

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A szívizom iszkémiás/reperfúziós károsodásai: a kamrafibrilláció lehetséges molekuláris mechanizmusai

Írta:

Szendrei Levente

2004

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

A szívizom iszkémiás/reperfúziós károsodásai: a kamrafibrilláció lehetséges molekuláris mechanizmusai

Írta:

Szendrei Levente

2004

Témavezető: Dr. Tóski Árpád

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

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

Bevezetés

A szívbetegségek, és a szívsebészeti beavatkozások a szívizom iszkémiás állapotát eredményezik. Az iszkémiás szövet vér- oxigén- és anyagcsere-ellátásának helyreállása, így a szívizom reoxigenizációja számos szöveti károsodást okoz, melyeket az irodalomban reperfüzió-indukálta károsodásokként ismerünk. A reperfüzió okozta károsodások különböző formákban, pl. kamrai arrhythmiaokban vagy a szívfunkciók romlásában nyilvánulnak meg. A reperfüzió-indukálta arrhythmia és a szív pumpafunkciójának károsodása minden eddig vizsgált állatkísérletes modellen kialakul, továbbá azok megjelenése az emberen végzett orvosi beavatkozások során is megfigyelhető (pl., szívműtétek, trombolízis). A reperfüzió-indukálta arrhythmia gyakran szívsebészeti műtétek alatt jelennek meg vagy trombolitikus terápia folyamán, de számos esetben előfordulnak a koronáriák görcsének (angina) oldódása folyamán is.

Az I-es és II-es típusú diabetes előrehaladta folyamán egyaránt szoros kapcsolatban van a kardiovaszkuláris komplikációk kialakulásával, mint pl. koronária artéria szűkület létrejöttével valamint a diabetikus cardiomiopátia kifejlődésével. A postmiokardiális infarktus prognózisa szintén rosszabb diabéteszes betegekben, akiknél magasabb az előfordulása a szívelégtelenségnek és a hirtelen szívhalálnak, összehasonlítva a nem diabéteszes egyénekkel. A diabéteszes miokardiumban, molekuláris szinten, a sarcolemmális ion transzport különböző rendellenességei is tapasztalhatóak, többek között a $\text{Na}^+\text{-H}^+$ és a $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ cserefolyamatok működési zavara, valamint a Ca^{2+} és $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPáz-ok működésének különböző fokú gátlása. A sarcoplazmatikus retikulum funkciója is funkciókárosultnak tűnik a diabéteszes miokardiumban, mely csökkent ATP szintézisen és elektron transzfer lánc aktivitáson keresztül csökkent ATP függő Ca^{2+} transzportban és Ca^{2+} szabályozta ATPáz aktivitásban nyilvánul meg. Ebből eredően bizonyos mitokondriális gének [pl. citokróm oxidáz B III alegység (COXBIII), és az ATPáz 6 alegység (ATPS6)] expressziója hatással lehet különböző ioncsatornák és ionpumpák működésére, így központi szerepet játszhat az arrhythmogenezisben, a szívfunkciók zavarában az iszkémiás/reperfundált szövetben. Közismert tény az, hogy az arrhythmia kialakulásáért többek között az ionháztartás felborulása, a rendellenes ionmozgások a felelősek.

A humán és más emlős sejtek, szövetek, szervek a csökkent oxigén ellátásra, tehát az iszkémiás állapotra, fiziológiailag fontos gének (melyek lehetnek a szervezetben már jelenlévő gének vagy „de novo” gének), proteinek, enzimek expressziójával válaszolnak. A közelmúltban egy új enzimrendszer került az iszkémia okozta szívizomkutatások előterébe: a Tenhunen és mtsai által azonosított mikroszómális hemoxigenáz (HO) (*J. Biol. Chem.* **244**:

6388-6394; 1969.), mely a hem oxidatív lebontását katalizálja. A folyamat során az enzim oxigén és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfiringyűrűjének α -metin hídját, amely így nyíltláncú biliverdinné alakul, s ekkor felszabadul a vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid (CO) keletkezik. A biliverdint a biliverdin reduktáz bilirubinná alakítja. A HO-nak három izoenzime ismeretes, a HO-1, a HO-2 és a HO-3, melyek különböző gének termékei. A HO-1 mely hsp (heat shock protein) 32 néven is ismert, indukálható forma és az emlős szervezet szinte minden sejtjében 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 az utóbbiról melynek aminosav szekvenciája ~ 90 %-ban azonos a HO-2-vel viszonylag keveset tudunk. Kevésbé aktív, mint a HO-2, szerepe még nem teljesen tisztázott. Az elmúlt néhány évben viszont jelentősen megnőtt azon közlemények száma melyek különböző biológiai funkciókat tulajdonítanak a HO katalizálta hem metabolizmus termékeinek. A porfiringyűrűből felszabaduló vas prooxidáns tulajdonságú, míg ezzel ellentétben a keletkező biliverdin, illetve redukált formája a bilirubin hatékony antioxidáns molekula. Egyre több bizonyíték van arra is, hogy a folyamat harmadik terméke a CO fiziológiai jelátvivő molekulaként funkcionálhat illetve, hogy képes a guanil-cikláz aktiválására, ezáltal a celluláris cGMP szint szabályozására (emelésére), hasonlóan a nitrogén oxidhoz, így szerepet játszhat egyaránt a fiziológiás és patológias értónus szabályozásában. Korábbi eredményeink arra elegendnek következtetni, hogy a kamrafibrilláció és az endogén CO termelés között szoros összefüggés van, bár ennek direkt bizonyítására további kísérletek elvégzése szükséges. Abban az esetben, ha a szív reperfüzió indukálta fibrillációt „túlélte”, a miokardiumban a HO-1 mRNS és protein expressziója, következés képen az endogén CO mennyisége jelentős mértékben csökkent. A HO-1 farmakológiai stimulálása viszont a miokardiumban emelkedett CO termeléséhez vezetett s ezzel párhuzamosan reperfüzió indukálta fibrilláció kialakulását nem regisztráltuk. Ezen eredményeink alapján feltételeztük, hogy a HO-1 „knock out” egyedek miokardiumának kamrafibrilláció iránti érzékenysége kapcsolatban lehet az enzim mRNS és protein expressziójával, az enzim aktivitással és az endogén CO termeléssel. Abban az esetben ha ez így van, úgy elmondhatjuk, hogy a HO-1 mRNS és proteinjének hiánya, ennek következtében pedig a csökkent endogén CO termelés központi szerepet tölthet be a reperfüzió indukálta kamrafibrilláció kialakulásában.

