale ferox* kivonat hatásait oxidatív ágenseknek kitett kínai hörcsög tüdő fibroblaston is. A teljes (n-hexán, diklórmétán, etil-acetát, n-butanol keverék), az etil-acetátos illetve butanolos kivonatokkal kezelt sejtek megnövekedett ellenálló képességet mutattak a H₂O₂ szabadgyökökkel szemben. Egy másik kísérletben mágneses magrezonancia spektroszkópiás (NMR) és tömegspektrometriás (MS) módszerekkel sikerült azonosítani az *Euryale ferox* glikolipidjeit.

Célkitűzések

Kísérleteinkben az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk izolált nyúl- és patkányszíveken. Munkánkat négy fő témakörre összpontosítottuk:

- I.** Vizsgálni kívántuk, hogy a prekondicionálás egészséges szíveken tapasztalt pozitív hatásai manifesztálódnak-e beteg (hiperkoleszterinémiás) szívekben is, és képes-e csökkenteni az infarktusos területek nagyságát az egészséges szívekben tapasztalt mértékben.
- II.** Célul tűztük ki a lipid raftok szerepének tisztázását a ceramid és a NO szignálfolyamataiban az iszkémia / reperfundált illetve prekondicionált szívekben.
- III.** Célkitűzéseink közé tartozott a Makhana kivonat kardioprotektív hatásainak vizsgálata a posztiszkémiás szívfunkciókra, az infarktusos terület nagyságára, és a redox folyamatokban jelentős szerepet betöltő TRX1 és TRP32 proteinek expressziójára. Célunk volt a Makhana kivonatok szabadgyök-befogó képességének vizsgálata is.
- IV.** Vizsgálni kívántuk továbbá, az ACTH (4-10) hatását a posztiszkémiás szívfunkciók felépülését, a reperfúzió indukálta aritmiák kialakulásának változását, valamint a miokardiális apoptózis mechanizmusát illetően. Választ kerestünk arra, hogy az ACTH (4-10) képes-e gátolni a programozott sejthalál folyamatát, és ha igen, mekkora dózis szükséges a gátláshoz. Tanulmányoztuk továbbá, hogy az ACTH (4-10) képes-e csökkenteni az infarktusos terület mértékét.

Módszerek és anyagok

Kísérleteink első részében New-Zealand nyulakat (2,2-2,6 kg) használtunk. Az állatokat a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásainak megfelelő körülmények között tartottuk és használtuk fel (NIH publication no. 86-23, 1985).

a) A hiperkoleszterinémia kiváltása nyulakban

Az azonos korú nyulak hiperlipidémiás csoportja 1.0 %-os koleszterinnel dúsított laboratóriumi eledelt, a kontroll csoport szintén egyidős tagjai pedig hagyományos koleszterinmentes eledelt kaptak (ad libitum). Az állatok etetése 8 héten keresztül történt. A 8 hét letelte után a szíveket izoláltuk.

Iszkémia/reperfúzió kiváltása prekondicionált nyúlszívekben

A prekondicionálás (PC) az iszkémia/reperfúzió (I/R) egymás utáni, periodikus ismétlése annak ciklusszámától függően (1XPC, 2XPC, 3XPC, 4XPC). Jelen esetben a rövid periódus 5 perc globális iszkémiát, majd ezt követő 5 perc reperfúziót jelent. A PC-t a hiperkoleszterinémiás és a nem-hiperkoleszterinémiás, egészséges csoport nyulaival is elvégeztük (csoportonként 6 állat). A PC befejezése után a szíveket 30 perc globál iszkémiának vetettük alá, amit 120 perc reperfúzió követett. A ciklusok számát 1 és 4 között határoztuk meg a felhasznált irodalmak alapján.

További kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat (250–300 g) használtunk.

b) A lipid raftok szerepének vizsgálata

A kísérleteket kétféle protokoll szerint végeztük. Az első esetben a szíveket 15 percig perfundáltuk Krebs-Henseleit pufferrel (KHB), szfingomielináz gátló hatású desipramine jelenlétében ill. anélkül. Ezt 30 perc iszkémia, majd 120 perc reperfúzió követte. A második esetben a szíveket a prekondicionálás protokollja szerint először négy cikluson át 5 perc iszkémiának és azt követően 10 perc reperfúzióknak vetettük alá, amit 30 perc iszkémia, majd 120 perc reperfúzió követett.

c) Előkezelés Makhana kivonattal

A Makhana termékek közvetlenül a termelőtől kerültek beszerzésre (Bihar, India). A Makhana keverő berendezésben vizes kivonásnak vetették alá. A végső csapadékot ultrahangos keverővel keverték és alkohollal, valamint vízzel kivonatot képeztek. Az állatokat véletlenszerűen egy kezelt és egy kontroll csoportra osztottuk. A vizsgálatokhoz kétféle modellt alkalmaztunk. Az akut modellben a szíveket a Makhana kivonat három különböző dóziséval (50 µg/ml; 125 µg/ml és 250 µg/ml) oldatával perfundáltuk. A krónikus modellben az állatokat 21 napon keresztül két különböző dózissal (250 mg/kg/nap és 500 mg/kg/nap) kezeltük perorálisan, gyomorszondán keresztül.

d) ACTH 4-10 előkezelés

A kísérletek során a patkányok 1-1 csoportját 50 µg/ttkg ill. 200 µg/ttkg koncentrációjú ACTH 4-10 oldattal kezeltük elő, melyet subcutan (s. c.) injektáltunk 12 órával az iszkémia / reperfúzió kiváltását megelőzően. A kontroll állatok ugyanezt az oldatot kapták, de hatóanyag nélkül.

Izolált dolgozó szív preparátum

A nyulakat ketamin/xilazin (40/5 mg/ttkg) keverékével, a patkányokat nátrium-pentobarbitállal (60 mg/ttkg) altattuk, majd ezt követően iv. heparint adtunk (patkány: 500 IU/kg, nyúl: 1000 IU/kg) a trombusok kialakulásának megelőzésére. A mellkas megnyitása után a szívet kimetszettük és hideg perfúziós oldatba helyeztük. A preparálást követően a szívet az aortán és a vena pulmonalison keresztül ún. „dolgozó-perfúziós” készüléken perfúziós oldattal perfundáltuk. A perfúziós oldat módosított Krebs-Henseleit puffer volt. A szíveket 5 percig Langendorff-módszer szerint perfundáltuk 37 °C-on és konstans perfúziós nyomáson. A mosási periódust követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk és regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP) illetve egyes esetekben ennek első deriváltját (LVdp/dt). Ezt követően a szíveket 30 perc teljes (totál) iszkémiát követő 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. A reperfúzió során (a 10., 30., 60. és 120. percben) regisztráltuk a szív előbbieken említett funkciók paramétereit (HR, CF, AF, LVDP, LVdp/dt).

