

DOKTORI (Ph.D.) TÉZISEI

**AZ OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA GÉNEK SZEREPE ÉS JELENTŐSÉGE A
MIOKARDIÁLIS ISZKÉMIA/REPERFÚZIÓ SORÁN**

Írta:

TURÓCZI TIBOR

Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád

Programvezető: Prof. Dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR

GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK

DEBRECEN

2004

RÖVIDÍTÉSEK

AP-1:	Activating protein-1
AF:	Aorta flow
ATPS6	ATP-áz 6 alegység
CF:	Koronária flow
CDDP:	Cis-diammine-dichloroplatinum
COX B III:	Citokróm oxidáz B III alegység
CO:	Szén monoxid
dp/dt:	Szív kontraktilitás
GADPH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSHPx-1:	Glutathione peroxidase
HFE:	Hereditary haemokromatózis
KHB:	Krebs-Henselit buffer
HO-I:	Hemoxygenáz-I
HTLV-I:	Human-T cell leukemia virus
ISA/RE:	Iszkémia/reperfúzió
KO:	Knock out
LVDP:	Bal kamrai „develop” nyomás
LVEDP:	Bal kamrai vég-diasztolés nyomás
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
MDA:	Malonaldehyde
NF-κB:	Nuclear faktor- κ B
NO:	Nitrogén monoxid
PK:	Prekondíció
PPI:	4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)-pyrazolo-3, 4-D-Pyrimidine
ROS:	Reaktív oxigén szabad gyökök
SOD:	Szuperoxid dismutase
STAT5A/STAT6:	Szignál transzdukciós és aktivátor faktor
SZF:	Szívfrekvencia
TTC:	Triphenyl-Tetrazolium-Clorid
Trx:	Thioredoxin
TUNEL:	Terminal-Deoxynucleotidil-Transferase-Deoxyuridine Nick end Labeling
VF:	Ventrikuláris fibrilláció

AZ OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA GÉNEK SZEREPE ÉS JELENTŐSÉGE A MIOKARDIÁLIS ISZKÉMIA / REPERFÚZIÓ SORÁN

Bevezetés:

A szív- és érrendszer betegségei a világ valamennyi fejlett országában a leggyakoribb megbetegedések, illetve a vezető halálokok közé tartoznak. Magyarországon a halálozások több mint a fele **a keringési betegségeknek** tulajdonítható, melyből a koszorúér-betegség a legfőbb halálokok. Amíg a nyugati országokban, a táplálkozási szokásokban bekövetkezett változások, a testmozgás és a korszerű gyógyszeres kezelés hatására a keringési betegségek (koszorúér-betegség, agyérrendszeri történés, perifériás érbetegség, illetve aorta betegség együttvéve) mortalitása 1970 óta 20-30 %-kal csökkent, addig Magyarországon a keringési betegségek halálozása az 1990-es évekig nőtt, majd lassú csökkenés indult meg. 2000-ben a keringési rendszer betegségei miatti halálozás Magyarországon duplája az EU átlagnak, ezen belül a 65 éven aluli lakosság esetében a halálozás háromszorosa a megfelelő EU-átlagnak. Az iszkémiás szívbetegségek előfordulása és nagy számú megjelenése napjainkban mindennapos jelenség, emiatt fontos a háttérben zajló molekuláris és pathofiziológias folyamatok megismerése. A szívizom iszkémiája, amely a miokardium oxigén hiányos állapotát jelenti valamint a reperfúzió, amelyre a koronária mikrocirkuláció újbóli megindulása jellemző, az utóbb időben kiemelkedő szereppel bír a kardiovaszkuláris kutatások területén. Klinikai gyakorlat szempontjából e jelenségnek fontos szerepe van thrombolitikus kezelés, koronária bypass műtétek esetében. Az iszkémia/reperfúzió jelensége összefüggésben áll az ionkoncentrációk megváltozásával illetve a folyamat során képződő toxikus szabadgyökök megjelenésével. Az oxigén és az ép miokardium működéséhez szükséges szubsztrátok hiánya megváltoztatja a szívizom normál működését. Az energiát felhasználó ionpumpák funkcionális zavara miatt az intracelluláris ionháztartás felborulása jön létre, aminek következménye az $[Ca^{2+}]_i$ gyors emelkedése. A Ca^{2+} központi szerepet játszik a miokardium kontrakciójában és az ingerületvezetés folyamataiban, pedig proteázokat aktiválva súlyos sejtkárosító hatásokat eredményez. Az emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ az egyik legfontosabb faktora az iszkémiás állapot után kialakuló súlyos életet veszélyeztető kamrafibrillációnak és egyéb vezetési zavaroknak. Az iszkémiát követő molekuláris és biokémiai mechanizmusok eredménye az apoptotikus és a nekrotikus sejthalál. Az előbbi indukciójában a TNF-faktor és Fas-ligand, valamint a mitokondriális citokróm „c” vesz részt aktiválva a kaszpáz 3 enzimet, mint az egyik legfontosabb effektor elemét az apoptotikus sejthalálnak. Az apoptózisnak nagy szerepet tulajdonítanak a „reflow” utáni állapotokat

követő kardiomyociták károsodásában illetve elhalásában. Folyamata genetikusan determinált, gének által regulált, és a géntermékek (bcl-2, bax, bak) expressziós aránya dönti el, hogy a folyamat elhalás illetve a túlélés irányban végződik. Az említett kóros molekuláris folyamatok ellen hatásos eszköz lehet a folyamatos ún. graduális valamint az iszkémiás és hypoxiás reperfüzió. Ezek a folyamatok bizonyos protektív gének expressziójával képesek kivédeni a „reflow” okozta hirtelen energia-felszabadulást és annak következményeit. Farmakológiai szempontból számos gyógyszercsoport, így pl. Ca^{2+} csatorna blokkolók és angiotenzin-konvertáz enzim gátlók is hatékonyságot mutathatnak a pathológiás folyamatok kezelésében.

CÉLKITŰZÉS

1. A dolgozat első részében összefüggést kerestünk a diéta vastartalma és az HFE mutáció (autoszómális, recesszív) között, mely hatással lehet infarktusos terület nagyságára, az apoptotikus sejtek számának változására és a miokardiális funkciókra. HFE KO és vad típusú egerek különböző vastartalmú állati takarmány etetésével modelleztük a haemokromatózist. A kísérlet második részében a redox-rendszer komponenseit elsősorban az antioxidáns enzimek változását vizsgáltuk, kerestük a választ arra, hogy ezek aktivitása miként változik a hosszan tartó vasterápia következtében. A következményes szabadgyök indukálta membránkárosító folyamatok elemzését HPLC-vel vizsgáltuk, és meghatároztuk a lipidperoxidáció mértékét, mely az oxidatív károsodás egyik fő markere.

2. A doktori értekezés második része a Thioredoxin (Trx) redox-protein kardioprotektív hatásának elemzésével és mechanizmusának feltárásával foglalkozik. Trx transzgenikus és vad típusú egereket alkalmazva bizonyítottuk a protein előnyös hatását az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális károsodásokkal szemben, vizsgálva az apoptózis mértékét és az infarktusos terület nagyságát, továbbá a szívfunkciókat. CDDP alkalmazásával, mely egy daganat terápiában használatos gyógyszerkészítmény elemeztük a Trx okozta előnyös hatások felfüggesztését patkányszív preparátumon végzett kísérleteinkben.

3. A munkánk utolsó részében a STAT5A és STAT6 szignáltranszdukciós molekulák iszkémiás prekonfidióban betöltött szerepének meghatározását tűztük ki. STAT5A és STAT6 „knock out” és vad típusú egérszívek iszkémiás inzultusnak kitéve vizsgáltuk a szív működésére jellemző legfőbb kardiális paramétereket. Sprague-Dawley patkányok alkalmazásával és foszforiláz inhibitor kezeléssel célul tűztük ki, hogy a STAT5A illetve STAT6 rendelkezik -e meghatározó szereppel az iszkémiás prekonfidió molekuláris folyamatában.

4. Molekuláris biológiai technikák segítségével vizsgáltuk az egyes mitokondriális gének [(COXBIII és ATP6) diabeteses és nem-diabeteses szívekben], valamint a hemoxigenáz-1 (HO-1) expresszióját és a kamrafibrilláció kialakulásában játszott lehetséges szerepüket, és szívfunkciókra kifejtett hatásukat.