Célkitűzések

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

I. Vizsgálni kívántuk, hogy a diabetes hatással van vagy sem a szívizom reperfúzió indukálta károsodásokkal szembeni érzékenységre. Molekuláris biológiai technikák segítségével összehasonlítottuk (i) egyes mitokondriális gének (COXIII és ATP6, melyeket 40 gén közül, beleértve a mitokondriális gének alegységeit is, előzetes szűréssel választottunk ki) expresszióját, (ii) a kamrafibrilláció kialakulásában játszott lehetséges szerepüket, valamint (iii) a szívfunkciókra kifejtett hatásukat iszkémia/reperfúzió alátámasztott diabeteses és nem diabeteses szívizomban. Célkitűzéseink közé tartozott továbbá a vizsgált gének expressziójának tanulmányozása elektromos úton indukálta (nem iszkémia/reperfúzió okozta) fibrillációba hozott diabeteses és nem diabeteses szívizomban.

II. Kísérleteink második részében célul tűztük ki a hemoxigenáz-1 (HO-1) mRNS expresszióhoz kapcsolódó celluláris védekező mechanizmusok és az endogén szénmonoxid (CO) hatásának vizsgálatát reperfúzió során, fibrilláló és nem fibrilláló szívekben, melyeket HO-1 „vad” típusú (+/+) és „knock out” [heterozigóta (+/-) és homozigóta (-/-)] egerekből nyertünk. Meg kívántuk vizsgálni a HO-1 mRNS és protein expresszió, valamint a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO termelés hatását (i) a reperfúzió indukálta arrhythmia kialakulásának csökkentésére, (ii) az infarktusos terület nagyságára, (iii) a celluláris ionkoncentrációk változására, valamint (iv) a szívfunkciókra beleértve a szívfrekvencia, a koronária és aorta kiáramlás, és a bal kamrai nyomás mértékét.

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

Módszerek és anyagok

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

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

Diabétesz kiváltása:

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

Mért paraméterek:

HO-1 génexpresszió vizsgálata:

A kísérletek teljes időtartama folyamán komputeres regisztrációs berendezés segítségével regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el. Az EKG-kat analizáltuk, hogy meghatározzuk a kamrafibrilláció (VF) előfordulását. Kamrafibrillációnak tekintettük, ha az EKG-n rendellenes, irreguláris hullámozó jeleket találtunk különféle amplitúdoval. A szívet szinusz ritmusúnak tekintettük, ha az EKG-n szabályos ritmusban normál sinus komplexek jelentek meg (PQRST komplex létrejöttével). 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) regisztráltuk.

Mitokondriális génexpresszió vizsgálata:

A serum glükóz mennyiségét standard assay kit segítségével spektrofotometriás úton határoztuk meg. A kísérletek teljes periódusa alatt komputeres regisztrációs berendezés segítségével regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el. A reperfúzió indukálta VF előfordulása az általuk használt modell esetén elég nagy (~80-90 %) mind a diabéteszes, mind pedig a nem diabéteszes alanyok esetében. Ezért, 31 és 41 db szívre volt szükségünk külön-külön, hogy 6 db nem fibrilláló, diabéteszes és nem diabéteszes szív álljon rendelkezésre vizsgálatainkhoz. Azokat a szíveket melyek a reperfúzió során fibrilláltak tovább osztottuk két csoportra: (i) a reperfúzió indukálta VF kevesebb, mint 3 percig állt fenn, illetve (ii) több mint 10 percig tartott. Az első esetben a VF-t reverzibilisnek (a szív spontán visszatért a normál ritmusba) tekintettük, míg a másodikban irreverzibilisnek (a reperfúzió első 10 percében folyamatosan fennállt). Ha az utóbbi eset állt elő, 10 perc után a szíveket elektromosan defibrilláltuk (a szívfunkciós paraméterek meghatározása végett), majd a reperfúziót 110 percen keresztül tovább folytattuk. Patkányszívekben az iszkémia előtt és reperfúzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária átfolyás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP). Az egérszívek esetén ugyancsak a fenti paramétereket regisztráltuk azzal a különbséggel, hogy az aorta nyomást (AOP) és annak első deriváltját (AOPdp/dt) regisztráltuk az LVDP helyett.

Teljes RNS izolálás és Northern-blot:

A totál RNS izolációját patkány szív szövetből (100 mg) 1 ml TRIzol reagensben (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Germany) történő homogenizációval, guanidinium thiocianát módszerrel végeztük, a texthez mellékelt útmutató leírása alapján. Az RNS pelletet oldottuk 100 µl dietil-pirokarbonát vizes oldatában, s a koncentrációkat a 260 nm-en ultraibolya spektroszkópiával mért elnyelésből számoltuk ki.