A szívfunkciók mérése

A szívfunkciós paraméterek mérésekor a koronária átáramlást adott időegység alatt (1 perc) a szívről lecsöpögő KHB mennyiségeként határoztuk meg, az aorta kiáramlást flowméterrel, az LVDP, HR, LVdp/dt értékeit pedig Gould p23XL transducer (Gould Instrument System Inc., Valley View, OH, USA) segítségével detektáltuk. A jelek felerősítésére Gould 6600 szignál erősítőt (Gould Instrument System Inc., Valley View, OH, USA) alkalmaztunk. A paraméterek monitorozását Cordat II real-time software (Triton technologies, San Diego, CA, USA) segítségével végeztük.

Az infarktusos terület nagyságának vizsgálata

A szívet a 120 perc regionális iszkémia leteltével 1 %-os trifenil-tetrazolium (TTC)-oldattal festettük meg az aorta-kanül oldalágán keresztül. Ezután a szíveket $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, majd a fagyott miokardiumból éles pengével metszeteket készítettünk az apikobazális tengelyre merőleges síkban. A metszetek tömegét megmértük, és szárítás után két üveglap közé helyezve szkenneltük őket és egy planimetriás software (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA.) segítségével meghatároztuk valamennyi metszet infarktusos területének értékét. Ezen területértékeket megszoroztuk a metszetek tömegeivel, és az eredményeket összegeztük. Végül az infarktusos területek nagyságát százalékosan fejeztük ki az infarktust szenvedett szívizom tömege és az össztömeg hányadosaként.

A caveolinban gazdag membránfrakciók izolálása

A szíveket proteáz koktélt tartalmazó nátrium karbonát puffer oldatban (pH 11,0) homogenizáltuk Polytron homogenizáló készülékkel (Brinkman Instruments, Westbury, NY, USA). A homogenizátumot ultrahanggal kevertettük, majd 2 ml 90% szaccharóztartalmú MBS (25mM Mes, pH 6.5, 0.15 M NaCl) oldat hozzáadásával 45 % szaccharóz koncentrációra állítottuk be. Ezután ultracentrifugacsőbe helyeztük. Egy 35 %-os diszkontinuus szaccharóz grádienszt hoztunk létre felette (4 ml 5 % szaccharóz oldat/ 4 ml 35 % szaccharóz MBS-ben oldva, amely 250 mM Nátrium karbonátot tartalmaz.) és 39 000 fordulatszámon centrifugáltuk (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Az 5 és 35 % szaccharóz határfelületén elhelyezkedő fénytörő, caveolinban gazdag részt leválasztottuk a további vizsgálatokhoz.

Immunoprecipitálás caveolin-1-el

A vizsgálathoz az Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA) által küldött Immunoprecipitation starter Pack-et használtuk, követve annak útmutatásait. A teszthez caveolin-1 ellen termelt poliklonális antitestet (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) használtunk. Ezután a Western blot analízist eNOS antitesttel (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) végeztük.

Ceramid és szfingozin-1-foszfát meghatározás a caveolinban gazdag membránfrakciókból

A ceramid és bomlástermékeinek analízisét egy, már korábban beállított nagy felbontású vékonyréteg kromatográfiás (High Performance Thin-layered Chromatography, HPTLC) módszer segítségével hajtottuk végre.

Antibody array

A teszthez használt lemezek egyenként 512 különböző antitestet tartalmaznak. Egy kísérlethez két lemez szükséges. 100 mg bal kamrai szövetet homogenizáltunk 1 ml kivonó / jelölő oldatban (a kit része) (BD Biosciences Clontech, Paolo Alto, CA, USA). A fehérjekoncentráció meghatározása után a mintákat 1.1 mg fehérje/ml koncentrációra hígítottuk. A Cy3 és Cy5 festékekhez (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 110 ml kivonó / jelölő oldatot adtunk. A felülúszókat külön-külön mindkét festékkel megjelöltük, majd a felesleges festéket leszűrtük. A kezelt csoportból származó, Cy5-el jelölt mintát elegyítettük a kontroll csoportból származó, Cy3-al jelölt mintával és ugyanezt tettük a kezelt csoportból származó, Cy3-al jelölt és a kontroll csoportból származó, Cy5-el jelölt mintával. Minden mintakeverékből 20 mg proteint inkubáltunk 30 percig az antibody array lemezekkel, majd sorrendben 7 különböző pufferrel mostuk őket. A lemezeket megszáritottuk és azonnal szkenneltük (Perkin-Elmer Life Sciences Scannary Express). A Cy3 és Cy5 jelzésekre külön-külön szkennelt képeket Imagene szoftver (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA) segítségével egyesítettük és analizáltuk. A lemezeken ismétlődő értékeket átlagoltuk és egy belülről normalizált arányt (INR) számítottunk a BD Biosciences weboldaláról letöltött Microsoft Excel lapon. Az eredmények ábrázolását Silicon Genetics Gene Spring szoftverrel végeztük.

Szabadgyök-fogó tulajdonság mérése

A „scavanger” aktivitást a szuperoxid-anionra 10 mU/ml szuperoxid-dizmutázzal (SOD), a hidroxil-gyökre pedig 500 µg/ml dimetil-tioureával (DMTU) hasonlítottuk össze. A szuperoxid-aniont kémiai indukáltuk xantinból (100 µM) xantin-oxidáz enzim (8 mU) hozzáadásával, reakciós puffer (10 mM foszfát puffer, pH 7,4, 10 µM etilén-diamin-tetra-acetát: EDTA 1 ml-ben) jelenlétében. A hidroxil-gyök előállításához szükséges puffer az előbbi pufferhez képest még 100 µM etilén-diamin-tetra-acetátot (EDTA) és 100 µM FeCl₃-ot is tartalmazott.

