

**AZ UROCORTIN SEJTPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A  
SZÍVIZOMZAT ENDOGÉN ADAPTÁCIÓS MECHANIZMUSAIBAN**

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés**

**Dr. Cserepes Barbara**

**Klinikai doktori iskola vezető: Prof. Dr. Nagy Judit**

**Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet**

**Témavezetők: Prof. Dr. Róth Erzsébet, Dr. Jancsó Gábor**

**Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Sebészeti Oktató és Kutató intézet**

**Pécs  
2007**

## BEVEZETÉS

Az emberi szervezet a külvilághoz való folyamatos alkalmazkodása során a túlélést biztosító adaptációs mechanizmusokat fejlesztett ki, létrehozva egy nagyon érzékeny endogén védekező rendszert. Az adaptációnak a szervezet, a szövetek, szervek illetve a sejt szintjén megnyilvánuló különböző mechanizmusait ismerjük. A **prekondicionálás (PC)** a szervezet egyik leghatékonyabb endogén adaptációs mechanizmusai közé tartozik, melyben rövid ideig tartó különféle stressz-ingerek (mint pl. a hipoxia, különböző fizikai és farmakológiai inzultusok) ellenállóvá teszik a szervezetet hosszan tartó, letális inzultussal szemben. 1986-ban Murry és mtsai írták le első ízben, hogy rövid ideig tartó iszkémiás stimulusokkal csökkenthető a koszorúér elzáródását követő szívizom infarktus kiterjedése. A jelenséget iszkémiás PC-nak nevezték el, mely hatékony védelmet nyújt az iszkémiás-reperfüziós (I/R) károsodásokkal szemben, azonban a klinikai gyakorlatban való alkalmazását korlátozta, hogy csak tervezett beavatkozások esetén valósulhatott meg. Ennek következtében számos olyan vizsgálatot végeztek, melynek során új endogén védő fehérjék indukálását kívánták elérni.

2003-ban Vinten-Johansen és munkatársai arra lettek figyelmesek, hogy tartósan fennálló iszkémiát követően a reperfüziós periódus kezdetén alkalmazva a rövid intermittáló hipoxiás stimulusokat, ugyancsak megfelelő védelemi reakció indul el a szívizomszövetben. A jelenséget a prekondicionálás mintájára ahhoz hasonlóan, **posztkondicionálásnak (PS)** nevezték el. Brar szerint a mechanizmus létrejöttében a következő elméletek játszanak szerepet: a *mechanikai elmélet* szerint PS során csökken az intravazális nyomás és a mikrovaskuláris károsodás, ill. csökken a folyadék érpályából történő kiáramlása. A *celluláris elmélet* alapján az intracelluláris oxidánsok és Ca<sup>2+</sup>-szint csökken, ill. a mitokondriális permeability transition pore (mPTP) nyitása gátlódik, ezek által csökken az apoptózis és nekrozis kialakulása. A *molekuláris magyarázat* szerint a PI3 kináz, p-Akt, ERK 1/2-túlélést segítő (survival) jelátviteli utak aktiválása; antiapoptotikus enzimek termelődése vezet az iszkémiás károsodás kivédéséhez.

1995-ben Vaughan és mtsainak patkány közepagyból sikerült egy 40 aminosavból álló fehérjét izolálni, mely 45%-ban azonos szekvenciájú a corticotrophin releasing faktorról (CRF), és szerkezetében hasonlít a halakban termelődő urotensin hormonhoz. Ez a magyarázata, hogy a CRF faktor család legújabb tagjaként, **urocortinnak (UCN)** nevezték el. A CRF család polypeptidjei a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengelyen keresztül szerepet játszanak a szervezet viselkedési formáinak kialakításában, illetve a különböző stresszingerre adott válaszreakciókban

Felefedezése óta az UCN-t az emberi központi idegrendszeren kívül kimutatták a placentában, mellékvesében, gastrointestinális traktusban, a petefészekben, tüdőben, lymphocytákban, és nem utolsósorban a szív és érrendszerben is. Szövettani vizsgálatok szerint szívelégtelenségben szenvedő betegek miokardiumából kivett mintákon az UCN intenzívebben expresszálódik, mint egészséges szívizomszöveten.