A Northern blot hibridizációt és az RNS izolálását Chomczynski és Sacchi módszere szerint végeztük (*Anal. Biochem.* **162**: 156-159; 1987.). A bal kamrából (kb.80-100 mg szövet) preparált RNS-ből 5 µg totál RNS-t horizontális elektroforézisnek vetettünk alá formaldehid tartalmú 1% agaróz-géleken és transzferáltuk pozitív töltésű nylon membránra (GeneScreen Plus) 18 órás kapillaris átvitel elve alapján. Vákuumban 2 órán át 80 °C-ra történő melegítés után hibridizációt hajtottunk végre ³²P-vel jelölve (5 x 10⁶ cpm/filter) egy hibridizációs szekrényben a gyári előírásoknak megfelelően (QuickHyb, Stratagene, CA, USA). Az autoradiográfia és az automata radiometriás vizsgálat után a „housekeeping” gén

mRNS szintre vonatkozóan (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz) ismét hibridizációt hajtottunk végre, hiszen kontrollként ezen csoporthoz viszonyítottuk az expressziós változásokat.

Western-blot:

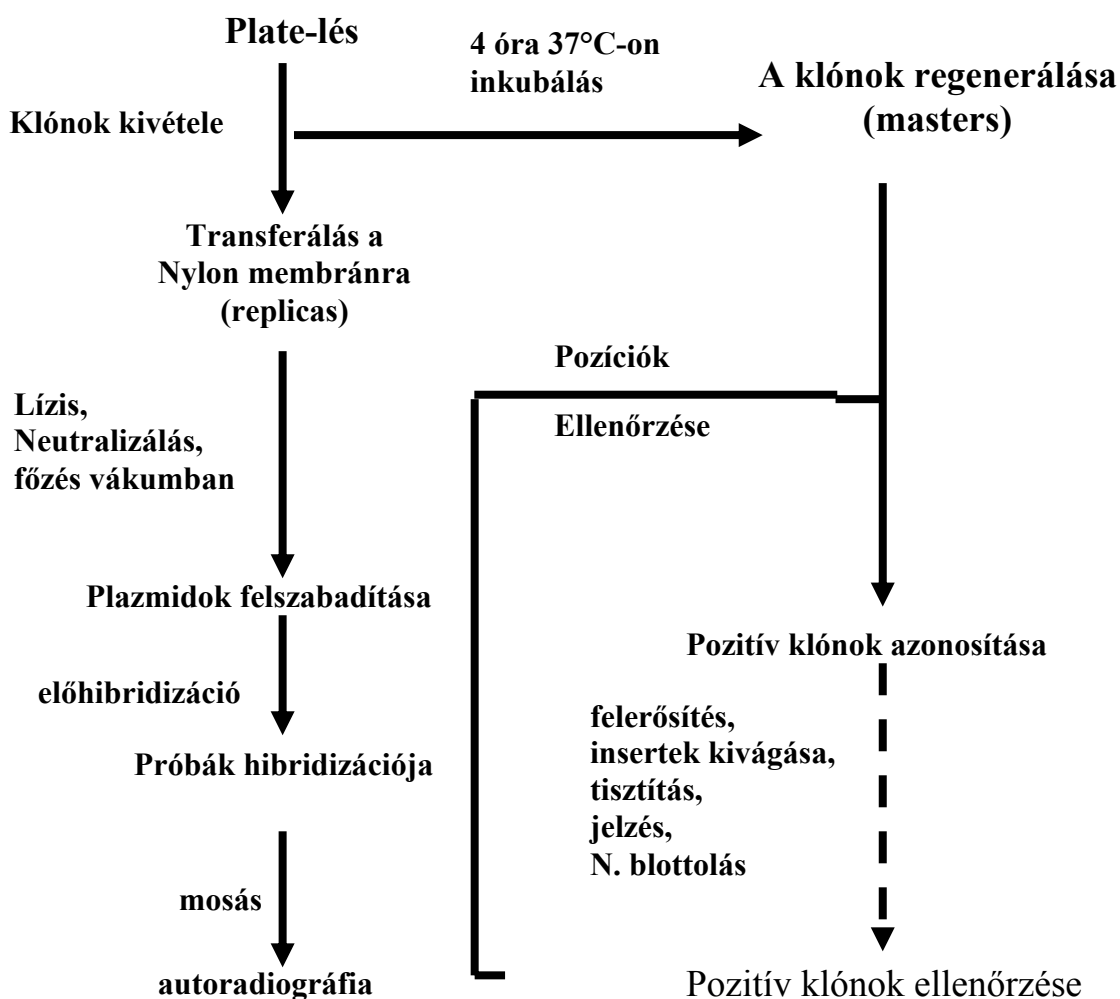
A mintákat homogenizáltuk Tris-HCl (13.2 mM/l), glicerín (5.5 %), SDS (0.44 %) és β -merkaptóetanol elegyében. Az oldható proteinek azonos mennyiségét (50 μ g) Tris-glicin-SDS-poliakrilamid gél (12%) elektroforézissel elválasztottuk és Western blot analízist végeztünk, ahogy azt Pellacani és mtsai leírták (*Circ. Res.* **83**: 396-403; 1998), rekombináns patkány HO-1 protein antitestet (1:1,000, Stressgen) használva. A relatív HO-1 protein expressziót denzitometriásan analizáltuk.