A kardiomiociták apoptózisának meghatározása

A formaldehiddel fixált bal kamrákat paraffinba ágyasztuk, 4 µm széles metszeteket készítettünk, majd xilén és etanol oldatokkal deparaffineztük. Az apoptotikus sejtek immunhisztokémiai detektálását TUNEL módszerrel végeztük. Ennek során a digoxigeninnel megjelölt dUTP, dezoxinukleotidil-transzferáz közreműködésével beépül a DNS láncba. A beépült nukleotidot birkában termelt, poliklonális anti-digoxigenin antitesttel inkubáltuk, majd nyúlban termelt FITC-konjugált, anti-birka IgG-al, mint másodlagos antitesttel kezeltük. A metszeteket (n=5) PBS-el háromszor átmostuk, normál nyúl szérummal blokkoltuk és monoklonális egér α-szarkomerin-aktinhoz specifikusan kötődő antitesttel inkubáltuk, majd nyulból származó TRITC-konjugált anti-egér IgG-al festettük (200:1).

Az endothel sejtek apoptózisának mérése

Az endothel sejtekben az apoptózis detektálásához készített metszeteket először TUNEL módszer szerint festettük. Ezután a mintákat először nyúl poliklonális anti-von Willebrand faktorról, mint elsődleges antitesttel, majd TRITC-konjugált kecske eredetű anti-nyúl IgG-al, mint másodlagos antitesttel inkubáltuk. A fluoreszcens festést konfokális lézer mikroszkóppal jelenítettük meg. A jellegzetes képek jól mutatják a von Willebrand pozitív endothel sejteket (a citoszól élénkpirosra festődött), melyek TUNEL festődést nem mutattak (a zöld festődés hiányzik a nucleusból) és a TUNEL pozitív sejteket egyaránt (1200x nagyítás).

A kaszpáz-3 aktivitás mérése immunhisztokémiai módszerrel

A metszeteket először biotinilált kecske anti-kaspáz-3 antitessel (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1:1000 higítás) inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. Ezt követően a metszetek 50 percig biotinilált nyúl antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA; USA) (1:100 higítás)

kezeltük, majd szobahőmérsékleten 4 órára avidin-biotinilált-peroxidáz komplexbe (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA; USA) (1:100 hígítás) helyeztük. A kísérleteket diaminobenzidin kromogén reakció zárta. A metszeteket minden antitestkezelés előtt 50 percre 10 % normál kecske szérumba helyeztük. Minden inkubálás folyamatos mozgatás közben zajlott, az antitesteket 10 mM foszfát pufferoldatban (PBS, pH 7.4) oldottuk, amely 0.1 % Triton X-100-at és 1 % normál nyúl szérumot (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tartalmazott.

Western blot analízis

A Clontech extrakciós oldatban oldott proteinhez (50 ill. 100 µg) egyenlő mennyiségű SDS puffert adtunk, majd 10 percig forrásban tartottuk. Ezután a fehérjéket 12 %-os SDS poliakrilamid gélen, „running” pufferben (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3) 200 V feszültség alatt szeparáltuk. Molekulasúly standardként Precision plus Protein Kaleidoscope standardet (10 µl) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) használtunk. A gél után 100 V feszültség alatt nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) vittük át „transzfer” pufferben (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 20 % (v/v) metanol, pH 8.3). Miután a membránt TBS-T-vel blokkoltuk ((50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl) és 0.1 % (v/v) Tween-20, valamint 5 % (w/v) non-fat dry milk), a blottokat a primer antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A membránokat a TBS-T-vel történő mosást követően 1 órán át a másodlagos antitesttel inkubáltuk (1:2000 hígítás TBS-T és 5 % (w/v) non-fat dry milk). Végül a blottokat ECL Detection Reagents 1 és 2 (Amersham Biosciences, NJ, USA) segítségével hívtuk elő és Kodak X-OMAT filmre exponáltuk.

Statisztikai analízis

Az ACTH 4-10 és a prekondicionálás hatásainak vizsgálata során a szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP), az infarktusos terület, valamint a Kaspáz-3 és HO-1 aktivitás értékeinek összehasonlításakor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Először „kétutas” variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk, van-e eltérés a különböző csoportok adatai között. Az észlelt különbségeket ezután Bonferroni-teszttel vizsgáltuk. A VF és a VT nem parametrikus eloszlást követ, ezért ezen paraméterek összehasonlításakor khí-négyzet tesztet alkalmaztunk a kezelt és a kezeletlen (kontroll) csoportok összehasonlításakor. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $p < 0,05$.

A lipid raftok vizsgálata során a szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP, LVdp/dt) az apoptotikus kardiomiocitaszám, az infarktusos terület, valamint a ceramid és szfingozin-1-

foszfát értékeinek összehasonlításakor szintén a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Majd Bonferroni-tesztel kiegészített variancia analízisnek vetettük alá a kapott adatokat a szignifikancia elemzésére.

A Makhana esetében a szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP, LVdp/dt) és az infarktusos terület értékeinek összehasonlításakor is a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. A gyógyszerrel kezelt csoportok értékeit a kezeletlen csoportéval Bonferroni korrekcióval kiegészített módosított t-tesztel hasonlítottuk össze.

Eredmények

I. Prekondicionálás hatása az infarktusos terület nagyságára

A kontroll (C) állatok szíveinek közel 40 %-a infarktust mutatott 30 perc iszkémia és az azt követő 120 perc reperfúziót követően. A PC ciklusainak számától függően, az infarktusos terület nagysága fokozatosan csökkent. Az egészséges, nem-hiperkoleszterinémiás állatok szíveinek tehát előnyös volt a PC, hiszen a 3XPC és a 4XPC szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét. A hiperkoleszterinémiás állatokon (HC) elvégezve a kísérletet azt tapasztaltuk, hogy a prekondicionálás ciklusszámától függően az infarktusos terület mérete növekedett. A HC-ás csoportban tehát a remélt protektív hatás elmaradt. Vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy míg a PC a nem-hiperkoleszterinémiás szíveken (C) jótékony hatásának bizonyult, addig a beteg (HC) szíveken szignifikáns módon növelte az infarktusos terület nagyságát.

II. A lipid raftok szerepe

1.) Az I/R és a PC hatásai a ceramid és szfingozin-1-foszfát felhalmozódásra a caveolákban

A ceramid és a szfingozin-1-foszfát mennyiségét mértük az izolált caveolin frakcióban. Jelentős mennyiségű ceramid kapcsolódott a caveolákhoz az I/R után. Szignifikánsan (kb. 3-szor) kevesebb ceramid található a caveolae frakcióban, ha a szívet előzőleg prekondicionáltuk. A prekondicionálásnak alávetett szívekben a ceramid mennyiségének csökkenése együtt járt a szfingozin-1-foszfát tartalom növekedésével. Ebből arra következtethettünk, hogy a PC triggereli a ceramid lebontását és ezáltal növeli a szfingozin-1-foszfát felhalmozódását a caveolákban. Az előzetesen desipramine-nal perfundált szívekben a szfingozin-1-foszfát felhalmozódása nem volt kimutatható.