A CRF család fehérjei a sejtfelszínen elhelyezkedő CRF receptorokhoz-CRF-R1 és CRF-R2 (R2a és R2b variánsok)-kapcsolódnak, és G proteineken keresztül az adenilát-cikláz enzimet aktiválják. Az UCN és CRF egyenlő mértékben kötődik a CRF-R1-hez, melyet elsősorban az agyban és a hypophysisben mutattak ki; ezzel szemben a 2-es receptorhoz az UCN 40-szer erősebb affinitással képes kapcsolódni, mint a CRF.

Szívizom-sejttenyészeteken végzett kutatások szerint UCN-nal kezelve a sejteket az iszkémiát megelőzően, illetve a reoxigenizáció kezdetén, hatásos sejtvédelmi reakcióutak aktiválódnak a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli kaskádrendszeren keresztül. A p42/p44 MAPK foszforilációjának gátlásával megszűnik az UCN infarktus terület csökkentő hatása Langendorff-modellen végzett vizsgálatok alapján. További vizsgálatok igazolták, hogy az

UCN indukálva a protein kináz C (PKC)-t és ATP- szenzitív  $K^+(K^+_{ATP})$  csatornát, az iszkémiás PC-hoz hasonló kardioprotekciót vált ki.

Az iszkémiás PC jelátviteli folyamatainak kutatása során számos triggert, másodlagos hírvivőt és transzkripciós faktort azonosítottak. A szignálkaskádót beindító –ún. trigger – mediátorok közül a klinikumban kiemelkedő szerepe van az adenozinak, mely az A1 receptoron keresztül ugyancsak a PKC és  $K^+_{ATP}$  csatornán keresztül védi meg a miokardiumot az I/R károsodásokkal szemben.

Izolált szívizomsejteken végzett kísérletek szerint különböző stresszhatásokat követően 12-18 óra múlva szignifikánsan nő az endogén UCN mRNS képződése. Exogén UCN kezelés az iszkémia ideje alatt, illetve a reperfüzió kezdetén is protektív hatásúnak bizonyult in vivo és in vitro modellekben, azonban még nem tisztázott hipoxiás stresszhatást követő endogén termelődésének időbeli dinamikája.

## AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

Kísérleteink célja egyrészt egy optimális prekondicionálási protokoll felállítása volt újszülött patkányokból izolált szívizomsejteken. Másrészt arra kerestük a választ, hogy az urocortin rövid iszkémiás inzultust követően mikor jelenik meg a szívizomsejtek citoplazmájában. Továbbá megvizsgáltuk, hogy az UCN milyen mértékben nyújt hatásos védelmet iszkémiás-reperfüziós károsodásokkal szemben összehasonlítva az iszkémiás, illetve az adozin által generált prekondicionálással, illetve az iszkémiás posztkondicionálással.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Szívizomsejtek izolálása.*

Újszülött Wistar patkányokból (2-4 napos) kinyert szívek kamrai területét egy korábban leírt módszer alapján [21] előkészítettük, majd az így nyert sejtszuspenziót 2-es típusú kollagenáz emésztésnek tettük ki. Miután a sejtek teljesen szétválasztódtak, oldatukat 100  $\mu$ m nylon hálón szűrtük át, miközben a sejtek a következő médiumba kerültek: DMEM/F-12, 100 IU/ml penicillin, 0,1 mg/ml streptomycin, 1,28% 200mM L-Glut, 10 % fetal bovine serum. A filtrált sejtoldatot centrifugáltuk, majd a sejteket DMEM/F-12 10%FBS tartalmú médiumban 100 mm átmérőjű műanyag Petri-csészében 45 percen keresztül inkubátorba helyeztük (5%  $CO_2$ , 37 °C), hogy a gyorsan letapadó sejteket elkülönítsük a szívizomsejtektől.