RT-PCR:

Ötven ng total RNS-t vagy pedig 20 ng mRNS-t tartalmazó mintát „amplification grade” DNáz I-el (Gibco-BRL) inkubáltuk, hogy az esetleges DNS szennyeződésekeltávolítsuk, majd random egyszálú cDNS szintézisnek vetettük alá, 0,1 μ g random 9-mer primerek (Stratagene) alkalmazásával. A mintákat, melyek 0,1 μ g kezdeti total RNS-t tartalmaztak, specifikus primerek segítségével, 12-26 ciklussal felerősítettünk optimalizált reakciókörülmények között AmpliTaq PCR kit segítségével. A primerek szekvenciája a következő volt: ATPáz 6, 312 bp: 5'-CGAACCTGAGCCCTAATA és 5'-GTA-GCTCCTCCGATTAGA; Citokróm Oxidáz III, 338 bp: 5'-CTTAGCATCAGGAGTCTC és 5'-TATCATGCTGCGGCTTCA. A fragmenseket 10 μ Ci [32 P] dCTP-el reakciónként megjelöltük. A be nem épült (nem inkorporálódott) nukleotidokat 3 %-os agaróz gélen elválasztottuk, a felerősített fargmensek radioaktivitását pedig folyadék szcincillációs detektorral detektáltuk.

cDNA klónok létrehozása és a mitokondriális gének analízisének folyamata:

Az alábbi ábra összefoglalja a legfontosabb lépéseket.



DNS szekvenálás és a gének azonosítása:

A Sanger és mtsai által kidolgozott (*Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5468; 1977.) dideoxi-mediálta láncszabító/lánclezáró módszert használtuk, szubsztrátként denaturált plazmid DNS-t (pUC 19 pSPORT 1 vector; Gibco-BRL) használtunk. Az M13/pUC „univerzális és a T7/T3α szekvenáláshoz használatos primereket és a Sequenase 2.0 kitet használtuk a ³⁵S-el jelölt reakciókban. A sávokat 47 cm-es 6 % poliakrilamid/urea géleken választottuk szét, kettős töltést alkalmazva (2,5 és 5 óra, 2000 V-on futtatva). A GenBank és az EMBL adatbázisokban a DNS szekvenciák közötti hasonlóság keresésében Pearson-Lipman algoritmust (*Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444-2448; 1982.) használtunk.

Az infarktusos terület meghatározása:

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

A szöveti CO tartalom meghatározása:

A CO tartalmat gázkromatográf segítségével határoztuk meg. A reperfüzió végén a szíveket eltávolítottuk a készülékről, majd négyszeres térfogatú 0.1 M foszfát-pufferben (pH:7.4) homogenizáltuk. A homogenizátumot 4 °C-on, 15 percig, 12800 x g-n centrifugáltuk, és az így kapott felülúszót használtuk a CO tartalom meghatározásához. A reakció elegy összetétele a következő volt: 150 µl 12800 g felülúszó, 60 µl NADPH (4.5 mM) és 50 µl 3.5/0.35 mM methemalbumin. A vak mintákba NADPH helyett 60 µl foszfát-puffert adtunk. A mintákat előinkubáltuk 5 percig 37 °C-on, majd a „headspace”-t oxigénnel 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 üvegcséből, 1000 µl headspace gázt injektáltunk a kolonnára. Az analízis 150 másodpercig tartott egy 200 cm hosszú, 0.3 mm belső átmérőjű rozsdamentes acél kolonnán. A csúcsokat integráltuk, a kapott eredményeket pedig önkényesen választott egységben fejeztük ki. A mérésekhez Molselect 5 Å töltött kolonnát használtunk. A kolonnatér hőmérséklete 30 °C volt.

A celluláris Na^+ , K^+ , és Ca^{2+} koncentrációk meghatározása:

A szíveket gyorsan, ionmentes, 100 mM/L trishidroxi-metil-amino-metánt és 200 mM/L szaharózt tartalmazó jéghideg pufferbe merítve 0-5 °C-ra lehűtöttük, hogy kimossuk az ionokat az extracelluláris térből, valamint, hogy meggátoljuk a membrán iontranszportért felelős enzimek aktivitását. Öt perces hideg pufferrel történő mosás az ionok több mint 90 %-t eltávolítja az extracelluláris térből. A mosási periódust követően a szíveket 48 órán keresztül 100 °C-on szárítottuk, majd 20 órán keresztül 550 °C-on tartva elhamvasztottuk. A hamut 5 ml 3 M salétromsavban felvettük, majd ionmentes vízzel 10 x hígítottuk. A miokardiális Na^+ tartalmat 330,3 nm-n, a K^+ mennyiségét 404,4 nm-n, míg a Ca^{2+} koncentrációt 422,7 nm-n mértük levegő-acetilén lángban, atomabszorpciós spektrofotométer segítségével.

HO-1 lokalizációjának meghatározása immunhisztokémiai módszerrel:

A vad típusú (+/+), heterozigóta (+/-) valamint homozigóta (-/-) HO-1 mutáns egerekből preparált szíveket formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyazást követően a bal kamrai szövetből 5 μm vastagságú metszeteket készítettünk poli-l-lizinnel bevont tárgylemezre (Sigma, St.Luis, USA). Deparaffinálást és rehidratálást követően az endogén peroxidáz aktivitást és a nem specifikus fehérjék kötődését 3% hidrogén-peroxidot tartalmazó normál kecske szérummal blokkoltuk. Ezt követően két órán keresztül inkubáltuk a mintákat tisztított, patkánymájából izolált HO-1-gyel és nyúlban termeltetett, poliklonális anti-HO-1 antitesttel (Stress Gen Biotech., Canada). A primer antitestet a gyártó utasításainak megfelelően, 1:750 arányban hígítottuk. Ezután PBS-sel alaposan mostuk, majd további fél órán át inkubáltuk a metszeteket, kecskében termeltetett, biotinnal jelölt, anti-nyúl IgG második antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), amit a gyártó utasításainak megfelelően, 1:200 arányban hígítottunk. Újabb alapos, PBS-sel történő mosást követően az immunreakciót peroxidáz enzimmal konjugált streptavidinnel (Zymed, USA) (30 perc) mutattuk ki. A színreakciót 3-amino-9-etilkarbazol szubsztráttal [0.1 M acetát pufferben (pH 5.2) készített oldat], a háttérfestést Gill's hematoxilinnel végeztük. A festődés intenzitásának növeléséhez néhány másodpercig 1% litium-karbonát oldatban inkubáltuk a mintákat. Ezt követően vízzel alaposan mostuk, majd fél órán keresztül 80°C-on tartottuk. A mikroszkópos vizsgálatokat Zeiss Axiolab mikroszkóppal végeztük, a felvételeket Zeiss Axiocam kamerával rögzítettük.