2.) Az I/R és a PC hatásai az eNOS és caveolin-1 kapcsolódására

A caveolin-1 elleni antitesttel immunprecipitált frakció eNOS expressziójának Western blot analízise kimutatta, hogy az eNOS fokozott mértékben kapcsolódik a caveolin-1-hez I/R során. A kapcsolódás mértéke jelentősen csökkent (mintegy tizedére), ha a szíveket előzőleg prekondíciónak vetettük alá. Ez az eredmény arra utal, hogy a PC fokozza az eNOS felszabadulását a caveolákból. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor gátoltuk a ceramid képződést desipramine előzetes perfúziójával, amelyet a pufferben oldottunk fel.

3.) A PC kardioprotektív hatásai

Az I/R jelentős szövetkárosodást hozott létre, ami nagy kiterjedésű infarktusos területben (37.6 ± 2.4 %) és fokozott mértékű kardiomiocita apoptózisban nyilvánul meg (24 ± 1 %). Mind a desipramine, mind a PC csökkentette a szövetkárosodást, amit a kisebb mértékű infarktusos terület (PC: 20.7 ± 1.9 %; desipramine: 25.6 ± 2 %) és apoptózis (PC: 3.1 ± 0.5 %; desipramine: 5.6 ± 0.9 %) bizonyít.

4.) Szívfunkciós paraméterek

Sem a szívfrekvencia, sem pedig a koronária átáramlás értékei nem mutattak jelentős változást az egyes csoportok adatait vizsgálva.

Az aorta kiáramlás, a bal kamrai nyomás és annak deriváltja minden csoportban csökkent a reperfúzió folyamán. Azonban a csökkenés mértéke szignifikánsan kisebb volt a PC csoportban a reperfúzió 60. és 120. percében. Az I/R okozta szívizom károsodás mértéke desipramine hatására kissé csökkent.

III. A Makhana hatásai

1.) Szabadgyök-fogó tulajdonság

A szabadgyök-fogó tulajdonságot a szuperoxid dizmutázhoz (SOD), a hidroxil szabadgyök megkötő képességet a dimetil tioureához (DMTU) viszonyítottuk, melyeknek kapacitását 100 %-nak vettük. A Makhana kivonat két különböző koncentrációban került alkalmazásra. A 0.005 % koncentrációban a vizes kivonat 39 %-al, az alkoholos kivonat 52 %-al csökkentette a szuperoxid-anion mennyiségét. A 0.01 % koncentrációban pedig a vizes kivonat 93 %-al, az alkoholos kivonat 100 %-al csökkentette a szuperoxid-anion mennyiségét. A 0.005 % koncentrációnál a vizes kivonat 60 %-kal, az alkoholos kivonat 63 %-al

csökkentette a hidroxil-szabadgyök mennyiségét. A 0.01 % koncentrációnál pedig, mind a vizes kivonat, mind pedig az alkoholos kivonat közel 100 %-al csökkentette a hidroxil-szabadgyök képződését.

2.) A Makhana hatása a szívfunkciókra

2/a. Akut modell

Az akut modellben a szíveket a Makhana kivonat három különböző dózisé (50 µg/ml; 125 µg/ml és 250 µg/ml) oldatával perfundáltuk. Az alapértékeket tekintetve nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Nem volt jelentős különbség a koronária átfolyás értékekben sem a kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz képest a reperfúzió folyamán.

A Makhana kardioprotektív hatását bizonyítja az aorta kiáramlás figyelemreméltó változása az iszkémiát követő reperfúzió 60. perce után. Az aorta kiáramlás az alkalmazott magasabb dózisok esetében (125 µg/ml és 250 µg/ml) szignifikánsan magasabb volt a reperfúzió 60. és 120. percében.

Az LVDP és LVdp/dt paraméterek mindkét fent említett koncentrációnál a reperfúzió 120. percében mutattak szignifikáns javulást.

2/b. Krónikus modell

A krónikus modellben az állatokat 21 napon keresztül két különböző dózissal (250 mg/kg/nap és 500 mg/kg/nap) kezeltük perorálisan, gyomorszondán keresztül. Ahogyan az akut modell esetében, ebben a modellben sem volt különbség az alapértékek közt négy csoportban, nem volt jelentős különbség az iszkémiát követően a koronária átfolyás értékekben sem a két kezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A Makhana kardioprotektív hatása a reperfúzió végén figyelhető meg, amely azt mutatja, hogy a szívfunkciók felépülése folyamatosan és lassan következik be. Az aorta kiáramlás szignifikánsan javult a reperfúzió 60. és 120. percében mindkét dózis alkalmazásakor. A bal kamrai nyomás a reperfúzió 120. percében javult, de csak a magasabb, 500 mg/kg dózis esetében. Az 500 mg/kg dózis a reperfúzió 120. percében javította az $LV_{max}dp/dt$ értékét is.

3.) A Makhana hatása az infarktusos terület nagyságára

Az infarktusos terület nagysága csökkent mind az akut, mind a krónikus modell kezelt csoportjaiban a kontrollhoz viszonyítva (35.6 ± 0.7 ill. 35 ± 1.9 %). Az akut modellben mind a 125 µg/ml (30 ± 1 %), mind az 250 µg/ml dózis (29.1 ± 0.4 %) csökkentette az infarktusos terület nagyságát. Bár a 25 µg/ml dózis is befolyásolta az infarktusos terület mértékét, de a

változás nem volt szignifikáns. A krónikus modellben mindkét alkalmazott dózis (50 mg/kg: 27.5 ± 1.3 %; 250 mg/kg: 24.9 ± 0.4 %) szignifikánsan csökkentette az infarktusos területet a kontroll csoporthoz viszonyítva.

4.) Antibody array és Western blot analízis

A Makhanával kezelt szívszövetekben nagyobb mennyiségben expresszáldó proteinek vizsgáltunk közismert adatbázisok (SwissProt, LocusLink) segítségével és két, a kardioprotektív hatás kialakulásában fontos szerepet játszó proteint vetettünk alá megerősítő bizonyítékul Western blot analízisnek. Az antibody array analízissel kimutattuk a TRP32 enzim „up”regulációját a jelintenzitás „scatter” plotja alapján.