Ezt követően a sejtoldatot poly D-lizinnel fedett tárgylemezre, illetve 12-lyukú tenyésztőedénybe vittük át, ügyelve a sejtek egyenletes eloszlására. 24 óra elteltével a sejteken lévő médiumot komplett szérum mentes médiumra (CSFM) (DMEM/F-12, 2.5 mg/ml BSA, 1 $\mu$ M insulin, 5.64  $\mu$ g/ml transferrin, 32nM szelenium, 2.8 mM Na-piruvát, 0.1-1 nM  $T_3$ , 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin) cseréltük, hogy meggátoljuk a többi sejttípus proliferációját. 2 nap elteltével egysejtrétegű spontán dobogó szívizom-sejttenyészet jött létre.

Újszülött patkány szívizomzatából izolált sejteken a hipoxiás stressz ingert egy korábban leírt iszkémiás pufferben történő inkubálással valósítottuk meg. Iszkémiás pufferben tartva a sejteket, az alacsony pH érték és a jelen lévő glükóz-antimetabolit hatására lejátszódó reakciók megfelelnek az oxigénhiányos állapotokra adott válaszreakcióknak. Az iszkémiás puffer összetevői a következők: 137 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.88 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.51 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5.55 mM D-glucose, 4 HEPES, 2%FCS, 10 mM 2-deoxy-D-glükóz and 20 mM DL-laktát ( pH 6.5).

### *Prekondicionálás különböző idejű iszkémiás inzultusokkal.*

A szívizomsejteket különböző időre a fent említett iszkémiás pufferben tartottuk, melyet rövid, 10 perces reperfüziós periódus követett, azáltal, hogy a sejtek tápoldatát ismét normál

sejtoldatra cseréltük. Ezt követően hosszan tartó 3 órás iszkémiás inger (teszt iszkémia) és az azt követő 2 órás reperfúzió után vizsgáltuk meg a kialakult védelem nagyságát laktát dehidrogenáz (LDH) enzim mérésével illetve a sejtek életképességének vizsgálatával.

#### ***Urocortin immunhisztokémiai jelölése.***

Az izolált szívizomsejteket poly D-lizinnel fedett tárgylemezen inkubáltuk normál sejtmediumban. Az izolált miokardiális sejttenyészetet rövid ideig tartó iszkémiás stresszhatásnak tettük ki, majd a reperfúzió különböző időpontjaiban kíméletes öblítést követően 4 %-os paraformaldehid oldatban fixáltuk a szívizomsejteket 1 órán keresztül 37 °C-on. PBS-sel történő mosást követően Triton X-100 0,1%-os oldatában (TBS)/Triton (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.4) inkubáltuk a miokardiális sejteket, hogy a sejtmembrán átjárhatóvá váljon az elsődleges antitest (rabbit anti-urocortin, Sigma) számára. A nem specifikus antitest-helyeket másodlagos antitest szérumát tartalmazó PBS oldatban kötöttük le. Éjszakán át tartó elsődleges antitest jelölést követően másodlagos antitestként Alexa Fluor goat anti-rabbit IgG-t használtunk, majd fluoreszcens-mikroszkópban vizsgáltuk az urocortin specifikus festődést a szívizomsejtek citoplazmájában.

#### ***Prekondicionálás iszkémiás stimulussal, adenozinnal és urocortinnal.***

A prekondicionálást egyetlen 10 perces inzultussal hoztuk létre: iszkémiás pufferben tartottuk a tenyészetet, illetve adenozinnal vagy UCN-nal egészítettük ki a sejtmediumot. A stimulust követően hosszan tartó iszkémiának és reperfúzióknak tettük ki a miokardiális sejteket, hogy megvizsgáljuk a prekondicionáló stimulus által kifejtett sejtvédő hatást.

Amíg a vizsgált sejtek „szimulált” hipoxiás környezetben az iszkémiás pufferben inkubálódtak, a kontroll sejteket CSFM mediumban tartottuk.

#### ***Poszkondicionálás iszkémiás stimulussal és urocortinnal.***

Hosszan tartó iszkémiát követően (iszkémiás puffer) 10 perc reperfúzió után a szívizomsejteket 10 percre iszkémiás pufferben illetve UCN-nal kiegészített sejtoldatban inkubáltuk, melyet 2 óráig tartó reperfúzió követett normál, a sejtek számára optimális tápoldatban.