I. A HFE mutáció és a diéta vastartalma közötti korreláció

Számos szívbetegség előfordulása és prognózisa szoros korrelációt mutat a szabadgyök képződéssel. A haemokromatózis egy autoszomális recesszív megbetegedés, melyre jellemző a nem heme-hez kötött vas depozíció a parenchymás szervekben, mint pl. szív, máj, vese. A folyamatért felelős az HFE gén, amely szerkezetileg hasonlít a MHC-I csoportba tartozó fehérjéhez, génlokálizációját tekintve a 6 kromoszóma rövid karján helyezkedik el. Expresszióját a vékonybél el nem szarusodó laphámjaiban valósul meg és a $\beta 2$ microglobulinnal képez szerkezeti egységet, s fontos szerepet tölt be az intesztinális vastranszportban. Az HFE gén mutációja, mely a DNS-t alkotó bázis cseréjéből adódik, kétféle lehet: 1. guanin→adenin csere a 875-s helyzetű nukleotidon, mely egy tyrozin→cisztein szubsztitúciót eredményez a 282-es helyzetű aminosavon, 2. citozin→guanin csere $\Rightarrow$ aszpartát→hisztidin aminosav csere a 63-s aminosav helyén. Az így létrejött mutációk a vastranszport teljes zavarát és fokozott vas depozíciót eredményezhet a szívben, amely kezelés hiányában fibrózist és vezetési zavarokat idézhet elő.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK I.

A HFE egerek létrehozása:

A génmanipulált egerek generálása az HFE gén célzott „diszrupciójával” történt. A HFE mRNA Northern blot analízis a HFE „knock out” egerekből a teljes messenger RNS hiányát erősítette meg. A kísérleteink végrehajtásához az állatokat 4 csoportra osztottuk. A HFE KO és vad típusú egyedek (utóbbi C57 vonalból származtak) két típusú, speciális egértakarmányt kaptak 4 héttel születésüket követően, amelyek 30 és 300 ppm vas diétával voltak kiegészítve. A vas terápia, a diéta megkezdését követő 3. hónapig tartott.

A dolgozó egérszív preparátum:

Az állatok anesztéziáját 200 mg/kg sodium pentobarbitállal végeztük intraperitoneálisan, heparinnal (500 IU/kg testsúly) kiegészítve. A sebészeti beavatkozás után az állatok szívet kimetszettük, hideg perfúziós oldatba helyeztük, majd az aortát kanuláltuk, és szíveket retrográd módon perfundáltuk Langerndorff módon 60 Hgmm perfúziós nyomáson. A perfúziós oldat egy módosított Krebs-Henseleit bikarbonát oldat volt, amely összetételében megközelíti a vér elektrolit-komponenseinek arányát (118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl,

1.2 mmol/L MgSO_4 , 25 mmol/L NaHCO_3 , 10 mmol/L Glükóz, és 1.7 mmol/L CaCl_2). Az oldatot a kísérlet időtartama alatt 95% O_2 és 5% CO_2 -t tartalmazó gázeleggyel telítettük, biztosítva a szövetek számára szükséges optimális O_2 mennyiséget, valamint a pH fenntartásához nélkülözhetetlen CO_2 -t.

A 10 perc retrográd perfúzió során a bal pitvart kanüláltuk a vena pulmonalison keresztül, majd ezt követően a szíveket ortográd módon perfundáltuk. Az ortográd perfúzió során a konstans hőmérsékletű oldat a kanülált bal pitvarba jutott 1 KPa-nak megfelelő nyomással (preload), majd onnan a pitvar kontrakció hatására a bal kamrába. A bal kamra spontán összehúzódásával a KHB oldat továbbítódott az aorta kanülön keresztül egy olyan folyadékoszlopba, amelynek nyomása 5 KPa-l (afterload) volt egyenértékű.

A szívfunkciókat a dolgozó preparátumon az iszkémia előtt és a reperfúzió folyamán regisztráltuk Micromed softwear alkalmazásával (bal kamrai kifejlődő nyomás, bal kamrai végdiasztolés nyomás, szívkontraktilitás). Az aorta flow mérésére „flowméter”-t használtunk, a koronária flow-t pedig a szívből lecsöpögő oldat mérésével végeztük. A szíveket 30 perc globál iszkémiának majd 2 óráig reperfúciónak vetettük alá és mértük a funkcióikat a reperfúzió 15., 30., 60., és 120 percében. Az *infarktusos terület* meghatározása céljából szíveket 10 % TTC (Tripheli-Tetrazolium-Clorid) oldattal perfundáltattuk 10 percig 37°C-on.

A MDA, a szöveti vastartalom és az antioxidáns enzimek meghatározása:

A szövetek nem hemoglobinhoz kötött vastartalmának meghatározásához a szíveket 3 mol/l HCl és 10% triclórecetsav elegyével 24 órán keresztül 65 °C-on kezeltük, majd 500 ml savas extraktumhoz 1.6 ml bathophenanthroline chromogén reagenst adtunk és az abszorbanciát 535 nm-en mértük Beckman DU-100000 spectrophotométerrel. Az MDA koncentrációt HPLC segítségével határoztuk meg. Az antioxidáns enzimek mennyiségét (szuperoxid diszmutáz, kataláz, és glutation-peroxidáz) hagyományos enzim „assay” módszerrel végeztük

Az apoptotikus sejtek detektálása:

Az apoptotikus sejtek számát TUNEL módszer segítségével határoztuk meg. A festés során anti-miokardiális nehéz myozin lánc ellen termeltetett egér-antitestet alkalmaztunk, melyhez TRIC-konjugált, nyúlban termeltetett egér antitestet adtunk (1:200 hígításban). Az infarktusos terület meghatározását TTC módszer alkalmazásával végeztünk, majd az 1 mm-es vastagságú haránt metszeteket NIH Image 1. 6. 1 nevű képalkotó és analízáló softwear segítségével értékeltük.

Statisztikai:

A szívfunkciós paramétereket és az MDA tartalmat, valamint az infarktusz terület mérését a számtani átlag és az átlagtól való eltérés hibája alapján számítottuk ki. Az adatok közlésekor a különbségek megállapítására ANOVA variancia analízist majd Scheffe-tesztet alkalmaztunk a statisztikai szignifikancia elemzésére. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $*p < 0,05$.

EREDMÉNYEK I.

A szövetek nem heme-hez kötött vastartalma:

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a HFE KO egerek nem heme-hez kötött vastartalma nagyságrendekkel magasabb volt, mint a vad típusú egerek szívszövetében. Statisztikai szempontból az HFE KO mindkét csoportja (30 illetve 300 ppm) szignifikánsan magas vastartalmat mutatott a kontroll csoportok értékeihez képest. Elsősorban a 300 ppm HFE KO egerek miokardiális szövete igen magas eltérést mutatott a vastartalomra vonatkozóan.

Szabadgyökök indukálta oxidatív stressz meghatározása:

Megfigyeltük, hogy a vad típusú szívek esetén az oxidatív károsodás minimális volt, viszont a HFE KO egerek szövetéből emelkedett MDA mennyiséget sikerült kimutatni, ami viszont nem volt szignifikáns. A vad típusú egerekben, 30 perc iszkémiát követő 2 órás reperfúzió alatt a MDA tartalom statisztikailag magas volt az alapértékekhez viszonyítva. A HFE csoportban emelkedést tapasztaltunk az MDA tartalomban mindkét csoportban mind alapállapotban mind, pedig az iszkémiát követő periódusban.

Az antioxidáns enzimszintek változása:

A Mn SOD és GSHPx-1 enzimszint csökkenést mutatott alapállapotban továbbá valamint 2 órás reperfúzió után azokból a szívszövetmintákból, amelyek az HFE KO-300 ppm egerekből származtak. Elsősorban 300 ppm HFE KO egérszívek mutattak csökkent kataláz aktivitást az iszkémiát követő 2 órás reperfúzió után. Ugyanez a tendencia volt megfigyelhető Mn-SOD esetében is azzal a kivétellel, hogy itt már alapállapotban is csökkent enzimaktivitást figyeltünk meg a 300 ppm HFE KO csoportnál, mely szignifikáns volt. A Cu/Zn-SOD esetében hasonló enzimaktivitást mértünk azzal a különbséggel, hogy statisztikai differencia csupán a 300 ppm HFE KO egérszív enzimértékeknél volt megfigyelhető a reperfúzió során. GSHPx-1 aktivitásban szignifikáns eltérés mutatkozott mind 30 ppm és 300 ppm HFE KO

csoportokban összehasonlítva a vad típus értékeivel egyaránt az iszkémiát megelőzően és a reperfúzió során.