A Western blot vizsgálatok alapján a TRP32 enzim aktivitása 2.8-szer, a TRX1-é pedig 4.5-szer volt nagyobb a kezelt szívekben a kontroll értékhez viszonyítva.

IV. Az ACTH 4-10 hatásai

1.) Az ACTH (4-10) hatása a kamrai aritmiára

A reperfúzió indukálta kamrafibrilláció előfordulása az 50 µg/ttkg dózis esetében 90 %-ra, a 200 µg/ttkg dózis esetében pedig 40 %-ra csökkent a kezeletlen kontroll csoportban előforduló 100 %-os értékhez képest.

A kamrai tachycardia előfordulását az 50 µg/ttkg dózis nem, a 200 µg/ttkg dózis viszont 50 %-kal csökkentette. Jelen adataink arra engednek következtetni, hogy az ACTH (4-10) nagyobb dózisban alkalmazva fejt ki a VT és a VF előfordulását csökkentő hatását, habár a protektív hatás kevésbé kifejezett, mint az az α-MSH (ACTH 1-13) esetében tapasztalható volt.

2.) Az ACTH (4-10) hatása a szívfunkciókra

Általában véve az ACTH (4-10) előkezelés hatására a posztisztkémiás szívfunkciók javulást mutattak a kezeletlen kontroll csoport értékeihez képest. Ez a VT és VF előfordulást csökkentő tulajdonságra vezethető vissza. Érdekes módon a szívfrekvenciára az ACTH (4-10) egyik alkalmazott dózisa sem fejtett ki jelentős hatást.

Az aorta kiáramlás a 200 µg/ttkg dózis alkalmazásakor jelentős mértékben javult a reperfúzió 60. és 120. percében egyaránt (AF: 34.3 ± 2 ml/perc ill. 24.75 ± 1.8 ml/perc) a kontroll csoporthoz képest (25 ± 1.4 ml/perc ill. 6.5 ± 0.9 ml/perc). Az alkalmazott kisebb dózissnál (50 µg/ttkg) szignifikáns javulást nem tapasztaltunk.

A koronária átáramlást és a bal kamrai nyomást tekintve szintén a 200 µg/ttkg dózis bizonyult hatékonyabbnak. Bár a fent említett tényezők csak a reperfúzió 120. percében javultak jelentős mértékben (CF: 20.7 ± 1.3 ml/perc, LVDP: 13.65 ± 0.7 kPa) a kezeletlen csoporthoz viszonyítva (CF: 18.3 ± 0.9 ml/perc, LVDP: 9.97 ± 0.7 kPa).

3.) Az ACTH (4-10) hatása az infarktusos terület nagyságára

A 35. ábrán látható, hogy az infarktusos terület nagysága 35.3 ± 6 % volt a kontroll csoportban. A 200 µg/ttkg ACTH (4-10)-el kezelt szívek esetében ez az érték 20.16 ± 1.5 % volt, ami jelentős mértékű csökkenés. A kisebb, 50 µg/ttkg dózis esetében szignifikáns javulás nem volt észlelhető (33.0 ± 2.6 %).

4.) Az ACTH (4-10) hatása a kaszpáz-3 aktivitásra

Kaspáz-3 aktivitás csökkenést figyeltünk meg a kezelt szívekből kapott mintákban 30 perc iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően. Az immunoreaktív kaszpáz-3 főként a kardiomiociták és a kapillárisok simaizom sejtjeinek citoplazmájában figyelhető meg. A kaszpáz-3 aktivitás mértékét az egyes kezelt ill. kezeletlen szívekből származó mintákban. A kaszpáz-3 aktivitás csökkenését a kezelt szívekben a barna festődés intenzitásának csökkenése jelzi. A kaszpáz-3 aktivitás csökkenését Western blot analízissel is alátámasztottuk.

5.) Az ACTH (4-10) hatása a kardiomiociták és az endothel sejtek apoptózisára

Hasonlóan az infarktusos terület csökkenéséhez, az apoptotikus kardiomiociták száma is szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz (451 ± 49.6 apoptotikus sejtszám/100 egységnyi terület) viszonyítva, ha a szíveket előzetesen az ACTH (4-10) nagyobb, 200 µg/ttkg dóziséval kezeltük elő (266.25 ± 49.14 apoptotikus sejtszám/100 egységnyi terület). Az ACTH (4-10) kisebb dózisa (50 mg/ttkg) nem nyújtott szignifikáns védelmet.

Az endothel sejtek tekintetében hasonló irányú változás figyelhető meg. A kontroll csoportnál mért értékekhez képest (366.6 ± 31.3 apoptotikus sejtszám/100 egységnyi terület) az alkalmazott magasabb dózisban az ACTH (4-10) szignifikánsan csökkentette az apoptózis mértékét (257.5 ± 31.2 apoptotikus sejtszám/100 egységnyi terület).

6.) Az ACTH (4-10) hatása a kaszpáz-3 és a HO-1 expressziójára

Az iszkémia / reperfúzió indukálta kaszpáz-3 expresszió a nagyobb dózisé ACTH (4-10) előkezelés hatására csökkent. A Western blot analízis megerősítette a szemikvantitatív immunhisztokémiás vizsgálatok eredményeit. A továbbiakban vizsgáltuk az ACTH (4-10)

előkezelés hatásait a HO-1 szignálfolyamataira. A 40. ábra jól mutatja, hogy a 200 µg/ttkg dózisú előkezelés eredményeképp a HO-1 expresszió szignifikáns mértékben (kb. 1.8-szeresére) megnövekedett.

Diszkusszió

a.) Prekondicionálás hatása az infarktusos terület nagyságára

Már több évtizede vizsgálják a korai és késői prekondicionálás jelentőségét. Az igen nagyszámú tanulmány alapján elmondható, hogy a jelenség inkább összetett mechanizmusok interakciójából jön létre, mintsem, hogy egyetlen folyamat egyedül lenne felelős a kardioprotektív hatásokért. Az alábbiakban összefoglaljuk a legfontosabbakat, természetesen a teljesség igénye nélkül:

Az α -adrenoceptorok, a protein tirozin kinázok, a foszfolipáz D, a delta-opioid receptorok, a bradikinin, a prostanoidok és az angiotenzin receptorok szerepe mind igazolást nyert a prekondicionálás folyamatának kiváltásában és szabályzásában. Ezek mellett mégis a két legfontosabb szabályzó mechanizmusnak az ATP-szenzitív K^+ csatornák és az adenosin ill. az adenosin-receptorok működését tartják.