A kísérletek végrehajtásának folyamata:

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

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

Statisztika:

A szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP, AOP és AOPdp/dt), infarktusos terület, miokardiális elektrolit koncentrációk, valamint a szöveti CO tartalom értékeinek közlésekor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Először „egyutas” variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk, van-e különbség a különböző csoportok adatai között. Ha volt különbség, a vad típusú (+/+) csoportok értékeit a HO-1 heterozigóta (+/-) és homozigóta (-/-) csoportéval, illetve a diabéteszes csoport értékeit a nem diabéteszes csoportkéval a Bonferroni korrekcióval kiegészített kétmintás t-tesztel hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $*p < 0.05$.

Eredmények

I. „Subtractive screening”:

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

II. Az azonosított gének mRNA expressziója:

A COXBIII upregulációját tapasztaltuk már 30 perccel az iszkémia indukcióját ($p < 0.05$ a kontrollhoz viszonyítva) és 120 perc reperfúziót követően nem diabéteszes, nem fibrilláló szívekben ($p < 0.05$ a kontrollhoz viszonyítva). A COXBIII mRNA expresszió jelentős mértékű csökkenését tapasztaltuk reperfúzió során mind az irreverzibilis fibrilláló mind pedig a reverzibilis fibrilláló nem diabéteszes szívizomban ($p < 0.05$). A diabéteszes, iszkémia/reperfúzióknak kitett szívekben a COXBIII expressziója jelentős mértékben emelkedett összehasonlítva a diabéteszes aerob kontroll értékekkel ($p < 0.05$).

Az ATPS6 upregulációját szintén tapasztaltuk, azonban eltérően a COXBIII-tól ez nem volt statisztikailag szignifikáns 30 perc iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően a nem diabéteszes/nem fibrilláló szívizomban. A reperfúzió során irreverzibilis, illetve reverzibilis fibrilláción átesett szívek esetén az ATPS6 expresszió jelentős mértékű downregulációját tapasztaltuk. Az ATPS6 expresszió diabéteszes, iszkémia/reperfúzióknak alávetett szívekben hasonló mértékű volt, mint a nem diabéteszes/nem fibrilláló csoporté. Abban az esetben, ha a diabéteszes szív fibrillált a vizsgált gén expressziója nem volt detektálható.

A COXBIII expressziója 30 perc iszkémiát követően nőtt az aerob kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez a növekedés 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak alávetett nem fibrilláló szívizomban még jelentősebb mértékű volt. Továbbá, iszkémia/reperfúzióknak kitett fibrilláló szívizomban a COXBIII expresszió jelentős mértékű csökkenését figyeltük meg. Ugyanezt a csökkenést tapasztaltuk az elektromos úton fibrillációba hozott szívizom esetében. A COXBIII expresszió irányának változásai diabéteszes szívizomban teljes mértékben megegyeztek a nem diabéteszes csoportban tapasztaltakkal.

Az iszkémia/reperfúzió indukálta, illetve az elektromos úton kiváltott kamrafibrilláció jelentős mértékű intenzitás csökkenést eredményezett, mind a diabéteszes, mind pedig a nem diabéteszes csoportban. Mindkét vizsgált gén expressziója mefigyelhető iszkémiát követően,

mind a nem diabéteszes, mind pedig a diabéteszes szívizomban. Reperfúzió során a génexpresszió változása azonos volt a nem fibrilláló diabéteszes és nem diabéteszes csoportokban egyaránt. Azokban a nem diabéteszes szívekben, melyek a reperfúzió során fibrilláltak az ATP5B (8 ± 3 mRNS relatív mennyiség) és a COXIII (6 ± 1 mRNS relatív mennyiség) expresszióban jelentős csökkenést tapasztaltunk, a diabéteszes fibrilláló csoportban azonban a vizsgált gének nem voltak detektálhatóak RT-PCR segítségével.

III. Szívfunkciók, szérum glükóz tartalom:

A szívfunkciók közül az AF, valamint a LVDP, illetve a szérum glükóz koncentrációja csökkent a diabéteszes patkány szívizomban összehasonlítva az azonos korú nem diabéteszes csoporttal. A reperfúzió viszonylag gyenge szívfunkciókat eredményezett a nem diabéteszes nem fibrilláló szívizomban. Azon iszkémia/reperfúzióknak alávetett nem diabéteszes szívekben, melyekben az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodást reperfúzió indukálta kamrafibrilláció kialakulása tovább súlyosbította, a posztiszkémiás szívfunkciók további romlását figyeltük meg. Ez jól magyarázható azzal az ismert ténnyel, mely szerint a VF megjelenése szignifikáns mértékben tovább erősíti a reperfúzió-indukálta károsodásokat. Tehát, egy akut iszkémiás esemény melyhez kamrafibrilláció társul a posztiszkémiás szívfunkciók további romlását eredményezi.

Elektromosan fibrillációba hozott, nem diabéteszes és diabéteszes szívizomban egyaránt, a fibrilláció utáni szívfunkció értékei jobbak voltak, az iszkémia/reperfúzióknak kitett és fibrilláló szívek értékeihez viszonyítva. Ugyanez a tendencia volt megfigyelhető a diabéteszes, iszkémia/reperfúzióknak kitett, fibrilláló és nem fibrilláló szívekben, bár a szívfunkciók és a kontraktilitás jelentős mértékben rosszabbak voltak, mint az azonos korú nem diabéteszes csoporté.