A szív kontraktilitása és az infarktusos terület:

A bal kamrai „develop” nyomás mérésekor azt tapasztaltuk, hogy ez az érték jelentős csökkenést mutatott az HFE KO 300 ppm szívekben. Jelentős eltérés figyeltünk meg viszont a reperfúzió 15., a 30., a 60. valamint 120. percében a kontroll csoporthoz képest. A bal kamrai végdiasztolés nyomás a HFE KO 300 ppm kísérleti csoportban folyamatos emelkedést mutatott a reperfúzió 30., 60., és 120. percében összehasonlítva a vad típusú csoporttal. A dp/dt értékek változásánál azt tapasztaltuk, hogy jelentős esés következett be reperfúzió során mindkét „knock out” csoportban. A szívfrekvenciában jelentős változást nem figyeltünk meg sem alapállapotban sem pedig a reperfúzió során. A szív perctérfogata, amely a koronária és azt aorta flow együttes összegéből származtatható, szintén csökkenő tendenciát mutatott az iszkémiát követő reperfúzió alatt. Az aorta flow mérése során csökkent paramétereket regisztráltunk összehasonlítva a kontroll értékekkel. Elsősorban az HFE KO 300 ppm csoport mutatott statisztikai csökkenést az aorta flow esetében a reperfúzió 30. (0.30 ± 0.01 v. 0.47 ± 0.04 ml/min), 60. (0.2 ± 0.02 v. 0.30 ± 0.02 ml/min), és 120. (0.13 ± 0.01 v. 0.23 ± 0.03 ml/min) percében a kontroll szívek értékeihez hasonlítva. A koronária flow mérése során, amit a szívből lecsöpögő oldat mennyisége jellemez, hasonló tendenciát mértünk, mint az aorta kiáramlásnál. Az infarktusos terület, amelyet az elhalt szívterület egészéhez viszonyított és százalékos arányával jellemeztünk, szignifikáns mértékben nagyobb volt a HFE KO 300 ppm csoportnál a kontroll szívekhez képest ($44.65 \pm 1.37\%$ HFE KO 300 ppm, $38.90 \pm 1.93\%$ HFE KO 30 ppm v. $32.75 \pm 1.85\%$ vad típus 300 ppm, $30.00 \pm 1.45\%$ vad típus 30-ppm).

Kardiomyocita apoptózis:

Az eredmények értékelésénél mind a vad és a HFE KO egér csoportok szív szövete jelentős számú apoptotikus sejtet tartalmaztak. A kísérlethez, kettős antitesthez kötött módszert használtunk. A protokoll végrehajtását követően szignifikánsan nagyobb számú apoptotikus sejtet detektáltunk az HFE KO egerek miokardiális szövetében. Általában a magas vastartalmú diétával etetett állatok miokardiális szövetében az apoptotikus sejtek száma nagyobb volt.

II. A thioredoxin (Trx) protektív hatása az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális károsodásokkal szemben.

A már említett károsító hatású pathológiás mechanizmusokkal szemben védelmet nyújthatnak a redox-rendszer fontos komponensei, mint a glutaredoxin illetve a thioredoxin (Trx). Az előbb felsorolt úgynevezett redox molekulák fontos jellemzője, hogy thiol csoportjai révén redukáló tulajdonsággal rendelkeznek és képesek semlegesíteni az iszkémia során képződött szabadgyököket és az általuk indukálta pathológiás folyamatokat. A Trx, akut T limfocita okozta leukémia faktorként vált ismerté, ami válójában IL-2 receptor α / γ induktor, melyet a vírus (HTLV-I)–által transzformált T sejtek termelnek. Számos publikáció már korábban utalt ennek a proteint kódoló génnek fokozott expressziójára koronária bypass műtét során, amikor a szív a műtéti beavatkozásból kifolyólag oxidatív stressznek van kitéve. A Trx fokozott expressziója volt megfigyelhető virális fertőzések, röntgen és UV besugárzás, valamint phorbol észterek és posztiszkémiás reperfúzió kiváltotta folyamatokban. Kromoszómális lokalizációját tekintve az emberi thioredoxin gén a 9-s kromoszómán helyezkedik el. A terhesség időszakában is kedvező hatással van a placentát alkotó trophoblast sejtek normál funkciójának megőrzésében, valamint a petesejt implantációjában. Az oxidatív stressz indukálta molekuláris folyamatokban bizonyos transzkripciós faktorok (NF- κ B, AP-1) aktivációja fokozódik, ezáltal indirekt módon különböző gének expresszálnak, illetve represszálnak. Ez a szabályozás úgy jön létre, hogy a transzkripciós faktorok redox-állapotainak megváltoztatásával azok DNS-kötő képessége módosul, befolyásolva ezzel a gének működését. Ez elsősorban a transzkripciós faktorok cisztein oldalláncain valósul meg Trx segítségével, amely a sejtmagba való transzlokációját eredményezi az oxidatív stresszt követően. A Trx továbbá részt vesz bizonyos immunfolyamatok regulálásában azáltal, hogy számos citokin, mint az immunrendszer modulátorainak szintézisét génexpressziós szinten szabályozza. Számos tanulmány korábban beszámolt arról, hogy szerzett immunhiányos állapotokban a Trx fokozott expressziója volt megfigyelhető, a HIV fertőzésből adódó fokozott oxidatív stressz következtében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK II.

A traszgén egerek létrehozása:

Az emberi Trx gén cDNA klónt az Incite Genomics (St. Louis, MO) biztosította. EcoRI-NotI cDNA fragmentet ezután insertáltuk egy EcoRI és SpeI által emésztet humán β -actin

expressziós vektorba. A teljes expressziós szekvencia tartalmazta a humán β -aktin promótert, a humán thioredoxint valamint SV40-s késői poliadenilációs helyet. Az expresszált szekvenciát majd KpnI és SalI enzimmel emésztve kinyertük az expressziós vektorból és agar gélen tisztítottuk. A kinyert DNS-t mikroinjekciós technikával bejutattuk fertilizált egér petesejtbe (B6D2 (C57BL/6 $\times$ DBA/2) F1). A transzgén egerek azonosítása során Southern blot technikát alkalmaztunk, mellyel az állatok farkából kinyert DNS-t azonosítottuk. Az ily módon nyert transzgenikus egereket, (amelyek extra Trx génnel rendelkeztek) kereszteztük B6D2 hibrid állatok első generációjából származó utódaikkal.

A humán Trx gén expressziós analízise:

Az RNS blot filtert Thomas és munkatársai ajánlása alapján készítettük elő a hibridizációs módszernek megfelelően. Hibridizáció során humán Trx cDNA-t használtunk. A szívek fehérje tartalmának meghatározása céljából, a szöveteket homogenizáltuk 7,8 pH-jú 50 mM-s kálium foszfát pufferban, ami 0,1% triton X-100-t és 1 mM penylmethyl-sulfonyl fluoride-t tartalmazott. A fehérje mérésnél bicinchoninic savas protein assay kitet használtunk. A protein 25 μ g-ját 12,5% SDS poliakrilamid gélen elektroforizáltuk a proteinek méret szerinti elválasztása céljából, majd ezeket egy nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A blottot először kecskében termeltetett anti-Trx antitesttel (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT) reagáltattuk, majd második antitestként tormaperoxidáz jelölt nyúlban termeltetett anti kecske IgG-t használtunk. A második antitest detektálásához SuperSignal kemilumineszcens reagenst használva vizualizáltuk az antitest kötődést.