Kísérleteinknek nem volt alapvető célja a hatásmechanizmusok feltérképezése. Mivel a PC jelenségét túlnyomórészt csak egészséges szíveken tanulmányozták, ezért feladatunknak tekintettük inkább annak vizsgálatát, hogy a PC pozitív hatásai érvényesülnek-e előzőlegesen megbetegedett (hiperkoleszterinémiás) szíveken és képes-e csökkenteni az infarktusos terület nagyságát.

Ahhoz, hogy meghatározzuk a hiperkoleszterinémia befolyását a PC előnyös hatásaira, az infarktusos területek nagyságát hasonlítottuk össze azonos korú, hiperkoleszterinémiás és nem-hiperkoleszterinémiás nyulak izolált szíveiben 30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió után. Eredményeink jól mutatják, hogy a PC hatására az infarktusos területek nagysága a hiperkoleszterinémiás csoportban a ciklusok számától függően szignifikánsan megnőtt. A hiperkoleszterinémia előrehaladtával, 8 hét után szívelégtelenség jelei alakultak ki még az I/R-t és a PC-t megelőzően.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a hiperlipidémia és/vagy hiperkoleszterinémia károsan befolyásolja a PC hatásait, bár a folyamat pontos okát még nem ismerjük. Úgy tűnik, hogy a szérum/membrán lipidek akkumulációja és redistribúciója illetve a mitokondriális és a szarkolemma membrán mikroviszkozitásának megváltozása

inkább felelősek, mint a szérum magas lipoprotein szintje és az ateroszklerózis, mert a miociták morfológiája már tíz napos koleszterindús diéta esetén is változást mutatott.

Összefoglalva, eredményeink rámutattak, hogy a folyamatosan fennálló hiperlipidémia megszünteti a PC kardioprotektív hatásait az I/R során, valamint, hogy a PC csak az egészséges szívszövetet képes megvédeni az iszkémia/reperfúzió szövetkárosító hatásaitól.

b.) A lipid raftok szerepe

Kísérleteink kimutatták, hogy I/R hatására jelentős mennyiségű ceramid halmozódik fel a caveolinban gazdag membránban. A megnövekedett mennyiségű eNOS pedig asszociálódik a Caveolin-1-el. A PC hatására a ceramid mennyisége csökken, míg metabolitja, a szfingozin-1-foszfát felhalmozódik. A caveolin-1-hez kapcsolódott eNOS mennyisége csökken, ha a szívet előzőleg PC-nak vetettük alá. Ha a ceramid képződést desipramine-al gátoljuk, az előzőekhez hasonlóan a ceramid mennyiségének és az eNOS-Caveolin-1 kapcsolódás csökkenését figyelhetjük meg, de a szfingozin-1-foszfát felhalmozódása nélkül. Mind a PC, mind pedig a desipramine hatására javult a szívfunkció, csökkent az infarktusos terület nagysága és a kardiomiocita apoptózis mértéke. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az I/R hatására emelkedik ugyan az eNOS mennyisége, de a Caveolin-1-hez való kapcsolódás miatt, ez a szív számára nem jelent hasznot. A PC során csökken az eNOS-Caveolin-1 kapcsolódás és nő a szabad eNOS mennyisége, ezáltal pedig NO szabadulhat fel.

A NO szerepe az I/R során már régóta vitatott kérdés. Annak ellenére, hogy a NO mennyisége nő I/R során, az exogén NO kardioprotektív hatása bizonyított. Ez azzal magyarázható, hogy a NO felszabadulás a reperfúzió során csökken. Jelen eredményeink magyarázatot adhatnak a NO paradox viselkedésére. Kísérleteink rámutattak arra, hogy a I/R hatására felszabaduló NO-t a miokardium nem képes hasznosítani, mert az eNOS asszociálódik a Caveolin-1-el. Úgy tűnik, hogy a PC, legalábbis részben, triggereli az eNOS felszabadulását, ezáltal a felszabadult NO elérhetővé válik a szívszövet számára a reperfúzió során.

A miociták membránjában elhelyezkedő szfingomielin az I/R során lebomlik és ceramid valamint szfingozin képződik. Az előbbi szerepet játszik az I/R okozta szívizomkárosodásban. A szfingomielin hidrolízisét a szfingomielinázok katalizálják, amelyek hidrolizálják a foszfodiészter kötést. Ennek révén ceramid és foszfokolin keletkezik. Jelen tanulmány arra is rámutatott, hogy a ceramidképződés fokozódott a reperfúzió során az iszkémiás szívszövetben. Nemrég bizonyították a desipramine kardioprotektív hatását,

amelyet a ceramid képződés gátlása révén fejt ki. Normál körülmények közt a ceramid gyorsan metabolizálódik és szfingozin, majd szfingozin-1-foszfát keletkezik. Ez utóbbi szintén rendelkezik kardioprotektív hatással. A szfingozin-1-foszfát „túlélő szignált” közvetít a PI-3 kináz, az Akt és a Bcl-2 aktiválásával. A szfingomielin metabolizmusának folyamatát követve könnyű belátni, hogy a ceramid felhalmozódása a szfingozin-1-foszfát csökkenését vonja maga után, ami I/R során általánosan előforduló jelenség.

Korábbi kísérletekben rámutattak arra, hogy az I/R együtt jár a foszfolipidek metabolizmusával és a foszfoinozítid válasz létrejöttével. Jelen vizsgálataink megerősítették megállapításainkat, valamint rámutattak arra, hogy a szfingomielin lebomlás a caveolákban megfigyelhető ceramid felhalmozódást eredményez. A proapoptotikus tulajdonsággal bíró ceramid funkciózavarokat indukál az iszkémiás szívben. Mára bizonyítást nyert, hogy a szfingomielin metabolizmusa során keletkező anyagok fontos szerepet játszanak a programozott sejthalál folyamatában.