IV. HO-1 „knock out” egerek:

HO-1 „knock out” homozigóta ($HO-1^{-/-}$) életképes egerek csak $HO-1^{+/-}$ (heterozigóta) anya és $HO-1^{+/-}$ (heterozigóta) apa, vagy heterozigóta anya és homozigóta apa pároztatásával jöhetnek létre. Ekkor a homozigóta egyedek születési %-a kb. 11%-20%. A $HO-1^{-/-}$ (homozigóta) egyedek pároztatása nem eredményez életképes almot, hiszen ezek az utódok már meg sem születnek. A kísérleteinkhez szükséges homozigóta HO-1 „knock out” egereket $HO-1^{+/-}$ heterozigóta és $HO-1^{-/-}$ homozigóta állatok egymással történő pároztatásával nyertük. Így 105 $HO-1^{+/-}$ és 13 $HO-1^{-/-}$ egeret kaptunk. A HO-1 génhiányos egyedek valamivel könnyebbek voltak (26 ± 3 g) a vad típusú (30 ± 4 g), illetve a heterozigóta (31 ± 3 g) azonos

korú alomtársaiktól, születéstől a kora felnőttkorig (12-13 hét), ezen kívül viszont teljesen megkülönböztethetetlenek voltak. Megfigyeltük továbbá, hogy 22 hetes korukra a HO-1^{-/-} állatok lesoványodtak, külső állapotuk romlott, valamint kevésbé aktívak voltak vad típusú, illetve a hetrozigóta egyedekhez képest. A HO-1^{-/-} állatok korai halálozása a 22. hét után általános volt, ezért kísérleteinkhez 16-20 hetes állatokat használtunk.

V. HO-1 jelenlétének igazolása aerob perfundált egér szívizomban:

Megvizsgáltuk az enzim mRNS és protein expresszió változását, valamint az enzim lokalizációját Northern blot, Western blot és immunhisztokémia segítségével. Aerob körülmények között perfundált HO-1^{+/+}, HO-1^{+/-} és HO-1^{-/-} egerek szívéből bal kamrai biopsziákat vettünk, majd immunhisztokémiát végeztünk. Húsz perc aerob perfúzió után átesett szívekből nyert mintákban homogén citoplazmatikus festődést tapasztaltunk a vad típusú, valamint a hetrozigóta miokardiumok esetén. HO-1^{-/-} szívizom felhasználása esetén nem tapasztaltunk festődést.

Ugyanez volt megfigyelhető a Northern blot technikával kapott eredményekben, vagyis a HO-1 mRNS 1,5 kb sávját detektáltuk, mind a ^{+/+}, mind pedig a ^{+/-} egyedek esetén, míg a ^{-/-} szívekből kapott mintákban nem volt detektálható a 1,5 kb sáv.

Western blot kísérleti analízis során az enzim proteinje detektálható volt a ^{+/+} és ^{+/-} szívekből származó minták esetén, míg a HO-1^{-/-} mintákban nem volt kimutatható a HO-1 protein.

VI. HO-1 expresszió vizsgálata iszkémia/reperfúciónak kitett egér szívizomban:

Kísérleteink során megvizsgáltuk a HO-1 protein expresszió változását fibrilláló és nem fibrilláló szívekben egyaránt, mindhárom típusú (^{+/+}; ^{+/-}; ^{-/-}) egerekből izolált és iszkémia/reperfúciónak kitett szívek esetében, immunhisztokémia és western blot alkalmazásával. Azokban az esetekben amikor a szív fibrillált az enzim expressziója jelentős mértékben csökkent a vad típusú ^{+/+} homozigóta és a ^{+/-} heterozigóta szívekben egyaránt, összehasonlítva nem fibrilláló szívizommal. A ^{-/-} homozigóta szívekben nem tudtuk detektálni az enzim expresszióját sem immunhisztokémia, sem pedig Western blot segítségével. Itt kell feltétlenül megjegyeznünk, hogy a HO-1 „knock out” állatokból izolált szívek minden esetben kamrafibrillációt mutattak reperfúzió során.

VII. Endogén CO tartalom meghatározása:

Húsz perc iszkémiának és 30, valamint 120 perc reperfúzióknak kitett vad típusú, valamint heterozigóta szívekben az endogén CO mennyisége jelentős mértékben nőtt az aerob kontrol értékekhez viszonyítva. HO-1^{-/-} egér miokardium esetén az endogén CO mennyisége nagyon alacsony volt, köszönhetően a HO-1 rendszer hiányának. Azokban a kísérletekben mikor a szív fibrilláción esett át nem tudtunk CO-t kimutatni.

VIII. Szívfunkciók, infarktusos terület és miokardiális Na⁺, K⁺, és Ca²⁺ tartalom:

Az iszkémia előtti szívfunkció értékei a HO-1^{-/-} csoportnak rosszabbak voltak a vad típusú és a heterozigóta csoportéhoz viszonyítva. Ugyanilyen jelentős különbséget tapasztaltunk a csoportok között, 20 perc iszkémiát követő 30, illetve 120 perc reperfúzió során. A HO-1^{-/-} szívek a reperfúzió során mind fibrilláltak, így azokat elektromos úton defibrilláltuk azért, hogy a szívfunkciós paraméterek (HR, CF, AF, AOP, AOPdp/dt) felépülését mérni tudjuk.