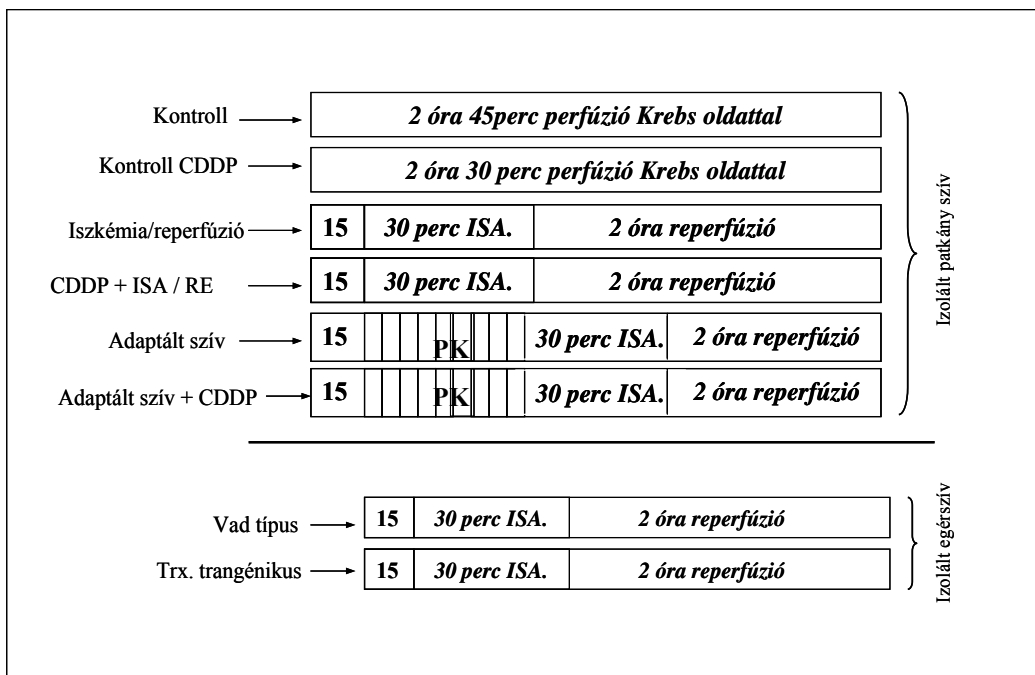
Kísérleti terv:

A dolgozó patkányszíves preparátum esetén az állatokat 6 csoportra osztottuk.

1. A perfúziót KHB oldattal 2 óra 45 percig végeztük.
2. A perfúziót 1 mM CDDP oldattal (Trx gátló, daganat ellenes szer) 15 percig, majd 2 óra 30 perces perfúzióval folytattuk KHB oldattal.
3. Perfúzió 30 perc globál iszkémiával és 2 óra reperfúzióval.
4. CDDP alkalmazása 1 mM-s koncentrációban 15 percig, majd 30 perc globál iszkémiát követően, 2 óra reperfúziót alkalmaztunk.
5. Prekondíció: 5 perc rövid iszkémia és 10 perc reperfúzió 4 ciklusban, melyet 30 perc iszkémia és 2 óra reperfúzió követett.

6. CDDP adása 1 mM koncentrációban 15 percig Langerdorff módban, majd prekonfúzió 4 ciklusban és 30 perc globál iszkémia, majd 2 óra reperfúzió.

A vad típusú és transzgenikus egerek (Trx) esetében 30 perc globál iszkémiát és 2 óra reperfúziót alkalmaztunk.



1. ábra A kísérleti terv vázlata: **Patkány:** Kontroll, Kontroll+CDDP, ISA/RE (30 perc ISA + 2 óra reperfúzió), PK (4 PK + 30perc ISA + 2 óra Reperfúzió), PK+CDDP. **Egér:** Vad és Trx transzgenikus (30 perc ISA+2 óra RE).

A Dolgozó egér és patkány szív preparátum:

A dolgozó egér és patkány szívpreparátum leírása megegyezik ez előző fejezetben leírtakkal. Az anesztéziát nátrium pentobarbitálal végeztük ip. injekcióval. Az izolált rendszerünkben alkalmazott nyomás, amit preloaddal és afterloaddal jellemeztünk a következő volt: patkány-preload: 17 Hgmm (2,0 kPa) , afterload: 71 Hgmm, (10 kPa); egér: preload: 10 Hgmm (1.4 kPa), afterload: 50 Hgmm (7 kPa).

Szívfunkciók:

A kardiális paraméterek esetén a bal-kamrai kifejlődő nyomást (a maximális és minimális szisztolés nyomás különbsége), a bal-kamrai végdiasztolés nyomást, a szívfrekvenciát, a koronária áramlást (időegység alatt a szívről lecsöpögő Krebs oldat mennyisége), az aorta kiáramlást (flowméter), a szív kontraktilis erejének idő szerinti deriváltját (dp/dt) mértük. Az LVDP, LVEDP, SZF, dp/dt értékeit Gould p23XL transzducer (Gould Instrument System

Inc., Valley View, OH) segítségével detektáltuk és a jelek felerősítésére, pedig Gould 6600 szignál erősítőt (Gould Instrument System Inc., Valley View, OH) alkalmaztunk. A paraméterek monitorozását Cordat II real-time software (Triton technologies, San Diego, CA) segítségével regisztráltuk és tároltuk.

Infarktusos terület meghatározása:

A perfúzió végén a szíveket 10% TTC (triphenyl tetrazolium) oldattal injektáltuk át 20 percig infarktusos terület meghatározása céljából. A bal kamrát eltávolítottuk és 1 mm vastagságú haránt metszeteket készítettünk, és azokat szkenneltük, majd egy speciális software (Scion Image) segítségével értékeltük. Az infarktusos terület fehérré vált, míg az ép miokardiális szövet piros maradt. Az értékelésnél mértük a metszetek súlyát, illetve az elhalt és intakt szív terület nagyságát, majd ezek összegzésével megkaptuk a teljes elhalt és ép miokardium nagyságát.

Northern blot analízis:

Az RNS izolálását Hattori által leírt módon hajtottuk végre. Az elektroforézist, a blottolási technika lépéseit, valamint a hibridizációt, a kísérleti terv szerint végeztük. Feltöltő standardként GADPH mRNS-ét alkalmaztuk, a blottot szkenneltük, majd Trx-1 arányát viszonyítottuk GADPH mRNS-hez. A képet ez követően vizualizáltuk, majd analizáltuk NIH Image analízis softwarevel.

A Malonaldehyd (MDA) mérése az oxidatív károsodás mértékének megállapítására.

Az MDA mennyiségénél a MDA-DNPH származékot határoztuk meg HPLC-vel.

Az apoptotikus sejtek detektálása TUNEL módszerrel:

Az apoptotikus sejtek immunhisztokémiai detektálását TUNEL módszerrel végeztük.

Statisztika:

A miokardiális funkciók értékeit, az MDA koncentrációt, az infarktusos terület nagyságát átlagoltuk és a szórással jellemeztük. A statisztikai analízist egy mintás variancia analízis és Scheffé-féle csoportos összehasonlító tesztel végeztük a csoportok közötti szignifikáns különbségek megállapítására. Az eltérések melyek szignifikánsnak mutatkoztak, standard Student t-test tesztel nyertek megerősítést.

EREDMÉNYEK II.

Patkánykísérletek:

Kísérleteinkben először az iszkémia/reperfúzió hatását vizsgáltuk a Trx „overexpresszió”-val összefüggésben. Northern blot analízis megerősítette azt a tényt, hogy a Trx jelen van az ép szívszövetben. Elképzeléseinket igazolták eredményeink, hogy a CDDP blokkolta a Trx expressziót. Ugyancsak megfigyelhető volt az, hogy az iszkémia/reperfúzió hasonló hatást eredményezett a Trx expresszióját illetően.

A Trx hatása az iszkémiát követően kardiális funkciókra:

A posztiszkémiás funkciókat vizsgálva nem tapasztaltunk lényeges változást, amikor a szíveket 2 óra 45 percig perfundáltuk. Ugyancsak nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést abban az esetben, ha 15 perces előkezelést végeztünk CDDP-vel. Érdekes módon a CDDP-vel történő előperfúzió szintén károsodást eredményezett a reperfúzió során. A prekondicionált szívekben a posztiszkémiás funkciók javulást mutattak az iszkémia-reperfúzió által előidézett miokardiális károsodásokkal szemben. A kardiális védőhatással bíró prekondíció előnyös tulajdonságait a CDDP-vel történő előkezelés teljes mértékben megszüntette.

A Trx hatása az iszkémia indukálta oxidatív károsodásra:

A kísérleteink során az oxidatív stressz mértékét HPLC-vel történő MDA tartalom mérésével határoztuk meg. Az MDA koncentráció jelentős emelkedést mutatott az összes kísérleti csoport vizsgálata során, elsősorban a reperfúziós időtartam kezdetén, majd ez a kezdeti növekedés később mérséklődött. A CDDP kezelés hasonló tendenciát mutatott aerob módon perfundált szívekben is. Ez a hasonlóság megfigyelhető volt a másik CDDP-vel előkezelt csoportban, ahol iszkémiát alkalmaztunk, de az MDA koncentrációban észlehető változás nem volt szignifikáns mértékű.

A Trx hatása az infarktusos terület nagyságára valamint az apoptotikus sejtek számára:

Kísérleteinkben CDDP hatását vizsgáltuk a miokardiális infarktusos terület nagyságára vonatkozóan. A CDDP kezelés nem mutatott jelentős változást a szív funkciókra, viszont csekély mértékű apoptotikus sejt elhalást okozott, és nem szignifikáns módon növelte az infarktusos terület nagyságát is. A prekondicionált szíveknél azt tapasztaltuk, hogy az elhalással kiterjedt terület valamint az apoptotikus sejtek száma szignifikáns csökkenést

mutatott. A védőmechanizmus teljes mértékben gátolható volt azokban a szívekben, melyek korábban CDDP-vel való kezelést kaptak.