#### ***Laktát dehidrogenáz (LDH) enzim mérések.***

A kísérlet végén a szívizom-sejttenyészetéről származó sejtmediumot folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd spektrofotometriás módszerrel a 340 nm-es tartományban határoztuk meg a sejtek által médiumba bocsátott nekrozis enzim szintjét.

#### ***Sejtek életképességének vizsgálata.***

A médium eltávolítását követően a miokardiális sejteket 0.25%-os tripszin és 0.2 %-os EDTA keverékében 37 °C-on feloldottuk a tenyésztőedény aljáról, majd centrifugálást követően PBS-sel mostuk át a sejtszuszpenziót.

A sejtoldat 45 µl-hez 5 µl tripán kék festéket adva az élő és a tripán kék pozitív halott sejteket a Bürker-kamra 1 mm<sup>2</sup>-es területén számoltuk meg, és a sejthalál mértékét a tripán kék pozitív sejtek százalékos arányában adtuk meg.

#### ***Nekrozis és apoptózis vizsgálatok.***

Az Annexin V-FITC festési eljárással meghatározható azon sejtek mennyiségi aránya, melyek az apoptózis folyamatán mennek keresztül. A Propidium-jodid (PI) festék a már nem élő, membránkárosodott sejteket képes megjelölni. A megfestett szívizomsejteket flow cytometriával (FACS Calibur flow cytometer; BD, USA) detektáltuk, és számszerűen fejeztük ki az apoptotizált, ill. nekrotizált sejtek számát. Minden sejttenyészet-mintából 5000 sejt került megszámlálásra, majd a festett sejtek számát az összes leszámolt sejtek számához viszonyítva adtuk meg a sejtkárosodás mértékét.

## ***Kísérleti csoportok***

*Különböző idejű iszkémiás prekondicionálás izolált szívizomsejt-tenyészetben:*

A kontroll csoportban (1. csoport) 3 órán keresztül iszkémiás oldatban, majd 2 óráig normál tápoldatban tartottuk a szívizomsejteket. A 2. csoportban 5 perces; a 3. csoportban 10 perces; a 4. csoportban 20 perces iszkémiás inzultust 10 perces reperfúzió előzte meg a 3 órás iszkémiás inzultust, melyet szintén 2 óra reperfúzió követett.

*Urocortin expresszióra vizsgált csoportok:*

A nem kezelt tenyészetet (1. csoport) normál médiumban tartottuk a fixálást megelőzően. A többi csoportban 10 perces iszkémiás inzultust követően normál, CSFM médiumban tartva a sejteket a "reperfúzió" 30 percében, az 1., 2., 18. és 24. órájában (2., 3., 4., 5., 6. csoport) fixáltuk a szívizomsejteket az immunhisztokémiai jelöléshez.

*Prekondicionált csoportok:*

Az nem kezelt csoportban (1. csoport) a szívizomsejteket normál, teljes szérum mentes tápoldatban inkubáltuk. Az iszkémiás csoportban (2. csoport) a miokardiális sejteket 3 órán át tartottuk az iszkémiás médiumban, majd azt követően 2 órán keresztül normál (CSFM) médiumban inkubáltunk. A 3. csoportban a szívizomsejteket iszkémiás pufferrel, a 4. csoportban adenzinnal (10 $\mu$ M), az 5. csoportban urocortinnal (0,1 $\mu$ M, Sigma) kiegészített médiummal kezeltük 10 percig, majd a prekondicionáló inzultust követően a sejteket 10 percre CSFM-ben „reperfundáltuk”. Annak vizsgálatára, hogy a prekondicionáló stimulusok valóban megfelelő védelmet jelentenek a szívizomsejtek számára, a tenyészeteket 3 órán keresztül iszkémiás pufferben (teszt iszkémia), majd 2 óráig CSFM médiumban (reperfúzió) tartottuk.