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

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

Következtetések

I. A miokardium iszkémiás periódusai különböző mértékű változásokat eredményezhetnek bizonyos gének expressziójában és a szívfunkciókban egyaránt. Az arrhythmia, többek között a kamrafibrilláció kialakulásának mechanizmusa(i), mint például a re-entry, jól ismertek és definiáltak, azonban a VF kialakulásának genetikai szintű magyarázatáról jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésre. Az idiopátiás kamrafibrilláció mechanizmusának vizsgálata során megállapították, hogy a szív ionszűrőit kódoló gének mutációi növelik a fibrilláció kialakulásának, illetve a hirtelen szívhalál előfordulásának valószínűségét. Ebből kiindulva feltételeztük - mivel a mitokondrium az oxidatív foszforizáció

helye -, hogy a mitokondriális gének fontos szerepet játszhatnak az arrhythmogenesisben iszkémia/reperfúziónak kitett szívizomban.

Megvizsgáltuk, hogy a mitokondriális mRNS expresszió, milyen kapcsolatban lehet a reperfúzió indukálta VF előfordulásával, perfundált, diabéteszes és nem diabéteszes patkány szívizomban. Továbbá vizsgáltuk a VF és a mitokondriális génexpresszió, konkrétan a COXBIII és ATP6 expresszió közötti kapcsolatot iszkémia/reperfúziónak ki nem tett, elektromos úton fibrillációba hozott szívizomban. Az általunk vizsgált gének expressziója növekedett 30 perc iszkémiát követően, de reperfúzió indukálta fibrilláció során jelentős mértékű downregulációt tapasztaltunk. Abban az esetben, ha kamrafibrilláció nem alakult ki nem tapasztaltuk a vizsgált mRNS expressziójának csökkenését. Hasonlóan más emlősökhöz, a patkány mitokondriális genomja is csak 13 proteint kódoló területet tartalmaz (COX I, II, III; ATPase 6, 8; citokróm B, valamint NADH 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6). Kísérleteinkben a reperfúzió indukálta VF kialakulása jelentős mértékben függött a COXBIII és az ATP6 expresszió downregulációjától. Mindezt alátámasztják elektromos úton fibrillációba hozott szíveken végzett kísérleteink is, mely szerint feltehető, hogy a kamrafibrilláció felelős a génexpresszió csökkenéséért, de a fibrilláció indukálta közepes mértékű iszkémia szerepe sem zárható ki teljes mértékben. Bár az elektromos fibrilláció indukálta koronária vasokonstriktio nem valószínű, hogy magyarázatot adhat a mitokondriális génexpresszió változására, de kétségtelen, hogy ez a tényező befolyásolhatja a szív fibrillációt követő felépülését, összehasonlítva az iszkémia/reperfúzió indukálta fibrilláción átesett szívizommal.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy a diabéteszes szívizom másképp reagál a miokardiális károsodásokra, mint a nem diabéteszes. Kísérleteinkben az arrhythmogén mechanizmusokra vonatkozólag nem tapasztaltunk jelentős mértékű változást a COXBIII és ATP6 mRNS expresszióval kapcsolatban az iszkémia/reperfúziónak kitett diabéteszes és nem diabéteszes csoport között, mely arra utal, hogy mindkét gén központi szerepet játszhat az arrhythmia kialakulásában diabéteszes és nem diabéteszes szívizomban egyaránt. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a vizsgált gének mRNS és protein expressziójának farmakológiai stimulálásával a reperfúzió indukálta VF kialakulása megelőzhető, valamint, hogy ezek a gének jelentős mértékben szabályozhatják az arrhythmia kialakulásának mechanizmusait iszkémia/reperfúziónak alávetett diabéteszes és nem diabéteszes szívekben egyaránt.

II. Munkánk második részében arra törekedtünk, hogy még közvetlenebb bizonyítékokat szerezzünk a HO-1 által termelt endogén CO szerepéről, a reperfúzió indukálta kamrafibrillációk kialakulásának megelőzésében. A celluláris CO termelés

mérésével közvetlen bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy az említett védekezési mechanizmus a HO-1 mRNS indukción keresztül, az emelkedett endogén CO termelésnek tulajdonítható. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy többek között az infarktusos terület nagysága jelentős mértékben nagyobb volt a HO-1^{-/-} csoportban, mint a vad típusú, illetve a heterozigóta csoportokban, továbbá, hogy ez a növekedés az infarktusos terület nagyságában emelkedett miokardiális Na⁺ és Ca²⁺, valamint csökkent K⁺ koncentrációkkal is összefüggésbe hozható. Kimutattuk, hogy a HO-1, illetve a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO produkció fontos szerepet játszik a miokardiális homeosztázisban azáltal, hogy megvédi a szívet az iszkémia/reperfúzió indukálta funkcionális károsodásoktól melyek magukba foglalják a reperfúzió indukálta VF-t is. Iszkémia/reperfúziós inzultust követően a HO-1 mRNS és protein nagymértékű downregulációját, valamint az enzim aktivitás csökkenését tapasztaltuk mind a fibrilláló vad típusú, mind pedig a fibrilláló heterozigóta szívek esetében. Aerob perfúciónak kitett HO-1^{-/-} szívekben nem tudtuk detektálni sem a HO-1 mRNS-t, sem pedig annak proteinjét. A HO-1 knock out (-/-) homozigóta szívekben pedig a szívfunkciók rosszabbak voltak mind aerob körülmények között mind pedig reperfúzió során, összehasonlítva a vad típusú szívekkel. Reperfúzió során a homozigóta (-/-) szívek mind fibrilláltak, ami bizonyítja, hogy a HO-1 mRNS és proteinjének jelenléte, illetve a HO-1 enzim aktivitás antiarrhythmias hatású lehet.