Egérkísérletek:

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy két különböző bázis nagyságú Trx mRNS-t nyertünk a transzgen egerek szívéből. Az egyik 1,1 Kb, a másik 0,75 Kb nagyságú volt. Az 1,1 Kb-nyi Trx mRNS a várakozásaink ellenére hosszabb volt, ami az emberi β -aktin-hTrx1 transzgenikus egérből származott. A hibridizáció során a keresztkötések száma nem volt számottevő az egér és a humán Trx próba között. Western blot analízis során sikerült kimutatnunk a hTrx protein jelenlétét a transzgenikus egerekből származó szövetekből. Egy 12 kDa nagyságú protein sikerült detektálnunk, melyhez a humán Trx ellen termelt antitest nagy affinitást mutatott.

A miokardiális funkciók:

A bal-kamrai „kifejlődő” nyomás a reperfúzió alatt csökkenést mutatott a kontroll értékekhez képest. A Trx egerek viszont erre a szívfunkciós paraméterre vonatkozólag szignifikánsan magasabb értékeket mutattak a kontroll szívekhez képest. A kardiális kontraktilitás esetében (dp/dt) hasonló tendencia volt megfigyelhető.

III. STAT5A és STAT6 molekulák szerepe az iszkémiás prekondícióban

A PK azt jelenti, hogy rövid ideig tartó iszkémiás állapotok és azokat követő reperfúzió védelmet nyújt a szívszövetnek a később kiváltott hosszabb iszkémiás inzultussal szemben. Az PK folyamata két szakaszra bontható: 1. A korai szakasz: rövid ideig tartó iszkémiás állapotot követően 1-2 óráig marad fenn. 2. Késői fázis: hatása egészen 24-72 óráig érvényesül. A késői prekondíció folyamatában természetesen számos egyéb faktor is részt vesz (NF- κ B, MAPK), amelyek közül az előbbi működésének fokozódása figyelhető meg az endotheliális NO produkció indukálta PKC aktiváció következtében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK III.

A STAT „knock out” egerek generálása:

A KO egerekben, a STAT5A és STAT6 gén teljes hiánya volt detektálható, s az egereket a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) biztosította számunkra. A KO egerekhez tartozó vad

típusú állatok genetikai vonalait (B6129SF2/J101045-STAT5A és BALB/cJ000651-STAT6) szintén a fent említett forgalmazó biztosította.

Kísérleti protokoll:

Kontroll	3 óra 45 perc perfúzió KHB oldattal			Izolált dolgozó patkányszív
ISA/RE	75 perc KHB	30 perc ISA.	2 óra reperfúzió	
„PK”	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	
Tryphostin	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	
PPI	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	
Ly 294002	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	
Stat-5a vad ISA/RE	75 perc KHB	30 perc ISA.	2 óra reperfúzió	Izolált dolgozó egérszív
Stat-5a „KO” ISA/RE	75 perc KHB	30 perc ISA.	2 óra reperfúzió	
Stat-5a vad „PK”	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	
Stat-5a „KO” „PK”	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	
Stat-6 vad ISA/RE	75 perc KHB	30 perc ISA.	2 óra reperfúzió	
Stat-6 „KO” ISA/RE	75 perc KHB	30 perc ISA.	2 óra reperfúzió	
Stat-6 vad „PK”	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	Izolált dolgozó egérszív
Stat-6 „KO” „ISA/RE”	15 perc	„PK”	30 perc ISA.	

2. ábra Kísérleti terv.

A kísérleteink alatt két modellrendszert használtunk. 1. Izolált dolgozó patkányszív perfúziós rendszert, amelynek során a szíveket iszkémia/reperfúciónak illetve prekondicionálásnak vettük alá. 2. Izolált dolgozó egérszív metodikát, melyet STAT5A és STAT6 genetikailag manipulált egerek esetében alkalmaztunk. A patkányszívekkel (hím Sprague-Dawley) történő kísérletek során az állatokat 3 csoportra osztottuk. Az első csoportnál normál perfúziót alkalmaztunk 3 óra 45 percig. A második kísérleti csoportban 30 perc iszkémiát és 2 óra reperfúziót alkalmaztunk. A harmadik csoportban a szíveket prekondicionáltuk a következő módon: 4 ciklusú 5 perc rövid iszkémia és az azt követő 10 perces reperfúzió útján, melyet 30 perc globál iszkémia és 2 óra reperfúzió követett. A prekondicionálás folyamán szíveknél a következő kezeléseket alkalmaztuk: **1.** tyrphostin AG 490, (inhibitor JAK 2 -re); **2.** 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl)-pyrazolo-3, 4-D-pyrimidine (PPI); (Src kináz inhibitor) **3.** LY-294002 (phosphatidylinositol PI-3 kináz inhibitor). Az inhibitorokkal 15 percig perfundáltuk a szíveket retrográd módon, majd ezt követően 30 perc globál iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vettük alá azokat. A „knock out” egerekkel történő kísérleteinkben 30 perc globál iszkémiát és 2 óra reperfúziót alkalmaztunk. A szívek izolálását, perfúzióját és a mért paramétereket egy korábbi fejezetben ismertettük.

Infarktusos terület meghatározása:

A módszert a 13.-ik oldalon részletesen ismertettük.

Westren blot analízis:

A bal kamrából származó szöveteket homogenizáltuk (mM-ban): 25 Tris HCl, 25 NaCl, 1 orthovanadát, 10 NaF, 10 pyrophosphát, 10 okadaik sav, 0.5 EGTA, és 1 PMSF jelenlétében. Minden egyes szívből 100 µg protein homogenátumot inkubáltunk 1µg antitesttel 1 órán keresztül 4 C°-on melyek, STAT6 illetve STAT5A ellen lettek termeltetve (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA). Ezt követően a keletkezett immunkomplexet kicsapattuk A-sepharose protein segítségével, majd a keletkezett terméket elektroforizáltuk SDS-PAGE gélen. Az így elválasztott proteineket immobilizáltuk egy polivinil-difluorid membránon, amit blottoltunk phosphotyrozin antitestel, a STAT5A és STAT6 proteinek foszforilációs fokának ellenőrzése végett. A kapott eredményt képalkotó módszer segítségével a protein sávokat intenzitásuk szerint jellemeztük egy NIH program használatával.

TUNEL módszer:

A módszer ismertetését a 14. oldalon részletesen ismertettük.

Statisztikai analízis:

A funkcionális paramétereket, apoptotikus sejteket, valamint az infarktusos területet, mint számszerű átlagot és szórást fejeztünk ki. Az adatok statisztikai elemzése esetében egy-mintás variancia analízist alkalmaztuk a csoportok közötti különbségek megállapítására. Az így nyert eltérések analízisét Student t-teszt használatával valósítottuk meg. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha *p érték kisebb volt, mint 0,05.

EREDMÉNYEK III.**Az izolált patkányszív kísérlet:**

Tyrphostin vagy PPI-nek nem volt hatása mindkét proteinforma vad típusú foszforilációjának gátlására, viszont nem teljes mértékben hatásosak voltak STAT5A foszforilációs állapotának negatív irányba történő befolyásolására. A PPI sikeresen blokkolta a STAT5A foszforilációját, bizonyítva, az src szerepét a STAT5A foszforilációban, viszont nem volt ilyen jellegű hatása a STAT6-ra.

A STAT5A és STAT6 foszforiláció hatása az infarktusos területre és az apoptózisra:

A várakozásnak megfelelően az iszkémia után az infarktusos zóna nagysága illetve az apoptotikus sejtek száma növekedett, viszont azok szignifikáns mértékben csökkentek iszkémiás prekondícióban. Kísérleteinkben meghatároztuk a PI-3 és Akt molekulák szerepét az ún. „downstream” szignálkaskádban. Az LY-294002 a PI-3 kináz gátlásával teljesen megszüntette a prekondíció előnyös hatását, utalva a PI-3-Akt fontosságára a prekondíció indukálta miokardiális struktúrák és fiziológiai működés megőrzésében, ami a STAT molekulák szerepével függ össze.