A kísérletek során az iszkémiát követően a szívfunkciós paraméterek romlottak, ahogyan az várható volt. A romlás hátterében a kontraktilitás csökkenése és a sejtpusztulás áll. Mind a desipramine, mind a PC javított a funkciós paramétereken. Fontos megemlíteni azonban, hogy bár a desipramine és a PC rendelkezik kardioprotektív tulajdonsággal, ez irányú hatásmechanizmusaik eltérnek egymástól. A desipramine csökkenti a ceramid képződését, ami valószínűleg hatással van a lipid raftok képződésére. A PC pedig stimulálja a ceramid lebomlását, ami a kardioprotektív hatással bíró szfingozin-1-foszfát képződését eredményezi. A szfingozin-1-foszfát a szfingozin kináz enzim közreműködésével szfingozin foszforilálódásával jön létre, ami pedig a ceramid metabolitja. A szfingozin-1-foszfát a ceramidtól eltérően túlélő szignált közvetít és védi a sejteket a ceramid mediálta apoptózissal szemben.

Mind a PC, mind pedig a desipramine gátolja az eNOS kapcsolódását a Caveolin-1-el. Nemrég rámutattak arra, hogy a ceramid a lipid raftokon belül lokalizálódik (69). Egy másik publikáció pedig beszámol arról, hogy a raft mikrodomainekben a stressz indukálta változások módosítják a tirozin kináz receptor szignál transzdukciós folyamatait, azáltal, hogy a ceramid modulálja a Caveolin-1 működését. Jelen kísérleteink azt a nézetet is alátámasztják, hogy a ceramid-caveolin-1 interakció a lipid raft membránján belül történik.

c.) A Makhana kezelés hatásai

Kísérleteinknek több említésre méltó eredménye van. Először is, a Makhana akár akut módon alkalmazzuk az izolált szívek közvetlen perfúziójával, akár krónikusan - amikor a

kísérleti állatokat 21 napon át perorálisan kezeltük - rendelkezik kardioprotektív hatással, amit a magasabb posztiszkémiás szívfunkciós adatok és az infarktusos terület csökkenése támaszt alá. A Makhana kivonat dóziszfüggő módon kötötte meg a szuperoxid anionokat és a hidroxil gyököket. Fontos továbbá megemlíteni, hogy két, a redoxreguláció folyamataiban fontos protein (TRP32, TRX1) is indukálódott a kezelt szívekben.

Mivel az oxidatív szabadgyökök nagymértékű termelődése és az antioxidáns tartalékok csökkenése kulcsszerepet játszik az iszkémia/reperfúzió okozta szívizom károsodások patofiziológiájában, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a Makhana ellenállóbbá teszi-e a szívet az iszkémia/reperfúzió okozta szívizom károsodásokkal szemben. Az eredményeink rámutattak arra, hogy a Makhana mind akutan, az iszkémiás történés előtt adva, mind krónikusan, perorális előkezeléssel, javította a posztiszkémiás kamrai felépülést és csökkentette az infarktusos terület nagyságát. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a Makhana már extrém kis koncentrációban (0.005 %) képes megkötni a szuperoxid anionok és a OH⁻ szabadgyökök csaknem 100 %-át.

Számos közlemény foglalkozik olyan redox proteinek kardioprotektív szerepével, mint az ubikviter thioredoxin. Egy nemrégiben megjelent tanulmányban leírták a TRX1 protein szintjének jelentős csökkenését iszkémiás szívizomban. Ha a szív prekonkondicionálással adaptálódik az iszkémiás stresszhez, a TRX1 expressziója megnövekszik. Az expresszió gátlása csökkent posztiszkémiás kamrai felépülést és megnövekedett infarktusos területet eredményez a prekonkondicionált szívben. Ezt a tényt alátámasztja, hogy a TRX1 enzimet overexpresszáló egérszívek ellenállóbbak voltak az iszkémia/reperfúzió okozta károsodásokkal szemben a vad típusú szívekhez viszonyítva.

Az emlős sejtekben ugyancsak ubikviter TRP32, egy 32 kDA nagyságú, az N-terminális végen TRX domainnel rendelkező protein. Az enzim funkciója még nem teljesen feltárt, de valószínűleg a citoplazmában levő fehérjék és transzkripciós faktorok redox regulációjában játszik szerepet. A DNS-kötő transzkripciós faktor NFκB például tiol-redox szabályzás alatt áll és a TRP32 fokozza az NFκB p50-es alegységének DNS-kötő és transzkripciós aktivitását. Az NFκB pedig szerepet játszik a miokardium iszkémiához való adaptációjának folyamatában.

d.) Az ACTH (4-10) hatásai

Az iszkémiát követő reperfúzió kétségkívül előfeltétele az érintett sejtek túlélésének, de nem zajlik minden káros következmény nélkül. A reperfúziós folyamat egyes komponensei átmenetileg megnövelhetik a kamrai aritmiák előfordulásának valószínűségét, amelyek a

szívfunkciós paraméterek romlását eredményezik. Mindezek ismeretében alapvető fontosságúnak látszik a szívszövet védelme az iszkémia/reperfúzió nyomán létrejövő károsodásokkal szemben. Az utóbbi években számos faktorról derült ki, hogy fontos szerepet játszik az I/R folyamatában, ezen faktorok egymáshoz való viszonyáról azonban számos esetben vitatott és ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre.

Előzőleg már bizonyítást nyert, hogy bizonyos melanocortinok (pl. α -MSH) képesek pozitívan befolyásolni a miokardiális iszkémia káros következményeit. Kísérleteinkben azt kívántuk tanulmányozni, hogy az α -MSH egy kisebb fragmentumával, az ACTH (4-10)-el történő előkezelés védelmet nyújt-e a szívszövet számára az I/R káros hatásaival szemben. Ennek érdekében vizsgáltuk, hogy az ACTH (4-10) javítja-e a posztiszkémiás szív funkcióit, csökkenti-e a reperfúzió során kialakuló kamrai fibrilláció és tachycardia előfordulását, csökkenti-e az infarktusos terület nagyságát, csökkenteni képes-e a szívizom- és endothelsejtek apoptotikus pusztulását, valamint hatással van-e a kaspáz-3 aktivitására és a HO-1 enzim szignálfolyamataira. A melanocortinok ezirányú hatásainak mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, bár az utóbbi időben megjelentek publikációk, amelyek magyarázattal szolgálnak ezekre. Úgy tűnik, hogy az adrenocorticotrop hormonok protektív hatásai részben a szabad gyökök képződésének gátlására, részben pedig gyulladáscsökkentő tulajdonságaikra vezethető vissza. A gyulladáscsökkentő hatás a MCR-1 és MCR-3 receptorokhoz kapcsolódik. Továbbá a melanocortinok ezen hatása összefüggésbe hozható egyes gyulladások keltő citokinek (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF) csökkent termelődésével, valamint az IL-10 és IL-8 gyulladásgátló mediátorok fokozott termelődésével. A melanocortinok immunrendszerben betöltött szerepe rendkívül összetett és csak részben feltárt. Ismert például, hogy az exogén α -MSH gátolja a LPS indukálta TNF- α felszabadulását a vérben in vitro körülmények között. Ismert továbbá, hogy a POMC-t és derivátumait számos sejt – monocyták, melanocyták, endothel sejtek – termeli. Ezek alapján logikusnak tűnik feltételezni, hogy az α -MSH és más ACTH fragmentumok szerepet játszanak egyes gyulladások keltő mediátorok felszabadulásának csökkentésében a szívben és más szervekben egyaránt.