A HO-1, illetve a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO termelés pontos mechanizmusa, mely során kifejti védő hatását jelenleg intenzíven kutatott terület. 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 (emelésére), hasonlóan a nitrogén oxidhoz, így szerepet játszhat egyaránt a fiziológiás és patológias értónus szabályozásában. A HO rendszer jelentőségét már számos betegségben, többek között asthmában, endotoxémiában, cardiomyopathiában, és iszkémia/reperfúzió indukálta sérülésekben is leírták. A bizonyítékok növekvő számának tükrében, mely szerint a HO-1 védelmet biztosít az oxidatív károsodások ellen, a kutatók 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 „citoprotektív” CO-ról kimutatták, hogy: (i) a szolubilis guanilát-cikláz aktiválásán keresztül szabályozza a celluláris cGMP szintet, hozzájárulva ezáltal az endotheliumtól-függő vasodilatációhoz, valamint

megakadályozza a vérlemezkék aggregációját; (ii) csökkenti a NO képződést a nitrogén oxid szintáz (NOS) gátlása következtében; (iii) gyulladás ellenes hatása van; és (iv) gátolja mind az apoptotikus, mind pedig a sejtosztódási mechanizmusokat. A HO által termelt CO hatását kifejezheti a keletkezés helyén, vagy pedig a szomszédos sejtekbe diffundálva.

Kísérleteink célja a HO-CO rendszer szerepének vizsgálata volt az iszkémiás/reperfundált szívizomban, mindemellett azonban meg kell említenünk a nitrogénoxid szintáz (NOS-NO) rendszer szerepét is. A két rendszer nagyon sok hasonlóságot mutat. Mind a HO, mind a NOS rendszernek van konstitutív és indukálható izoformja, valamint mind a CO és az NO képes aktiválni a guanil-ciklázt, melynek következtében megnő a cGMP szint, amely hatékony szekunder-messsengerként funkcionál. Továbbá, a legtöbb hatás, melyek indukálják az iNOS expresszióját, mint pl. katecholaminok, citokinek és az iszkémia/reperfúzió, szintén indukálják a HO-1 expressziót. A CO és NO relatív hozzájárulása a guanil-cikláz aktiválásához a kardiovaszkuláris rendszerben, jelenleg még tisztázatlan. Számos pathológiai körülmény során, mint pl. hypoxia, hő sokk, és iszkémia/reperfúzió, a CO mediálta hatás lehet a domináló. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint HO inhibitor alkalmazása gátolta a cGMP termelést, ugyanakkor NOS inhibitoroknak nem volt hatásuk. Pannen és mtsai vérzéses sokk patkány modelljén kimutatták, hogy a CO indukálja a mikrocirkuláris dilatációt és a sejtek védelmét, míg a NO esetében nem tapasztaltak jelentős hatást az alkalmazott modellen. Mindamellett, hypertermiás stressz szintén emelte a cGMP szintet CO termelésen keresztül, míg a NO-nak nem volt szignifikáns hatása. Újabb kutatások bizonyították, hogy a NO sokkal erősebb stimulátora a guanil-cikláznak, kb. 300-400 x emelkedést eredményez az enzim aktivitásban, összehasonlítva a CO okozta 5-15 x emelkedéssel. Valószínűsíthetjük, bár általában a NO dominánsabb aktivátora a guanil-cikláznak, bizonyos körülmények között, egyes szövetekben, a CO fiziológiai funkciója fontosabb lehet. Mivel mind a NO, mind pedig a CO a guanil-cikláz stimulálásán keresztül fejt ki hatását, ezért további kísérletekre van szükség, hogy bizonyítsuk, hogy az emelkedett cGMP szint legalább részben a CO-nak köszönhető az általunk használt modell estén.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy HO-1 vad típusú, valamint HO-1 „knock out” hetero-, illetve homozigóta egerek használatával kimutattuk, hogy a HO-1, illetve a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO produkció fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer iszkémia/reperfúziós inzultusra adott válaszában. A K.O. állatokból izolált szívek érzékenyebbek voltak az iszkémia/reperfúzióra, rosszabb posztiszkémiás szívfunkciókat mutattak, valamint reperfúzió során, minden esetben fibrilláltak. Ezen eredményeink alapján

feltételezhetjük, hogy a hemoxigenáz-1 központi szerepet játszhat a szív fiziológiás működésének megőrzésében, vagy helyreállításában azáltal, hogy megvédi a szívmizmot az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásoktól.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

Szendrei L., Turoczi T., Kovacs P., Vecsernyes M., Das DK, Tosaki A. (2002) Mitochondrial gene expression and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused nondiabetic and diabetic myocardium. *Biochem. Pharmacol.* **63**: 543-552. **IF: 3,542**

Bak I., **Szendrei L.**, Turoczi T., Papp G., Joo F., Das DK, De Leiris J., Der P., Juhasz B., Varga E., Bacskey I., Balla J., Kovacs P., Tosaki A. (2003) Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J.* **17**: 2133-2135 **IF: 7,252**

Citálható folyóiratokban megjelenő absztraktok:

1. **Szendrei L.**, Turoczi T., Das DK, Tosaki A. (2001). The role of mitochondrial gene expression in ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**: (6) p. A117. **IF: 4.091**

2. **Szendrei L.**, Turoczi T., Das D. K., Tosaki A. (2002) Reperfusion-induced ventricular fibrillation and mitochondrial gene expression in ischemic/reperfused hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34** (6): A61 **IF: 4.091**

3. **Szendrei L.**, Bak I., Juhasz B., Turoczi T., Das D. K., Tosaki A. (2003) The role of heme oxygenase-1 and carbon monoxide in reperfusion-induced ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35** (6): A45 **IF: 4.091**

Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

1. Kovacs P., Bak I., **Szendrei L.**, Vecsernyes M., Varga E., Blasig I. E., Tosaki A. (2001) Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **364**: 501-507; **IF: 2.566**

2. Bak I., Papp G., Turoczi T., Varga E., **Szendrei L.**, Vecsernyes M., Joo F., Tosaki A. (2002) The role of heme oxygenase related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free. Rad. Biol. Med.* **33**: 639-648; **IF: 5.533**