Az izolált egérszív kísérletek:

Western blot vizsgálat igazolta a STAT5A és STAT6 protein teljes hiányát mindkét KO állatvonalból származó kardiális szövetben. Az infarktusos területet és az apoptózist vizsgálva a STAT5A KO egerekben a miokardiális infarktusos terület nagysága és az apoptotikus sejtek száma emelkedett a prekondicionált szövetekben a vad típusú egyedekhez viszonyítva. A prekondicionált STAT6 KO iszkémiás/reperfundált egér szívekben csökkent infarktusos területet és apoptotikus sejt számot kaptunk a STAT KO egérszívekkel összehasonlítva mely, a vad típusú egérszívekhez viszonyítva nagyobb volt (infarktusos zóna).

A szívfunkciók:

A szívfunkciók vizsgálatok a STAT5A vad típusú egerek, melyek korábban iszkémiás prekondíciónak voltak alávetve a kardiális paraméterek javulást mutattak az iszkémia/reperfundált csoporthoz képest. Ugyanez a hatás nem volt azonban megfigyelhető a STAT5A KO egerekben, még prekondíció alkalmazásakor sem. A STAT6 csoporttal végrehajtott izolált egérszíves kísérletek során, a prekondíció előnyös hatásai hűen tükröződtek a vizsgált paraméterekben, mind a vad illetve a KO szívekben.

IV. Mitokondriális gének és a Hemoxigenáz-I (HO-I) szerepe a ventrikuláris arrhythmiákkal szemben.

A reperfüzió előidézte károsodások következményeként kamrai arrhythmiák jöhetnek létre, melynek eredményeként a szív teljesítménye romlik. Az emlős sejtek, szövetek, szervek érzékenyen reagálnak a csökkent oxigén ellátásra, és fiziológiailag fontos gének proteinek, enzimek expressziójával válaszolnak. A hemoxigenáz (HO) jelentőségét az iszkémiás

miokardium károsodásai elleni védőmechanizmusokban már több kutató felvetette. Az enzim működés alkalmával oxigén és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfiringyűrűjének α -metin hídját, amely így nyíltláncú biliverdinné alakul, s eközben felszabadul a vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid (CO) keletkezik. Egyre több bizonyíték van arra is, hogy a folyamat terméke a CO fiziológiai jelátvivő molekulaként funkcionálhat illetve, hogy képes a guanil-cikláz aktiválására, ezáltal a celluláris cGMP szint szabályozására. Az I-es és II-es típusú diabetes pathomechanizmusa egyaránt szoros kapcsolatban van a kardiovaszkuláris komplikációk kialakulásával, mint pl. koronária artéria szűkület létrejöttével valamint a diabetikus cardiomiopátia kifejlődésével. A posztmiokardiális infarktus prognózisa szintén rosszabb diabéteszes betegekben, akiknél magasabb az előfordulása a szívelégtelenségnek és a hirtelen szívhalálnak. A diabéteszes miokardiumban, molekuláris szinten, a sarcolemmális ion transzport különböző rendellenességei figyelhetők meg, 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 károsodottnak 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 arrhythmogenesiseben, a szívfunkciók zavarában az iszkémiás/reperfundált szövetben. Közismert tény az, hogy az arrhythmia kialakulásáért többek között az ionháztartás felborulása, a rendellenes ionmozgások a felelősek.

Anyagok és módszerek IV.

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

A dolgozó egér és patkány szívpreparátum leírása megegyezik ez előző fejezetben leírtakkal.

Diabétesz kiváltása:

A diabéteszt streptozotocin (55 mg/kg) intravénás injekciójával indukáltuk. A nem diabéteszes azonos korú kontrol állatok azonos térfogatú vivőanyagot kaptak.

Teljes RNS izolálás és Northern-blot analízis:

A totál RNS izolációját patkány szív szövetből (100 mg) 1 ml TRIzol reagensben (Gibco BRL, Germany) történő homogenizációval, guanidium thiocianat módszerrel végeztük. Az

RNS pelletet oldottuk 100 µl dietil-pirokarbonát vizes oldatában, s a koncentrációkat a 260 nm-en ultraibolya spektroszkópiával mértük. A Northern blot hibridizációt és az RNS izolálását Chomczynski és Sacchi módszere szerint végeztük. A bal kamrából 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). Vákuumban 2 órán át 80 °C-ra történő melegítés után hibridizációt hajtottunk végre ³²P-vel jelölve. Az autoradiográfia és az automata radiometriás vizsgálat után kontrollként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz ismételt hibridizációt hajtottunk végre.

Western-blot analízis:

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

HO-1 lokalizációjának meghatározása immunhisztokémiai módszerrel:

A vad típusú, heterozigóta valamint homozigóta HO-1 mutáns egerek szíveit formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyazást követően a bal kamrai szövetből 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Ezt követően két órán keresztül inkubáltuk a mintákat tisztított, patkánymájából izolált HO-1-gyel és nyúlban termeltetett, poliklonális anti-HO-1 antitesttel.

RT-PCR:

Ötven ng total RNS-t vagy pedig 20 ng mRNS-t tartalmazó mintát „amplification grade” DNáz I-el (Gibco-BRL) inkubáltuk, majd random egyszálú cDNS szintézisnek vetettük alá, 0,1 µg random 9-mer primerek (Stratagene) alkalmazásával. A mintákat, specifikus primerekkel, 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 µCi [³²P] dCTP-el reakciónként megjelöltük. A be nem épült nukleotidokat 3 %-os agaróz gélen elválasztottuk, a felerősített fargmensek radioaktivitását pedig folyadék szcintillációs detektorral detektáltuk.

DNS szekvenálás és a gének azonosítása:

A szekvenáláshoz Sanger és mtsai által leírt dideoxi-mediálta lánchosszabbító/lánclezáró módszert alkalmaztuk. Az M13/pUC „univerzális és a T7/T3α szekvenáláshoz használatos primereket és a Sequenase 2.0 kitet használtuk a ^{35}S -el jelölt reakciókban. A sávokat 47 cm-es 6 % poliakrilamid/urea géleken elválasztottuk. A GenBank és az EMBL adatbázisokban a DNS szekvenciák közötti hasonlóság keresésében Pearson-Lipman algoritmust használtunk.

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

A szíveket gyorsan, ionmentes, 100 mM/L trishidroximetil-amino-metánt és 200 mM/L szaharózt tartalmazó jéghideg pufferbe merítve 0-5 °C-ra lehűtöttük, hogy kimossuk az ionokat 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.

EREDMÉNYEK IV.**Az azonosított gének mRNS expressziója:**

A COXBIII upregulációját tapasztaltuk már 30 perccel az iszkémia indukcióját és 120 perc reperfüziót követően nem diabéteszes, nem fibrilláló szívekben). A COXBIII mRNS expresszió jelentős mértékű csökkenését tapasztaltuk reperfüzió során mind az irreverzibilis fibrilláló mind pedig a reverzibilis fibrilláló nem diabéteszes szívizomban. Az ATP6 upregulációját szintén megfigyeltük, azonban eltérően a COXBIII-tól ez nem volt statisztikailag szignifikáns. A reperfüzió során irreverzibilis, illetve reverzibilis fibrilláción átesett szívek esetén az ATP6 expresszió jelentős mértékű downregulációját tapasztaltuk.

Szívfunkciók, szérumban glükóz tartalom:

A szívfunkciók közül az AF, valamint a LVDP, illetve a szérumban glükóz koncentrációja csökkent a diabéteszes patkány szívizomban összehasonlítva az azonos korú nem diabéteszes csoporttal. A reperfüzió viszonylag csökkent szívfunkciókat eredményezett a nem diabéteszes nem fibrilláló szívizomban.

HO-1 jelenlétének igazolása aerob perfundált egér szívizomban:

Húsz perc aerob perfúzió után átesett szívekből nyert mintákban homogén citoplazmatikus festődést tapasztaltunk a vad típusú, valamint a heterozigóta miokardiumok esetén. Ugyanez volt megfigyelhető a Northern blot technikával kapott eredményekben, vagyis a HO-1 mRNS 1,5 kb sávját detektáltuk, mind $+/+$, mind pedig a $+/-$ egyedek esetén, míg a KO szívekből kapott mintákban nem volt detektálható a 1,5 kb sáv.

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

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.

Endogén CO tartalom meghatározása:

Az endogén CO mennyisége jelentős mértékben nőtt az aerob kontroll értékekhez viszonyítva heterozigóta és vad típusú egerek szívében.

Szívfunkciók, infarktusos terület és miokardiális Na^+ , K^+ , és Ca^{2+} tartalom:

Az iszkémia előtti szívfunkció értékei a HO KO csoportnak rosszabbak voltak a vad típusú és a heterozigóta csoportéhoz viszonyítva.