A miokardiumban kialakuló programozott sejthalál összefüggésbe hozható mind az I/R során létrejövő károsodással, mind pedig számos olyan extrém mértékű mechanikai igénybevétellel, amely fokozott kamrai terheléssel jár. Mind in vitro, mind in vivo körülmények között a hipoxia és az iszkémia aktiválni képesek a kardiomiocitákban és az endothel sejtekben a programozott sejthalált. Az apoptózis gyakran kialakul akut és krónikus szövetkárosodások folyamán, a folyamatért felelős szignáltranszdukciós lépések még nem teljesen ismertek. Az apoptózis molekuláris mechanizmusa meglehetősen bonyolult és

változatos, valamint igen sok faktorról feltételezhető, hogy fontos szerepet játszik az apoptotikus és a nekrotikus folyamatokban egyaránt. Egy korábbi kísérletben már bizonyítást nyert, hogy az α -MSH gátolni képes az apoptotikus sejtpusztulást. Jelen kísérleteinkben pedig a His-Phe-Arg-Trp „magot” ugyancsak tartalmazó ACTH (4-10) antiapoptotikus hatásait vizsgáltuk kardiomiocitákban és endothel sejtekben. A kaszpáz-3 szerepe a programozott sejthalál folyamatában ma már jól ismert. Ez a faktor a kaszpáz-9 hatására aktiválódik, amit viszont a citokró-m-c, a mitokondriumok vagy kaszpáz-8 aktivál. Továbbá a kaszpáz-3-at az alábbiak is aktiválják: a bcl-2 család, a bax, a TNF- α , a TNF- α receptor, a Fas/FasL valamint a jobb kamrai dysplasia és a végstádiumú szívszélhűdés. Nemrég publikálásra került, hogy specifikus inhibítorral gátolt kaszpáz aktivitás következtében csökken az infarktusos terület nagysága a patkányszívekben a koronária artéria lekötését követően, de az ok-okozati összefüggés a kaszpáz-3 aktivitás és a szívfunkciók között még nem teljesen tisztázott. Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy az ACTH (4-10) jótékony hatásai a kaszpáz-3 aktivitáscsökkentő tulajdonságra vezethetők vissza, ezáltal, vagy legalábbis részben emiatt, az apoptózis okozta sejtpusztulás is kisebb mértékű lesz. Ezt támasztják alá az immunhisztokémiai, TUNEL és Western blot vizsgálatok eredményei is.

Az apoptózis csökkenésének másik oka lehet a HO-1 protein fokozott expressziója. A HO-1 indukálása igen fontos védelmi tényezőnek tűnik az iszkémia/reperfundált szívizomban. A hemoxigenáz enzim szerepe jól ismert számos kórképben (I/R, hipertenzió, kardiomiopátia, szerv transzplantáció, endotoxémia, immunszuppresszió). Zou és mtsai kimutatták, hogy a reperfúzió első órájában történő α -MSH kezelés hatására nő a HO-1 expressziója bélszövet I/R modellben. A HO-1 antiapoptotikus hatásainak pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert. Egy lehetséges magyarázat lehet, hogy a bilirubin védelmet biztosít a kardiomiociták számára az oxidatív károsodásokkal szemben. Ezért vizsgáltuk azt, hogy az ACTH (4-10) előkezelés hatással van-e a HO-1 működésére kísérleti modellünkben. Eredményeink rámutattak arra, hogy az előkezelés hatására növekszik a HO-1 expresszió a szívszövetben, amely egy alapvető mechanizmusa lehet az ACTH (4-10) kardioprotektív hatásának.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

1. **Der P**, Cui J, Das DK. (2006) Role of lipid rafts in ceramide and nitric oxide signaling in ischemic and preconditioned hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40(2), 313-20 **IF: 4.859**
2. Juhasz B, **Der P**, Szodoray P, Gesztelyi R, Lekli I, Bak I, Antal M, Maulik N, Tosaki A, Vecsernyes M. (2007) Adrenocorticotrophic hormone fragment (4-10) attenuates the iszkémia/reperfúzió induced injury in isolated rat hearts. *Antioxid. Redox Signal.* 9(11) 1851-1861 **IF: 4.491**
3. Das S, **Der P**, Raychaudhuri U, Maulik N, Das DK (2006) The effect of Euryale ferox (makhana), an herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusión injury. *Mol. Cell. Biochem.* 289(1-2), 55-63 **IF: 1.862**
4. Juhasz B, **Der P**, Turoczi T, Bacsakay I, Varga E, Tosaki A. (2004) Preconditioning in Intact and Previously Diseased Myocardium: Laboratory or Clinical Dilemma? *Antioxid. Redox Signal.* 6, 325-333. **IF: 3.763**

Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

1. Karsai D, Zsuga J, Juhasz B, **Der P**, Szentmiklosi AJ, Tosaki A, Gesztelyi R. (2006) Effect of nucleoside transport blockade on the interstitial adenosine level characterized by a novel method in guinea pig atria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47(1) 103-9 **IF: 1.576**
2. Gesztelyi R, Zsuga J, Juhasz B, **Der P**, Vecsernyes M, Jozsef Szentmiklosi A. (2004) Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull. Math. Biol.* 5, 1439-53 **IF: 1.485**
3. Bak I, Szendrei L, Turoczi T, Papp G, Joo F, Das DK, De Leiris J, **Der P**, Juhasz B, Varga E, Bacsakay 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: 7.172**
4. Vecsernyes M, Juhasz B, **Der P**, Kocsan R, Feher P, Bacsakay I, Kovacs P, Tosaki A. (2003) The administration of α -melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 177-83. **IF: 2.352**