*Posztkondicionált csoportok:*

*A protokoll*

Az A/1.csoportban a sejteket normál, CSFM médiumban tartottuk. Az A/2. csoportban 30 percig iszkémiás pufferben inubáltuk a miokardiális sejteket, ezt 2 óras reperfúzió követte normál sejtoldatban. Az A/3. csoportban a 30 perces iszkémiás stresszingert 10 perces reperfúzió követett, mely után 10 perces iszkémiás pufferben tartottuk a sejteket- ezáltal biztosítva a posztkondicionáló stimulust-, majd újra normál tápoldatra cseréltük a sejtmediumot 2 óráig. Az A/4. csoportban a 30 perces iszkémia és a 10 perces reperfúzió után 10 percig UCN-nal kiegészített sejtmediumban inkubáltuk a sejteket, melyet 2 óras reperfúzió követett.

*B protokoll*

A B/1.csoportban a sejteket normál sejtmediumban tartottuk. Az B/2. csoportban 60 perces iszkémiát 2 óras reperfúzió követte normál sejtoldatban. Az B/3. csoportban a 60 perces iszkémiás stresszingert 10 perces reperfúzió követte, mely után 10 perces iszkémiás pufferben tartottuk a sejteket- ezáltal biztosítva a posztkondicionáló stimulust-, majd újra normál tápoldatban inkubáltuk a sejteket 2 órán keresztül. Az B/4. csoportban a 60 perces iszkémia és a 10 perces reperfúzió után 10 percig UCN-nal kiegészített sejtmediumban inkubáltuk a sejteket, melyet 2 óras reperfúzió követett.

## EREDMÉNYEK

### *Különböző idejű iszkémiás prekondicionálás izolált szívizomsejt-tenyészetén:*

A kontroll csoportban (1. csoport), melyben a miokardiális sejteket 3 órán keresztül iszkémiás pufferben, majd 2 óráig normál sejtoldatban inkubáltuk, ill. reperfundáltuk, a sejtek felülúszójából vett mintában az LDH enzim szintje  $137\pm 7,3$  IU/l volt. Az 5 perces PC-t követően (2. csoport) az LDH  $119\pm 3,2$  IU/l-re; a 20 perces PC-t követően (4. csop.)  $103\pm 7,5$  IU/l-re csökkent. A 10 perces PC után (3. csop.) az LDH szintje szignifikáns mértékű csökkenést mutatott ( $95\pm 3,2$  IU/l).

A tripán kék festést követően a szívizomsejtek életképessége (élő sejtek aránya összehasonlítva a teljes sejtlétszámmal %-ban kifejezve) az 1. csoportban  $0,119\pm 0,097$  %; a 2. csoportban  $0,65\pm 0,189$  %; a 3. csoportban  $4,615\pm 0,176$  %; a 4. csoportban  $1,86\pm 0,54$  % volt.

### *Urocortin immunoreaktivitás szívizom-sejttenyészetén*

Az 1. csoportban a stressz ingerrel nem kezelt, intakt szívizomsejteken is megjelenik az urocortinra specifikus festődés, azonban az iszkémiás stresszingert követően a reperfúzió 2. órájában (4. csoport) a sejtek citoplazmájában kifejezett UCN jelölődés mutatható ki.

A reperfúzió 30 percében (2. csoport), 1., (3. csoport), 18. (5. csoport) és 24. (6. csoport) órájában történt jelölést követően az UCN expresszió mértéke az intakt szívizomsejtekéhez hasonló mértékű.

### *Prekondicionált csoportok*

A sejtmediumba bocsátott **LDH szintje** a 2. csoportban  $27,71\pm 3,15$  IU/l volt. A prekondicionált csoportokban az LDH szintje szignifikánsan csökkent: az iszkémiával prekondicionált csoportban (3. csop.)  $6,28\pm 0,64$  IU/l; az adenzinnal prekondicionált csoportban (4. csop.)  $7,85\pm 0,508$  IU/l; az urocortinnal kezelt csoportban (5. csop.)  $8,71\pm 0,6$  IU/l értékeket kaptunk.