DISZKUSSZIÓ

I. A HFE és a vas közötti korreláció jelentősége

A HFE mutációból adódó vas depozíció, az általa indukált sejtkárosító folyamatok szoros korrelációt alkotnak a szabadgyökök indukálta folyamatokkal, amelyek a nem megfelelően megválasztott kezelés következtében súlyos szervi károsodásokat idézhetnek elő. Fontos a kórfolyamatok mechanizmusának megismerése, amelyek segíthetnek olyan terápiás intervenciók megtervezésében, amely hatásosak lehetnek. A vasterápia következtében kialakuló dózis-hatás jellegű eredményeket alátámasztja diéta vastartalmától függően a csökkent posztiszkémiás funkciók, emelkedett apoptotikus kardiomyocita szám, megnövekedett infarktusos terület egyaránt a vad és a HFE KO egerekben. Az oxidatív stressz előidézte lipid-peroxidáció, melyet az MDA tartalom HPLC meghatározásával detektáltunk, szoros összefüggést mutatott az állati takarmányok vastartalmával (nagyobb Fe^{2+} adag-

nagyobb oxidatív károsodás). Tehát a diéta vastartalma és az HFE polimorfizmus szoros összefüggést mutatott az oxidatív károsodásokkal szembeni fogékonyságra. A nem heme-hez kötött vas depozíciója igen súlyos toxicitást eredményez, amely a szív esetén vezetési zavarokat, és arrhythmia kialakulását eredményezi, mely hosszú távon kardiomyopáthiát okoz. A koronária betegségekben is kimutatták, hogy a ROS fontos szereppel bírnak, melyek érintkezve targetjeikkel protein degradációt, DNS-törést, valamint lipid peroxidációt okoznak. Ezért a szabadgyök fogók alkalmazása lehet olyan terápiás beavatkozási lehetőség, amely sikerrel kecsegtet az oxidatív stresszel szemben. Az HFE mutáció igen széles körben terjedt el bizonyos etnikai populációkban, és ott a heterozygóták (10%-os gyakoriság) elfordulása mutat összefüggést a magas vastartalomból eredő Fe^{2+} depozícióval. Mind a kísérleti és az epidemiológiai adatok azt mutatják, hogy alacsonyabb Fe^{2+} tartalom alacsonyabb kockázatot hordoz magával a koronária betegségek kialakulásában.

II. Trx szerepe oxidatív károsodásokban

A Trx a redox rendszer fontos alkotója, mely thiol-csoportjai révén részt vesz több molekula redox állapotának meghatározásában befolyásolva indirekt módon a sejt szintű molekuláris folyamatokat. A kísérlet eredményeit a Trx-re vonatkozólag az alábbiakban foglaljuk össze:

1. A Trx génje az iszkémia/reperfúzió során downregulálódik, míg iszkémiás prekonfúzió során a gén aktivációja figyelhető meg.
2. A Trx indukálta védő hatások a CDDP-vel történő előkezeléssel blokkolhatóak voltak, melyet a posztiszkémiás funkciók romlása valamint az apoptotikus sejtek számának emelkedése, és infarktusos terület nagyságának növekedése kísért.
3. A Trx blokkolása prekonfúziált szívekben is növeli az oxidatív stressz iránti hajlamot.
4. Azok az egérszívek melyekben a Trx gén több másolat formájában van jelen, nagyobb védelmet mutattak az oxidatív stressz indukálta miokardiális károsodásokkal szemben.

Kísérleteinkben bizonyítottuk a Trx redox-regulációs szerepét a szív iszkémia/reperfúziós folyamatában. A miokardiális iszkémia/reperfúzió jelensége együtt asszociálódik ROS képződéssel, amelynek negatív hatásait az PK-val ki lehet védeni. Az eredményeinkkel megerősíthetjük azon teóriát, amely szerint iszkémia/„reflow” indukálta kardiomyocita apoptózis kivédhető az PK-val. Ezen jelenségben fontos szereppel bír a Trx mint fontos redox-szignál komponens, amely csökkent mértékű expressziója növeli a miokardiális szövet

érzékenységet az oxidatív stresszel szemben ami apoptózis növekedésének formájában érvényesül. A CDDP alkalmazásával a Trx hatásai reverzibilis módon gátolhatóak voltak mind transzkripciós és transzlációs szinten. Az 1 mM-os CDDP-vel történő 15 perces előkezelés a Trx hatásait szinte teljes mértékben blokkolta, viszont kisebb koncentrációban a CDDP csak részben volt hatékony. Egy másik készítmény a bis-(glutathionato)-platinum (GS-Pt) is hasonló hatásokkal rendelkezik mind a Trx illetve a glutathion rendszerre. Számos transzkripciós faktor (NF- κ B, AP-1) működése szigorúan szabályzott redox-állapotuk által a Trx mechanizmus útján. A Trx mint celluláris antioxidáns védelmet biztosít az oxidatív stressz előidézte szabadgyök képződéssel szemben. Eredményeink is mutatják azt, hogy az „overexpresszáldott” humán Trx hatásos eszközként működik, melyet kísérleteink során csökkent MDA produkció és posztisztkémias „felépülés” jellemez. Az eredményeink mutatják azt, hogy a Trx-nak fontos szerepe van az iszkémiás miokardium szignáltranszdukciós folyamataiban. Összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy a Trx olyan tulajdonságokkal rendelkezik, melyek előnyösek és szerepet játszanak az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardiális károsodás mérséklésében.

III. STAT5A és a STAT6 szignál transzdukció szerepe prekondícióban

Eredményeink bizonyíthatják, hogy a STAT5A és nem a STAT6 szignál transzdukciós protein fontos szerepet játszik az iszkémiás prekondícióban. A STAT5A prekondíciós aktivitása kétféle módon történhet: src illetve a Jak2 kináz segítségével megvalósuló szignáltranszdukcióval, de az előbbinek tulajdonítanak nagyobb szerepet. Az src mediálta mechanizmus valójában szorosan kapcsolódik PI-3 kiváltotta Akt-regulálta ún. túlélést biztosító molekuláris folyamatokhoz, amelyek a kardiomyocytákban csökkentik az apoptózis indukálta sejthalál mértékét. A vizsgált változások igen kifejezetten jelentkeztek a STAT5A KO egerekben, és ez teljesen gátolható volt Jak illetve Src valamint PI-3 kináz inhibitorok adásával a vad típusú állatokban. A Jak2 inhibitor tyrphostin és Src inhibitor PPI alkalmazása a STAT5A szignáltranszdukciós aktivitásának illetve a prekondíció hatásának nagymértékű csökkenését eredményezte, amit az apoptotikus sejtek számának, és az infarktusos terület nagyságának növekedése és a funkcionális paraméterek romlása kísért. A proteinek legfontosabb sajátossága az, hogy rendelkeznek SH2 doménnal, mely kapcsolatba lép a tyrozin foszforilációs hellyel, elősegítve a STAT proteinek rendeződését receptoraikhoz. Az SH2 domain-nek közötti dimerizáció legfontosabb kulcslépése a karboxi-terminálisan elhelyezkedő foszfotyrozin-on keresztül megvalósuló tyrozin foszforiláció. Sikerült

bizonyítanunk, hogy a STAT5A aktiváció nem csupán Jak2 révén, hanem Src segítségével is végbemegy. Több bizonyíték is amellet szól, hogy az Src kináz aktív részese a prekondíció szignáltranszdukciós folyamatainak. Korábban leírták, hogy a Src aktivációja megfigyelhető az iszkémia mediálta folyamatokban, ugyanakkor képes triggerelni a prekondíció előidézte előnyös hatásokat is. Feltehetően protein kináz C- ϵ megvalósuló folyamatról van szó, de ennek direkt bizonyítékeként igen kevés információ szolgál. A jelen munkánkban bizonyítottuk, hogy az Src valamint Jak2 kináz azonos módon játszik szerepet az iszkémiás prekondícióban. Az Src kináz-STAT5A indukálta Akt-IP3-mediálta szignáltranszdukciós mechanizmusoknak igen fontos szerepet tulajdonítanak az iszkémiával szemben nyújtott protekciónak. PI-3 kináz inhibitor LY-294002 alkalmazásával indirekt módon sikerült bizonyítani azt, hogy Akt mint végrehajtó protein vesz részt a „túlélési” folyamat során elsősorban az apoptózist indukáló bax protein foszforilációjában, eliminálva a prekondíció nyújtotta védő hatását.