A **tripán késsel festődött sejtek száma** jelentős csökkenést mutatott prekondicionálást követően: a 3. csoportban  $47,02\pm 0,12$ %; 4. csoportban  $44,69\pm 0,105$ %; és az 5. csoportban  $45,69\pm 0,87$  % volt a halott sejtek aránya, míg a csak iszkémiának kitett csoportban (2. csop.) szignifikánsabban magasabb volt sejthalalozás:  $57,057\pm 1,209$  %.

Az **Annexin V-FITC-vel jelölődött sejtek aránya**-mely az apoptózis mértékét mutatja- a 2. csoportban  $84,43\pm 1,98$  %-os értéket mutatott. A különböző módszerekkel végzett prekondicionálásokat követően az apoptózis mértéke szignifikánsan csökkent: az iszkémiával PC-t csoportban (3. csop.)  $38,9\pm 1,68$  %-ra; az adenzinnal kezelt csoportban (4. csop.)  $40,81\pm 0,99$  %-ra; és az UCN-nel kezelt csoportban (5. csop.)  $46,54\pm 1,11$  %-ra.

A **Propidium-joddal megjelölt szívizomsejtek százalékos aránya** –mely a nekrosis mértékét mutatja- szintén jelentős csökkenést mutatott a 3. csoportban ( $24,5\pm 3,33$  %); 4. csoportban ( $23,34\pm 1,99$  %); ill. az 5. ( $24,14\pm 1,57$  %) csoportban az iszkémiás (2. csop.) csoporthoz képest ( $40,27\pm 1,86$  %).

### *Posztkondicionált csoportok:*

A sejtmediumba bocsátott **LDH szintje** az A/2. csoportban  $10,14\pm 0,73$  IU/l volt. Az iszkémiával posztkondicionált csoportban (A/3.csop.) az LDH szintje szignifikánsan csökkent  $3,57\pm 0,64$  IU/l-re. Az UCN-nal posztkondicionált csoportban (A/4. csop.) az enzim szintje szintén csökkenést mutatott ( $8,28\pm 1,47$  IU/l), mely csökkenés azonban nem érte el a szignifikancia szintjét. A normál tápoldatban tartott szívizomsejtek médiumából mért LDH szintje (A/1. csoport)  $3,42\pm 0,36$  IU/l volt.

Az LDH enzim értékei szignifikánsan csökkentek iszkémiás poszt kondicionálás (B/3. csop.: $6\pm 0,75$  IU/l.) és UCN-nal történt PS után is (B/4. csop.: $3,42\pm 0,61$  IU/l.), a csupán 60 perc iszkémiának kitett B/2. csoporthoz képest ( $11,71\pm 0,68$  IU/l.). A B/1. csoportban  $3,42\pm 0,36$  IU/l LDH szintet mértünk.

**A tripán késsel festődött sejtek száma** A/1. csoportban  $36,16\pm 2,78$  %, az A/2. csoportban  $55,42\pm 1,89$  %-os volt. Az A/3. csoportban  $39,21\pm 0,76$  % és A/4. csoportban  $41,33\pm 2,39$  %-os értékeket mértünk, melyek jelentős csökkenést jelentenek a halott sejtek arányának tekintetében a poszt kondicionálás nélküli csoportoz (A/2.) képest. A B protokoll szerint kezelt csoportokban a tripán kékre pozitívan festődött sejtek aránya a következők szerint alakultak: B/1. csoportban  $36,16\pm 2,78$  %, a B/2. csoportban  $53,24\pm 1,57$  %, a B/3. csoportban  $42,7\pm 1,93$  %, a B/4. csoportban  $36,02\pm 1,99$  %.

**Az Annexin V-FITC-vel jelölődött sejtek aránya**-mely az apoptózis mértékét mutatja- az A/1. csoportban  $22,67\pm 1,3$  %-os értéket mutatott. Az A/2. csoportban az apoptotizált sejtek aránya  $66,97\pm 0,78$  %-os volt. A különböző módszerekkel végzett poszt kondicionálásokat követően az apoptózis mértéke szignifikánsan csökkent: az iszkémiával poszt kondicionált csoportban (A/3. csop.)  $36,91\pm 0,69$  %-ra, az UCN-nal kondicionált csoportban  $45,64\pm 1,01$  %-ra. A B protokoll szerinti B/1. csoportban az Annexin V-tel festődött sejtek aránya  $22,67\pm 1,3$  %-ot mutatott. A 60 perces iszkémia és 2 órás reperfüziót követően a B/2. csoportban az apoptózis mértéke  $83,19\pm 0,93$  %-os volt. Az iszkémiás PS-t követően a B/3. csoportban az apoptózis mértéke szignifikánsan csökkent  $40,29\pm 0,68$  %-ra, mely tendencia ugyancsak megfigyelhető volt az UCN-nal poszt kondicionált csoportban is (B/4.) :  $34,87\pm 0,76$  %.

**A Propidium-jodiddal megjelölt szívizomsejtek százalékos aránya** –mely a nekrosis mértékét mutatja- szintén csökkenést mutatott a poszt kondicionált csoportokban az iszkémiás (A/2. csop.) csoporthoz képest ( $11,44\pm 0,54$  %): az A/3. csoportban  $8,75\pm 0,61$  %-os, az A/4. csoportban  $9,66\pm 1,49$  %-os volt a PI pozitív sejtek aránya. A nem kezelt A/1. csoportban a nekrosis mértéke  $5,17\pm 0,54$  %-os volt.

A 60 perces iszkémiának kitett szívizomsejtekben mért nekrosis kiterjedése  $14,44\pm 0,6$  %-os értéket mutatott. Az iszkémia ill. UCN indukálta PS-nak köszönhetően a B/3. és B/4. csoportokban a PI-dal festődött sejtek aránya szignifikáns csökkenést mutatott: a B/3. csoportban  $8,52\pm 0,73$  %, a B/4 csoportban  $6,29\pm 0,53$  % volt a PI-dal pozitívan jelölt szívizomsejtek aránya.

## MEGBESZÉLÉS

Az urocortin felfedezését követően a kutatások -CRF-ral való hasonlóságának köszönhetően- a szervezetet ért stressz-hatásokkal szembeni védelemben betöltött szerepére irányultak. A szívizomzatot érő stresszhatások közül elsősorban az iszkémiás stressz szerepét vizsgálták. Miokardiális sejteket ért hosszan tartó (4órás) hipoxiát követően 18 óra elteltével már kimutatható az UCN fehérjének transzkripciója, majd az újonnan képződött fehérje endokrin/parakrin módon kapcsolódva a szívizomsejtek és endotheliális sejtek CRF R1-es és CRF R2-es sejtfelszíni receptoraihoz, kifejti kardioprotektív hatását. Immunhisztokémiai eredményeink alapján feltételezhető, hogy az UCN preszintetizált formában jelen van a miokardiális sejtekben, mert az iszkémiás inger követően a reperfüzió 2. órájában a sejtek citoplazmája kifejezetten festődött az UCN specifikus jelöléssel. Az új fehérje képződés a stressz-inzultust követően 18 óra elteltével kezdődik meg, míg sejtenyészeteinken 24 óra reperfüziót követően sem volt nyomon követhető az esetleg újonnan képződött UCN molekula. Immunfestési vizsgálatunk korrelál az idegrendszeri kísérletekben talált eredményekkel, melyek szerint különböző stresszhatásokkal ingerelve patkányokat az Edinger-Westphal agyidegmagban szintén 2 óra elteltével aktiválódnak az UCN pozitív idegsejtek.

*Az urocortin hasonlóan hatékony védelmet nyújt az iszkémia-reperfúziós károsodás ellen miokardiális sejtenyészeten, mint az iszkémiás, és. adenozinál végzett prekondicionálás, illetve az iszkémiás poszt-kondicionálás.*

Újszülött patkányból nyert szívizom-sejtenyészeten első ízben vizsgáltuk a stressz-szabályozásban jelentős szerepet játszó urocortin sejtvédő szerepét összehasonlítva az adenozinál indukált és iszkémiás PC-sal.