Kísérleteink eredményei azt bizonyítják, hogy STAT5A szignálmolekula részt vesz az iszkémiás prekondíció mechanizmusában, melynek aktivációja Jak2 illetve Src kinázok révén valósul meg. Az Src úton történő transzdukció során az IP-3 indukálta Akt protein is részt vesz, eredményezve a prekondíció kedvező hatását az iszkémiás miokardium funkcióinak felépülésére.

IV. Gének szerepe az arrhythmogenesisben

A miokardium iszkémiája eltérő változásokat eredményezhet bizonyos gének expressziójában és a szívfunkciókban egyaránt. Az arrhythmia, többek között a kamrafibrilláció kialakulásának mechanizmusa jól ismertek és definiáltak, azonban a VF kialakulásának genetikai okairól jelenleg kevés információ áll rendelkezésre. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a mitokondriális mRNS expresszió, milyen kapcsolatban lehet a reperfüzió előidézte 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/reperfüciónak ki nem tett, elektromos úton fibrillált szívizomban. Kísérleteinkben a reperfüzió 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.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a vizsgált gének mRNS és protein expressziójának farmakológiai stimulálásával a reperfüzió indukálta VF kialakulása megelőzhető.

Munkánk második részében arra törekedtünk, hogy direkt összefüggést találjunk a HO-1 által termelt endogén CO jelentőségéről, a reperfüzió indukálta kamrafibrillációk kialakulásának megelőzésében. 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/reperfüzió indukálta funkcionális károsodásoktól melyek magukba foglalják a reperfüzió indukálta VF-t is.

ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertáció négy fő részben foglalkozik a szabadgyök indukálta kardiális károsodások jelenségével. Az első részben a HFE génmutáció és a vasterápia közötti összefüggés fontosságát vizsgáltuk, különös tekintettel a szabadgyök képződés folyamatára. Megállapítottuk, hogy a diéta vastartalma szoros korrelációt mutat az iszkémia/reperfüzió indukálta kardiális károsodások mértékével, amit az infarktusos terület nagysága és az apoptotikus sejtek számának emelkedése és a kontraktilis funkciók gyengülése kísér. Az antioxidáns enzimstátusz vizsgálata rámutatott arra, hogy ezek aktivitása lecsökken a HFE KO egerek szívében a vasterápia következtében. Vizsgálva a nem heme-hez kötött Fe^{2+} depozícióját igen magasnak találtuk az HFE KO egerek szívszövetében, alátámasztva a fent említett hipotézist. A második fejezet a Trx redox protein protektív hatásával foglalkozik. Transzgenikus egerek felhasználásával bizonyítottuk, hogy a Trx hatékony volt az iszkémia/reperfüzió indukálta celluláris károsodás kivédésében, melyet a csökkent nagyságú infarktusos terület, mérséklődött apoptotikus sejtelhalás, javult posztiszkémiás funkciók egyértelműen bizonyítanak. A Trx expressziója CDDP-vel történő előkezeléssel gátolható, amely az általa okozott előnyös hatásokat megszüntette patkányszíven végzett kísérletekben. A dolgozat harmadik része a STAT5A és STAT6 szignáltranszdukciós proteinek prekondícióban betöltött szerepét tanulmányozta. Eredményeink azt mutatják, hogy a STAT5A rendelkezik meghatározó szereppel az iszkémiás prekondícióban, amely valójában Src tirozin és Jak2 kináz révén valósul meg. Foszforiláz inhibitorok alkalmazása bebizonyította, hogy mind az Src illetve Jak2 indukálta STAT5A aktiváció gátolható, melyet a prekondíciós védőhatásának elmaradása kísér. STAT5A KO egerek megnövekedett infarktusos területet, és emelkedett apoptotikus sejtszámot mutattak. STAT6 KO egerekkel történő kísérletekben a STAT6 protein prekondícióban foszforilálódott, azonban ennek háttére

ismeretlen volt. A dolgozat negyedik része hemoxigenáz enzim, valamint mitokondriális citokróom oxidáz és ATPáz ventrikuláris fibrilláció elleni hatékonyságát igyekezett feltárni. Az iszkémia/reperfúzió útján történő kísérleteink során a HO-I KO. szívek érzékenyebben reagáltak az iszkémia/reperfúzióra, amit posztiszkémiás szívfunkciók rosszabbodása jellemzett, valamint reperfúzió során, minden esetben fibrilláltak. Ezek az eredmények bizonyíthatják azokat a teóriákat, hogy a hemoxigenáz-1-nek fontos szerepe van a miokardium fiziológiájának megtartásában, vagy helyreállításában az által, hogy megvédi a szívmot az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásoktól.

A mitokondriális enzimek (COXBIII, ATPáz 6) protektív sajátosságainak vizsgálata azokat a tényeket erősítheti meg, hogy az oxidatív foszforilációs kaszkád számos tagja anti-arrhythmogén tulajdonsággal rendelkezik, mely farmakológiai befolyásolása előnyös lehet a diabetogén szívekben gyakran előforduló kamrai fibrillációkkal szemben.

Eredményeink azt mutatják, hogy bizonyos géneknek fontos szerepet töltenek be az iszkémia/reperfúzió indukálta celluláris károsodások elhárításában, illetve a prekondícióban mint egy védekezési mechanizmus létrejöttében. A gének gyakorlati felhasználását és génterápiás alkalmazását azonban jelen tudományos ismereteink még nem teszik lehetővé.

A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE

Közlemények:

1. 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. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J.* 2003 Nov; 17 (14): 2133-5. **Impact Factor: 7,252**
2. Szendrei L, **Turoczi T**, Kovacs P, Vecsernyes M, Das DK, Tosaki A. Mitochondrial gene expression and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused nondiabetic and diabetic myocardium. *Biochem Pharmacol.* 2002 Feb 1; 63 (3): 543-52. **Impact Factor: 3,542**
3. **Turoczi T**, Chang VW, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK. Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Jun; 35 (6): 695-704. **Impact Factor: 4,091**
4. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *Circ Res.* 2003 Jun 13; 92 (11): 1240-6. **Impact Factor: 9.694**
5. Yamaura G, **Turoczi T**, Yamamoto F, Siddiqui MA, Maulik N, Das DK. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285 (2): H476-82. **Impact Factor: 3,369**

Citálható folyóiratokban megjelenő absztraktok:

1. Cordis G, **Turoczi T**, Jun L, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. Detection of Oxidative Stress in Mouse Heart affected by HFE Mutation and Dietary Iron Content by estimating the Dinitrophenylhydrazine Derivative of Malonaldehyde. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003 Jun, **35** (6):A46 **IF: 4,091**
2. Cordis G, **Turoczi T**, Jun L, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. Detection of Oxidative Stress in Mouse Heart affected by HFE Mutation and Dietary Iron Content by estimating the Dinitrophenylhydrazine Derivative of Malonaldehyde. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003 Jun, **35** (6):A46 **IF: 4,091**
3. Szendrei L, **Turoczi T**, Das DK, Tosaki A. The role of the mitochondrial gene expression in ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001, **33**: (6) p.A117, **IF: 4,091**
4. Szendrei L, **Turóczi T**, Das DK, Tosaki A. Reperfusion-induced ventricular fibrillation and mitochondrial gene expression in ischemic/reperfused hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002, **34** (6): A61, **IF: 4,091**
5. Szendrei L, Bak I, Juhasz B, **Turoczi T**, Das DK, Tosaki A. The role of heme-oxygenase-1 and carbon monoxide in reperfusion-induced ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003 Jun, **35** (6): A45, **IF: 4,091**

6. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 2003 Jun, **35** (6): A39, **IF: 4,091**
7. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *FASEB J.*, 2003 May, **17** (5): A18 **IF: 7,252**
8. **Turoczi T**, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE Mutation and Dietary Iron Content Interact to Increase Ischemia/Reperfusion Injury of the Heart in Mice. *Circ.* 2003 Jun 13; **92** (11): 1240-6. **IF: 11.164**

TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK MELYEK ÖSSZEFÜGGENEK A TÉZISEKKEL

1. Bak I, Papp G, **Turoczi T**, Varga E, Szendrei L, Vecsernyes M, Joo F, Tosaki A The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *A. Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 1; **33** (5): 639-48. **Impact Factor: 5,533**
2. Juhasz B, Der P, **Turoczi T**, Bacskey I, Varga E, Tosaki A. Preconditioning in intact and previously diseased myocardium: laboratory or clinical dilemma? *Antioxid Redox Signal.* 2004 6 (2): 325-33. **Impact Factor: 3,027**