A miokardium iszkémiás kondicionálásával –legyen az a pre-, vagy a poszt-kondicionálás-rendkívül hatékony adaptációs mechanizmusok indukálódnak, mellyel jelentősen fokozható a szívizom stressztoleranciája. A prekondicionáló inger követően a szívizom jelentősen ellenállóbb egy súlyosabb iszkémiás inzultussal szemben: csökkenti az életveszélyes kamrai aritmiák előfordulását, kisebb a kialakuló infarktusz nagysága, rövidebb ideig tart és enyhébb fokú az ún. kábult (stunned) miokardium jelensége. Amióta ismert, hogy ez az adaptációs válasz nemcsak iszkémiás-reperfúziós ciklusokkal, hanem az I/R hatására keletkező mediátorok (adenzin, bradikinin, opioidok, prosztaglandinok, nitrogén monoxid, reaktív oxigén intermedierok) exogén adásával is kiváltható, a jelenség kilépett a kísérletes kardiológia kizárólagos hatóköréből, és fontos helyet kapott a szívgyógyászati gyakorlatban.

Ugyancsak elsőként mutattuk ki szívizom-sejtenyészeten, hogy a stressz-szabályozásban jelentős szerepet játszó urocortin hatásos védelmet nyújt hosszan tartó (60 perces) iszkémiát követően az I/R okozta károsodásokkal szemben, mely protektív hatás összehasonlítható az irodalomban iszkémiás poszt-kondicionálásnak leírt protektív mechanizmussal.

Kísérleteinkben az 1995-ben felfedezett, majd UCN I-nek jelölt fehérje kardioprotektív hatását kutattuk a korai PC folyamatában. Az UCN felfedezése óta a CRF családnak két újabb tagját is kimutatták: az UCN II-t (stresscopin related peptide) és UCN III- at (stresscopin), melyek a legújabb eredmények szerint szívizomsejteken hatékonyabb antiapoptotikus és antinekrotikus védelmi reakciót indítanak el I/R károsodás esetén-főként a CRF 2-es típusú receptoron keresztül-, azonban értágító hatásuk kevésbé jelentős, mint az UCN-é.

Vizsgálatainkban szívizomból nyert sejtkultúrákon a nem letális, reverzibilis iszkémiás károsodást egy puffer segítségével idéztük elő, amely hasonlóan az in vivo hipoxiához, metabolikusan gátló milliót jelentett a sejtek számára. A szívizomból nyert sejtenyészeteinket 10 percre UCN-nal kiegészített médiummal kezeltük, majd a prekondicionáló inger követően 3 órás teszt iszkémiával és az azt követő 2 órás reperfúzióval vizsgáltuk a kezelés eredményét. Eredményeink alapján elmondható, hogy az UCN mint farmakológiai prekondicionáló és poszt-kondicionáló ágens, valóban megnövelte a sejtek ellenállását és túlélését hosszan tartó iszkémiás stresszel szemben.

Humán vizsgálatokban rövid iszkémiás stimulus illetve adenzin exogén adásával csökkenthetők a perkután koronária intervenció (PTI) során fellépő hipoxia által okozott mechanikai és metabolikus károsodások. Mindezek alapján megfontolás tárgyát képezi az UCN terápiás felhasználása tervezett szívsebészeti beavatkozások esetén, mint pl. a koronária bypass-műtét, szívtranszplantáció, vagy PTCA-s koronária sztentelés.

Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy az urocortinnal végzett prekondicionálás és poszt-kondicionálás jelentősen csökkenti a sejtkárosodás mértékét tenyésztett szívizomsejteken iszkémiás-reperfúziós inzultus során. A miokardiális sejteket ért iszkémiás stressz hatására a fehérje órákon belül megjelenik, és kardioprotektív hatását endokrin és parakrin módon fejti ki. Az UCN-nak eddig ismert szív- és érrendszeren kifejtett klinikai hatásai -értágító; pozitív inotróp; agyi és pitvari nátriuretikus fehérjetermelés fokozó; koronária vérátáramlás növelő-tekintetében és eredményeink alapján megfontolás tárgyát képezi az UCN használata iszkémiás szívbetegségben szenvedő betegek kezelésében.